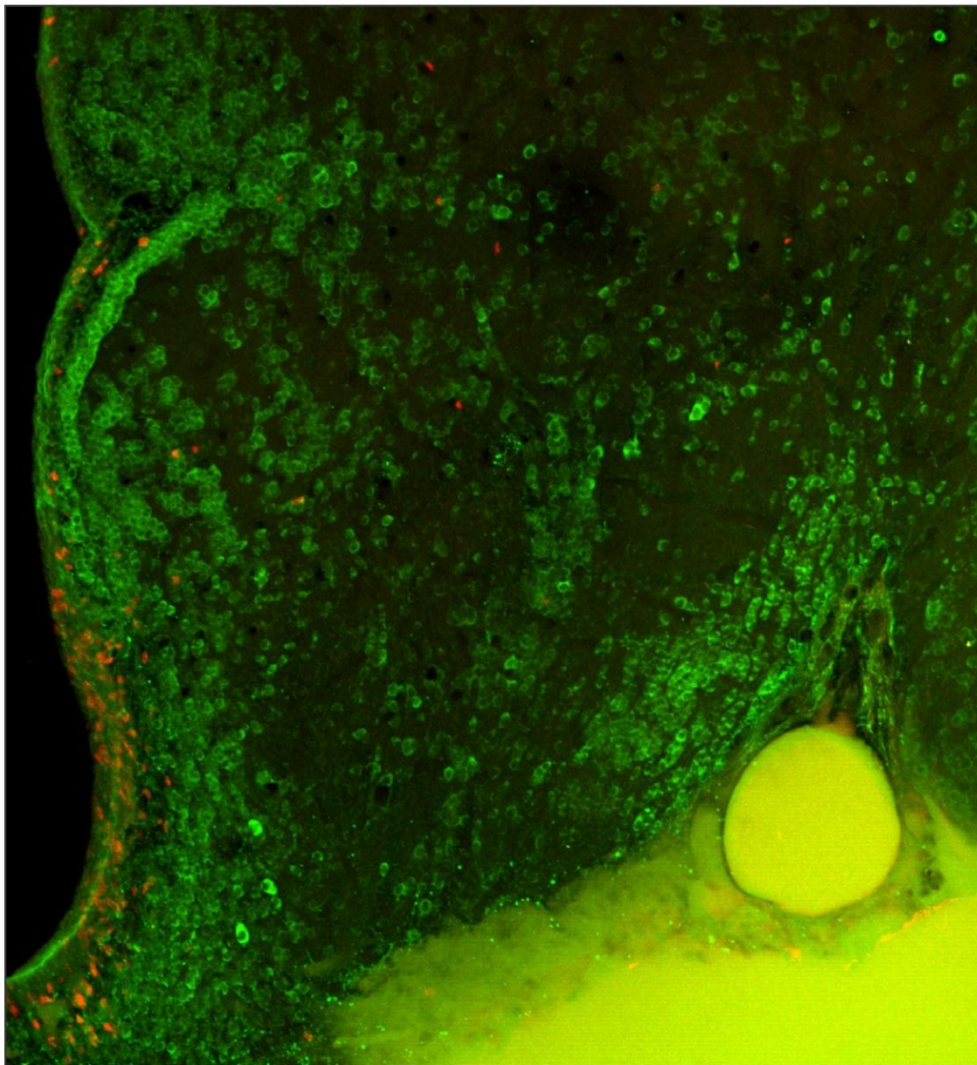


Evaluación de la capacidad neurogénica adulta en el telencéfalo de *Gymnotus omarorum*

Bach. Moira Lasserre



Orientadora: Dra. María E. Castelló

Tribunal: Dr. Angel Caputi, Dra. Anabel Fernández, Dra. Milka Radmilovich.
Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales, IIBCE.

AGRADECIMIENTOS

A Ángel, Anabel y Milka, por haber dedicado parte de su tiempo en leer y revisar esta tesina. Al laboratorio de Neuroquímica del IIBCE por facilitarnos un anticuerpo contra TH de ThermoScientific. A la ANII, por el incentivo económico que me fue brindado para la realización de este trabajo mediante la beca de iniciación otorgada y por el Fondo Clemente Estable, FCE_2009_1_2246 y FCE_3_2011_1_6168 que, junto con PEDECIBA Biología, permitieron financiar parcialmente los materiales necesarios en esta ocasión.

A mi familia y amigos. Como debe ser, los fundamentos de mi persona. Signe, Vale Majo y Lu, el pequeño círculo inicial con el que atravesamos segundo año, el mejor de todos. Lu, Guio, Mile, Naty, Naty, Naty, Pau, Danilo, Maxi, Pablito... En fin. Todo el mundo con el que interactué en lo más mínimo. Cada persona se define como la sumatoria de las interacciones que tiene con los demás. Sean buenas o malas, de todas se aprende algo. Soy consciente de la importancia de las experiencias que me brindaron aquéllas personas con las que me encontré estos años. Valen, gracias por hacer mi estadía en el lab algo sumamente divertido!

A mi madre, que siempre estuvo atrás mío en todas mis decisiones ¡Al fin terminé! Gracias por tu paciencia y todo lo que me diste en mi corta vida.

A Marita, por ayudarme y guiarme en el proceso de finalización de esta etapa. Mucho más allá de los conocimientos teóricos y prácticos que me brindaste, te agradezco enormemente la forma en que me animaste a enfrentar y desenvolverme entre el mar de dudas existenciales que me aparecieron en el camino.

"No man is an island entire of itself; every man
is a piece of the continent, a part of the main;
if a clod be washed away by the sea, Europe
is the less, as well as if a promontory were, as
well as any manner of thy friends or of thine
own were; any man's death diminishes me,
because I am involved in mankind.
And therefore never send to know for whom
the bell tolls; it tolls for thee."

-- John Donne.

ÍNDICE.-

ABREVIACIONES	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Nichos neurogénicos	9
El telencéfalo en teleósteos y tetrápodos	10
El bulbo olfatorio y la corriente rostral migratoria	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
METODOLOGÍA	15
Colecta de especímenes	15
Diseño experimental	15
Inmunohistoquímica	16
Observación de preparados y obtención de imágenes	18
Procesamiento y análisis de imágenes	18
RESULTADOS	20
Organización histológica del bulbo olfatorio y subpallium rostral en <i>G. omarorum</i>	20
Desarrollo de la distribución de células proliferantes en telencéfalo	23
Caracterización del destino neuronal de las células marcadas	30
DISCUSIÓN	38
Consideraciones sobre la citoarquitectura del bulbo olfatorio	38
Distribución espacial de células proliferantes en el bulbo olfatorio	40
Dinámica de la migración de células en el telencéfalo rostral	40
Diferenciación neuronal de las células generadas a partir del nicho proliferativo del subpallium rostral	41
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	43
REFERENCIAS	44

ABREVIACIONES*.-

DC - División central del telencéfalo dorsal

DL - División lateral del telencéfalo dorsal

DM - División medial del telencéfalo dorsal

ECL - Capa de células externa

Ep - Epitelio ventricular

Er - Núcleo entopeduncular rostral

FB - Haz del cerebro anterior

GL - Capa glomerular

ICL - Capa de células interna

MOTF - Campo terminal medial de fibras olfatorias

OB - Bulbo olfatorio

POFL - Capa de fibras olfatorias primarias

V - Ventrículo

Vc - Telencéfalo ventral, subdivisión central

Vd - Telencéfalo ventral, subdivisión dorsal

VI - Telencéfalo ventral, subdivisión lateral

Vv - Telencéfalo ventral, subdivisión ventral

* Las abreviaciones corresponden al nombre en inglés de las estructuras, según la nomenclatura utilizada por Maler et al. (1991), Kress y Wullimann (2012) y Kermen et al., (2013).

RESUMEN.-

La neurogénesis postnatal es una característica ancestral conservada que presenta similitudes estructurales y funcionales entre los nichos neurogénicos de los vertebrados estudiados, si bien hay una progresiva reducción de su distribución en la línea evolutiva. En mamíferos, los nichos neurogénicos *in vivo* quedan prácticamente restringidos a dos regiones telencefálicas: la zona subventricular del ventrículo lateral (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Contrariamente, en teleósteos, se ha evidenciado neurogénesis en todas las divisiones del cerebro y en la médula espinal. Se han mostrado similitudes en la generación posnatal de neuronas en el bulbo olfatorio (OB) del teleósteo *Danio rerio* y mamíferos. En ambos casos, células madre telencefálicas dan origen a neuroblastos que migran de forma tangencial a lo largo de una corriente rostral migratoria (RMS) hacia el OB, donde migran de forma radial, dispersándose y completando su diferenciación neuronal. Esta similitud podría sugerir un patrón básico filogenéticamente conservado para la neurogénesis.

En este trabajo se pone a prueba la generalidad de este fenómeno en teleósteos, mediante el análisis de la distribución espacio-temporal de células proliferantes en el OB y región rostral del subpallium del pez eléctrico *Gymnotus omarorum*, así como la diferenciación neuronal de células derivadas de las mismas. Para ello se administró por vía sistémica la 5-cloro-deoxiuridina (CldU) que permitió marcar las células que se encontraban en fase S del ciclo celular en torno al momento de inyección. Se analizaron tres regiones del telencéfalo rostral a cinco tiempos de sobrevida entre 1 y 180 días post-CldU. Las secciones cerebrales se procesaron por doble IHQ para evidenciar núcleos marcados con CldU y la expresión de los marcadores neuronales doblecortina, HuC/HuD, β III tubulina y tirosina hidroxilasa. La obtención de reconstrucciones 3D de los cortes permitió cuantificar y localizar los núcleos CldU+. A un día de sobrevida post-inyección, las células CldU+ a nivel del OB rostral fueron escasas, restringiéndose a la superficie del mismo. Allí no se observó un nicho proliferativo típico, lo cual sí fue evidente en la zona subventricular del subpallium rostral y el OB caudal en su unión con el telencéfalo. El número de células CldU+ en el OB aumentó en función del tiempo de sobrevida, observándose dos fenómenos. Primero, una acumulación de células ciclantes en la superficie dorso-medial del OB caudal, próximo a su unión con el pallium rostral. Luego, las mismas alcanzaron la capa celular interna del OB. Estos resultados sugieren un proceso de migración tangencial de nuevas neuronas desde los nichos proliferativos mencionados hacia el OB, donde se produciría además un proceso de migración radial.

Finalmente, la demostración de colocalización de marcadores de diferenciación neuronal temprana y de neuronas maduras catecolaminérgicas en células CldU+ constituye el primer aporte al conocimiento de la neurogénesis postnatal de posibles interneuronas dopaminérgicas en el OB en *G. omarorum*. Esto reafirma la existencia de una RMS en los teleósteos y sustenta que esta constituiría un carácter filogenéticamente conservado. Por eso además propone a *G. omarorum* como un modelo apropiado para el estudio comparativo de la RMS y de los mecanismos que modulan la neurogénesis posnatal en vertebrados.

INTRODUCCIÓN.-

La neurogénesis, ya sea durante el desarrollo como en la vida postnatal, puede definirse como un proceso que involucra la proliferación celular, salida del ciclo celular, elección entre sobrevivida y muerte, migración, la elección del destino celular hacia la estirpe neuronal y diferenciación (Nowakowski y Hayes, 2008). Estos procesos ocurren mayormente en zonas específicas del tejido nervioso, nichos proliferativos con capacidad neurogénica, que brindan un microambiente que regula la autorrenovación y diferenciación de las células madre del sistema nervioso (Doetsch, 2003a; Taupin, 2006; Hermann et al., 2009).

La neurogénesis adulta, en particular, es una característica ancestral conservada, común a los vertebrados e invertebrados, presentando una similitud estructural y funcional notable entre los nichos neurogénicos de los diferentes taxones estudiados (Cayre et al., 2002; Lindsey y Tropepe, 2006; Sullivan et al., 2007; Kaslin et al., 2008). Los nichos neurogénicos de distintas especies animales comparten algunas características como la presencia de células gliales (células precursoras que a la vez dan soporte y regulación a la neurogénesis y ofician de guía a las nuevas células generadas en los nichos), una lámina basal especializada y una asociación próxima a los vasos sanguíneos (Lim et al., 2000; Sullivan, 2007; Ma et al., 2008).

La distribución de los nichos neurogénicos varía notablemente a lo largo de la ontogenia y la filogenia del sistema nervioso central (SNC). Es bien sabido que la distribución de estos nichos presenta, onto y filogenéticamente, una progresiva reducción de su extensión. En mamíferos, esto conduce a que en adultos queden prácticamente restringidos a dos nichos proliferativos con capacidad neurogénica *in vivo*: la zona subventricular del ventrículo lateral (SVZ), desde donde las neuronas inmaduras migran hacia el bulbo olfatorio (OB) y se diferencian, y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Altman y Das, 1965; Taupin, 2006; Ma et al., 2008; Altman, 2011). Por el contrario, en anamniotas hay una menor restricción en la extensión y cantidad de nichos proliferativos durante la ontogenia. En teleósteos, muchos de ellos persisten en la vida postnatal, inclusive en la adulta, en diferentes zonas del telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Zupanc y Horschke, 1995; Zupanc, 1996, 2001; Maeyama y Nakayasu, 2000; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2008, 2009; Fernández et al., 2011; Isoe et al., 2012; Teles et al., 2012; Tozzini et al., 2012) y presentan una tasa de proliferación celular de al menos un orden de magnitud mayor a la encontrada en mamíferos (Zupanc, 2008). Varios de los nichos proliferativos del SNC de teleósteos se han demostrado neurogénicos en la vida adulta (*Austrolebias*: Fernández et al., 2011; *Apteronotus leptorhynchus*: Zupanc et al., 1996; *Carassius auratus*: Delgado y Schmachtenberg, 2011; *Danio rerio*: Adolf et al., 2006; Chapouton et al., 2006; Grandel et al., 2006; Hinsch y Zupanc 2007; Zupanc

et al., 2005; *Nothobranchius furzeri*: Tozzini et al., 2012; *Oreochromis mossambicus*: Teles et al., 2012).

El telencéfalo de los peces teleósteos resulta de alto interés desde el punto de vista comparativo con vertebrados superiores, ya que se cree que presenta zonas homólogas a las antes mencionadas del telencéfalo de mamíferos con capacidad neurogénica *in vivo* (Zupanc, 2008). Al igual que en mamíferos, se ha evidenciado que el telencéfalo dorsal o pallium de los peces teleósteos está vinculado a procesos de aprendizaje y memoria; particularmente de señales electrosensoriales en peces eléctricos de descarga débil (*A. leptorhynchus*: Harvey-Girard et al., 2010; *Gymnotus sp.*: Jun et al., 2012). El telencéfalo del pez eléctrico *Gymnotus omarorum* presenta varios nichos proliferativos que persisten en la vida postnatal, incluso en el adulto (Castelló y Caputi, 2008; Castelló e Iribarne, 2010; Olivera et al., 2012a-c), aunque aún no se ha demostrado su capacidad neurogénica ni el destino de las nuevas neuronas.

Nichos neurogénicos.-

Los nichos proliferativos neurogénicos de mamíferos adultos están conformados por al menos tres tipos celulares principales (células madre, células amplificadoras transitorias, y neuroblastos) estrechamente vinculados a células endoteliales y endoteliales (Alvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch, 2003b; Tavazoie et al., 2008; Llorens-Martín y Trejo, 2011). Las células madre presentan ciclos celulares de larga duración, son autorregenerantes y multipotentes. Las células amplificadoras transitorias son más abundantes, con ciclos celulares de corta duración y una mayor limitación de su potencialidad de diferenciación. La progenie de las células progenitoras salen del ciclo celular, migran y se diferencian hacia la estirpe neuronal, localizándose a distintas distancias entre los nichos proliferativos y sus destinos finales, adquiriendo progresivamente su fenotipo estructural morfológico-bioquímico y funcional (Riquelme et al., 2008). Finalmente, las nuevas neuronas se incorporan a circuitos neuronales ya existentes, contribuyendo a la plasticidad del sistema nervioso adulto (Abrous y Wojtowicz, 2008; Lledo, 2008).

Como ya fue señalado, el SNC de los peces teleósteos, al igual que otros anamniotas e invertebrados y a diferencia de lo que ocurre en vertebrados superiores, presenta en la vida adulta una amplia distribución de nichos proliferativos, mostrando notorias similitudes entre especies filogenéticamente distantes (Teles et al., 2012). Aun así, existen también diferencias específicas en la distribución de los nichos proliferativos, que se atribuyen a las correspondientes especializaciones funcionales, como se ha propuesto para el pez eléctrico de descarga débil *A. leptorhynchus* (Grandel et al., 2006), uno de los modelos en los que la proliferación y neurogénesis postnatal están mejor caracterizados (Zupanc y Zupanc, 1992; Grandel et al., 2006;

Zupanc, 2006, 2008). Se cree que la neurogénesis adulta en teleósteos cumpliría varias funciones. Por un lado, permitiría acompasar la capacidad de procesamiento del SNC a la hiperplasia de estructuras periféricas que subyace al crecimiento continuo de los peces (*matching hypothesis*). Por otro, conferiría una capacidad regenerativa notoriamente mayor con respecto a la de vertebrados superiores. Además contribuiría a una forma plasticidad neuronal, por incorporación de nuevas neuronas a los circuitos preexistentes (*A. leptorhynchus*: Zupanc, 1999, 2001, 2006, 2008; Kaslin et al., 2008). Estudios previos en *G. omarorum* han mostrado una amplia distribución de nichos proliferativos en todas las divisiones cerebrales. Estos nichos persisten a lo largo de la vida postnatal, presentando una notoria abundancia de células proliferantes en estructuras vinculadas al procesamiento de la información electrosensorial y visual ubicadas en el telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Olivera et al., 2012a-c). En el período larvario tardío y juvenil del desarrollo, se ha observado que dichas estructuras difieren su patrón de crecimiento relativo (Castelló y Caputi, 2008). Esto sugiere diferencias en la composición, dinámica y/o capacidad neurogénica de los nichos proliferativos de las mencionadas divisiones del SNC de estos peces, como se ha evidenciado en mamíferos (Hermann et al., 2009).

El telencéfalo en teleósteos y tetrápodos.-

El telencéfalo de los vertebrados está constituido por los bulbos olfatorios (OB) y los hemisferios cerebrales (Nieuwenhuys, 2009). Los hemisferios telencefálicos se dividen en zonas dorsal (pallium) y ventral (subpallium). Durante el desarrollo embrionario en teleósteos, debido a un proceso de eversión de la vesícula

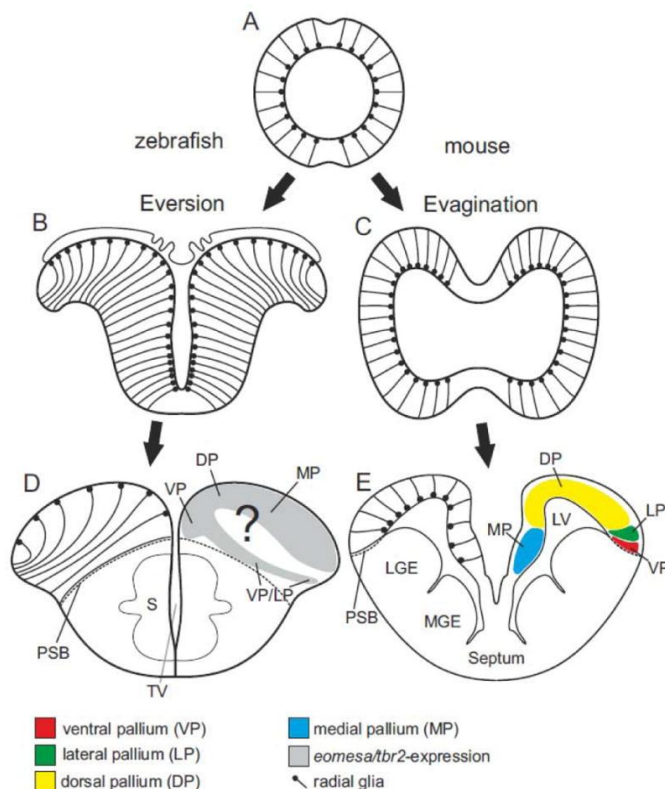


Figura 1.- Desarrollo comparativo del telencéfalo en teleósteos y mamíferos. (A) Esquema de corte frontal de porción anterior del tubo neural, del cual se origina el telencéfalo. (B y D) En los teleósteos, la eversión del telencéfalo provoca que ocupe una localización dorsal en la que las zonas proliferativas ventriculares están ubicadas en su región más dorsal (indicada por la localización y orientación de la glía radial). (C y E) El telencéfalo de los mamíferos se desarrolla por evaginación, por lo cual las zonas proliferativas presentan una localización interna. Tomado de Mueller et al. (2011).

prosencefálica, se producen dos hemisferios telencefálicos sólidos separados por un ventrículo (fig. 1). La eversión ocurre principalmente a nivel dorsal del telencéfalo y el grado de eversión varía considerablemente entre actinopterigios (Nieuwenhuys, 2009) por lo que el pallium muestra una diversidad estructural considerable. Esto contrasta con lo que sucede en vertebrados superiores, donde dos hemisferios con ventrículos internos resultan de la evaginación del prosencéfalo (Broglia et al., 2005; Northcutt, 2008). Es por esto que, aun cuando teleósteos y tetrápodos tengan un ancestro común, resulta difícil establecer el grado de homología basado solamente en la topografía de las estructuras adultas. Sin embargo, se han encontrado similitudes a nivel celular entre el pallium de teleósteos y mamíferos (Harvey-Girard, 2012) y homologías funcionales entre regiones telencefálicas de ambos grupos (Broglia et al., 2005).

En tetrápodos, el pallium a su vez se subdivide en regiones medial, dorsal, lateral y ventral. El pallium medial de los mamíferos, conocido como hipocampo, es esencial para la memoria espacial. El pallium lateral de todos los tetrápodos es una región primaria de recepción olfativa (Northcutt, 2008), mientras que el pallium ventral o porción palial de la amígdala está involucrada en el aprendizaje emocional, como el condicionamiento por miedo (Portavella et al., 2004). El pallium dorsal de mamíferos (isocorteza) está hipertrofiado y es responsable del aprendizaje asociado a procesos perceptuales, motores y cognitivos.

En cuanto a la anatomía del OB, ambos grupos exhiben también una estructura similar, aunque en teleósteos no hay un patrón de láminas concéntricas tan distinguible como el presentado en mamíferos. En teleósteos el OB presenta cuatro capas, de más superficial a más profunda: (1) la capa del nervio olfatorio, donde se distribuyen las fibras aferentes (POFL), (2) la capa glomerular, que presenta neuropilos esféricos característicos, los glomérulos olfatorios (GL), (3) la capa de células mitrales, donde se encuentran neuronas olfatorias secundarias de proyección (ECL), y (4) la capa celular interna o capa granular (ICL), que contiene células de pequeño tamaño empaquetadas de manera compacta, entre ellas interneuronas inhibitorias que se consideran el equivalente funcional de las células granulares en mamíferos (Alonso et al 1987, 1989; Sas et al., 1990; Satou, 1990; Rodríguez-Gómez et al., 2000; Fuller y Byrd, 2005; Braubach et al., 2012, 2013; Kermen et al., 2013; Kress y Wullimann, 2012).

El bulbo olfatorio y la corriente rostral migratoria.-

Los nichos neurogénicos telencefálicos *in vivo* encontrados en mamíferos adultos (SVZ y SGZ) han sido caracterizados de forma exhaustiva, permitiendo delinear un boceto básico de desarrollo neuronal para ambas zonas (Doetsch et al., 1997; Seri et

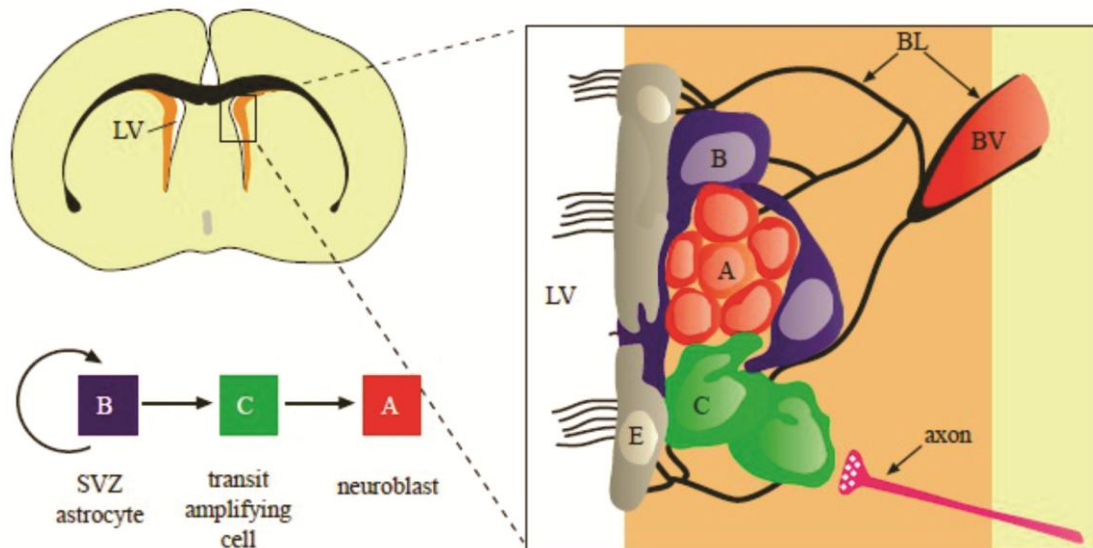


Figura 2.-Tipos celulares y organización anatómica del nicho proliferativo de la zona subventricular (SVZ). Esquema de una sección frontal del cerebro de ratón adulto en el que se indica la ubicación de la SVZ (naranja) adyacente al ventrículo lateral (LV). Los astrocitos de esta región (células B, azul) son células madre que generan células amplificadoras transitorias (células C, verde) que a su vez dan lugar a neuroblastos (células A, rojo) cuyo destino es el bulbo olfatorio. La región delimitada por el rectángulo se amplifica a la derecha para mostrar la relación de los tipos celulares mencionados entre sí y con otros elementos del nicho proliferativo: las células endodermiales multiciliadas (E, gris; que tapizan las paredes del ventrículo) las células endoteliales de los vasos sanguíneos (BV) y la lámina basal. Cadenas de neuroblastos rodeados por cúmulos de células C se desplazan a través de túneles formados por procesos de astrocitos. Tomado de Riquelme et al., 2008.

al., 2001). En ratones, se han propuesto esquemas de diferenciación similares para ambos dominios telencefálicos. En el caso de SVZ, astrocitos que actúan como células madre (células B), inmunopositivas para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), generan células progenitoras amplificadoras transitorias (células C) que expresan el factor de transcripción *Mash1*. Estas células son multipotentes y proliferan para generar neuroblastos (células A) que expresan la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neuronal (PSA-NCAM) y doblecortina (DCX) (ver fig. 2). Se ha visto que los neuroblastos migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el OB (Lim et al., 2008), donde dan origen a dos tipos de neuronas inhibitorias, las neuronas granulares y periglomerulares. Las neuronas granulares son sólo GABAérgicas, mientras que algunas neuronas periglomerulares son sólo GABAérgicas, y otras también catecolaminérgicas, como se evidencia por la coexpresión de GAD y TH (Kosaka et al., 1995). No hay evidencias de que se produzcan nuevas neuronas excitatorias glutamatérgicas (células mitrales y empenachadas) en la vida postnatal (Roybon et al., 2009).

El teleosteo *D. rerio* es un modelo ampliamente utilizado para estudio de la proliferación y neurogénesis posnatal en el SNC. En particular, en el telencéfalo de esta especie se han descrito dos nichos proliferativos ventriculares: (i) en el subpallium, adyacente a las regiones ventral y dorsal del mismo (Vv y Vd) formando una banda que alcanza el OB y se asemeja a la RMS observada en mamíferos, y (ii) en

el pallium formando el nicho proliferativo dorsolateral, territorio que se ha propuesto homólogo al hipocampo mamífero (Grandel et al., 2006; März et al., 2010).

Como se ha esbozado, el origen de nuevas neuronas del OB en *D. rerio* comparte muchas características con lo encontrado hasta la fecha en mamíferos. Estudios con análogos de la timidina como la bromodeoxiuridina (BrdU) en *D. rerio* han permitido realizar seguimientos de la actividad mitótica de las células en el cerebro, encontrándose una actividad proliferativa pronunciada a lo largo de los ventrículos (Adolf et al., 2006). Poco después de realizada la administración no se registraron células BrdU-positivas en el OB: a nivel del subpallium telencefálico se ve que el número de células marcadas va disminuyendo progresivamente a la vez que las mismas van apareciendo en el OB. A los tres días post-administración de BrdU se evidencian células post-mitóticas tempranas que expresan las proteínas HuC y HuD y corresponden a neuroblastos, cerca de la superficie subventricular y en el OB (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Se ha sugerido que el origen de nuevas interneuronas del OB, predominantemente GABAérgicas y dopaminérgicas, es la zona subventricular del subpallium, y el patrón de proliferación recordaría a la RMS de mamíferos. Además, se ha observado expresión de PSA-NCAM en una ubicación ventricular telencefálica (Grandel et al., 2006). En mamíferos, la RMS se caracteriza por la expresión de esta molécula, brindando otra prueba que reforzaría la existencia, en *D. rerio*, de una migración tangencial comparable a la encontrada en mamíferos.

En suma, el estudio comparativo de la neurogénesis postnatal entre los mamíferos y grupos evolutivamente distantes como teleósteos ha permitido encontrar nichos neurogénicos conservados, así como una variedad de otros nichos que se encuentran en teleósteos pero no presentan correspondencia en mamíferos. Los estudios realizados en *D. rerio* han abierto las puertas a la utilización de esta especie como modelo teleósteo para caracterizar la proliferación, migración y diferenciación celular postnatal en el SNC. Así, se va haciendo más tangible la obtención de un común denominador en el desarrollo posnatal del telencéfalo en especies de vertebrados filogenéticamente distantes, si bien son necesarios estudios en un mayor número de especies que permitan confirmar la generalidad de los procesos observados. La presencia de una corriente rostral migratoria como vía de acceso de nuevas neuronas hacia el OB es una característica que se ha observado ampliamente en mamíferos, pero en teleósteos sólo fue evidenciada en *D. rerio*. En este trabajo se busca aportar mayores evidencias en cuanto a la generalidad de este proceso, a través de su estudio en el gimnótido de pulso *G. omarorum*.

HIPÓTESIS.-

El telencéfalo rostral de *G. omarorum* presenta nichos proliferativos que persisten en la vida postnatal, con capacidad neurogénica.

El OB *per se* carecería de nichos proliferativos y, por ende, se podría predecir que nuevas neuronas del OB se originarían a partir de nichos proliferativos adyacentes en el extremo rostral del subpallium.

OBJETIVO GENERAL.-

Estudiar el patrón de distribución espacial y temporal de células proliferantes del OB y del subpallium adyacente al mismo, y la potencial diferenciación de células derivadas hacia la estirpe neuronal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-

- 1) Describir el patrón de distribución espacial de células proliferantes en el OB y porción rostral del subpallium para constatar la existencia de nichos proliferativos.
- 2) Analizar el desarrollo de la distribución espacial de células proliferantes generadas en los nichos proliferativos.
- 3) Estudiar la expresión de características morfológicas-bioquímicas propias de la estirpe neuronal en células derivadas de los nichos proliferativos.

METODOLOGÍA.-

Colecta de especímenes.-

La colecta de especímenes se realizó en la Laguna del Sauce (Departamento de Maldonado) utilizando un dispositivo detector/transductor de la descarga del órgano eléctrico que permite la localización de los especímenes de *G. omarorum* con mínimas alteraciones de su ambiente. Los peces fueron extraídos con la ayuda de un calderín (60 x 50 cm) y rápidamente colocados individualmente en bolsas de plástico conteniendo un tercio de agua de la laguna y dos tercios de aire, que luego se trasladaron al Bioterio de poiquiloterms del IIBCE y se colocaron en contenedores individuales. Se mantuvieron condiciones de temperatura, ciclo luz/oscuridad y conductividad similares a las que se registran en el hábitat natural. Los animales fueron alimentados con *Tubifex tubifex*.

Se utilizaron 10 machos (largo = $12,6 \pm 1,7$ cm, peso = $6,7 \pm 2,6$ g). El sexo se determinó por disección *post-mortem* para la identificación macroscópica de las gónadas.

Diseño experimental.-

Para lograr el objetivo de este proyecto se utilizaron dos protocolos de tipo marcación de nacimiento ("birth-marking", Kempermann, 2006). En el primer protocolo, se realizó una marcación de tipo pulso, mediante la administración intraperitoneal de una única dosis del análogo halogenado de la timidina, 5-Cloro 2'-deoxiuridina (CldU, Sigma) (42.5 mg/kg, 20 μ l/gr), con una sobrevida post-CldU de 24 horas (N=3), 7 días (N=2) ó 30 días (N=3). En el segundo protocolo, con tiempos de sobrevida post-CldU de 90 (N=1) y 180 días (N=1), se efectuaron cuatro inyecciones de CldU (de igual dosis) en días consecutivos¹.

Luego de los tiempos post-CldU correspondientes a cada grupo, los animales fueron fijados por perfusión transcardíaca de paraformaldehído (10% en buffer fosfato 0.1M pH 7.4), luego de lavar el lecho vascular con una solución fisiológica. Previo a la fijación los especímenes fueron expuestos a una dosis eutanásica de MS-222 (500 mg/L) por inmersión seguida de perfusión oral durante la fijación, según protocolo aprobado por CEUA.

Los cerebros fueron post-fijados durante un día por inmersión en la misma solución fijadora, disecados y seccionados en cortes transversales seriados de 60 μ m de espesor por medio de un vibrátomo (Leica, VT 1000S).

1.- En los grupos con tiempos de sobrevida más prolongados (90 y 180 días) las múltiples inyecciones de CldU en días consecutivos se realizaron a los efectos de lograr una mayor incorporación del análogo de la timidina, de forma de asegurar que perdure la marcación a pesar de su dilución por sucesivas divisiones celulares.

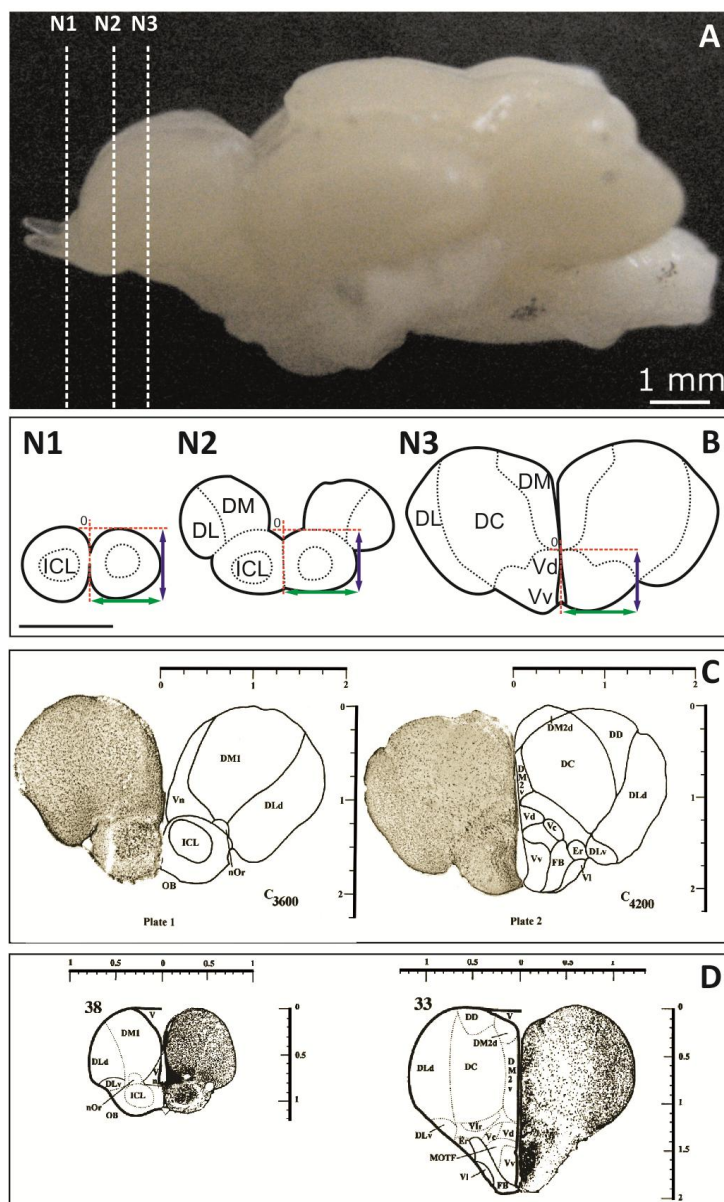


Figura 3.- Regiones estudiadas del cerebro de *G. omarorum*. (A) Vista lateral del encéfalo de *Gymnotus omarorum*. Las líneas punteadas señalan la posición aproximada rostro-caudal de los tres niveles del telencéfalo rostral estudiados: bulbo olfatorio (OB) rostral (N1), OB caudal (N2) y subpallium rostral (N3). (B) Diagramas esquemáticos de secciones frontales de los tres niveles en *G. omarorum*. Las líneas punteadas rojas indican la posición de los ejes x-y que se utilizaron como referencia para las medidas de posición de los núcleos de células proliferantes, y las doble flechas azul y verde los sitios donde se obtuvieron las longitudes máximas de la región de interés en ambas direcciones. Notar la correspondencia de los niveles 2 y 3 con las láminas de Corrêa et al., 1998 (*Gymnotus carapo*, C) y Maler et al., 1991 (*Apteronotus leptorhynchus*, D) que se utilizaron como referencia.

Se seleccionaron dos a tres cortes de tres niveles del telencéfalo rostral de los especímenes estudiados: N1, porción rostral libre del OB; N2, porción caudal del OB, correspondiente a las láminas 1 y 38 de los atlas del telencéfalo de *Gymnotus carapo* (Corrêa et al., 1998, fig. 3C izquierda) y *A. leptorhynchus* (Maler et al., 1991, fig. 3D izquierda); y N3, porción rostral del subpallium, correspondiente a la lámina 2 (Corrêa et al., 1998, fig. 3C derecha) y lámina 33 (Maler et al., 1991, fig. 3D derecha).

Inmunohistoquímica.-

Las secciones fueron procesadas por doble inmunohistoquímica para evaluar la distribución de las células proliferantes (células CldU+) del OB y subpallium rostral, y el destino y fenotipo molecular de su progenie, particularmente su diferenciación hacia la estirpe neuronal. Esto se realizó por demostración de la colocalización de

CldU con los siguientes marcadores: HuC/D, DCX, β III y TH². Los cortes fueron contrateñidos con Nissl fluorescente (NeuroTrace, Molecular Probes) o el marcador nuclear ToPro3 (Molecular Probes; Bink et al., 2001).

Para la doble inmunohistoquímica, se procedió en base al siguiente protocolo:

- 1- Lavado de las secciones en buffer fosfato de sodio, 0.1M, pH 7.4 (BF), 3 veces durante 10 minutos.
- 2- Pretratamiento para la exposición del ADN por incubación de los cortes en HCl 2N (en BF conteniendo 0.3% Tritón X-100, BFT) durante 50 minutos.
- 3- Lavado en BF, 3 veces durante 10 minutos.
- 4- Incubación durante 48 horas en anticuerpos primarios diluidos en BFT [anti-CldU producido en rata (1:500, Accurate) junto con uno de los siguientes: anti-HuC/HuD producido en ratón (1:200, Molecular Probes-Invitrogen), anti-DCX producido en conejo (1:2000, Abcam), anti- β III tubulina producido en ratón (1:40000, Sigma) ó anti-TH producido en conejo (1:800, ThermoScientific)].
- 5- Lavado en BF, 3 veces durante 10 minutos.
- 6- Incubación en anticuerpos secundarios, todos ellos diluidos en BFT:
 - A) Incubación durante 60 minutos anti-IgG de rata producido en burro biotinilado (1:500, Jackson Immuno).
 - B) Lavado en BF, 3 veces durante 10 minutos.
 - C) Incubación durante 90 minutos en una solución conteniendo estreptavidina Cy3 (1:500, Jackson Immuno) y anticuerpos secundarios ligados a Alexa 488. De acuerdo al anticuerpo primario utilizado serán: anti-IgG de ratón producido en cabra ó anti-IgG de conejo producido en cabra, (1:1000, Molecular Probes-Invitrogen).
- 7- Lavado en BF, 3 veces durante 10 minutos.
- 8- Contrateñido durante 20 minutos con NeuroTrace (1:150 en BF).
- 9- Lavado en BF conteniendo 0.1% Tritón X-100, durante 10 minutos.
- 10- Lavado en BF, 3 veces durante 5 minutos.
- 11- Montado de los cortes con un medio de montaje conteniendo alcohol de polivinilo (PVA, con propiedades endurecedoras) y 1, 4 – diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO, sustancia que disminuye el blanqueamiento de la fluorescencia).

2.- HuC y HuD son proteínas de unión a RNA que estabilizan la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo neuronal, y se utilizan como marcadores de diferenciación temprana hacia la estirpe neuronal (Marusich y Weston, 1992). Doblecortina (DCX) es una proteína asociada a microtúbulos, cuya expresión está relacionada con la neurogénesis y migración de neuroblastos (De Nevi et al., 2013). β III-tubulina es un componente del citoesqueleto neuronal, que comienza a expresarse tempranamente y persiste en neuronas maduras (Kempermann, 2006). Tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrenalina, y por ende está presente en todas las neuronas catecolaminérgicas (Gnerly et al., 2012).

En algunos de los cortes se realizó contratinción nuclear por incubación con ToPro3 (Molecular Probes-Invitrogen, 1:5000 en BF) durante 15 minutos.

En todos los casos, se realizaron controles negativos para descartar la unión inespecífica de los anticuerpos secundarios mediante omisión de la incubación con anticuerpos primarios.

Observación de preparados y obtención de imágenes.-

Los preparados fueron examinados mediante microscopía confocal de fluorescencia del IIBCE (Olympus BX61, equipado con una unidad confocal FV300 y cuatro líneas laser: 405, 488, 543 y 633). Para evaluar la distribución de células proliferantes, se obtuvieron imágenes correspondientes a 15 planos cada 2 μ m. Se utilizó un objetivo 20x A.N.:0,50, una apertura confocal igual a 2. La adquisición se controló con el software FluoView, ajustando los parámetros del fotomultiplicador de modo de explotar todo el rango dinámico de los canales. Posteriormente, se realizó una proyección intensidades máximas de todos los planos en un único plano. Para demostrar la colocalización de señales se obtuvieron apilados de barridos secuenciales de menor extensión pero mayor resolución espacial en los ejes x, y (objetivos 40x A.N.: 0,75 o 60x A.N.: 1,42) y en el eje z (distancia entre barridos: 0.5 μ m). Una vez obtenidos los apilados, se realizaron proyecciones en los ejes x-z e y-z, intersectando a nivel de la zona de interés. La colocalización también fue evidenciada por visualización independiente de cada uno de los canales de un único plano y la superposición de ambos en una única imagen.

Procesamiento y análisis de imágenes.-

A menos que se aclare, sólo se realizaron modificaciones relativamente menores del brillo, contraste e intensidad de las imágenes luego de su adquisición.

A partir de las series de imágenes confocales de cortes de los tres niveles de interés en todos los grupos experimentales, se realizaron reconstrucciones 3D mediante el software BioVis3D de forma de poder visualizar la ubicación de los núcleos CldU+ y cuantificarlos.

Para obtener cada una de las reconstrucciones 3D, se cargaron las series de imágenes correspondientes a un apilado x y z en una secuencia BioVis3D y se calibraron. Luego se trazaron de modo semiautomático los perímetros de las regiones de interés en cada uno de los cortes (como ejemplos, el perfil del OB o el límite de la ICL). El programa calcula la superficie y volumen de las regiones reconstruidas. Posteriormente, se marcó la localización de los núcleos CldU+ utilizando la herramienta "dot sets", obteniéndose finalmente una representación

transparentada de las regiones de interés en la que también se representan los núcleos marcados.

Para obtener las coordenadas de la posición de cada núcleo, se utilizó como referencia cero la línea media del cerebro, para el eje x , y el límite dorsal del OB y subpallium (líneas punteadas en la fig. 3B). Los valores así obtenidos, se normalizaron por el ancho y alto de cada región de interés, de modo de obtener así las distancias relativas para cada núcleo.

Se calcularon la media y desviación estándar del número total de núcleos marcados en los diferentes niveles y tiempos, de forma de visualizar conjuntamente la progresión espacio-temporal de los núcleos CIdU+. En el OB rostral y caudal se calculó la proporción del total de núcleos marcados que se encontraron dentro de la ICL y fuera de ella (que contiene las capas ECL, GL y POFL). En el subpallium rostral se calculó la proporción de total de núcleos marcados que se encontraron en la zona ventricular adyacente a Vv y Vd, y en el resto del subpallium.

RESULTADOS.-

ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL BULBO OLFATORIO Y SUBPALLIUM ROSTRAL EN *G. OMARORUM*.-

La tinción de Nissl permitió visualizar la organización histoarquitectural del OB y del subpallium rostral. Como se muestra en la fig. 4A/N1 y 4A/N2, el OB de *G. omarorum* está formado, al igual que el de otros teleosteos, por cuatro capas principales más o menos concéntricas, que de fuera hacia adentro son: 1) una delgada capa externa que correspondería a la capa de fibras olfatorias primarias (POFL); 2) la capa glomerular (GL) en la que se identifican regiones ovoides a circulares de muy escasa densidad de células (asteriscos en fig. 4A/N1 y 4A/N2) separadas entre sí por tabiques o septos de espesor variable (flechas en fig. 4A/N1) en los que se observan neuronas (caracterizadas por núcleos grandes, redondeados y teñidos tenuemente) y células gliales (con núcleos alargados más intensamente teñidos); 3) una capa de células externa (ECL), conteniendo una baja densidad de somas relativamente grandes (puntas de flechas en fig. 4A/N1 y A/N2) que podrían corresponder a los de las células principales, también llamadas células mitrales; y 4) capa celular interna (ICL), con una alta densidad de células pequeñas que podrían corresponder a la numerosa población de células grano (Byrd y Brunjes, 1995; Kermen et al., 2013). Tanto las células grano como las células principales parecen formar cordones en las respectivas capas del OB.

La tinción con Topro3 fue consistente con la tinción de Nissl fluorescente. En el OB se encontró gran concentración y densidad de núcleos, predominantemente a nivel de la ICL y de los tabiques de la GL y una ECL con menor densidad celular (fig. 4B/N1 y 4B/N2).

La inmunomarcación de DCX, como ya se esbozó, puso en evidencia neuroblastos en migración. Si bien con una inmunoreactividad muy tenue, en los dos niveles del OB estudiados se observó una localización central de procesos DCX+ (datos no mostrados).

Por otra parte, la inmunohistoquímica para la proteína β III reveló que las fibras olfatorias del OB (principalmente a nivel del OB rostral) forman haces o fascículos con orientación espacial diversa (fig. 4C/N1 y 4C/N2).

La inmunohistoquímica para las proteínas HuC/HuD (fig. 4D/N1 y 4D/N2) permitió confirmar la naturaleza neuronal y relación de tamaño de la mayor parte de los componentes celulares de la ICL y ECL del OB. Como se observa en la fig. 4DN1-3, el anticuerpo para HuC/D marcó predominantemente citoplasma neuronal, si bien también se encontraron algunos núcleos HuC/HuD+ (no mostrado). Las células HuC/HuD+ de la ICL presentaron una marcación muy débil, probablemente vinculado

a que corresponden a células grano y el citoplasma consiste solamente en un delgado halo perinuclear. En las células de la ECL y GL, con una mayor relación citoplasma/núcleo, la expresión de estas proteínas fue mucho más notoria (fig. 4D/N1 y 4D/N2).

Finalmente se evidenció el fenotipo bioquímico mediante inmunohistoquímica para el neurotransmisor GABA y la enzima de síntesis de catecolaminas, TH. La proteína TH reveló numerosas neuronas catecolaminérgicas, cuyos somas pequeños y ovoides se encuentran principalmente en la ECL. También se encontraron neuronas TH+, aunque en menor cantidad, en la ICL y en los tabiques interglomerulares de la GL. Delgados procesos TH positivos se extendieron en el espesor de GL pero no parecen alcanzar la POFL (fig. 4E/N1 y 4E/N2). La inmunohistoquímica para el GABA marcó tenuemente neuronas pequeñas de la ICL, con un halo citoplasmático muy delgado y haces de fibras en la GL (datos no mostrados).

A nivel del subpallium rostral, la tinción de Nissl permitió identificar las principales subdivisiones (central: Vc, dorsal: Vd, lateral: Vl, ventral: Vv), fascículos (haz del cerebro anterior: FB) y zonas neuropílicas (campo terminal medial de fibras olfatorias: MTOF) descritos por Maler et al. (1991) y Lopes Corrêa et al. (1998) (fig. 4A/N3).

La tinción con Topro3 reveló una intensa tinción a nivel de la pared ventricular del subpallium rostral. Al igual que el Nissl, la contratinción nuclear también permitió el reconocimiento de las subdivisiones del subpallium, destacándose la alta densidad nuclear a nivel de Vd, Vl y Vv, complementada con la inmunohistoquímica para β III (fig. 4B/N3).

A su vez, la expresión de DCX fue muy escasa, excepto en zonas particulares que podrían corresponder a las Vd, Er y, muy débilmente, FB ventral (datos no mostrados).

La inmunohistoquímica para la β III marcó regiones del subpallium complementarias a las teñidas con la técnica de Nissl y el Topro3, en las que se aprecian mayor cantidad de fibras relativamente gruesas (fig. 4C/N3).

En este nivel, también se observó una heterogeneidad de inmunomarcación de HuC/HuD. Se encontraron muchas neuronas con una marcación intensa de HuC/D a nivel paraventricular. Entre ellas, se vio una marcación especialmente intensa de células dispuestas en forma de coma, extendiéndose desde Vd hasta Vc (flechas blancas en fig. 4D/N3). La intensidad de marcación disminuyó con la distancia de las células marcadas a la pared del ventrículo. Esta técnica también evidenció que un conjunto de neuronas del subpallium se disponen en cordones paralelos a las

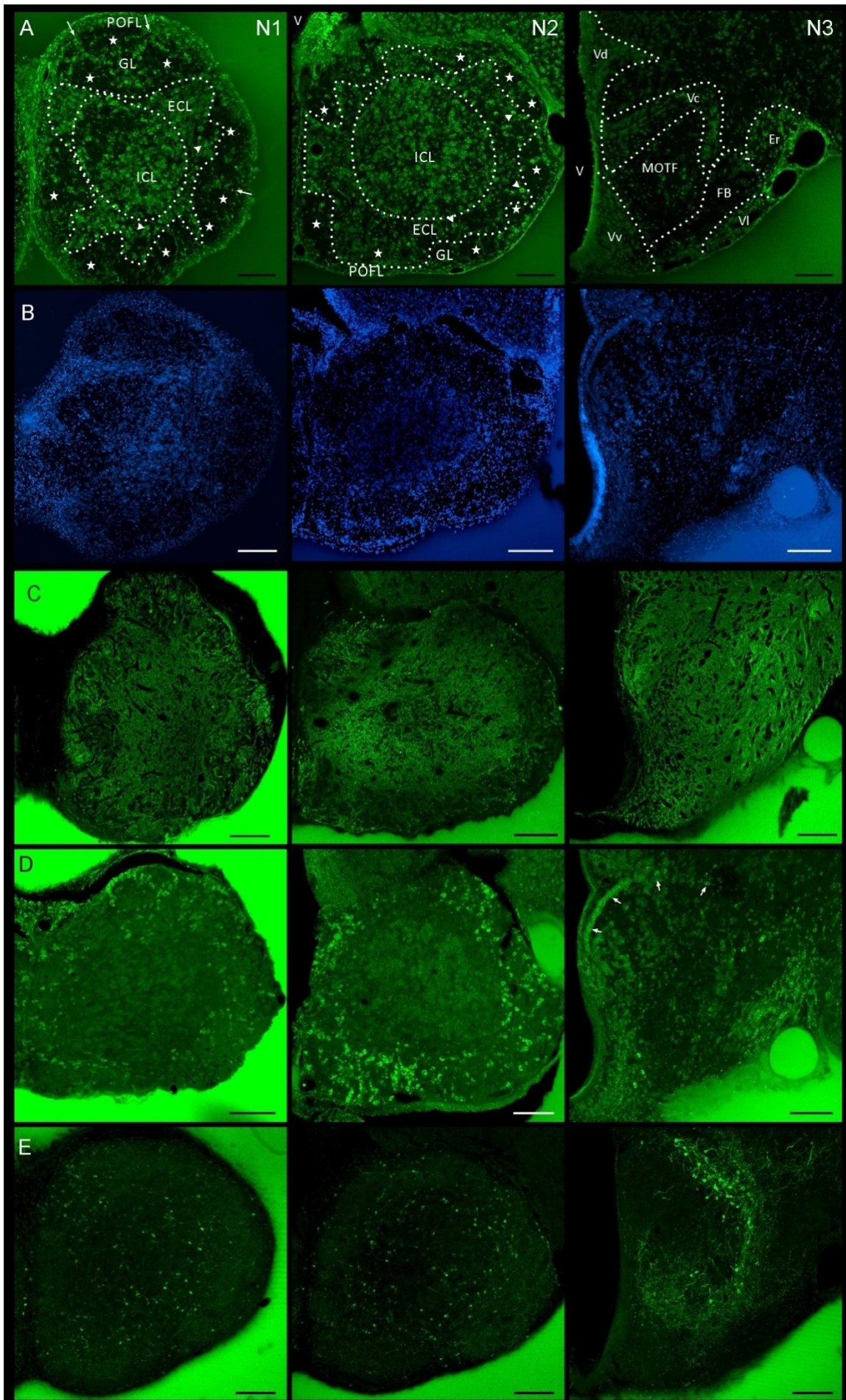


Figura 4.- Histoarquitectura del bulbo olfatorio (rostral, columna N1 y caudal, columna N2) y del subpallium rostral (columna N3) en *G. omarorum*. Las imágenes corresponden a secciones coronales del cerebro teñidas con Nissl fluorescente (NeuroTrace, **A**), Topro3 (**B**), o procesadas para la demostración inmunohistoquímica de β III tubulina (**C**), HuC/HuD (**D**) y tirosina hidroxilasa (**E**). Las líneas punteadas en la fila A indican los límites de las regiones identificables en los tres niveles estudiados. Las escalas corresponden a 100 μ m.

superficies del subpallium. Esta disposición es notoria en VI y en la parte medial de Vd y Vv (fig. 4D/N3). Si bien, tanto β III como HuC/HuD son marcadores neuronales, en las adyacencias del epitelio ventricular mostraron una distribución complementaria. Mientras que β III está prácticamente ausente (fig. 4C/N3), las proteínas HuC/HuD se expresan en cadenas de células a tan sólo una a dos células de distancia del epitelio ventricular (fig. 4D/N3).

Gran cantidad de células catecolaminérgicas de soma pequeño y ovoide a redondeado se evidenciaron en Vc y la parte más lateral de Vd mediante la inmunohistoquímica para TH. Esta técnica también reveló fibras TH positivas abundantes y delgadas en el MTOF (fig. 4E/N3).

DESARROLLO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PROLIFERANTES EN TELENCÉFALO

Para aproximarnos a la dinámica de proliferación celular en los niveles antes mencionados, se estudió cualitativa y cuantitativamente la localización y distribución de los núcleos que incorporaron CldU durante la fase S del ciclo celular luego de distintos tiempos de sobrevivencia (rango: 24 hs a 180 días).

Como se mencionó en métodos, en cada una de las regiones para todos los tiempos se adquirieron imágenes correspondientes a 15 planos confocales separados 2 μ m entre sí. A partir de cada uno de esos conjuntos de imágenes se obtuvieron las proyecciones de las intensidades máximas en un único plano. También se obtuvieron reconstrucciones 3D de cada nivel (fig. 5) y de las regiones dentro de cada nivel: ICL

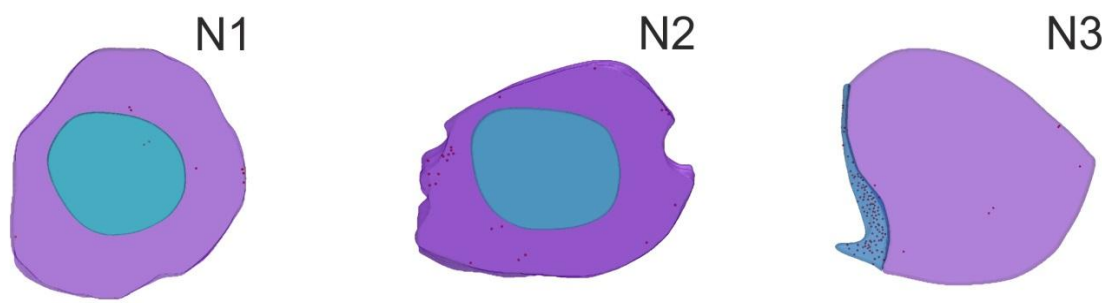


Figura 5.- Reconstrucciones de las regiones de interés. Las imágenes muestran la visualización casi frontal de los modelos 3D obtenidos con el software BioVis3D del bulbo olfatorio rostral (**N1**), bulbo olfatorio caudal (**N2**) y región rostral del subpallium (**N3**) de especímenes con sobrevivencia post CldU de 24 hs. En N1 y N2 también se obtuvo la reconstrucción de la capa celular interna (celestes), mientras que en N3 se obtuvo la reconstrucción 3D del nicho proliferativo (celestes). Los puntos rojos indican la localización de los núcleos marcados con CldU. El software también permite obtener varios datos cuantitativos como cantidad y localización de núcleos marcados, y forma y volumen de subdivisiones de las regiones de interés. La escala pertenece a 100 μ m.

en el OB rostral y caudal (zona resaltada en celeste en fig. 5N1 y 5N2), y nicho proliferativo ventricular en el subpallium rostral (región resaltada en celeste en fig. 5N3). Además, en todas las reconstrucciones se marcó la localización de los núcleos CldU+ (puntos rojos en fig. 5).

A través del software BioVis3D, se calculó la cantidad total de núcleos en cada región (fig. 6) y la posición de cada núcleo en relación a los ejes x e y. Esta información permitió complementar la descripción cualitativa en base a las proyecciones en un plano que se muestran en la fig. 7. Por un lado, se utilizó para construir histogramas de frecuencia de las posiciones relativas de las células proliferantes en los ejes x (fig. 8) e y (fig. 9), y por otro para calcular la repartición de los núcleos marcados entre subregiones en cada nivel estudiado (fig. 10).

Como se muestra en la fig. 6, la cantidad total de células proliferadas varió tanto en función del nivel como del tiempo de sobrevivencia post-CldU. A las 24 hs de administrado el CldU, la cantidad total de células proliferantes que se encontraron en el OB rostral fue muy reducida; dicha cifra está duplicada en el OB caudal y alcanzó casi un orden de magnitud mayor en el subpallium rostral. El total de

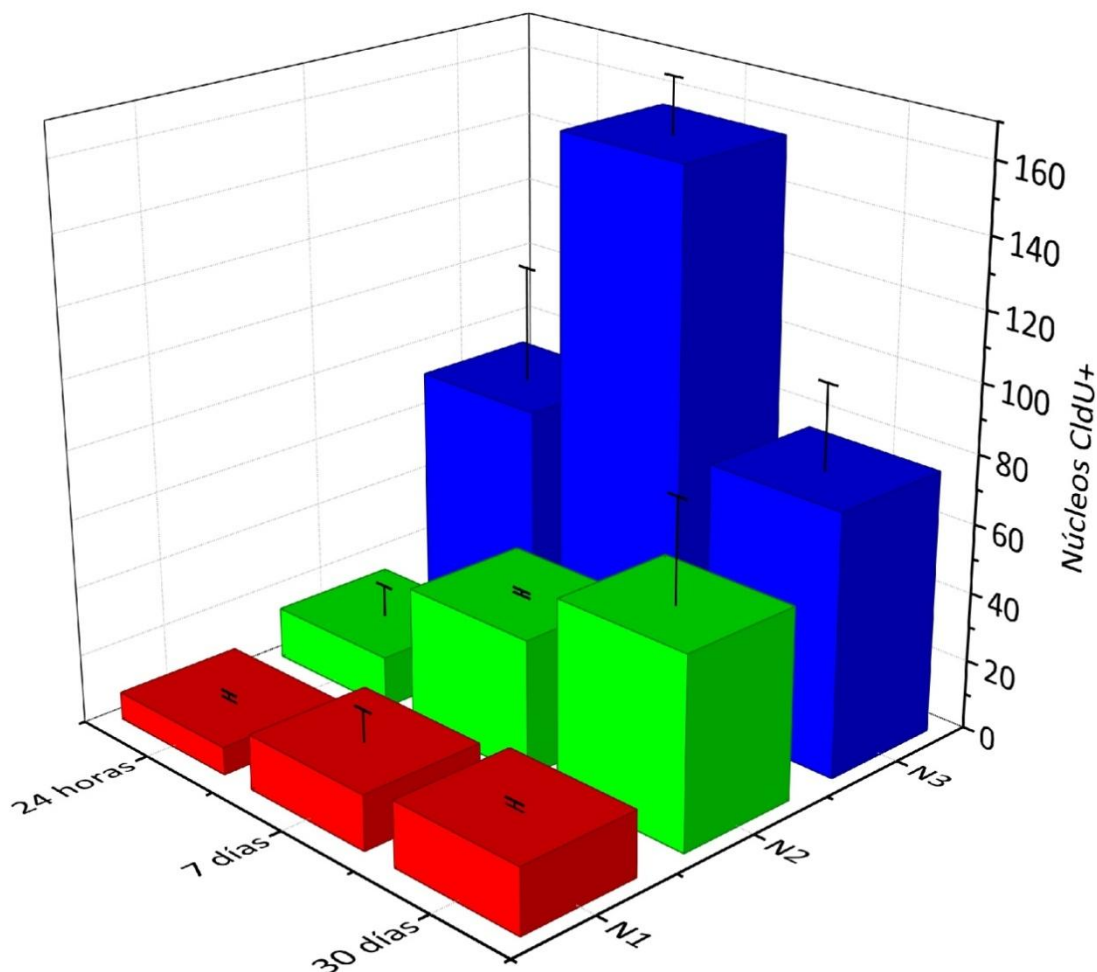


Figura 6.- Cantidad de células CldU positivas en los tres niveles estudiados: bulbo olfatorio rostral, caudal y subpallium rostral (N1, N2 y N3, respectivamente) para 24 horas, 7 y 30 días post-administración de dicho análogo de timidina.

núcleos marcados en el OB rostral y caudal aumentó en función del tiempo de sobrevida post-CldU, alcanzando al mes valores de aproximadamente 2.5 y 3.5 veces los encontrados a las 24 hs, respectivamente. Por otra parte, en el subpallium rostral, el total de células proliferantes a las 24 horas de administrado el CldU fue notoriamente mayor que en el OB. Dicha cantidad aumentó a los 7 días de sobrevida post-CldU, pero a los 30 días disminuyó hasta valores similares a los encontrados a las 24 horas.

La observación de las secciones histológicas permitió evidenciar que las células proliferantes se encuentran heterogéneamente distribuidas en los tres niveles analizados. A las 24 horas de la administración de CldU, en el OB rostral se observaron muy escasos núcleos marcados con CldU próximos a la superficie del OB (fig. 7A/N1). En el OB caudal también fueron localizadas pocas células proliferantes. Varias de las mismas se dispusieron densamente en la zona dorso-medial del OB en las adyacencias del límite entre el OB y el telencéfalo dorsal, predominantemente en el espesor de la pared de la porción más rostral del ventrículo telencefálico (fig. 7A/N2). Por otra parte, se encontró una mayor cantidad de células marcadas, densamente empaquetadas, en la pared ventricular adyacente al subpallium (fig. 7A/N3). La baja cantidad y densidad de células proliferantes en el OB rostral a las 24 horas no concuerdan con la existencia de un nicho proliferativo en la parte rostral del OB. Por el contrario, los cúmulos descritos de células proliferantes en el OB caudal y subpallium rostral constituyen claramente nichos proliferativos ventriculares (delimitados por las líneas punteadas finas en fig. 7A/N2 y 7A/N3). Las células proliferantes de estos nichos proliferativos presentaron en general una forma oval alargada, y usualmente se dispusieron en hileras perpendiculares o formando un ángulo agudo respecto de la superficie ventricular.

Siete días luego de la administración de CldU (fig. 7B/N1) se observó un aumento en el número de células marcadas en el OB rostral, con una localización más central que la encontrada a las 24 horas. En el OB caudal se registró un notorio aumento de células CldU+, disponiéndose predominantemente en la zona dorso-medial y en la zona central del OB (fig. 7B/N2). En el subpallium rostral se observó un aumento en la cantidad total de células marcadas. Aun así, también se notó una disminución de la cantidad de células marcadas a nivel de la pared ventricular del subpallium, con una disposición más laxa que lo observado en el grupo de 24 horas. También se constató un aumento en la cantidad de células marcadas en la zona subventricular, abarcando una banda de tejido de aproximadamente 15 μ m de la superficie ventricular (fig. 7B/N3).

A los 30 días de sobrevida post-administración de CldU, en el OB rostral se observó un aumento en el número de núcleos CldU+, con predominancia en la ICL (fig. 7C/N1). Conjuntamente, en el OB caudal también hubo un aumento del número de

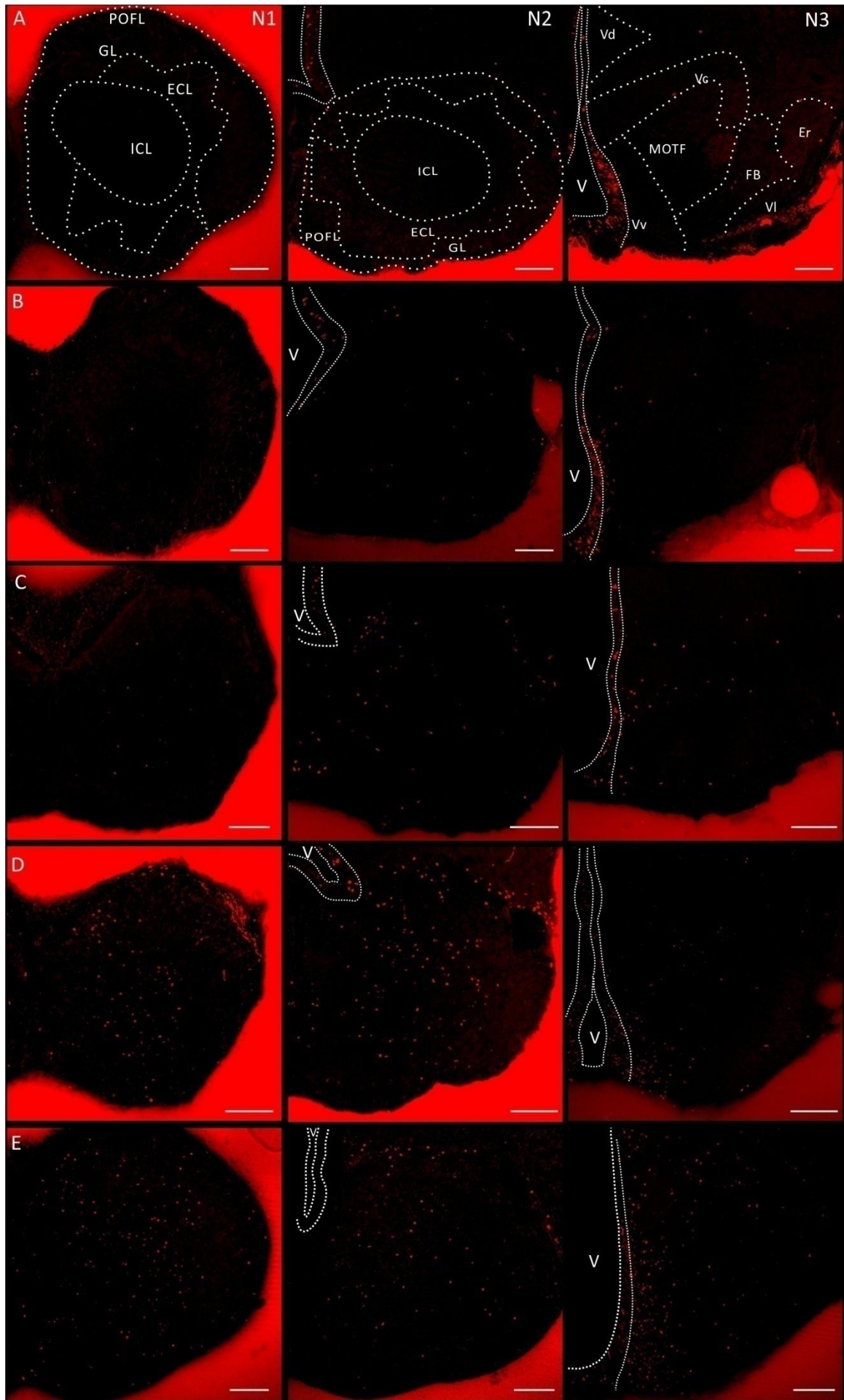


Figura 7.- Distribución espacio-temporal de células proliferantes en el bulbo olfatorio (OB) rostral (N1) y caudal (N2), y subpallium rostral (N3) de *G. omarorum*.- Las imágenes corresponden a la proyección en un único plano de las intensidades máximas de 15 planos confocales (separados 2 μm entre sí) de cortes de los tres niveles de interés (N1, N2 y N3) de especímenes con una sobrevida de 24 horas (A), 7 (B) o 30 (C) días de sobrevida post-administración de una única dosis del análogo de timidina cloro-deoxiuridina (CldU, rojo), y 90 (D) o 180 (E) días luego de la administración de cuatro dosis de CldU en días consecutivos. La escala corresponde a 100 μm . Las líneas punteadas finas en A/N1-N3 indican esquemáticamente el límite de las subdivisiones de cada uno de los niveles.

núcleos CldU, de los cuales aproximadamente la mitad se localizaron en la ICL (fig. 7C/N2), principalmente en su mitad más interna. Otra parte importante de las células proliferantes se encontraron en la parte externa de la ECL y GL. Por el contrario, se detectó un descenso notorio del número total de núcleos CldU+ en el subpallium rostral. Se registró, a la par de una disminución de células marcadas en la zona ventricular-subventricular, un aumento del número de células marcadas a mayores distancias de la superficie ventricular, alcanzando las subdivisiones adyacentes Vd y Vv, y el MOTF (fig. 7C/N3).

De forma coherente con los protocolos utilizados, la cantidad de núcleos marcados a los 90 y 180 días superó ampliamente la observada en tiempos menores permitiendo analizar la distribución espacial en tiempos de sobrevida tan prolongados. Así, a los 90 días de la administración de cuatro dosis de CldU en días consecutivos, se encontró que la mayoría de las células marcadas se ubicaron en la ICL del OB, tanto en los niveles rostral como caudal. El resto de las células se distribuyó de forma heterogénea en la ECL y GL de ambos niveles del OB, detectándose un predominio de células marcadas en la región dorso-medial (fig. 7D/N1 y 7D/N2), y en la región dorsal adyacente al telencéfalo dorsal del OB caudal. En el subpallium rostral, la mayoría de las células marcadas se encontraron en los núcleos Vd, Vv y MOTF del subpallium (fig. 7D/N3).

Por último, a 180 días de sobrevida post-administración de CldU, los núcleos CldU+ observados en el OB rostral y caudal también presentaron una disposición predominantemente central (a nivel de la ICL) y dorso-medial (fig. 7E/N1 y 7D/N2). En el subpallium rostral también se observaron núcleos marcados a nivel de Vd, Vv, MOTF y una parte de FB (fig. 7E/N3).

Los resultados previamente descritos fueron complementados con un análisis de la distribución de las posiciones relativas de los núcleos CldU+ respecto de las coordenadas horizontal (x) y vertical (y) para cada uno de los niveles estudiados. Los resultados fueron representados en histogramas de frecuencia (figs. 8 y 9, respectivamente) en los que se observa la cantidad de núcleos en cada intervalo de distancia relativa en los ejes x e y, para los distintos niveles a las 24hs, 7 y 30 días de sobrevida post administración de CldU en todos los especímenes estudiados.

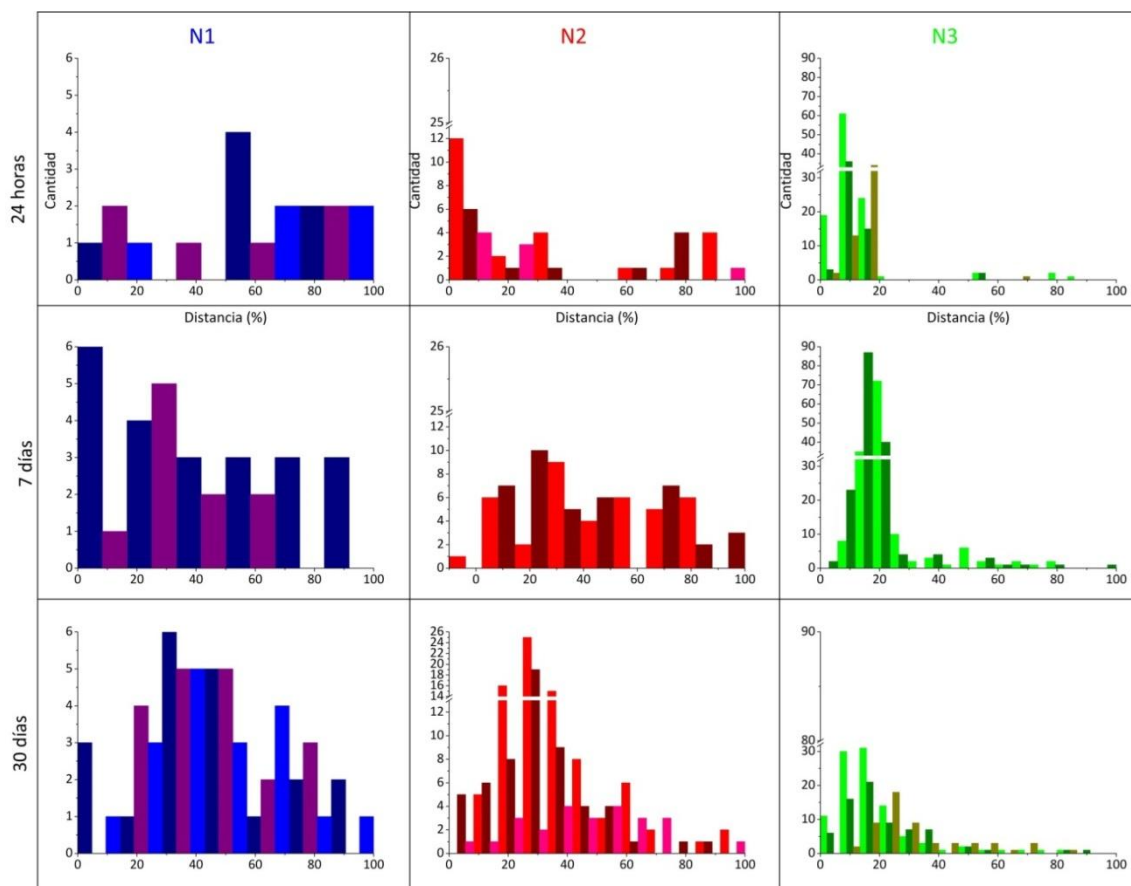


Figura 8.- Histogramas de frecuencia de las distancias relativas de los núcleos CldU+ respecto al eje X. Las gráficas representan las distancias (expresadas como porcentaje de la dimensión máxima de cada región) de los datos obtenidos para cada uno de los especímenes (codificados en color) a nivel del bulbo olfatorio rostral (N1), caudal (N2) y subpallium rostral (N3) para tiempos de supervivencia post-CldU de 24 horas, 7 y 30 días.

En el OB rostral y caudal, los histogramas de frecuencia en el eje x muestran una distribución bastante homogénea a las 24hs y 7 días de supervivencia post CldU, mientras que al mes de supervivencia tienden a encontrarse más próximos a la zona media del OB, que correspondería a la parte medial de la ICL (fig. 8N1-N2). El análisis comparativo de los histogramas de frecuencia del subpallium rostral permitió visualizar cómo, en tiempos cortos de supervivencia, la mayoría de los núcleos marcados se concentran a distancias menores desde la superficie ventricular, y a mayores tiempos de supervivencia post CldU la población se distribuye de modo de alcanzar mayores distancias desde el epitelio ventricular.

Los datos obtenidos para el eje y muestran que los núcleos marcados en el OB rostral y caudal están distribuidos de forma homogénea a las 24 hs de administrado el CldU y que dicha distribución permanece más o menos incambiada a los 7 días de supervivencia post CldU. A los 30 días, los núcleos tienden a ubicarse centralmente, aunque con una notoria variación entre muestras analizadas (fig. 9N1-N2). Por el

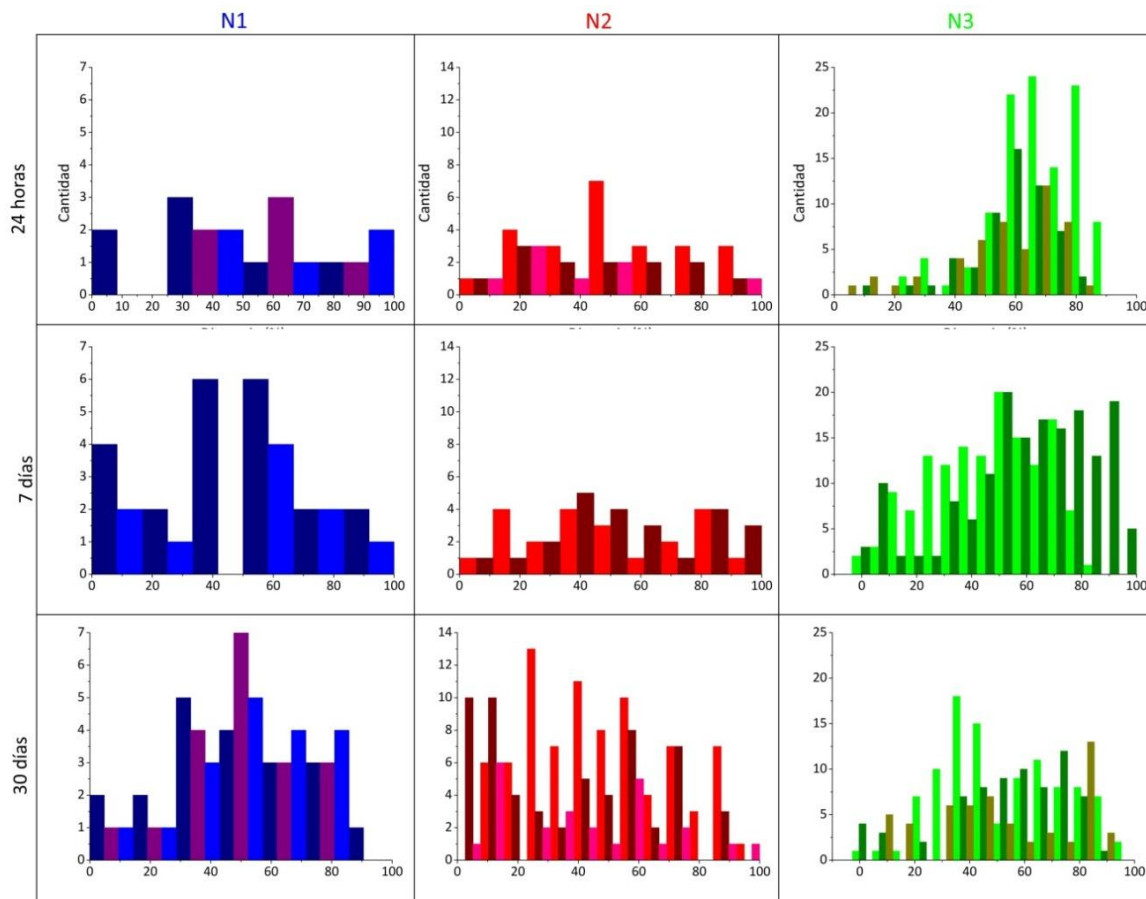


Figura 9.- Histogramas de frecuencia de las distancias relativas de los núcleos CldU+ respecto al eje Y. Las gráficas representan las distancias (expresadas como porcentaje de la dimensión máxima de cada región) de los datos obtenidos para cada uno de los especímenes (codificados en color) a nivel del bulbo olfatorio rostral (N1), caudal (N2) y subpallium rostral (N3), para tiempos de sobrevivencia post-CldU de 24 horas, 7 y 30 días.

contrario, en el subpallium rostral se observó que la mayoría de los núcleos se encontraron inicialmente en la parte ventral (coincidentemente con la localización del nicho proliferativo). A tiempos de 7 y 30 días se observó una mayor dispersión de los núcleos marcados, que se distribuyeron más homogéneamente en esta dirección, alcanzando posiciones más dorsales del subpallium (fig. 9N3).

La proporción de células CldU+ en las distintas regiones del OB y subpallium se observa en la fig. 10. Allí se pone en evidencia la progresión temporal de los núcleos desde las capas más externas hacia la ICL para los niveles rostral y caudal del OB, desde prácticamente su ausencia a las 24 horas, hasta alcanzar el 30 y 50% del total a los 7 y 30 días, respectivamente. Mientras tanto, en el subpallium rostral ocurre el proceso inverso; existe un descenso del 90% al 30% de los núcleos en el nicho proliferativo ventricular entre las 24 horas y los 30 días, lo cual se ve acompañado por un descenso gradual en el número total de núcleos marcados en este nivel (ver fig. 6).

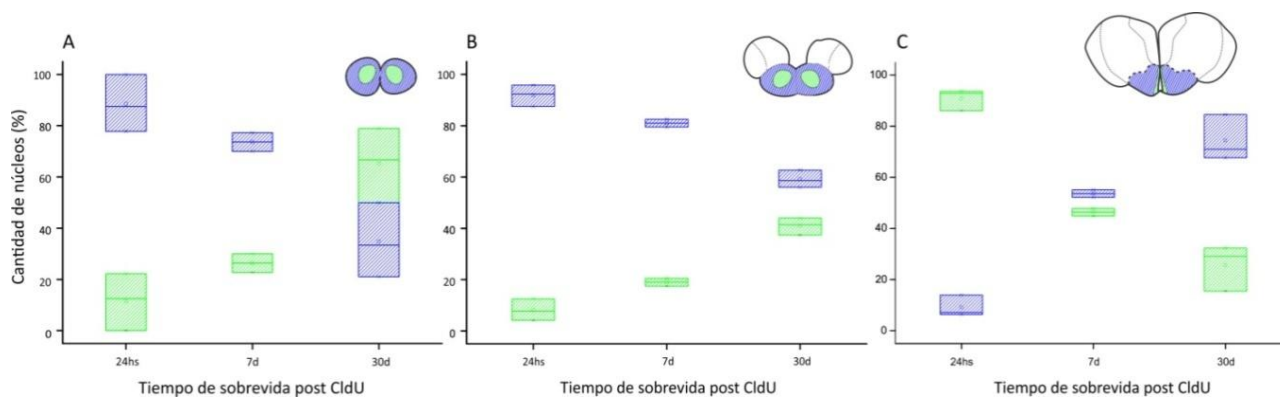


Figura 10.- Distribución de células proliferantes dentro de las regiones de interés. En las gráficas se muestra la proporción de células CldU positivas dentro de la capa de células interna (ICL) y fuera de la misma [capa de células externa (ECL), capa glomerular (GL) y capa de fibras olfatorias primarias (POFL)] del bulbo olfatorio (A y B), y entre el epitelio ventricular y el resto del subpallium (C).

CARACTERIZACIÓN DEL DESTINO NEURONAL DE LAS CÉLULAS MARCADAS

El análisis de la expresión de marcadores de estirpe neuronal en paralelo con el revelado de la incorporación de CldU mostró que, a las 24 hs de administración del mismo, las células que incorporaron este análogo no presentaron inmunoreactividad para ninguno de los marcadores neuronales evaluados (HuC/D, DCX y β III).

Ya a los 7 días post-administración de CldU, se evidenciaron algunas células doble marcadas con anti-CldU y anti-HuC/HuD en la parte más ventral de la zona subventricular del subpallium rostral (fig. 11), pero no se encontraron células

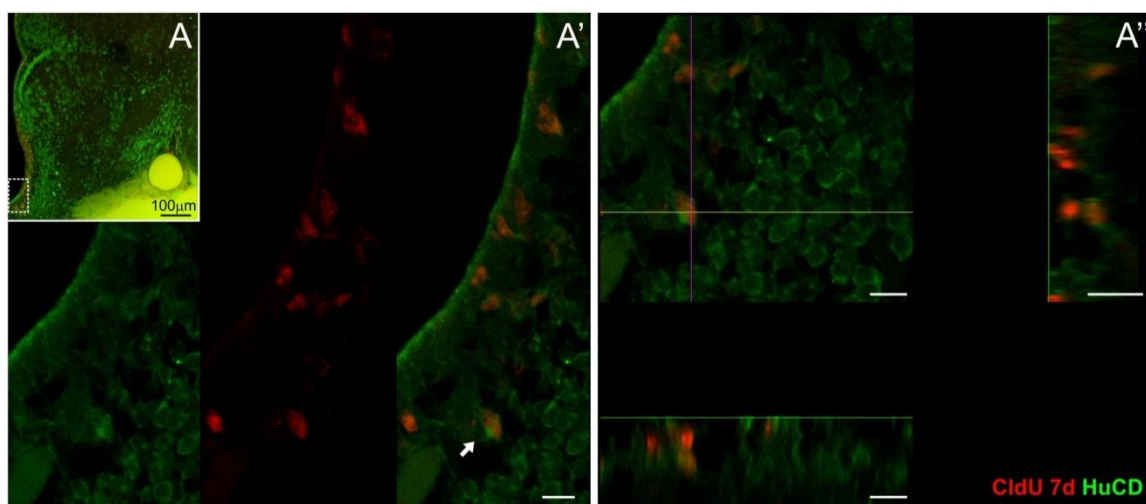


Figura 11.- Sección transversal de cerebro de *Gymnotus omarorum* con 7 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-HuC/D en el subpallium telencefálico. (A) Vista panorámica; el rectángulo punteado indica la zona que se amplifica en A'. (A') Microfotografías de un único plano confocal en las que se muestra la imagen resultante del barrido secuencial con cada uno de los láser (488: izquierda; 543: medio) y la superposición de ambos (derecha). La flecha blanca indica una célula doble marcada. (A'') Proyección en los ejes x-z e y-z de un apilado de 25 planos confocales (cada 1 μ m) a nivel de la zona donde se cruzan los ejes x e y en A''. Las escalas, a menos que se especifique, corresponden a 10 μ m.

doble marcadas a nivel del OB rostral o caudal. Tampoco se encontraron células doble marcadas con CldU y DCX en este tiempo de sobrevivencia en ninguno de los niveles estudiados.

A los 30 días post administración de CldU, también se observaron núcleos CldU+ colocalizando con HuC/HuD, tanto en una posición central del OB caudal como en la zona subventricular ventral del subpallium rostral (fig. 12). Al mismo tiempo, se observaron células doble marcadas con DCX y CldU en la zona subventricular en el subpallium rostral (fig. 13). Como se observa en esta figura, la morfología de las células DCX+/CldU+ también es compatible con la de neuroblastos en migración, es decir, presentan una morfología alargada, con uno o dos procesos alargados y núcleos alargados con cromatina compactamente dispuesta (Wang et al., 2011). En ninguno de estos tiempos se encontró colocalización de CldU con β III.

A los 90 días, se encontraron en el OB rostral células doble marcadas con CldU y HuC/D en la zona central (coincidiendo con la localización de la ICL, fig. 14A1) y en la zona dorso-medial del OB (fig. 14A2). También se hallaron núcleos doble marcados

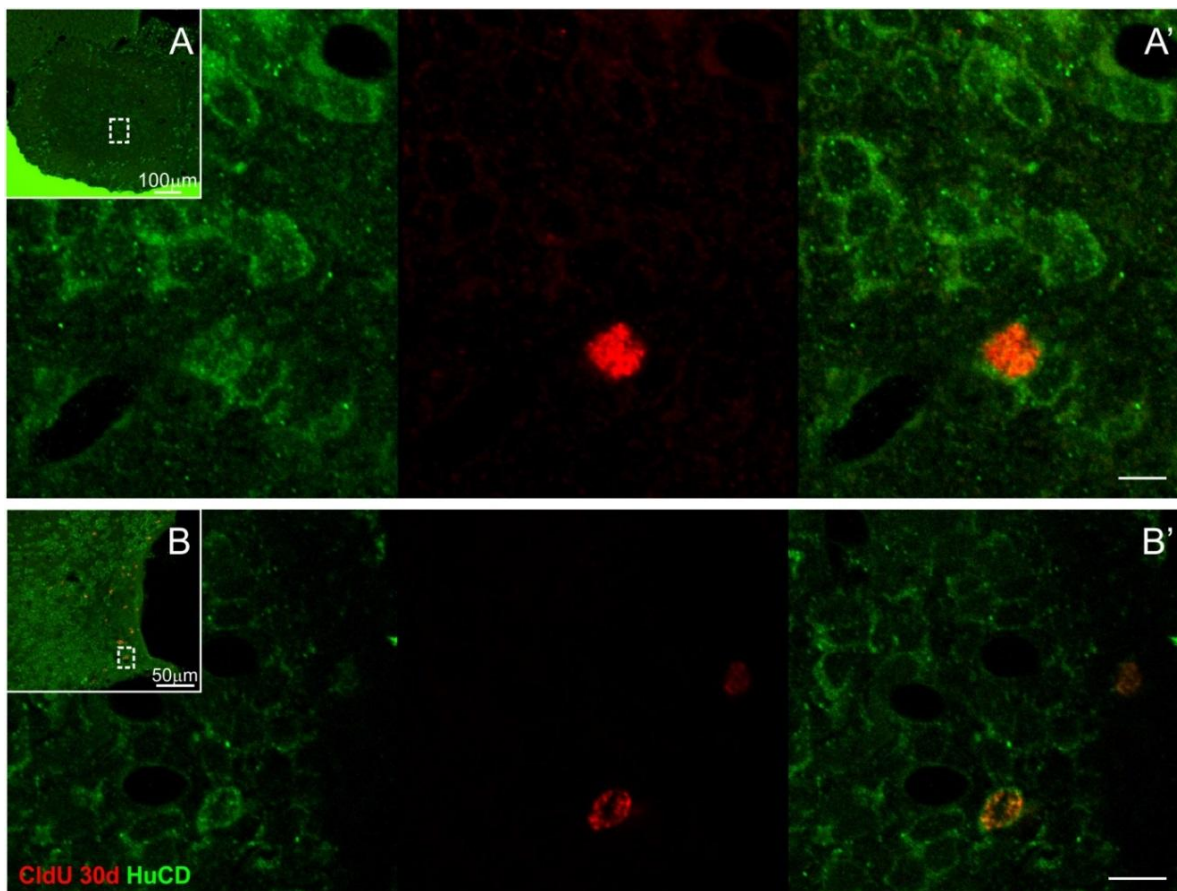


Figura 12.- Secciones transversales del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 30 días de sobrevivencia post-CldU, mostrando la colocalización CldU-HuC/D en el BO caudal (A) y el subpallium telencefálico (B). La colocalización de los marcadores se evidenció mediante tres vistas, dos de ellas correspondientes al barrido de cada láser (488 y 543, imágenes a izquierda y medio de A' y B') y la superposición de ambos (imagen a derecha en A' y B'). La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5 μm.

en la zona subventricular del subpallium rostral (fig. 14B). Asimismo, se evidenciaron células doble marcadas con CldU/DCX en la zona dorso-medial del OB rostral (fig. 15). Al mismo tiempo post-CldU se evidenció colocación de CldU con el marcador para tirosina hidroxilasa (TH) en el subpallium rostral, pero no en los otros dos niveles (fig. 16).

Finalmente, a 180 días post-administración de CldU sí se observaron células doble marcadas CldU/TH en los tres niveles estudiados.

La mayoría de las células TH+, incluyendo las doblemarcadas con CldU, presentaron un soma pequeño, de forma redondeada a ovalada, con uno o dos procesos. En el OB rostral se dispusieron centralmente, en toda la extensión de la ICL, la ECL y probablemente los tabiques interglomerulares de GL (fig. 17). En el OB caudal, las células doblemarcadas CldU+/TH+ se localizaron en la parte dorso-medial (fig. 18A), central (fig. 18B) y ventro-lateral (no mostrado). Finalmente, en el subpallium rostral se encontraron doblemarcados en el límite entre Vv y Vd, región que podría corresponder a la parte medial del MTOF y en la parte lateral de Vc (fig. 19).

De las neuronas marcadas en el OB, algunas presentaron un soma centrado en el eje mayor de la célula (puntas de flecha blanca en fig. 17A' y 17B), pero también se

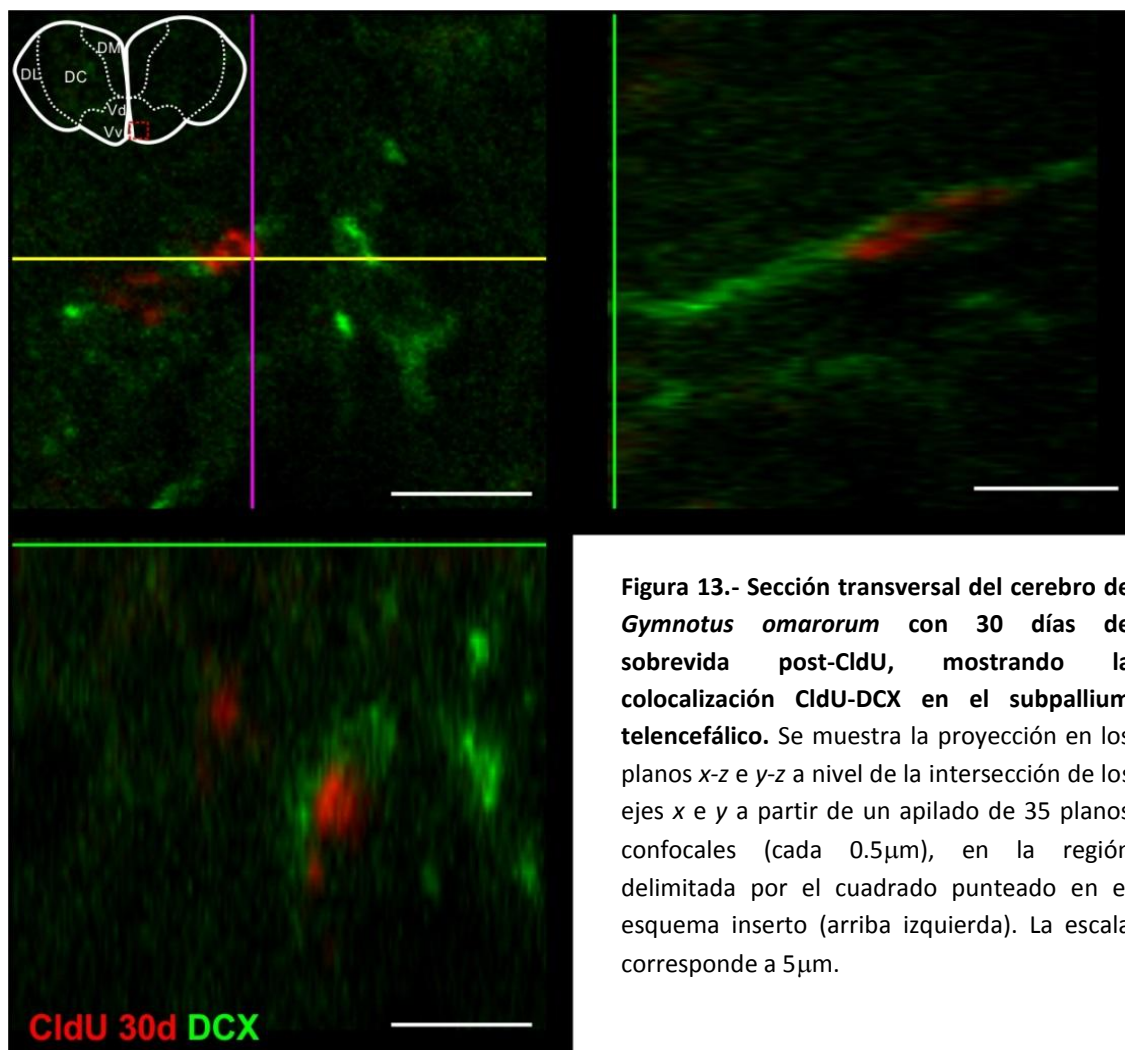


Figura 13.- Sección transversal del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 30 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocación CldU-DCX en el subpallium telencefálico. Se muestra la proyección en los planos x-z e y-z a nivel de la intersección de los ejes x e y a partir de un apilado de 35 planos confocales (cada 0.5µm), en la región delimitada por el cuadrado punteado en el esquema inserto (arriba izquierda). La escala corresponde a 5µm.

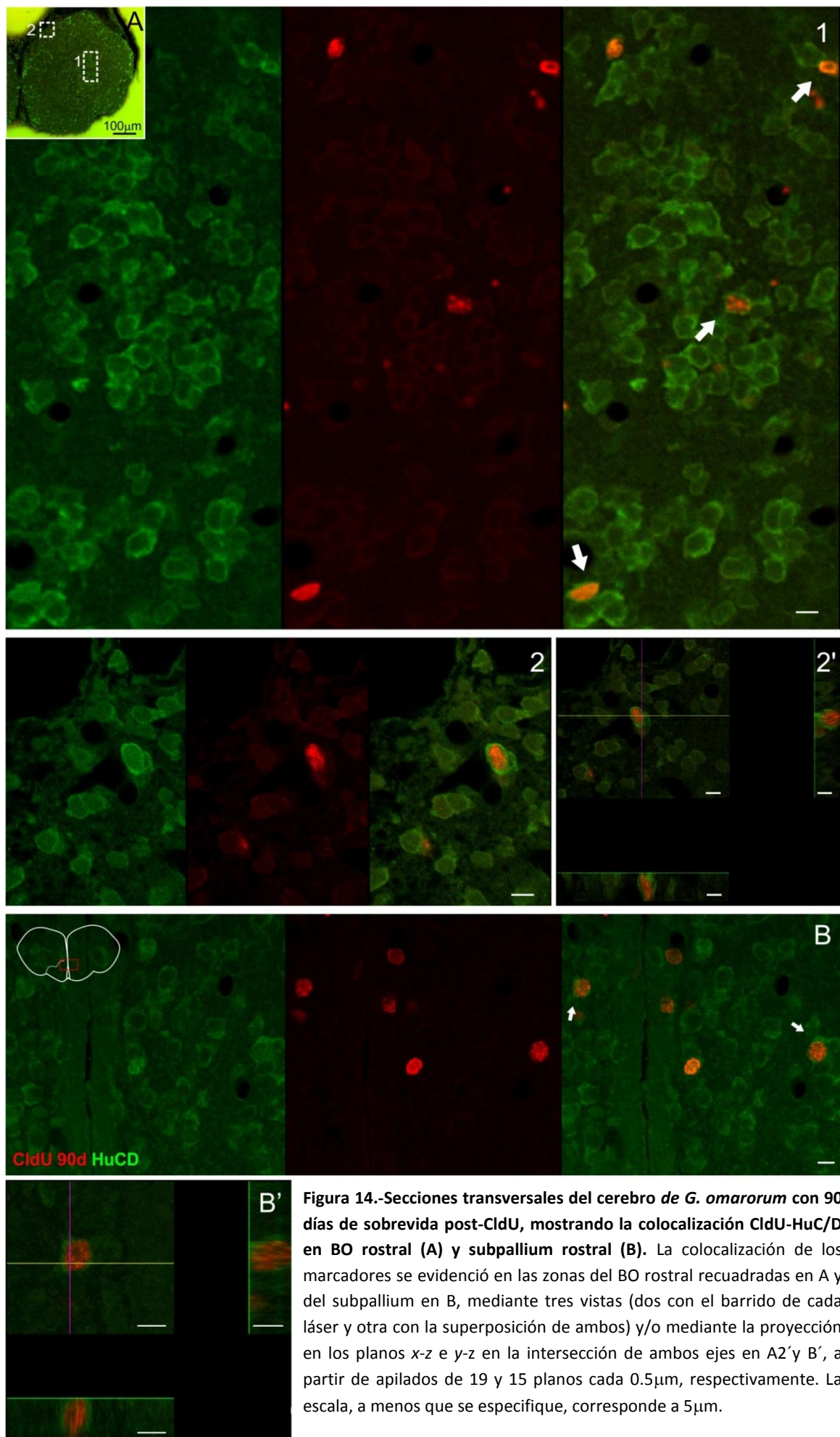


Figura 14.-Secciones transversales del cerebro de *G. omarorum* con 90 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-HuCD/D en BO rostral (A) y subpallium rostral (B). La colocalización de los marcadores se evidenció en las zonas del BO rostral recuadradas en A y del subpallium en B, mediante tres vistas (dos con el barrido de cada láser y otra con la superposición de ambos) y/o mediante la proyección en los planos x-z e y-z en la intersección de ambos ejes en A2' y B', a partir de apilados de 19 y 15 planos cada 0.5 μ m, respectivamente. La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5 μ m.

observaron algunas células cuyo soma se dispuso excéntrico respecto al eje mayor de la célula (punta de flecha amarilla en fig. 17A' y 18A'). Este aspecto podría corresponder a neuronas que, si bien presentan una madurez bioquímica, podrían estar aún en un proceso de migración. Un tercer fenotipo morfológico de neuronas TH+ correspondió a neuronas multipolares.

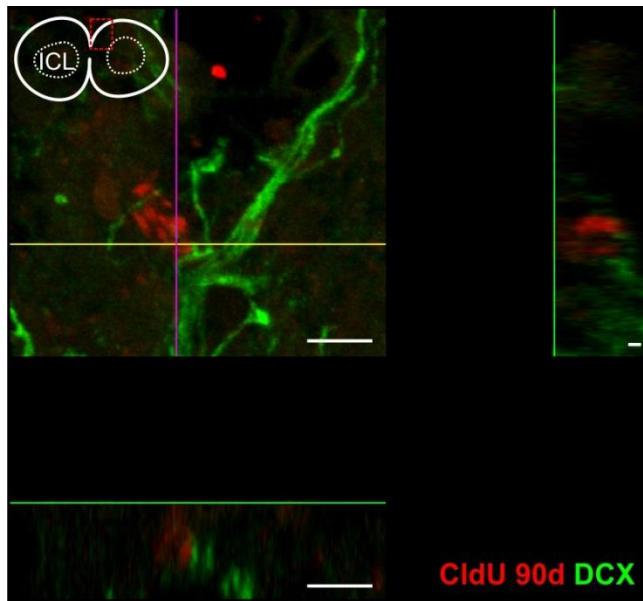


Figura 15.- Sección transversal del cerebro de *G. omarorum* con 90 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-DCX en el bulbo olfatorio rostral a nivel de la zona indicada por el recuadro rojo en el inserto. La colocalización de los marcadores se evidencia mediante la proyección en los planos x-z e y-z, a nivel de la intersección de los ejes x e y, a partir de un apilado de 15 planos cada 0.5μm. La escala corresponde a 5μm.

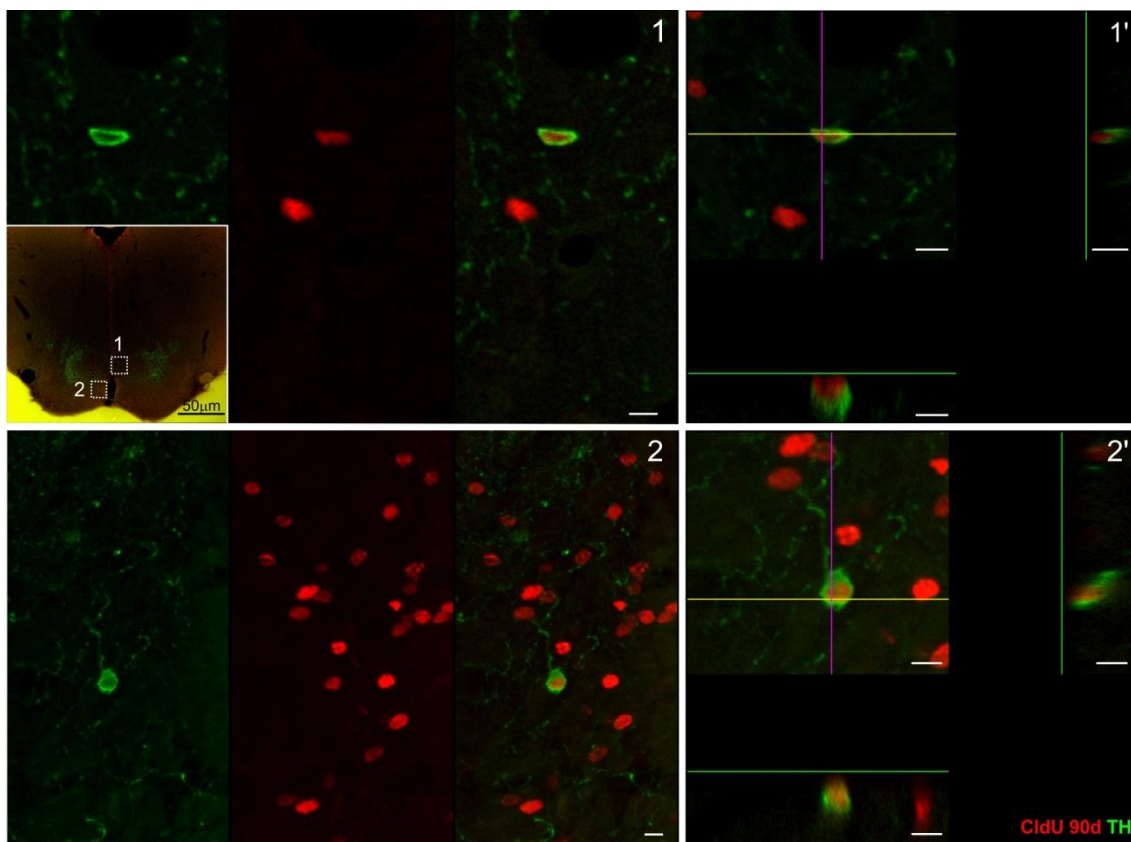


Figura 16.- Secciones transversales del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 90 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización de CldU y TH en el subpallium rostral. La colocalización de los marcadores se evidenció mediante tres vistas de un único plano (dos correspondientes a las imágenes obtenidas mediante el barrido de cada láser y una tercera correspondiente a la superposición de las anteriores) y mediante la obtención de una pila de planos confocales y proyección en los planos x-z e y-z, a nivel de la intersección de los ejes x e y en 1' y 2' a partir de un apilado de 16 y 45 planos cada 0.5μm, respectivamente. La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5μm.

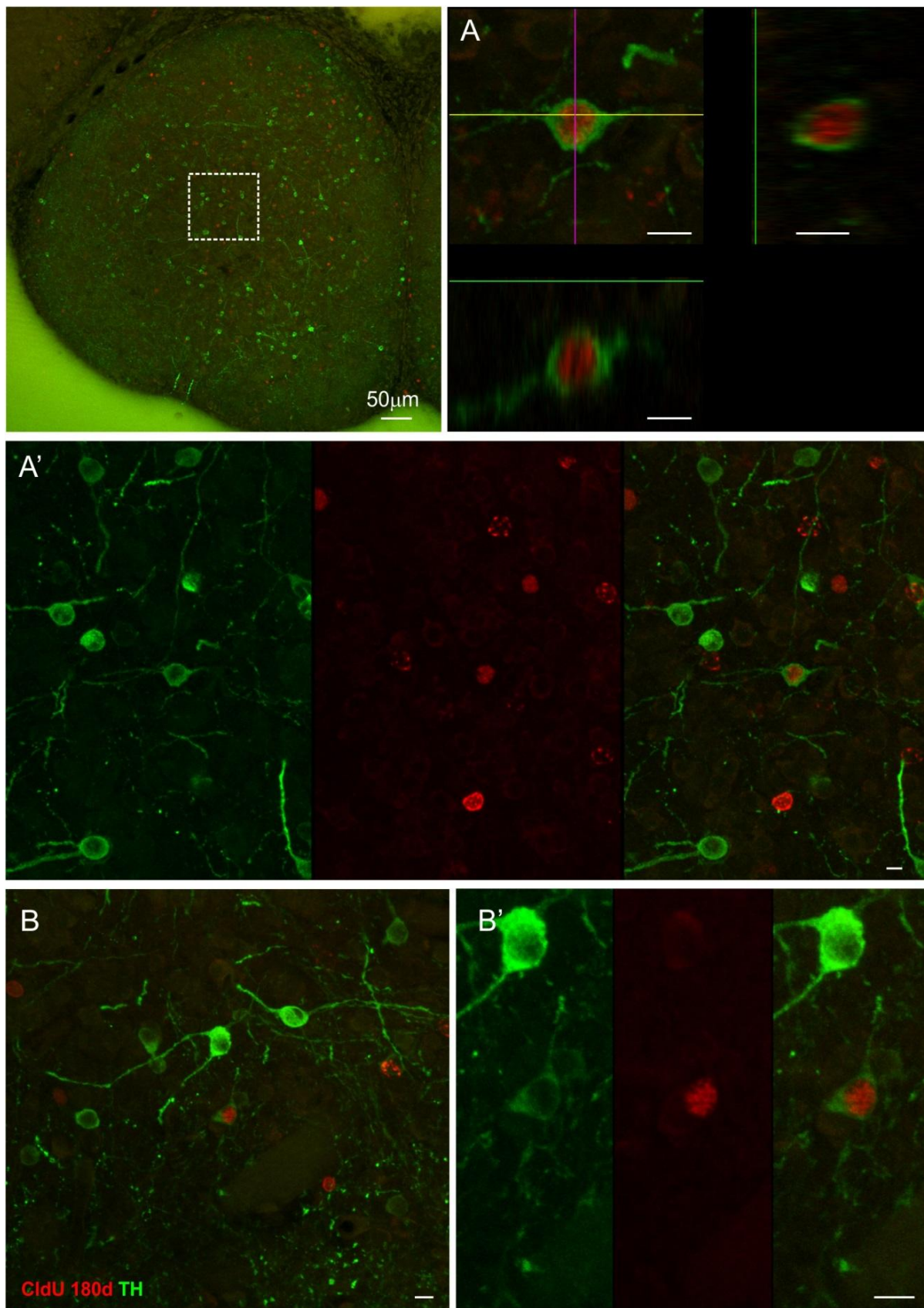


Figura 17.- Secciones transversales del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 180 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-TH en el bulbo olfatorio rostral. La colocalización de los marcadores se evidenció mediante tres vistas con el barrido de cada láser y la superposición de ambos, y mediante la proyección de la selección en los planos x-z e y-z, a nivel de la intersección en A, a partir de un apilado de 22 planos cada 1µm. La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5µm.

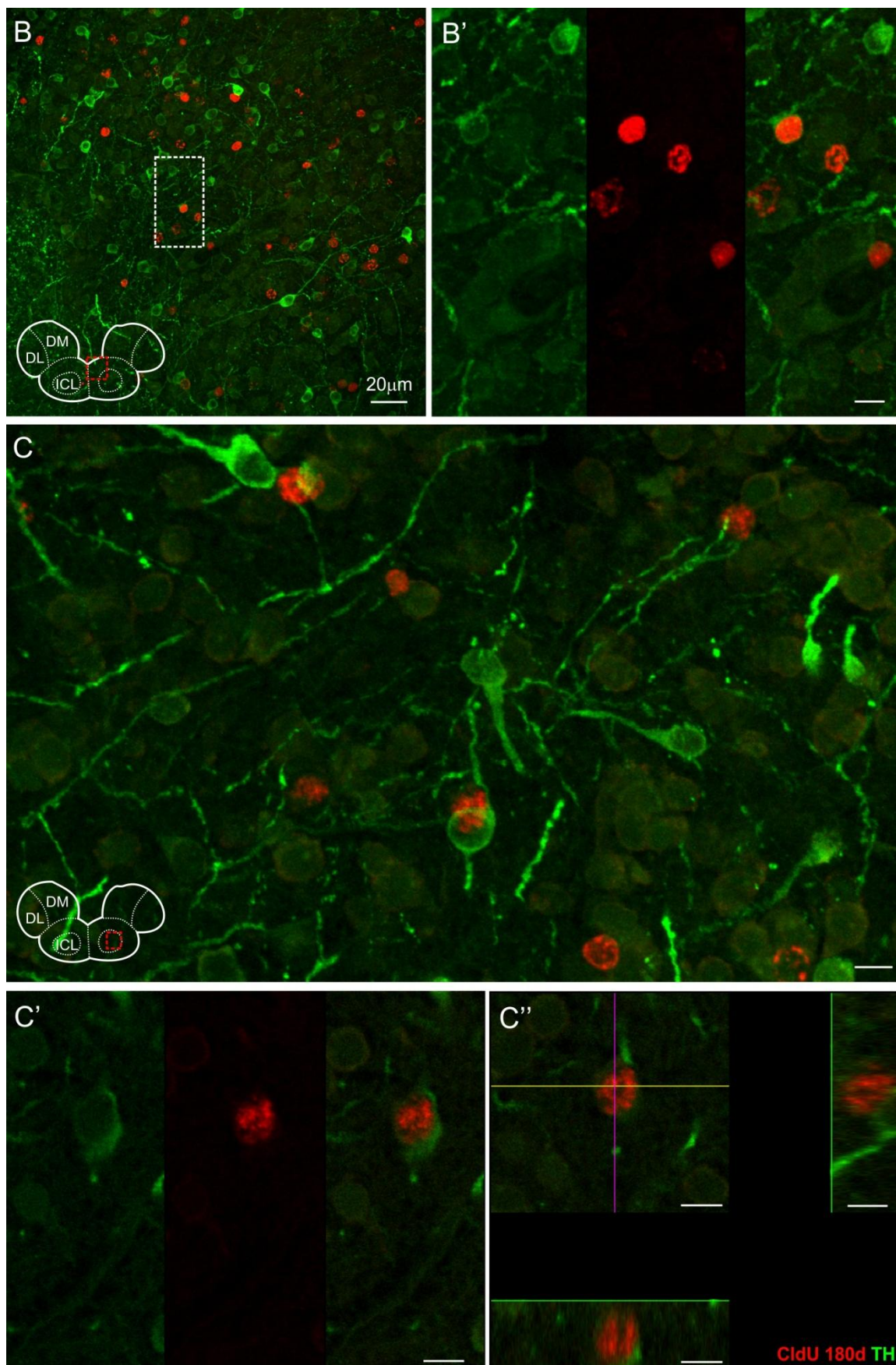


Figura 18.- Secciones transversales del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 180 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-TH en el bulbo olfatorio caudal. La colocalización de los marcadores se evidencia mediante tres vistas con el barrido de cada láser y la superposición de ambos, y mediante una proyección de la selección en los planos x-z e y-z a partir de un apilado de 17 planos cada 0.5μm (C''). La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5μm.

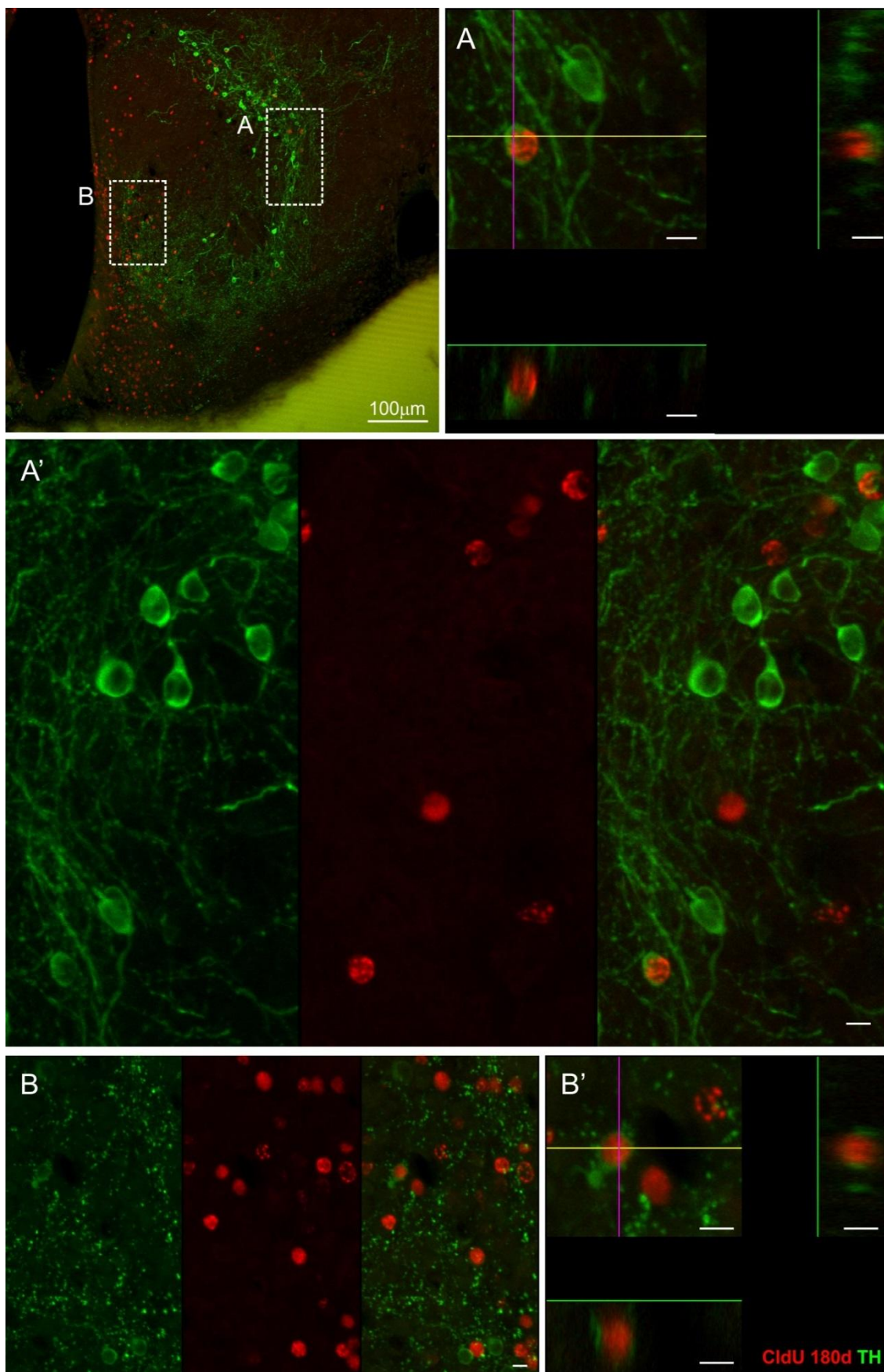


Figura 19.- Secciones transversales del cerebro de *Gymnotus omarorum* con 180 días de sobrevida post-CldU, mostrando la colocalización CldU-TH en el subpallium rostral. La colocalización de los marcadores se evidencia mediante tres vistas con el barrido de cada láser y la superposición de ambos, y mediante proyección en los planos x-z e y-z, a nivel de la intersección en A y B' a partir de un apilado de 25 planos cada 2µm. La escala, a menos que se especifique, corresponde a 5µm.

DISCUSIÓN.-

Consideraciones sobre la histoarquitectura del OB

Luego del trabajo pionero de Sheldon (1912), son relativamente escasos los reportes concernientes a la organización histo-citoarquitectural y conectividad del OB en teleósteos (Alonso et al 1987, 1989; Satou, 1990; Fuller y Byrd, 2005; Braubach et al., 2012, 2013), algunos de los cuales fueron revisados recientemente por Kermen et al. (2013). En peces eléctricos se restringe casi exclusivamente a *A. leptorhynchus* (Sas et al 1993), por lo cual en primer instancia estudiamos algunos aspectos de la histo-citoarquitectura del OB en *G. omarorum*. Esto nos permitió contar con una referencia anatómica más precisa para la correcta ubicación de los nichos proliferativos y localización de las nuevas células, tanto durante el proceso de migración como finalizado el mismo.

Constatamos que el OB de esta especie comparte la organización histoarquitectural previamente descrita en otros teleósteos, constando de cuatro capas: POFL, GL, ECL e ICL. En *G. omarorum* la ICL presentó una disposición central y forma redondeada en la región caudal del OB, extendiéndose en sentido dorso-medial en la región rostral del OB, como se ve delineada en los cortes coronales de la fig. 4N1/A y 4N2/A. Esta disposición es similar a la descrita en *A. leptorhynchus* y *G. carapo* (Sas et al., 1990; Maler et al., 1991; Lopes Corrêa et al., 1998), pero difiere de la encontrada en *O. mossambicus*, cuya ICL se localiza predominantemente en el cuadrante dorso-medial del OB (Simões et al., 2012). La comparación con *D. rerio* se dificulta, debido a que las descripciones difieren entre autores (Zupanc et al., 2005; Zupanc, 2008; Kress y Wullimann, 2012). La ECL del OB de *G. omarorum*, concéntrica a la ICL, presentó un límite externo irregular, de forma estrellada, de modo que aparenta contribuir a los septos que separan los glomérulos en la GL. La POFL no fue evidenciada claramente en *G. omarorum* con las técnicas utilizadas en este trabajo.

En cuanto a la citoarquitectura del OB de *G. omarorum*, se encontró una región central, cargada de cuerpos celulares pequeños, en su mayoría neuronales (HuC/HuD+, fig. 4N1/D y 4N2/D). La distribución heterogénea de HuC/D en el OB indicó que, a nivel central y dorso-medial, las neuronas marcadas presentan un citoplasma más pequeño y se encuentran en mayor cantidad y densidad que en el resto del OB. Esto coincide con las características de la capa granular descrita por Satou (1990) en *Cyprinus carpio*. Entre las neuronas de la ICL de *G. omarorum*, algunas correspondieron a neuronas catecolaminérgicas (fig. 4N1/E y 4N2/E). La abundancia de este tipo neuronal pareció ser intermedia a la reportada en *D. rerio* (Byrd y Brunjes, 1995; Kaslin y Panula, 2001; Kress y Wullimann, 2012) por un lado y en *Dicentrarchus labrax* (Batten et al., 1993; Sébert et al., 2008) y *Solea senegalensis*,

por otro (Rodríguez-Gómez et al., 2000). Es llamativo que, de acuerdo con Sas et al. (1990), la ICL de *A. leptorhynchus*, un gimnótido filogenéticamente cercano a *G. omarorum*, carece de células catecolaminérgicas, lo cual nos debería hacer cuestionar cuales son las bases moleculares que resultan en tal diferencia, prominente incluso en especies tan cercanas filogenéticamente. Estas diferencias entre las especies de teleósteos comparadas podrían además atribuirse a variaciones en la interpretación de la histo-citoarquitectura.

A su vez, las neuronas en la ECL y GL del OB presentaron una marcación HuC/HuD más intensa, con somas más grandes con una mayor relación citoplasma/núcleo y se dispusieron de forma más laxa entre sí (fig. 4N1/D y 4N2/D). Este patrón de marcación resulta similar a lo encontrado por otros autores en *D. rerio* (Grandel et al., 2006). En la ECL se constataron numerosas neuronas catecolaminérgicas, al igual que en los septos interglomerulares. Estos resultados son consistentes con los reportados en *Raja radiata* por Meredith y Smeets (1987), en *S. senegalensis* por Rodríguez-Gómez et al. (2000) y en *D. rerio* por Byrd y Brunjes (1995). La capa glomerular, sitio donde se encuentran los neuropilos donde se establece la primer sinapsis de las terminales del nervio olfatorio (Satou, 1990; Kermen et al., 2013), presenta en *G. omarorum* una profusa ramificación de procesos TH+ delgados, al igual que en *A. leptorhynchus* y *D. rerio* (Sas et al., 1990; Byrd y Brunjes, 1995).

La localización de neuronas catecolaminérgicas del OB que se ha descrito también para algunas especies reptiles, pájaros y mamíferos, muestra una localización periférica de fibras TH+ pero una ausencia o muy baja cantidad de marcación de somas a nivel central, los cuales también se localizan en la zona periglomerular (Hökfelt et al., 1984; Smeets y Steinbusch, 1990; Reiner et al., 1994, citados por Rodríguez-Gómez et al., 2000). En mamíferos, una fracción de las interneuronas inhibitorias en el OB originadas de forma posnatal son dopaminérgicas y forman parte de la capa glomerular como células periglomerulares (Hack et al., 2005), lo cual coincide con el patrón observado en los grupos antes mencionados. Aun así, en lampreas y otros teleósteos también se encontraron células TH+ predominantemente centrales, localizadas en la ICL o capa granular (Batten et al., 1993; Rodríguez-Gómez, et al., 2000), como encontramos en *G. omarorum*.

Este patrón citoarquitectural también es evidente con la marcación de β III tubulina, donde la zona observada con células pequeñas y muy próximas en la región central correspondería a las células granulares de la ICL, mientras que aquella en la que los cuerpos celulares son menos evidentes, correspondería a las capas ECL y GL.

Por otro lado, la marcación de DCX en el OB rostral y caudal presentó una localización predominantemente central (ICL) y dorso-medial. Debido a que es usualmente aceptado que la DCX se expresa en neuroblastos en migración, este patrón de marcación sugiere una vía de migración de nuevas neuronas.

En cuanto al subpallium rostral, las técnicas utilizadas evidenciaron una organización histo-citoarquitectural que comparte un patrón básico común con otros peces teleósteos, particularmente los gimnótidos (Sas et al., 1990; Maler et al., 1991; Batten et al., 1993; Lopes Corrêa et al., 1998; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Kaslin y Panula, 2001).

Distribución espacial de células proliferantes en el OB

Considerando la cantidad escasa y densidad baja de núcleos marcados con CldU en el OB de *G. omarorum* a tiempos de sobrevivida cortos, consideramos que esta región del telencéfalo carece de un nicho proliferativo propio. En el OB se encontraron muy pocas células CldU+ en una localización predominantemente periférica, que podrían corresponder, como propusieron Byrd y Brunjes (2001), a células gliales. El nicho proliferativo más cercano al OB se encontró en el epitelio ventricular de la porción más rostral del ventrículo telencefálico, adyacente a la zona dorso-medial del extremo caudal del OB (fig. 7N2/A). A este nivel, el epitelio ventricular mostró un aspecto cuboidal. En el extremo rostral del subpallium también se halló un claro nicho proliferativo, adyacente a sus subdivisiones dorsal y ventral (Vd y Vv, respectivamente, fig. 7N3/A). La mayoría de los núcleos marcados con CldU en esta zona presentaron una forma alargada y se dispusieron intercalados con otros elementos celulares del epitelio ventricular, de apariencia pseudoestratificada. En algunos casos se observaron hileras de varios núcleos, aspecto característico de células en proceso de migración. Estos nichos proliferativos han sido descritos anteriormente en *D. rerio* (Grandel et al., 2006; Adolf et al., 2006).

Dinámica de la migración de células en el telencéfalo rostral

El análisis de tiempos de sobrevivida post-CldU más prolongados permitió evidenciar la ocurrencia de varios tipos de migración dentro y entre los niveles estudiados.

La distribución espacial de los núcleos marcados con CldU en función del tiempo de sobrevivida a nivel del subpallium rostral es compatible con un proceso de migración radial. En efecto, la cantidad relativa de células marcadas del nicho proliferativo y el resto del subpallium evolucionan de manera opuesta (fig. 10C), alcanzando los núcleos Vv y Vd a los 7 días (fig. 7N3/B) y Vc a los 180 días (fig. 7N3/E). Un fenómeno similar de migración radial se observa en *zebrafish* (Grandel et al., 2006).

Como se mencionó previamente, entre 1 y 30 días, el número de células marcadas en el OB rostral y caudal de *G. omarorum* aumentó progresivamente 2.5 y 3.5 veces, respectivamente. Esta cifra es menor que la reportada en *D. rerio* (4 a 8 veces en el mismo lapso de tiempo; Byrd y Brunjes, 2001), sugiriendo una duración mayor de los

ciclos celulares en *G. omarorum*. Por otra parte, en el subpallium rostral se encontró un aumento transitorio a los 7 días post-CldU (fig. 6). Estos datos, sugieren la presencia de una migración rostral desde el subpallium rostral hacia el OB caudal y rostral. Dicho fenómeno presentaría dos componentes: uno tangencial y otro radial.

Esto coincide con lo propuesto en *D. rerio* por Grandel et al. (2006), Adolf et al. (2006) y Kishimoto et al. (2011), quienes proponen que el aumento progresivo de células marcadas en el OB se debe a la migración de células recién nacidas desde un nicho proliferativo ubicado caudalmente. Este fenómeno de migración tangencial se ve sustentado por la presencia de células proliferantes PSA-NCAM+ (marcador ampliamente utilizado para evidenciar células en migración) alineadas en la zona de transición entre el subpallium y el OB (Grandel et al., 2006). Más aún, los estudios de Kishimoto et al. (2011) permitieron la visualización directa del fenómeno de migración *ex vivo*.

En *G. omarorum*, las células proliferantes alcanzaron primero la zona medial del OB caudal a los 7 días post-CldU (fig. 7N2/C). En tiempos posteriores, se constató la presencia de células CldU+ en una extensión más amplia del OB caudal, en sentido medial-lateral. Este fenómeno aparece más retardado en el tiempo a nivel del OB rostral (comparar fig. 7N1/C-D). Estos datos sustentarían tanto el componente radial en la migración además del tangencial previamente mencionado. De modo que, en la ICL, la cantidad relativa de células marcadas alcanza un 60 y 40 % del total de células a nivel del OB rostral y caudal, respectivamente. En ambas regiones, la proporción de células marcadas en la ICL se mantiene en torno al 60% tanto a los 90 como 180 días de sobrevivida post-CldU. Esto coincide con lo observado en el teleosteo *Oreochromis mossambicus*, donde aproximadamente un 60-70% de las células marcadas se localizan en la ICL a los 100 días post administración de BrdU (Teles et al., 2012).

En suma, el componente radial de la migración rostral se daría en forma simultánea al tangencial; es decir, a medida que las células recién formadas van desplazándose a través del OB, también alcanzarían la región más central del OB. Este trayecto es análogo a la corriente rostral migratoria (RMS) de mamíferos (Doetsch et al., 1997; Wang et al., 2011).

Diferenciación neuronal de las células generadas a partir del nicho proliferativo del subpallium rostral

Contrariamente a lo esperado, no se encontraron células DCX-CldU positivas en tiempos cortos post-CldU en *G. omarorum*. En tiempos más largos, se evidenciaron muy escasas células doble marcadas, primero en el subpallium rostral (30 días), para luego aparecer en el OB caudal a los 90 días post-CldU.

A 7 días de sobrevida del pulso de CldU localizamos las primeras células marcadas que adquirieron una identidad neuronal, lo cual es evidenciado por su inmunoreactividad al anticuerpo anti-HuC/D. Dichas células se encontraron solamente en una ubicación paraventricular ventral del subpallium rostral (fig. 11). En *D. rerio*, esto se ha hecho evidente a partir de los 3 días post-administración de BrdU (Adolf et al., 2006). Podría ser de interés el estudio de tiempos intermedios de sobrevida en *G. omarorum*, entre las 24 horas y los 7 días, para analizar comparativamente la expresión del fenotipo neuronal entre estas especies. A 30 días de sobrevida, no sólo se encontraron células CldU+ coexpresando HuC/HuD en el subpallium rostral sino también en el OB caudal (fig. 12), y a los 90 días en el OB rostral y subpallium rostral (fig. 14). Las células doble marcadas CldU-HuC/HuD+ encontradas hasta el momento siempre se localizaron en la ICL designada anteriormente. Teniendo en consideración lo antes propuesto respecto a la migración radial y rostral de nuevas células, formadas a partir del ventrículo telencefálico, estos datos sugieren que algunas de las mismas se diferencian hacia la estirpe neuronal. Es decir que este nicho proliferativo es neurogénico.

Algunas de las nuevas neuronas generadas en el subpallium y OB de *G. omarorum*, mostraron además un grado de maduración mayor, evidenciado por la expresión de una enzima de síntesis de neurotransmisores en tiempos de sobrevida post-CldU de 90 y 180 días. En *D. rerio*, este grado de maduración se evidenció en muy pocas nuevas neuronas del OB a los 46 días post-BrdU (Grandel et al., 2006), mientras que en *G. omarorum* no observamos tal evidencia. Si bien Grandel et al. sugieren que es rara la adición de nuevas células que expresan TH en el OB, la cantidad de células que encontramos que incorporaron CldU e inmunoreactivas a TH a los 180 días post-administración de CldU es apreciablemente mayor que el número encontrado por estos autores a los 46 días. Seguramente, en su caso, hubiera sido necesario esperar mayores tiempos para corroborar lo antes mencionado.

Debido a que la tirosina hidroxilasa es la enzima paso límite en la vía biosintética de las catecolaminas, se puede afirmar que las neuronas TH+ son catecolaminérgicas. Si bien para poder discriminar el fenotipo bioquímico dopaminérgico del noradrenérgico sería necesario combinar esta técnica con inmunohistoquímica para la enzima dopamina β -hidroxilasa, a partir del conocimiento de otras especies de teleósteos podemos suponer que las neuronas TH+ aquí encontradas en el OB y subpallium rostral de *G. omarorum* corresponderían a interneuronas dopaminérgicas periglomerulares (Sas et al., 1990; Batten et al., 1993; Kaslin y Panula, 2001).

La demostración de marcadores de diferenciación neuronal temprana y de neuronas maduras en células que retienen un marcador de síntesis de ADN por una larga duración, constituye el primer aporte al conocimiento de la neurogénesis postnatal de interneuronas en el OB en *G. omarorum*. Esto reafirma la existencia de una RMS

no solamente en mamíferos sino también en los teleósteos y, por tanto, constituye un carácter filogenéticamente conservado. Por eso *G. omarorum*, al igual que *D. rerio*, podría constituir un buen modelo para el estudio comparativo de la RMS y de los mecanismos que modulan la neurogénesis posnatal en vertebrados.

CONCLUSIONES

Estos datos, en conjunto, evidencian que en *G. omarorum* persisten nichos proliferativos en el epitelio ventricular del subpallium rostral. Además, los resultados aquí presentados muestran que en el OB de *G. omarorum* se generan nuevas neuronas, algunas de las cuales corresponden a interneuronas dopaminérgicas. La ausencia de un nicho proliferativo obvio en el OB, sumado al revelado de un desplazamiento gradual de células proliferantes desde el ventrículo telencefálico hacia el OB, indicaría que las nuevas neuronas del OB provienen del subpallium rostral. Por tanto, en *G. omarorum*, al igual que en *D. rerio*, ocurriría un fenómeno análogo a la corriente migratoria rostral observada en mamíferos. Por tanto, los resultados obtenidos aportan mayores evidencias en cuanto a la generalidad del proceso.

PERSPECTIVAS

Para confirmar estadísticamente este fenómeno, será necesario aumentar el N de todos los grupos experimentales y, a su vez, abordar nuevos grupos con tiempos de sobrevida post-CldU más cortos y largos que los utilizados en este trabajo. El análisis de especímenes de sexo femenino (ya que en este estudio se utilizaron sólo los de sexo masculino), permitirá evaluar un potencial dimorfismo sexual en la modulación de la neurogénesis posnatal.

La doble marcación de células con PSA-NCAM y un análogo de timidina en cortes sagitales podría utilizarse como herramienta a futuro para apoyar los datos obtenidos en este trabajo. La confirmación última de este fenómeno habría de alcanzarse mediante realización de experimentos *ex vivo* como los realizados por Kishimoto et al. (2011).

Por otra parte, es de interés el análisis de las diferentes especies neuronales presentes en el OB, y si estas son originadas posnatalmente o no en esta especie. Por lo tanto, se plantea la realización de inmunohistoquímica con marcadores para calbindina, calretinina y GABA en diferentes tiempos de sobrevida para estudiar el curso temporal de la diferenciación hacia los diferentes tipos neuronales en la vida posnatal.

REFERENCIAS.-

- Abrous, D.N., Wojtowicz, J.M.** (2008). Neurogenesis and the hippocampal memory system. En: Adult Neurogenesis (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 445-462, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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: 278-293.
- Alonso, J. R., Lara, J., Miguel, J. J., Aijón, J.** (1987). Ruffed cells in the olfactory bulb of freshwater teleosts. I. Golgi impregnation. *J. Anat.* 155: 101-107.
- Alonso, J. R., Lara, J., Vecino, E., Coveñas, R., Aijón, J.** (1989). Cell proliferation in the olfactory bulb of adult freshwater teleosts. *J. Anat.* 163: 155-163.
- Altman, J.** (2011). The discovery of adult mammalian neurogenesis. En: Neurogenesis in the adult brain (I. T. Seki, K. Sawamoto, J.M, Parent, A. Alvarez-Buylla, eds). Springer. 1era Edición.
- Altman, J., Das, G.D.** (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124(3): 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:287-293.
- Batten, T.F.C., Berry, P.A., Maqbool, A., Moons, L., Vandesande, F.** (1993). Immunolocalization of catecholamine enzymes, serotonin, dopamine and L-dopa in the brain of *Dicentrarchus labrax* (Teleostei). *Brain Res. Bull.* 31: 233-252.
- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H., Werner, M.** (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochem. Cell Bio.* 115: 293-299.
- Braubach, O.R., Fine, A., Croll, R.P.** (2012). Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 520(11): 2317-39.
- Braubach, O.R., Miyasaka, N., Koide, T., Yoshihara, Y., Croll, R.P., Fine, A.** (2013). Experience-dependent versus experience-independent postembryonic development of distinct groups of zebrafish olfactory glomeruli. *J. Neurosci.* 33(16): 6905-16.
- Broglio, C., Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F.M., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F., Salas, C.** (2005). Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res. Bull.* 66(4-6): 277-81.
- Byrd, C.A., Brunjes, P.C.** (1995). Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J. Comp. Neurol.* 358(2): 247-59.
- Byrd, C.A., Brunjes, P.C.** (2001). Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neurosci.* 105(4): 793-801.
- Castelló, M.E., Caputi, A.** (2008). Postnatal brain development of *Gymnotus omarorum*. *Abstr. Soc. Neurosci.* 99.18/UU66.
- Castelló, M.E., Iribarne, L.** (2010). Postnatal cell proliferation in the brain of the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Abstr. V LASDBP-100.*
- Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C., Strambi, A.** (2002). The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 132(1): 1-15.
- 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: 4293-4303.

- De Nevi, E., Marco-Salazar, P., Fondevila, D., Blasco, E., Pérez, L., Pumarola, M.** (2013). Immunohistochemical study of doublecortin and nucleostemin in canine brain. *Eur. J. Histochem.* 57(1): e9.
- Delgado, L. M., Schmachtenberg, O.** (2011). Neurogenesis in the adult goldfish cerebellum. *Anat. Rec.*, 294: 11–15.
- Doetsch, F.** (2003a). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 13: 543–550.
- Doetsch, F.** (2003b). The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 6(11): 1127–1134.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Alvarez-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.
- 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.
- Fernández, A.S., Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S.** (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (*Cypridontiform: Rivulidae*): A comparative study. *Neuroscience*.189: 12–24.
- Fuller, C.L., Byrd, C.A.** (2005). Ruffed cells identified in the adult zebrafish olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 379(3): 190–4.
- Gnegy, M.E.** (2012). Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology* (Brady, S.T., Siegel, G.J., Albers, R.W., Price, D.L., eds) pp 283–299, Academic Press, Waltham.
- 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.
- Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P. M., Götz, M.** (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci.* 8(7): 865–72.
- Harvey-Girard, E., Tweedle, J., Ironstone, J., Cuddy, M., Ellis, W., Maler, L.** (2010). Long term recognition memory of individual conspecifics is associated with telencephalic expression of *Egr-1* in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Comp. Neurol.* 518: 2666–2692.
- Harvey-Girard, E., Giassi, A.C., Ellis, W., Maler, L.** (2012). Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: IV. Expression of conserved transcription factors and implications for the evolution of dorsal telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 520(15): 3395–413.
- Hermann, A., Suess, C., Fauser, M., Kanzler, S., Witt, M., Fabel, K., Schwarz, J., Höglinger, G.U., Storch A.** (2009). Rostro-caudal gradual loss of cellular diversity within the periventricular regions of the ventricular system. *Stem Cells.* 27: 928–941.
- Hinsch, K., Zupanc, G. K. H.** (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience.* 146: 679–696.
- Hökfelt, T., Martensson, R., Björklund, A., Kleinau, S., Goldstein, M.** (1984). Distributional maps of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. En: *Classical Transmitters in the CNS. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Part I, vol. 2.* (Björklund, A., Hökfelt, T., eds.) pp. 277–379, Elsevier, Amsterdam.
- Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T., Takeuchi, H.** (2012). p53 Mutation suppresses adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423(4): 627–31.
- Jun, J.J., Harvey-Girard, E., Longtin, A., Maler, L.** (2012). Spatial memory shapes active sensory sampling in pulse-type electric fish. *Front. Behav. Neurosci.* Tenth International Congress of Neuroethology, College Park. Maryland, USA.
- Kaslin, J., Panula, P.** (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 440(4): 342–77.
- Kaslin, J., Ganz, J., Brand, M.** (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 101–122.

- 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. *J. Neurosci.* 29(19): 6142-6153.
- Kempermann, G.** (2006). *Adult neurogenesis. Stem cells and neuronal development in the adult brain.* Oxford University Press. New York.
- Kermen, F., Franco, L.M., Wyatt, C., Yaksi, E.** (2013). Neural circuits mediating olfactory-driven behavior in fish. *Front. Neural Circuits* 7:62.
- Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami, K., García-Verdugo, J.M., Sawamoto, K.** (2011). Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 519(17): 3549-65.
- Kosaka, K., Aika, Y., Toida, K., Heizmann, C.W., Hunziker, W., Jacobowitz, D.M., Nagatsu, I., Streit, P., Visser, T.J., Kosaka, T.** (1995). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci. Res.* 23(1): 73-88.
- Kress, S., Wullmann, M. F.** (2012). Correlated basal expression of immediate early gene *egr1* and tyrosine hydroxylase in zebrafish brain and downregulation in olfactory bulb after transitory olfactory deprivation. *J. Chem. Neuroanat.* 46(1-2): 51-66.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo J.M., Herrera DG, García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A.** (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 28:713-726.
- Lim, D.A., Huang, Y., Alvarez-Buylla, A.** (2008). Adult subventricular zone and olfactory bulb neurogenesis. En: *Adult Neurogenesis.* (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 175-206, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Lindsey, B.W., Tropepe, V.** (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology.* 80: 281-307.
- Lledo, P.M.** (2008). Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb. En: *Adult Neurogenesis* (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 425-443, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Llorens-Martín, M., Trejo, J.L.** (2011). Multiple birthdating analysis in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects. *Frontiers Neurosci.* 5: 1-8.
- Lopes Corrêa, S.A., Corrêa, F.M.A., Hoffmann, A.** (1998). Stereotaxic atlas of the telencephalon of the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J. Neurosci. Methods* 84: 93-100.
- Ma, D.K., Ming, G., Gage, F.H., Song, H.** (2008). Neurogenic niches in the adult mammalian brain. En: *Adult Neurogenesis.* (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 207-225, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Maeyama, K., Nakayasu, H.** (2000). Postembryonic neurogenesis in zebrafish (*Danio rerio*) brain: Presence of two different systems. *Zool. Sci.* 17: 959-966.
- Maler, L., Sas, E., Johnston, S. A. and Ellis, W. G.** (1991). An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 1-38.
- Marusich, M.F., Weston, J.A.** (1992). Identification of early neurogenic cells in the neural crest lineage. *Dev. Biol.* 149: 295-306.
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesi, B., Takamiya, M., Lam, C.S., Kah, O., Bally-Cuif, L., Strähle, U.** (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia.* 58(7): 870-88.
- Meek, J. and Nieuwenhuys, R.** (1998). Holosteans and Teleosts. In: *The Central Nervous System of Vertebrates* (ed. R. Nieuwenhuys, H.J. Ten Donkelaar and C. Nicholson), pp. 759-913. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag.
- Meredith, G.E., Smeets, W.J.A.J.** (1987). Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the forebrain and midbrain of *Raja radiata*: evidence for a substantia nigra and ventral tegmental area in cartilaginous fish. *J. Comp. Neurol.* 265: 530-548.
- Mueller, T., Dong, Z., Berberoglu, M.A., Guo, S.** (2011). The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Res.* 1381:95-105.

- Nieuwenhuys, R.** (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain Behav. Evol.* 73: 229–252.
- Northcutt, R.G.** (2008). Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Res. Bull.* 75: 191–205.
- Nowakowski, R.S., Hayes, N.L.** (2008). Numerology of neurogenesis: characterizing the cell cycle of neurostem cells. En: *Adult Neurogenesis*. (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 7-23, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Olivera, V., Fernández, A., Torres, M., Rosillo, J.C., Peterson, D.A., Castelló, M.E.** (2012a). Comparative study of brain proliferative zones between species with different predominant sensory modalities. *Abstr. V LASDBP-161*
- Olivera, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E.** (2012b). Spatial distribution and cellular characterization of adult brain proliferation zones in *Gymnotus omarorum*. *Abstr. Weakly electric fish meeting. International Congress of Neuroethology* 19.
- Olivera, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E.** (2012c) Caracterización de las zonas proliferativas del cerebro de *Gymnotus omarorum* durante el desarrollo postnatal. XIV Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis, Uruguay.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C.** (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J. Neurosci.* 24: 2335–2342.
- Reiner, A., Karle, E.J., Anderson, K.D., Medina, L.** (1994). Catecholaminergic perikarya and fibers in the avian nervous system. En: *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates, Part I.* (Smeets, W.J.A.J., Reiner, A., eds.) pp. 135–181, Cambridge University Press, Cambridge.
- Riquelme, P.A.; Drapeau, E; Doetsch, F.** (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 123-137.
- Rodríguez-Gómez, F.J., Rendón-Unceta, M. C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A.** (2000). Localization of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J. Chem. Neuroanat.* 19(1): 17-32.
- Roybon, L., Deierborg, T., Brundin, P., Li, J.Y.** (2009). Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 29:232–43.
- Sas, E., Maler, L., Tinner, B.** (1990). Catecholaminergic systems in the brain of a gymnotiform teleost fish: an immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 292: 127–162.
- Sas, E., Maler, L., Weld, M.** (1993). Connections of the olfactory bulb in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol.* 335(4): 486-507.
- Satou, M.** (1990). Synaptic organization, local neuronal circuitry, and functional segregation of the teleost olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.* 34: 115– 142.
- Sébert, M.E., Weltzien, F.A., Moisan, C., Pasqualini, C., Dufour, S.** (2008). Dopaminergic systems in the European eel: characterization, brain distribution, and potential role in migration and reproduction. *Hydrobiología.* 602:27-46.
- Seri, B., García-Verdugo, J., McEwen, B., Alvarez-Buylla, A.** (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21: 7153–7160.
- Sheldon, R.E.** (1912). The olfactory tracts and centers in teleosts. *J. Comp. Neurol.*, 22: 177–339.
- 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.
- Smeets, W.J.A.J., Steinbusch, H.W.M.** (1990). New insights into the reptilian catecholaminergic systems as revealed by antibodies against the neurotransmitters and their enzymes. *J. Chem. Neuroanat.* 3: 25–44.
- Sullivan, J.M., Benton, J.L., Sandeman, D.C., Beltz., B.S.** (2007). Adult neurogenesis: A common strategy across diverse species. *The Journal of Comp. Neurol.* 500: 574-584.
- Taupin, P.** (2006). Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. *Stem Cell Rev.* 2(3): 213-219.

- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vragas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, V., García-Verdugo, J.M., Doetsch, F.** (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 3: 279-288.
- Teles, M.C., Sîrbulescu, R.F., Wellbrock, U.M., Oliveira, R.F., Zupanc, G.K.** (2012). Adult neurogenesis in the brain of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Comp. Physiol. A.* 198(6): 427-449.
- Tozzini, E.T., Baumgart, M., Battistoni, G., Cellerino, 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): 241-51.
- Wang, C., Liu, F., Liu, Y.Y., Zhao, C.H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., Yang, Z.** (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21(11): 1534-50.
- Zupanc, G.K.H.** (1996). Postembryonic Development of the Cerebellum in Gymnotiform Fish. *J. Comp. Neurol.* 370: 443-464.
- Zupanc, G.K.H.** (1999). Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *J. Exp. Biol.*, 202: 1435-1446.
- Zupanc, G.K.H.** (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav. Evol.* 58: 250-275.
- Zupanc, G.K.H.** (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A* 192: 649-670.
- Zupanc, G.K.H.** (2008). Adult neurogenesis in teleost fish. En: *Adult Neurogenesis.* (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 571-592, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Zupanc, G.H.K., Zupanc, M.M.** (1992). Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia sp.*). *PNAS.* 89: 9539-9543.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I., Ott, R., Rascher, G.B.** (1996). Postembryonic Development of the Cerebellum in Gymnotiform Fish. *J. Comp. Neurol.* 370: 443-464.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I.** (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353(2): 213-233.
- Zupanc, G.H.K., Hinsch, K., Gage, F.H.** (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* 488(3): 290-319.