



PEDECIBA

BIOLOGÍA -NEUROCIENCIAS

TESIS DE DOCTORADO

Características distintivas del bulbo olfatorio de *Austrolebias charrua* como nicho neurogenico y su vínculo con la vía olfatorio-retinal.

Juan Carlos Rosillo Marti

**ORIENTADORES: Anabel Fernández Constenla
José Manuel García-Verdugo**

IIBCE

2017

**TESIS DE DOCTORADO
SUBÁREA: NEUROCIENCIAS**

**Características distintivas del Bulbo olfatorio de *Austrolebias
charrua* como nicho neurogénico y su vínculo con
la vía olfacto-retinal.**

Juan Carlos Rosillo Martí

TRIBUNAL

Presidente: Dr. Ángel Caputi

**Vocales: Dra. Patricia Cassina
Dr. Flavio Zolessi**

2017

*Dedicado a mis padres,
ejemplos de trabajadores
incansables y máxima
humildad.*

INDICE

RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ORGANIZACIÓN Y CONTENIDO.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 NEUROGÉNESIS ADULTA: ANTECEDENTES	1
1.2 CÉLULAS MADRE NEURALES Y NICHOS NEUROGÉNICOS.....	2
1.3 NEUROGÉNESIS ADULTA: METODOLOGÍAS RELEVANTES PARA SU DEMOSTRACIÓN	4
1.3.1 Marcadores de proliferación celular en el estudio de la Neurogénesis.....	5
1.4 ESTUDIOS COMPARATIVOS EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA DE LOS VERTEBRADOS.....	7
1.4.1 Peces teleosteos: Modelos emergentes para el estudio de la neurogénesis ..	9
1.4.2 Austrolebias como modelo validado para estudiar la neurogénesis adulta: aporte de nuestro grupo	10
1.4.3 Actividad neurogénica en relación a las estructuras sensoriales en peces..	11
1.5 NEUROGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO: UNA RESPUESTA A LAS NECESIDADES DEL SISTEMA	12
1.5.1 El circuito en roedores y la banda migratoria rostral.....	12
1.5.2 El circuito olfatorio en peces y la banda migratoria rostral	14
1.5.3 La olfacción y su vínculo con el sistema visual: nervio terminal.....	14
2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	16
2.1 HIPÓTESIS PROPUESTAS.....	16
2.2 OBJETIVO GENERAL	20
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	20
HIPÓTESIS 1	20
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	21
3.2 FIJACIÓN, DISECCIÓN Y OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS DEL CEREBRO DE LOS ESPECÍMENES	21
3.3 ESTUDIO DE LA CITOARQUITECTURA DEL BULBO OLFATORIO DE AUSTROLEBIAS CHARRUA	22
3.3.1 Tinción con Azul de Metileno Boráxico	22
3.3.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	23

3.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido	24
3.3.4 Técnica de Cajal de Castro	24
3.3.5 Impregnación argéntica con el método de Golgi.....	25
3.3.6 Técnica de NADPH Diaforasa.....	25
3.3.7 Inmunohistoquímica con Oro Coloidal	25
3.4 ADMINISTRACIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN DIFERENTES TIEMPOS	27
3.5 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y SU ESTIRPE CELULAR.....	29
3.5.1 Cuantificación de las poblaciones de células proliferantes en Bulbo olfatorio y Telencéfalo.....	29
3.5.2 Detección inmunohistoquímica de la estirpe de las células proliferativas	30
3.5.3 Controles.....	32
3.9 DETECCIÓN DE CÉLULAS GNRH EN LA VÍA OLFAC-TO-RETINAL	36
3.9.1 Análisis de Imágenes en Microscopio Confocal.....	36
3.10 APLICACIÓN DE TRAZADOR RETRÓGADO EN AUSTROLEBIAS AFFINIS.....	37
4. RESULTADOS CAPÍTULO 1	38
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PECES ANUALES	38
4.2 ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES EXTREMAS DEL HÁBITAT	41
4.3 ANATOMÍA DEL CEREBRO DE AUSTROLEBIAS CHARRUA	41
4.4 ANATOMÍA DEL BULBO OLFATORIO DE AUSTROLEBIAS CHARRUA.....	43
5. DISCUSIÓN.....	47
6. RESULTADOS CAPÍTULO 2	49
6.1 CITOARQUITECTURA DE LOS BULBOS OLFATORIOS.	49
6.1.1 Cajal de Castro y Golgi.....	49
6.1.2 Detección de NADPH-diaforasa	52
6.1.3 Detalles estructurales de la capa glomerular	54
6.2.1 Cuantificación del número de células proliferantes en el Bulbo olfatorio y Telencéfalo.....	57
6.2.2 Identificación por Inmunohistoquímica de células proliferantes propuestas como candidatas a células madre	58
6.2.3 Las glías radiales están unidas por Conexina 43 (Cx 43).....	60
6.3 COMPOSICIÓN CELULAR Y SUS DETALLES ESTRUCTURALES	62
6.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS SUPERFICIES VENTRICULARES.	66

6.5 CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y NEUROGÉNESIS EN DIFERENTES VENTANAS TEMPORALES DE ADMINISTRACIÓN	68
6.5.1 Ruta de migración de neuroblastos a lo largo del cerebro anterior hasta el Bulbo olfatorio.....	74
7. DISCUSIÓN.....	78
7.1 TIPOS CELULARES DE LA PARED VENTRICULAR.....	78
7.2 GLÍAS RADIALES.....	80
7.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CILIOS.....	82
7.4 BANDA MIGRATORIA ROSTRAL EN LOS BULBOS OLFATORIOS	82
8. CONCLUSIONES.....	85
9. RESULTADOS CAPÍTULO 3.....	87
9.1 EXPERIMENTOS DE TRAZADORES PARA DETERMINAR EL ORIGEN Y LA TRAYECTORIA DEL NERVIO TERMINAL EN A. CHARRUA	87
9.1.1 Experimentos con Biocitina-Alexa 488	87
9.1.2 Experimentos “in vivo” con Biocitina y HRP	94
9.1.3 Experimentos en tejidos postfijados con el Dil	96
9.2 DETECCIÓN DE CÉLULAS GNRH EN LA VÍA OLFATO-RETINAL	99
9.3 DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DEL NERVIO TERMINAL EN AUSTROLEBIAS AFFINIS CON EL USO DE BIOCITINA COMO SUSTANCIA TRAZADORA.	101
10. DISCUSIÓN.....	103
10.1 COMPARACIÓN DE SUSTANCIAS TRAZADORAS UTILIZADAS	105
10.2 FIBRAS QUE CONFORMAN EL TRACTO OLFATO-RETINAL DEL NERVIO TERMINAL	106
10.3 CUERPOS CELULARES MARCADOS A TRAVÉS DEL TRAYECTO DEL NERVIO TERMINAL ...	107
10.4 POSIBLES IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LOS HALLAZGOS ACTUALES	109
11. CONCLUSIONES.....	110
12. CONCLUSIONES GENERALES.....	111
13. PERSPECTIVAS.....	113
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
15. ANEXOS.....	137

RESUMEN

La neurogénesis adulta es un proceso de plasticidad del sistema nervioso conservado en todos los vertebrados e invertebrados. Esta plasticidad confiere diferentes capacidades de crecimiento, auto-reparación y respuesta a necesidades del sistema.

El conocimiento de los diferentes sitios donde esta ocurre, conlleva a comprender los mecanismos que involucran la neurogénesis adulta. Estos sitios denominados nichos neurogénicos también presentan características conservadas y propias dependiendo de la especie. La comparación en la diversidad de modelos biológicos nos aporta una visión más amplia de la neurogénesis y nos proporciona diferentes herramientas para su mejor comprensión.

Las particularidades que ofrece nuestro modelo biológico *Austrolebias charrua*, un pez anual con una importante actividad neurogénica, en todo su ciclo de vida, nos brinda la posibilidad de analizar los sitios neurogénicos con diferentes herramientas metodológicas en periodos de tiempo trascendentes dada la corta vida del animal.

El trabajo de Investigación realizado en esta Tesis, a través de la aplicación de diferentes marcadores de proliferación celular análogos a la Timidina, junto con técnicas de histología clásicas; inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB), revelaron aportes significativos referentes a las capacidades neurogénicas en el Bulbo olfatorio (BO) del pez y su fuerte vinculación con el Sistema visual.

- 1) Se demostró la existencia de tres regiones neurogénicas con características propias en la pared ventricular del telencéfalo a nivel del BO a diferencia de los descritos en los mamíferos.
- 2) La composición celular y el ritmo de proliferación de los nichos es diferente en cada uno de ellos.
- 3) Las glías radiales ofician de progenitoras fundamentales en la zona de transición entre el BO y los Lóbulos telencefálicos (Región neurogénica 1). Existen al menos dos tipos de glías radiales diferenciables por MET y por Inmunohistoquímica. Estas glías se encuentran conectadas por uniones tipo "Gap".

-
- 4) El análisis de la pared ventricular por MEB mostró que solo se observan células monociliadas, provistas de dos tipos de cilios largos o cortos dependiendo de la región.
 - 5) En la pared ventricular de la Región neurogénica 2 existe una población estable de células madre, alrededor de un 10%, que se repite en otras zonas ventriculares del cerebro adulto.
 - 6) Los nichos de la zona dorsal (Región neurogénica 1) y ventral (Región neurogénica 3) son sitios donde existen migraciones hacia diferentes regiones. Por lo que se deduce que tienen diferentes propósitos funcionales.
 - 7) En la región ventral, la migración ocurre hacia la zona rostral del BO, recorrido similar a la banda migratoria rostral descrita en mamíferos y en pez Cebra.
 - 8) La aplicación de trazadores neuronales desde la retina nos muestra la existencia de una conexión proveniente del par craneal 0 que vincula ambos sistemas sensoriales y que se origina de un grupo neuronal importante localizado en la porción rostral coincidente con la región transicional entre el BO y los Lóbulos telencefálicos (Región neurogénica 1).

De esta Tesis surgieron tres publicaciones en revistas arbitradas, dos de ellas con primera autoría y un Capítulo de libro que se adjuntan en la sección Anexos.

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo quiero dejar constancia de mi especial agradecimiento a:

A mis orientadores; los Doctores José Manuel García-Verdugo y Anabel Fernández por sus valiosos apoyos e intercambios de experiencias en este amplio campo de las Neurociencias Comparativas. Amigos excelentes como personas y con la envidiable virtud de impulsar el crecimiento profesional de sus estudiantes y colegas. Queden con ellos mi eterno respeto y admiración.

A mis amigas y porqué no, orientadoras también; Silvia Olivera-Bravo y Gabriela Casanova por continuar juntos en esta línea de investigación y próximas que puedan surgir.

A Nicolás Papa por su consecuente ayuda en la recolección de especímenes.

A mi entusiasta equipo de trabajo Inés Berrosteguieta, Magela Rodao y Maximiliano Torres por sus valiosos aportes y activa participación en continuar conociendo más acerca del Sistema Nervioso de las Austrolebias y otras especies.

A Feli y José Ramón mis espejos de paciencia y perseverancia.

A los Doctores Angel Caputi y Flavio Zolessi, integrantes de la Comisión de Seguimiento de Investigación, por sus muy oportunas sugerencias para el buen desarrollo del tema abordado.

A la Dra. Patricia Cassina, quien me atrevo a considerarla mi “gatillo impulsor clave” en esta etapa de culminación del Doctorado.

A todos mis amigos y colegas de las Instituciones siguientes:

- 1) Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”*
- 2) Departamento de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, España*
- 3) Unidad de Microscopía Electrónica, Fcien, UdelaR*
- 4) Departamento de Histología/Embriología, Fmed, UdelaR*

*A mi adorada compañera de vida Daiana quien junto a nuestros afectos familiares y amigos excepcionales **SIEMPRE** están presentes.*

Para finalizar agradezco enormemente el apoyo financiero recibido por parte de las entidades siguientes; PEDECIBA, ANII y CAP que hicieron posible la realización de este estudio.

ORGANIZACIÓN Y CONTENIDO

En esta Tesis se demuestra la existencia de tres nichos neurogénicos intrínsecos en el Bulbo olfatorio de *Austrolebias charrua*. Cada nicho neurogénico presenta características propias que probablemente sirvan a distintos propósitos funcionales.

La actividad neurogénica olfativa no trabaja sola, seguramente está modulada por la información visual mediante la existencia de la vía olfacto-retinal, demostrada mediante la aplicación de trazadores neuronales.

Tomando como base los datos obtenidos durante el desarrollo de la investigación, organizamos la Tesis en siete secciones fundamentales:

- I) **Introducción**, en la que se exponen antecedentes del tema, las preguntas que nos condujeron a generar nuestras hipótesis y los objetivos generales y específicos.
- II) **Estrategia de Investigación**, en esta sección se detallan las metodologías utilizadas para lograr cada objetivo planteado.
- III) **Capítulo 1** se presenta la elección del modelo biológico y las particularidades del ciclo de vida. También se describe brevemente la anatomía general del cerebro de los peces del género *Austrolebias*, haciendo énfasis en el sistema olfatorio.
- IV) **Capítulo 2** en el que se describe la citoarquitectura del Bulbo olfatorio con diferentes abordajes experimentales, la dinámica de la proliferación celular y la neurogénesis.
- V) **Capítulo 3** donde se exponen los experimentos que demuestran la vía olfacto-retinal como parte del sistema del Nervio terminal en *A. charrua* y *A. affinis*.
- VI) **Conclusiones y perspectivas de futuro desarrollo**
- VII) **Referencias Bibliográficas**

ABREVIATURAS

- **BLBP** *proteína de unión lipídica cerebral*
- **BMR** *banda migratoria rostral*
- **BrdU** *5-bromo-2'-desoxiuridina*
- **BO/OB** *bulbo olfatorio*
- **CB** *cerebelo*
- **CldU** *5-Cloro- 2'-desoxiuridina*
- **DAB** *diaminobenzidina*
- **DAPI** *4', 6- diamidino- 2- fenilindol*
- **Dil** *1,1'-Dioctadecil-3,3,3'-Tetrametil-Indocarbocianina Perclorato*
- **Go** *glomérulo olfatorio*
- **GR** *glia radial*
- **GFAP** *proteína fibrilar ácida glial*
- **GnRH** *hormona liberadora de gonadotropina*
- **HuC/D** *proteína neuronal humana*
- **IdU** *5-Iodo-2'-desoxiuridina*
- **IHQ** *inmunohistoquímica*
- **MET** *microscopía electrónica de transmisión*
- **MEB** *microscopía electrónica de barrido*
- **NADPH** *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato*
- **NeuN** *proteína neuronal nuclear*
- **NT** *nervio terminal*
- **PAF** *para-formaldehído*
- **SN** *sistema nervioso*
- **SNC** *sistema nervioso central*
- **Tel** *telencéfalo*
- **Teld** *telencéfalo dorsal*
- **Telv** *telencéfalo ventral*
- **TO** *tectum óptico*
- **TL** *torus longitudinalis*
- **VT** *ventrículo telencefálico*
- **ZTr** *zona de transición bulbo olfatorio/telencéfalo*
- **ZM** *zona medial*



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Neurogénesis adulta: antecedentes

Los estudios del proceso neurogénico o generación constante de neuronas en el cerebro adulto, cada día cobra especial interés. Estos estudios incluyen áreas relacionadas con el desarrollo del cerebro, el aprendizaje y el envejecimiento. El gran desafío que se presenta es por un lado; saber las áreas donde hay neurogénesis, conocer las células responsables de dicha neurogénesis y por último entender los mecanismos de la neurogénesis adulta como un proceso importante de plasticidad del sistema nervioso y vincularlos con eventos fisiológicos y patológicos.

En la actualidad es aceptado que algunas poblaciones neuronales en el cerebro de individuos adultos nacen, migran, se diferencian y se integran a circuitos preexistentes (Lindsey y Tropepe, 2006). Esta concepción es nueva dado que a finales del siglo XIX se pensaba que lo único que sucedía en el sistema nervioso adulto era la muerte neuronal y que esas neuronas no podrían suplantarse. Esta hipótesis se basó en investigaciones realizadas por personalidades como Koelliker, His y Ramón y Cajal (citados por Gross, 2000). Sus hallazgos, basados en la interpretación de estudios histológicos del Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y del hombre apuntaban a que luego de concluido el desarrollo embrionario, y poco después del nacimiento la citoarquitectura quedaba establecida sin modificaciones. Esta idea también se reforzaba con el hecho de que las lesiones en el sistema nervioso podían ser, según la importancia de la misma, invalidantes y con pocas posibilidades de recuperación.

La neurogénesis postnatal es un proceso de etapas consecutivas, que dan origen al nacimiento de neuronas bajo condiciones fisiológicas en el cerebro maduro. Este fenómeno plástico puede estar referido a situaciones como; 1) mantenimiento y crecimiento del SNC y 2) como respuesta a estimulación por injuria o a diferentes estímulos internos y externos que provienen del medio ambiente. Todo esto está orquestado por señales moleculares y/o factores de crecimiento y comunicación intercelular.

Los estudios sobre neurogénesis postnatal han demostrado que las nuevas neuronas generadas además de participar en la reparación de tejidos también participan en la modulación de funciones como la memoria y el aprendizaje (Gould y col., 1999; Gould y Gross., 2002; Kempermann y col, 2002; Yau y col., 2015).

Estas neuronas se generan en sitios especializados, localizados en zonas ventriculares del cerebro como resabios embrionarios, con la salvedad del giro dentado de mamíferos donde las células madre y las nuevas neuronas comparten espacio.

1.2 Células madre neurales y nicho neurogénico

En términos generales, se acepta que una célula madre es aquella célula no especializada que preserva la capacidad de autorrenovarse y bajo condiciones apropiadas, puede dar origen a una amplia variedad de tipos celulares en el cuerpo animal (Galvin y Jones, 2002).

El nicho neurogénico es el sitio donde se encuentran las células madre neurales, que conservan características embrionarias provenientes del tubo neural, y que tienen la capacidad de dividirse y generar células iguales a sí mismas (divisiones simétricas), además mediante divisiones asimétricas son capaces de generar células progenitoras que darán origen a glías o neuronas (Fig. 1) (Arias-Carrión y col., 2007).

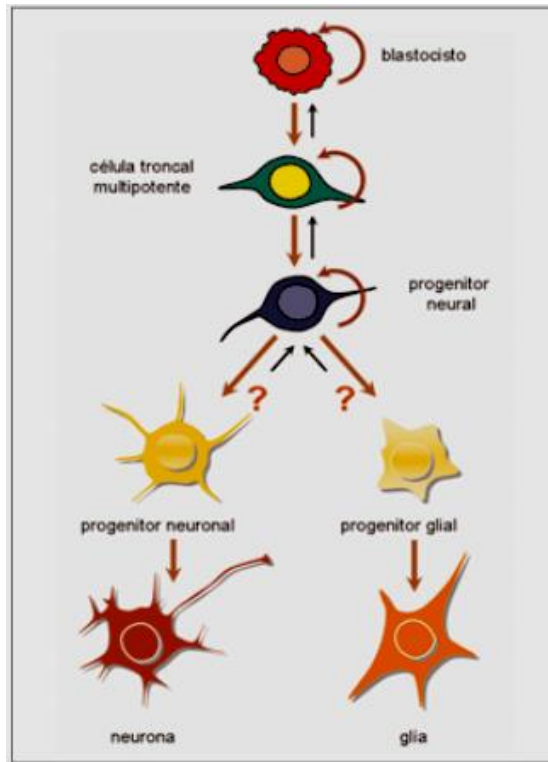


Figura 1. Células troncales con potencial capacidad neurogénica. La figura muestra, en orden jerárquico, las células troncales que en los mamíferos pueden dar origen a neuronas (**Modificado de Arias-Carrión y col., 2007**).

En esta temática las investigaciones realizadas han dado lugar a nuevos principios básicos sobre la identidad de las células madre neurales. Se ha estudiado la función de los progenitores altamente proliferativos y la identificación de nuevas rutas de migración neuronal en roedores y más recientemente en humanos neonatos (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois y col., 1996; Álvarez-Buylla y col., 2001; Paredes y col., 2016).

En conjunto, los avances en el conocimiento del proceso neurogénico se debieron al desarrollo de herramientas que permitieron demostrar la proliferación celular en tejidos adultos y constatar la capacidad neurogénica en el SNC desarrollado de diversos grupos de vertebrados.

1.3 Neurogénesis adulta: metodologías relevantes para su demostración

En la primera mitad del siglo XX no existían técnicas concluyentes para demostrar el nacimiento de nuevas neuronas. Solo se podía constatar la presencia de mitosis en pequeñas células cerebrales cercanas a los ventrículos, sin poder identificar su fenotipo celular, dado que las únicas técnicas disponibles eran las tinciones histológicas clásicas.

Con la introducción de la Timidina tritiada en los años sesenta, Joseph Altman realizó una serie de experimentos en ratas sugiriendo la existencia de nuevas neuronas y que se localizaron en regiones como la corteza, el giro dentado y los bulbos olfatorios (BO) (Altman, 1963 a,b; Altman y Das, 1965; Altman, 1966, 1969). Estos estudios fueron seguidos posteriormente por la combinación de Timidina tritiada con microscopía electrónica para examinar las características ultraestructurales de las células en el momento de la fase S y la presencia de fenotipos neuronales (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan y col., 1985). Estudios con esta metodología se realizaron también en reptiles donde se constató neurogénesis postnatal en el BO de lagartijas (García-Verdugo y col., 1989). Simultáneamente, Fernando Nottebohm y sus colegas demostraron que las fluctuaciones en el tamaño del centro vocal superior (HVC) (High Vocal Center, *traducción en inglés*) de aves cantoras (*Serenius canarius*), eran resultado directo de cambios en los niveles hormonales al momento de la estación reproductiva. La variación en el tamaño de estos núcleos responsables del canto se asoció al nacimiento de cientos de neuronas por día, y que las mismas neuronas tenían propiedades electrofisiológicas que respondían al sonido del canto (Goldman y Nottebohm, 1983; Nottebohm, 1985). Sin embargo, tales afirmaciones fueron rápidamente cuestionadas en el campo de los primates (Rakic, 1985), ya que la presencia de una población estable de neuronas en la edad adulta parecía esencial para codificar comportamientos aprendidos. Otro de los descubrimientos más relevantes, a partir de la utilización de cultivos celulares, fue la demostración que células aisladas del estriado del cerebro adulto de ratón pueden ser estimuladas y proliferan “*in vitro*” por la aplicación de factores de crecimiento. Estas células, luego de ser cultivadas presentaron características de células neuroepiteliales que bajo diferentes condiciones, se

diferenciaron en astrocitos, oligodendrocitos y en neuronas similares a las encontradas en el estriado del ratón adulto (Reynolds y Weiss, 1992).

1.3.1 Marcadores de proliferación celular en el estudio de la Neurogénesis

En la década de los 90 la aplicación de nuevos marcadores de proliferación celular sentó las bases para aceptar que en el SNC de individuos adultos hay génesis de nuevas neuronas. Si bien el uso de la Timidina tritiada fue el primer marcador de células mitóticas, años más tarde fue sustituida por su análogo 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), otro marcador de células proliferantes (Miller y Nowakowski, 1988; Cameron y col 1993; Okano y col 1993; Seki y Arai 1995; Kuhn y col., 1996) (Fig. 2).

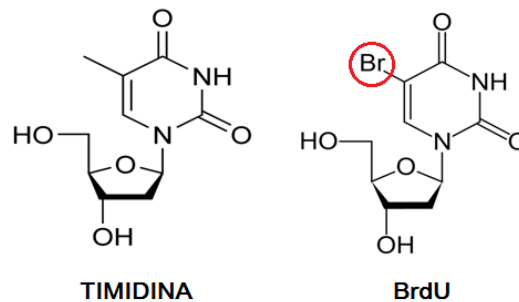


Figura 2. Esquema de la estructura molecular de la Timidina y de la Bromodesoxiuridina.

Si bien la Timidina tritiada permite una perfecta visualización por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), dos factores resultaron decisivos para sustituir su empleo; en primer lugar la radioactividad y en segundo lugar el engorroso procesamiento que implica el revelado de las muestras por autorradiografía. En cambio, el BrdU resultó más aceptado por su baja toxicidad a dosis mínimas y por su incorporación al ADN en casi un 100 % (Bick y Davidson, 1974; Nowakowski y Hayes, 2001). Tanto la Timidina tritiada como el BrdU luego de ser administrados se incorporan al ADN durante la fase S (o síntesis del ADN) del ciclo celular, previo a la mitosis. Por lo tanto la señal permite identificar células recientemente generadas y su marca perdura luego de varias divisiones (Gross, 2000).

La vía de administración es variable en dependencia de la especie y en el caso del BrdU puede incorporarse a través del consumo de agua potable, inyecciones intraperitoneales o diluida en el medio en el caso de los peces (Kee y col., 2002; Grandel y col., 2006; Taupin, 2006 ab). Una de las principales ventajas que ofrece la técnica de marcaje con BrdU es que al detectarse mediante la técnica Inmunohistoquímica, permite no solo identificar la célula recientemente generada sino también su fenotipo al combinarse con otros marcadores de estirpe celular. Sumado a estos compuestos se han desarrollado otros análogos de la Timidina reemplazando el grupo Bromo con otros halógenos; etinil, yodo o cloro. Entre los dos últimos, los productos finales obtenidos son el Iododesoxiuridina (IdU) y Clorodesoxiuridina (CIdU).

Al observar varios análogos de la Timidina en el tejido podemos evaluar la localización y el número de células marcadas; así como establecer una cronología de la proliferación celular y evaluar su contribución a la composición del tejido. Además, los análogos de la Timidina al ser administrados por separado, a intervalos conocidos, permiten distinguir tanto a las células que reingresan al ciclo celular como las que continúan proliferando (Vega y Peterson, 2005).

En seres humanos, la aplicación del BrdU ha estado limitado por cuestiones éticas, sin embargo cuando este marcador fue utilizado para estudiar crecimiento de tumores en individuos con cáncer terminal, el investigador Gage y su grupo (pioneros en la estandarización del procedimiento, con el consentimiento de los familiares de los pacientes) utilizaron muestras de cerebro post-mortem y analizaron lo que ocurrió a nivel del giro dentado del hipocampo. Como resultado observaron que en pacientes entre 57 y 72 años habían células grano doble marcadas con BrdU y NeuN (marcador de estirpe neuronal) (Eriksson y col., 1998). La aplicación de estos métodos en estudios a través de diversas especies muestra una gran diversidad en cuanto a las capacidades proliferativas en número y sitios proliferativos. A continuación se describen los estudios donde se aplica BrdU en distintas especies de vertebrados.

1.4 Estudios comparativos en la neurogénesis adulta de los vertebrados

En todas las especies de vertebrados estudiadas se ha constatado la generación de nuevas neuronas en el SNC (Sullivan y col., 2007; Kaslin y col., 2008 (Lindsey y col 2012, 2014). En mamíferos, los modelos donde se ha estudiado la neurogénesis han sido en primer lugar: los roedores (Altman 1963b); Lois y col 2002.), le siguen los primates no humanos (Kornack y Rakic, 2001; Gould y col 1999) y también en el humano con los estudios del grupo de Gage (Eriksson y col., 1998) y más recientemente Álvarez-Buylla y García-Verdugo donde estudian la neurogénesis en neonatos humanos (Paredes y col., 2016). En estas especies la neurogénesis adulta ha sido bien caracterizada en dos regiones: la zona subventricular, sitio de origen de las nuevas interneuronas que se incorporan en el BO; y la zona subgranular del giro dentado, la cual genera las células granulares de la formación hipocampal (Altman, 1962; Bayer y col., 1982, Kaplan, 1985; Eriksson y col., 1998; Álvarez- Buylla y García-Verdugo, 2002).

Los estudios comparativos del proceso neurogénico en vertebrados no mamíferos demuestran la presencia de numerosos sitios neurogénicos y una clara disminución de los mismos en las especies más evolucionadas (Fig. 3).

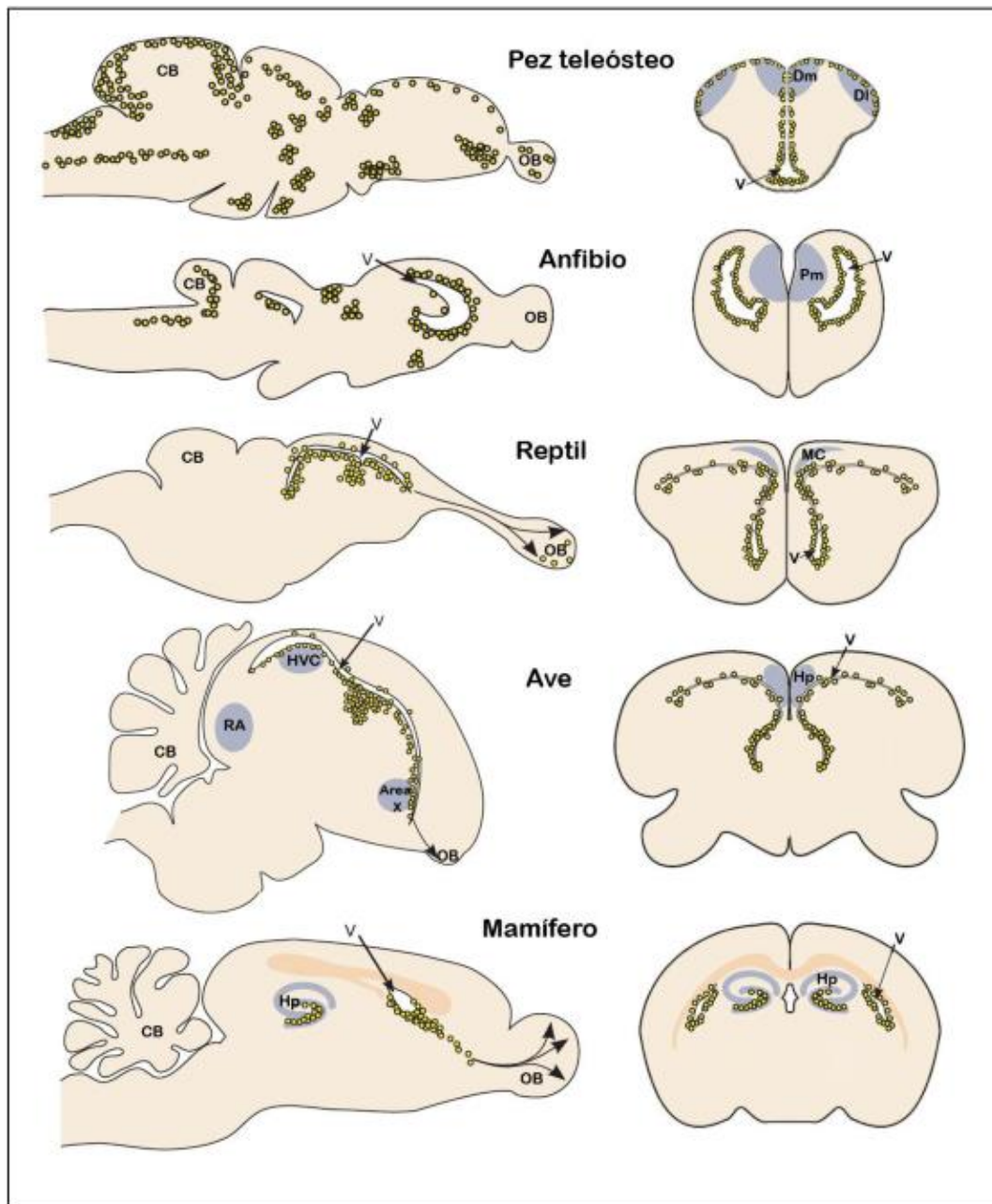


Figura 3. Esquemas de nichos neurogénicos en los vertebrados más estudiados. Secciones sagitales (izquierda) y transversales (derecha) de cerebros de vertebrados adultos que muestran las zonas donde se generan nuevas células. En reptiles, aves y mamíferos se muestra además la migración de las nuevas células a los bulbos olfatorios (OB). Las áreas en azul son núcleos del circuito implicado en la producción del canto de las aves [(HVC), siglas del inglés High Vocal Center, núcleo robusto del arcopallio (RA) y Área X] y áreas cerebrales esenciales para la memoria espacial (Dm: palio dorsomedial; Dl: palio dorsolateral; Pm, palio medial; MC, córtex medial; Hp, hipocampo). CB, cerebelo; V, ventrículo (**Tomada de Barker y col., 2011 y modificado por Sampedro Sigalat 2015**).

Como se puede observar la neurogénesis está menos restringida en grupos como las aves (Goldman y Nottebohm, 1983; Álvarez-Buylla y col., 1990; Barnea y Pravosudov, 2011;), reptiles (García-Verdugo y col., 1989; Pérez-Cañellas y col., 1997; Font y col., 2001; Fernández y col., 2002) y anfibios (Graziadei y Metcalf, 1971;

Mackay-Sim y Patel, 1984; Bernocchi y col., 1990; Polenov y Chetverukhin, 1993; Dawley y col., 2006; Simmons y col., 2008; Almlí y Wilczynski, 2012). En peces se ha constatado que la neurogénesis adulta y la gliogénesis son más pronunciadas y persisten por largos períodos de su vida que en los otros grupos de vertebrados (Fig. 3) (Zupanc y col., 2006; Grandel y col., 2006; Lindsey y Tropepe, 2006; Maruska y col., 2012; Ekström y col., 2001; Birse y col., 1980; Anderson y Waxman, 1985; Zupanc y Horschke, 1995; Lema y col., 2005, Alunni, 2010, Fernández y col., 2011, Tozzini y col., 2012; Olivera-Pasilio y col., 2014). Los estudios en peces han abierto nuevas perspectivas con aportes relevantes que merece resaltar.

1.4.1 Peces teleósteos: Modelos emergentes para el estudio de la neurogénesis

En las últimas décadas el estudio de la neurogénesis en peces ha despertado un especial interés por los valiosos aportes reportados. La tasa de proliferación celular que muestra el cerebro de los peces teleósteos supera en uno o dos órdenes de magnitud a la reportada en mamíferos. Los peces son capaces de regenerar grandes áreas de su sistema nervioso después de una lesión o daño experimental (Stuermer y col., 1992; Zippel, 1993). Al respecto, la actividad neurogénica que poseen estas especies seguramente contribuya a la capacidad regenerativa (Byrd y Brunjes, 2001). En conjunto, estas particularidades colocan a los peces teleósteos en un lugar privilegiado respecto a los mamíferos, como modelos biológicos adecuados para profundizar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes de la neurogénesis en individuos adultos.

Los peces presentan numerosas regiones proliferativas y neurogénicas en las principales divisiones cerebrales. Grandel y col. (2006) reportaron 16 sitios en *Danio rerio* (pez Cebra), mientras que Kuroyanagi y col. (2010) identificaron 17 regiones en Medaka. Es válido destacar que el pez Cebra, en primera instancia, y más recientemente los cíclidos y los peces estacionales, surgen como promisorios modelos en el estudio de la neurogénesis postnatal en los sistemas sensoriales. Como resultado estos estudios, permitirían correlacionar el proceso neurogénico con su rol funcional. Con ese propósito desde la década de los años 80', diferentes

grupos han estudiado la neurogénesis postnatal en el cerebro de peces, enfocados a diferentes estructuras sensoriales como el *tectum opticum*, retina, bulbo olfatorio y otras de similar importancia como la línea lateral. (Birse y col., 1980; Raymond y Easter, 1983, y a partir de los 90´ (Zupanc 1992) hasta la actualidad (Zupanc y Zupanc, 1992; Zupanc y Horschke, 1995; Byrd y Brunjes, 1995; , 2001;;; Maeyama y Nakayasu, 2000; Zikopoulos y col., 2000; Ekström y col., 2001; Zupanc y col., 2005; Adolf y col., 2006; Grandel y col., 2006; Zupanc, 2006; Topp y Gallivan 2008; Kaslin y col., 2009; Alunni y col., 2010; Kuroyanagi y col., 2010; Strobl-Mazzulla y col., 2010; Chapouton y col., 2007 , 2011; Kishimoto y col., 2011; Lindsey y col., 2012 2014; Ampatzis y col., 2012; Kizil y col., 2012A, 2012B; Maruska y col., 2012;; Schmidt y col., 2013; Kaslin y col.,2013; Olivera-Pasilio, 2014).

1.4.2 Austrolebias como modelo validado para estudiar la neurogénesis adulta: aporte de nuestro grupo

En los peces del género *Austrolebias sp.* (Pez de ciclo anual) nuestro grupo fue pionero en validarlos como modelo biológico para estudiar la neurogénesis adulta (Rosillo y col., 2010; Rosillo 2010; Fernández y col., 2011; Rosillo y col., 2016). En primer lugar, se realizó el mapeo de la proliferación celular en el cerebro de tres especies de peces del género *Austrolebias*: *A. affinis*, *A. charrua* y *A. reicherti*. Mediante el empleo del BrdU como marcador de proliferación celular, se cuantificaron y topografiaron cinco zonas proliferativas cerebrales principales: BO, Ventrículos Telencefálicos, *Torus Longitudinalis (TL)*, *Tectum óptico (TO)* y Cerebelo. Se constató una contigüidad de las zonas proliferativas a lo largo del eje rostro-caudal y cercanía a las regiones ventriculares en las tres especies. *A. affinis* la especie más antigua en la filogenia presentó un mayor índice de proliferación normalizado por volumen, áreas asociadas con la visión (*TO* y *TL*) que en el BO. En cambio *A. reicherti*, la especie más moderna evolutivamente presentó un patrón inverso; o sea mayor índice de proliferación en el BO, estructura encargada de la olfacción y menor índice de proliferación en las áreas visuales. Estos resultados sugieren un predominio diferencial entre las modalidades sensoriales visual y olfatoria de acuerdo a la posición filogenética o a los hábitats correspondientes. Se demostró la génesis de nuevas neuronas en todas las regiones estudiadas, lo cual confirmó nuestra hipótesis sobre la potencialidad neurogénica de los sitios proliferativos en el cerebro de *Austrolebias*. Un resultado relevante fue que hasta ese momento no se había reportado una neurogénesis en tan sólo 24 horas de inyectado el marcador de proliferación celular y combinado con el marcador neuronal HuC.

Asimismo se encontró una gran variedad de células gliales, diferenciables por su morfología, expresión de marcadores y regiones donde se localizan.

Mediante microscopía electrónica de transmisión se demostró que **las zonas proliferativas presentan características celulares comunes a las descritas en otros nichos neurogénicos. Los resultados obtenidos permiten concluir que la capacidad proliferativa y neurogénica del cerebro de peces *Austrolebias* se conserva en el género, aunque existen diferencias relativas a las tasas proliferativas en regiones relacionadas con estructuras sensoriales (Fernández y col., 2011).**

1.4.3 Actividad neurogénica en relación a las estructuras sensoriales en peces

La existencia de neurogénesis adulta en el BO y el TO, se ha constatado en géneros como; *Danio*, *Gasterosteus*, *Carassius*, *Gymnotus Medaka* y más recientemente en *Austrolebias* (Rahmann, 1968; Zupanc y Horschke, 1995; Fernández y col., 2011; Olivera- Pasillio 2016).

Los peces teleósteos constituyen el grupo de vertebrados más diversificado con más de la mitad del número total de especies de vertebrados vivos (Nelson, 1994). La visión y la olfacción cobran especial relevancia en los peces durante su adaptación a la gran diversidad de sus hábitats (Butler y Hodos, 1996; Bédart y Parent, 2004; Lledo, 2006; Zupanc, 2006).

Cabe señalar que el olfato y la visión son modalidades sensoriales que pueden ser modulables por las condiciones del entorno, lo cual evidencia la ocurrencia de procesos plásticos donde la neurogénesis está implicada. En los sistemas olfatorio y visual, la adición de nuevas neuronas conlleva la reorganización en su circuitería funcional propia. Por tanto, esta renovación a nivel celular no es estática o solo restaurativa, más bien la neurogénesis adulta constituye una respuesta adaptativa a los cambios impuestos, por las condiciones ambientales y el estado interno del animal (Lledo y col., 2006).

En este trabajo uno de los objetivos primarios es estudiar la neurogénesis en el BO de *Austrolebias charrua* por la importancia que esta modalidad sensorial representa

para estas especies dado las características de su ciclo de vida (*ver más adelante*). Por lo tanto introduciremos en la siguiente sección una reseña del estado actual del conocimiento referente a la neurogénesis en el BO de los vertebrados.

1.5 Neurogénesis en el Bulbo olfatorio: una respuesta a las necesidades del sistema

El sistema olfatorio es una de las modalidades sensoriales más antiguas y esenciales para la supervivencia de las especies animales (Breton y Saghatelian, 2012). El sistema olfativo procesa las señales de olor e interviene en comportamientos cruciales para la supervivencia como; alimentación, cortejo y respuestas de alarma (Kotrschal y col., 1998; Lindsey y col., 2012).

La actividad de este sistema exige un recambio continuo tanto de las neuronas sensoriales en el epitelio olfatorio, como de las neuronas granulares y periglomerulares del BO que integran los circuitos. Estos circuitos están influenciados por la interacción con el medio ambiente de donde provienen los diferentes estímulos olfativos y es variable en las diferentes especies. La mayor cantidad de información proviene de estudios realizados en ratas donde se demuestra que la regulación constante de este proceso está dada por su interacción con el microambiente inmediato y factores externos (Lledo y col., 2006, 2016).

1.5.1 El circuito en roedores y la banda migratoria rostral

Dado que la mayor cantidad de estudios se ha realizado en roedores, particularmente en ratas, describiremos brevemente algunas características anatómicas y circuitales del BO de los roedores. En la rata el BO es la estructura más rostral del encéfalo y muestra una arquitectura conformada por varias capas. Desde la superficie hacia el centro son: capa glomerular, capa plexiforme externa, capa de las células mitrales, capa plexiforme interna y por último la capa de las células granulares. Los estudios en el sistema olfatorio muestran que la información sensorial es transferida hacia el BO a través de los axones de las neuronas del epitelio olfatorio que atraviesan la placa cribosa del hueso etmoides. Los axones de estas hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales, en los glomérulos. Las

dendritas de las mitrales también hacen sinapsis con las células periglomerulares y con los axones de los granos (Fig. 4).

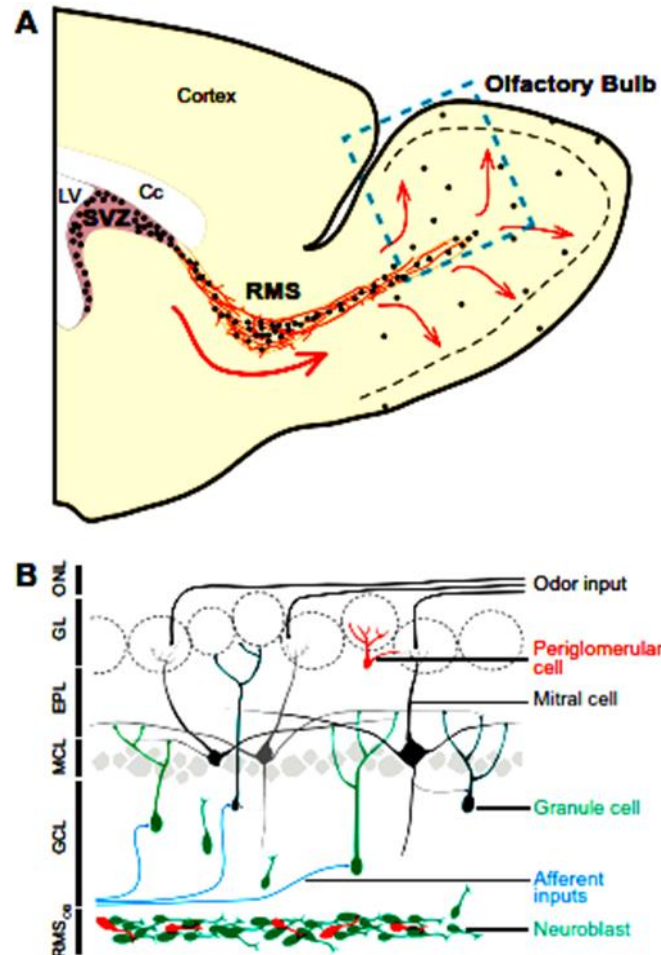


Figura 4. Las células generadas en la adultez constantemente se incorporan en el bulbo olfatorio y se diferencian en interneuronas granulares y periglomerulares. **(A)** Esquema que muestra la neurogénesis adulta en el OB. Las flechas rojas indican la migración tangencial inicialmente desde la zona subventricular (SVZ, en Inglés) con la guía de los vasos sanguíneos hasta llegar al BO, migrar radialmente hasta su completa diferenciación e integración a los circuitos neurales preexistentes en la región. LV: ventrículo lateral; Cc: cuerpo caloso. **(B)** Vista del área señalada en el recuadro azul en A que representa la organización laminar del BO. Las células adultas se diferencian en interneuronas bulbares (granulares y periglomerulares). RMS: banda migratoria rostral del OB; GCL: capa células granulares; MCL: capa de células mitrales; EPL: capa plexiforme externa; Gl: glomérulo; ONL: capa del nervio olfatorio. **(Tomado de Breton y Saghatelyan, 2012)**

En los mamíferos el procesamiento del estímulo oloroso en el BO es orquestado por 2 poblaciones de interneuronas: células periglomerulares (CPG) y las células granulares (CG). Las células periglomerulares están localizadas alrededor del

glomérulo del BO, realizan sinapsis dentro y entre los glomérulo. Las CPG controlan la actividad de diferentes glomérulos, están involucradas en la detección y procesamiento de la discriminación del estímulo oloroso (Breton y Saghatelyan, 2012) (Fig. 4). Las neuronas recientemente generadas que se integran a los circuitos sensoriales del BO, surgen de los progenitores neurales localizados en la zona subventricular, bordeando los ventrículos laterales, conformando lo que se conoce como Banda Migratoria Rostral (Lois y Álvarez-Buylla, 1994). De las miles de neuronas que conforman esta banda migratoria, 97 % son células grano y 3% células periglomerulares (Winner y col., 2002).

1.5.2 El circuito olfatorio en peces y la banda migratoria rostral

En los peces el circuito es más sencillo, la histoarquitectura del BO está conformado por capas concéntricas que desde la periferia son: capa del nervio olfatorio, capa glomerular, capa de las células mitrales, y capa de las células grano, están ausentes las células periglomerulares. Esta descripción es la encontrada en la mayoría de los teleósteos. En el Capítulo 1 explicaremos las diferencias encontradas en la citoarquitectura de los Bulbos olfatorios en *Austrolebias charrua* y las características de su circuito.

A diferencia del pez Cebra las capas celulares en *Austrolebias* están alineadas en paralelo con la luz ventricular y se denominan como en *Danio rerio* y *Nothobranchius furzeri* capa celular interna (CCI), la más próxima a la luz ventricular y capa celular externa (CCE) se localiza alejada de la luz ventricular. La capa glomerular es importante en *Austrolebias* y ocupa casi la mitad del BO.

En *Austrolebias* se ha estudiado la neurogénesis en el BO y esta será bien explicada en el transcurso de la Tesis por ser uno de los objetivos de la misma.

1.5.3 La olfacción y su vínculo con el sistema visual: nervio terminal

El sistema olfatorio, está condicionado por la permanente entrada de información desde el mundo exterior y que se integra con la participación de otros sistemas sensoriales. En particular la interacción con el sistema visual responde a señales

olfativas a través de un par craneal, el Nervio Terminal (NT) o par craneal 0. Este nervio constituye un vínculo entre las aferencias visuales y olfatorias. La existencia del NT es muy importante en los peces y si bien varios aspectos no se conocen, este sistema se correlaciona con la actividad sexual y reproductiva. La mayoría de los axones del NT terminan en el cerebro anterior y el cerebro medio, pero algunos axones proyectan por la vía del nervio óptico a la retina neural. En experimentos que evalúan la sensibilidad visual del pez Cebra, se demostró que la entrada olfatoria está implicada en la modulación de la sensibilidad visual en *Danio rerio* (Maaswinkel y Li, 2003). La vía centrífuga descrita del NT, está formada por cuerpos neuronales localizados en el Bulbo olfatorio a modo de ganglios, cuyos axones vía ventral y a través del nervio óptico alcanzan la capa plexiforme interna de la retina donde establecen sinapsis.

A través de la actividad del nervio terminal, el olfato y la visión son modalidades sensoriales que cooperan para objetivos comportamentales esenciales para la vida del pez con sus congéneres y con su medio ambiente (Whitlock, 2011). Dado que las *Austrolebias* cumplen su ciclo de vida en condiciones extremadamente cambiantes, nos preguntamos ¿qué características tendrá el nervio terminal en este grupo y cómo este podrá influenciar en la actividad neurogénica de ambos sistemas?

2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

2.1 HIPOTESIS PROPUESTAS

La existencia de paralelismos estructurales y funcionales en los nichos neurogénicos de diversas especies, se ha constatado a partir de estudios comparativos (Sullivan, 2007). La comparación entre especies incrementará el entendimiento de aspectos funcionales de la neurogénesis adulta. En particular, permitirá entender la capacidad moduladora de los sistemas sensoriales en respuesta a variaciones del medio ambiente.

Enfocarnos en este argumento podría responder las siguientes interrogantes:

¿Por qué los vertebrados filogenéticamente más antiguos (como los peces) muestran más nichos neurogénicos que los mamíferos, considerados filogenéticamente más evolucionados?

¿Los nichos neurogénicos permanecen igual en todo su ciclo de vida o las poblaciones de células madre neurales varían?

Estas dos interrogantes nos llevan a preguntar ¿cuáles son las características celulares de los nichos y su variedad entre vertebrados?

En este trabajo nos centramos en la neurogénesis adulta en el Bulbo olfatorio y su vínculo con la vía visual, en *Austrolebias charrua* una especie de peces que presenta un ciclo de vida anual. Dadas las condiciones ambientales extremas a las que se enfrentan, esta condición les exige desarrollar estrategias adaptativas únicas, como la actividad neurogénica rápida (Fernández y col., 2011). Este hecho nos condujo a plantearnos las siguientes preguntas:

¿Cuáles son las particularidades de los nichos neurogénicos que sustentan la neurogénesis en el BO de las *Austrolebias*?

¿Qué características tendrá la vinculación del sistema olfatorio y visual en las *Austrolebias charrua*?

¿La distribución del NT será similar a la descrita en otros peces?

El hallazgo de Hamdani y Døving (2007) que describe en peces *ciprinidos* la existencia de al menos tres vías sensoriales independientes que realizan sinapsis en diferentes regiones glomerulares del BO (Fig. 5), unido al reporte de Diotel y col., (2010) donde se describe un sistema olfatorio accesorio en BO de pez Cebra, nos permite proponer como **hipótesis 1: en el BO de *Austrolebias charrua*, existe neurogénesis intrínseca en sitios delimitados en los cuales las neuronas generadas podrían estar involucradas en diferentes funciones.**

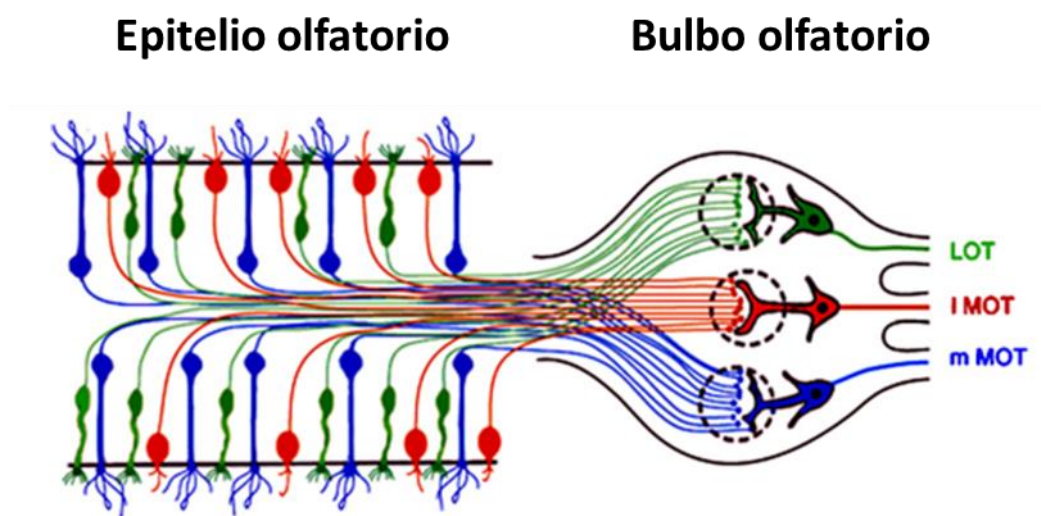


Figura 5. Representación esquemática de tractos olfatorios compuestos por 3 tipos de neuronas sensoriales paralelas en el sistema olfatorio de peces a partir de las rosetas olfatorias (epitelio). Células de la Cripta (rojo), Neuronas Sensoriales con microvellosidades (verde) y Neuronas Sensoriales ciliadas. Abreviaturas: LOT; Tracto olfatorio lateral, I-MOT; Tracto olfatorio medial-lateral; m-MOT; Tracto olfatorio medial. **(Modificado de Hamdani & Døving, *Progress Neurobiology*, 2007).**

Estudios anatómicos indican que el sistema del nervio terminal en los peces teleósteos es complejo y heterogéneo (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Para comprender la existencia y particularidades del nervio terminal en *Austrolebias* tendremos en cuenta características particulares del ciclo de vida de estos peces como:

Presencia de un marcado dimorfismo sexual dado por diferencias en la coloración y diseño corporal de los machos, lo cual sugiere que la visión juega un papel importante, al momento de la selección de la pareja.

Los charcos a medida que se secan, aumentan la turbidez hasta quedar en un ambiente completamente barroso. Este aumento de la turbidez del agua coincide con la etapa de cortejo y apareamiento de la especie. Datos de Passos y col. (2014) demuestran que la olfacción es muy importante al momento de elección de parejas en *Austrolebias reicherti* cuando los charcos tiene poca luminosidad.

Ambas situaciones representan indicios de que estos peces deben contar con un sistema de procesamiento de señales olfato-visuales eficaces para conservar la especie ante las variables condiciones ambientales a las que están sometidos. Nos parece trascendente indagar acerca de la existencia del nervio terminal descrito en otras especies de peces teleósteos (Fig. 6) (Whitlock, 2009). La demostración que la neurogénesis en el BO de la rata es modificada por estímulos variados, nos hace pensar que demostrar la existencia del NT, en *Austrolebias* sienta las bases para postular nuestra **hipótesis 2: el Bulbo olfatorio y el sistema visual están asociados neuroanatómica y funcionalmente mediante el Nervio terminal que podría modular la actividad neurogénica existente en el Bulbo olfatorio.**

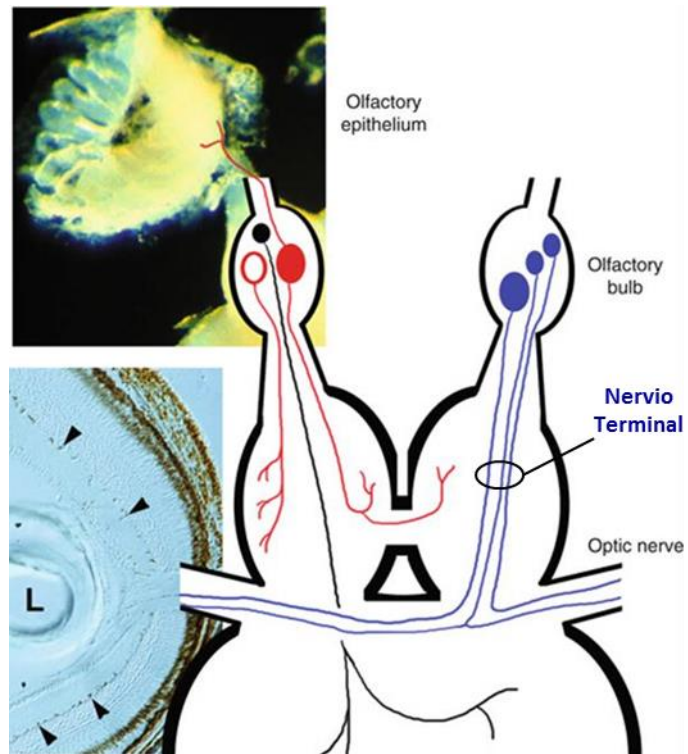


Figura. 6 Esquema que representa la distribución del complejo del nervio terminal en el pez Cebra. Un grupo de neuronas localizadas en los Bulbos olfatorios cuyos axones terminan en la capa interplexiforme de la retina (líneas azules) (*Tomado de Whitlock, 2009*).

2.2 OBJETIVO GENERAL

Conocer las características de la neurogénesis en el Bulbo olfatorio de *Austrolebias charrua* y su posible vinculación con el sistema visual.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Focalizados en nuestra **primera hipótesis**, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar la composición celular del Bulbo olfatorio.
- 2) Estudiar las características de las paredes ventriculares en las zonas de mayor proliferación celular.
- 3) Determinar la capacidad de proliferación celular en distintos tiempos de administración de análogos de la Timidina tritiada (BrdU, IdU, CldU).
- 4) Cuantificar las poblaciones proliferantes a dos tiempos de sobrevivencia.
- 5) Identificar las posibles candidatas a células madre.
- 6) Demostrar la existencia de neurogénesis en el Bulbo olfatorio.

Por su parte, para validar nuestra **segunda hipótesis** los objetivos específicos consistieron en:

- 1) Demostrar la existencia y el trayecto del complejo del NT en *Austrolebias charrua*.
- 2) Detectar la presencia de la hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH, siglas en inglés) en las neuronas que integran la vía olfacto-retinal.
- 3) Demostrar la existencia del complejo del NT en *A. affinis* otra especie dentro del mismo género desde el punto de vista comparativo.



ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

3. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

HIPÓTESIS 1

Para la ejecución de los objetivos relacionados con nuestra primera hipótesis la estrategia experimental desarrollada fue la siguiente:

- a) Los objetivos 1 y 2 se realizaron mediante las siguientes metodologías:
- obtención de cortes semifinos y tinción con azul de metileno borácico.
 - microscopía electrónica de transmisión (MET) (para estudiar la citoarquitectura de las regiones que registraron la mayor proliferación en el BO).
 - microscopía de barrido (MEB) (para explorar la superficie que tapiza esta estructura).
 - impregnación argéntica con técnica Cajal de Castro, Método de Golgi (para identificar la morfología de las células que integran el BO). Se utilizaron diferentes técnicas para la detección de población glial: 1) Histoquímica NADPH-Diaforasa y 2) Inmunohistoquímica con diferentes anticuerpos primarios como S-100, BLBP y Vimentina
- b) Para el objetivo 3 la capacidad proliferativa se determinó a través de la identificación de células proliferantes mediante detección inmunohistoquímica de los marcadores de proliferación utilizados. Para ello se usaron análogos de la Timidina como BrdU, IdU y CldU. Todos se aplicaron con diferentes ventanas temporales lo cual permitió determinar el origen, las migraciones, la población de progenitores y células madre, así como comprobar la estirpe celular de las células recientemente generadas.
- c) El objetivo 4 consistió en localizar las células proliferativas positivas al BrdU, CldU, IdU y CldU/IdU en secciones seriadas de las zonas del BO y Tel.
- d) En la ejecución de los objetivos 5 y 6 se realizaron dobles marcajes en los que se combinaron los marcadores de proliferación celular con los marcadores específicos de células madre, neuronales y gliales.

3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron peces machos adultos de la especie *A. charrua* del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes-Rivulidae) (Costa, 2006). Los peces se colectaron durante la temporada de lluvias (septiembre a noviembre) en masas de aguas temporales próximas a los ríos de Rocha y Treinta y Tres, Uruguay. Los especímenes se mantuvieron en acuarios con capacidad de 30 L, con agua declorinada (pH=7-7,5), oxigenada con aereadores permanentes y expuestos a un fotoperiodo de 14 h luz/ 10 h oscuridad. El agua con temperatura acondicionada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, fue parcialmente cambiada cada 5 días y los peces se alimentaron con *Tubifex tubifex* (*Tubifex rivolorum*) dos veces al día. Todos los procedimientos con los animales se aprobaron por el Comité Nacional de Experimentación Nacional conformado por el Comité Honorario de Experimentación Animal (CHEA), UdelaR y el Comité de Ética en el Uso de los Animales del Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable” (CEUA-IIBCE), que siguen las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) (National Institute of Health, *traducción en inglés*) para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio destinados a la investigación científica.

3.2 Fijación, disección y obtención de secciones histológicas del cerebro de los especímenes

El método de fijación empleado para cada pez individualmente fue la perfusión intracardíaca. Previo a la fijación, los peces se anestesiaron mediante la adición de una solución de Eugenol 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA.) al agua del acuario con una dilución resultante de 1:1000 v/v, hasta el cese del movimiento opercular. En ese estado, para mantener el nivel adecuado de oxígeno, los peces se entubaron por vía oral y se les mantuvo un flujo continuo de agua del acuario durante la perfusión de las soluciones, de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación: una vez expuesta la cavidad ventral y con el objetivo de remover la sangre del sistema vascular, se le introdujo una aguja intracardialmente para transfundir inicialmente la solución salina con anticoagulante (Citrato de Sodio 2%) y vasodilatador (Nitrito de Sodio 1 %). Una vez removida la sangre, se perfundió la

solución fijadora específica según el método empleado. Los fijadores específicos se mencionarán en cada técnica histológica respectiva. Al finalizar la fijación, los cerebros se disecaron cuidadosamente, se postfijaron en la misma solución fijadora 1 h y pasado este tiempo se sumergieron en Tampón Fosfato (TF) 0,1 M pH= 7,2 y mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Seguido a este paso los cerebros se encastraron en una mezcla de Gelatina-Albúmina 1:2 (1,5 y 45% respectivamente, disueltos en Cloruro de Sodio 0,9%) y se cortaron seriados en Vibrátomo S1000 (LEICA Buffalo Grove, IL, USA) a 60 µm de grosor con la orientación de los planos transversal y parasagital. Por último, las secciones se transfirieron a placas multipocillos para su procesamiento inmunohistoquímico por flotación.

3.3 Estudio de la citoarquitectura del bulbo olfatorio de *Austrolebias charrua*

3.3.1 Tinción con Azul de Metileno Borácico

Este método se utilizó previo a la microscopía electrónica y permitió seleccionar las áreas que posteriormente serían analizadas más detalladas por MET. Los cortes semifinos permitieron localizar geográficamente el área y se realizó el tallado del bloque para realizar de los cortes finos. Luego de la fijación por perfusión, las piezas se lavaron reiteradas veces con TF y se postfijaron con Tetróxido de Osmio (OsO₄) al 1% en TF durante 1 h a Temperatura Ambiente (TA), en oscuridad y bajo campana de extracción de gases. Se lavaron varias veces con TF, se deshidrataron en alcohol de graduación creciente (25, 50, 70, 96 y 100% respectivamente) e incluyeron en resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA). Se realizaron cortes semifinos de 1,5 µm de grosor en Ultramicrotomo (LEICA PowerTome XL), se tiñeron con Azul de Metileno Borácico al 1% y se estudiaron con el microscopio de luz para obtener datos relacionados con la calidad de la fijación y la localización de las áreas de interés. En nuestro caso se analizaron el Bulbo olfatorio y las paredes ventriculares del telencéfalo y el tercer ventrículo.

3.3.2 Microscopía electrónica de transmisión

La técnica convencional de MET aplicada a las paredes ventriculares telencefálicas permitió observar con mayor resolución, algunas de las regiones que muestran mayor proliferación celular. Por tanto, proporcionó información valiosa acerca de los diferentes fenotipos celulares que integran dichas regiones proliferativas potencialmente neurogénicas.

El método de fijación empleado fue la perfusión intracardíaca, explicado anteriormente y específicamente el fijador utilizado fue Paraformaldehído (PAF) 4% y Glutaraldehído 2% disueltos en TF 0,1 M pH=7,2. Los cerebros se disecaron cuidadosamente y permanecieron en la misma solución fijadora durante 1 h a 4 °C. Se lavaron varias veces con TF y se cortaron transversalmente en el Vibrátomo S1000 a 150 µm de grosor. Estos cortes, análogos a los utilizados para inmunohistoquímica, se postfijaron con OsO₄ 1% en TF durante 1 h a TA, en oscuridad y bajo campana de extracción de gases. Se lavaron varias veces con TF, se deshidrataron en alcohol de graduación creciente y se incluyeron en resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA). Se realizaron cortes semifinos de 1,5 µm de grosor en Ultramicrotomo, se tiñeron con Azul de Metileno Borácico 1% y se estudiaron con el microscopio de luz para obtener datos relacionados con la calidad de la fijación y la localización de las áreas de interés. En nuestro caso se analizaron el Bulbo olfatorio y las paredes ventriculares del telencéfalo y del tercer ventrículo. Con el mismo Ultramicrotomo, empleando cuchillas de vidrio, se obtuvieron secciones de 80 nm que se colectaron con rejillas de cobre de ranura (2x1 mm), previamente recubiertas con membranas de soporte de Polivinilformvar (Solución de Formvar al 0.3% diluido en Cloroformo). Una vez adheridas a la membrana, para aumentar la densidad electrónica del tejido, las secciones se contrastaron por flotación con una solución acuosa saturada de Acetato de Uranilo (UO₂ (CH₃COO)₂ x 2H₂O) al 2% (60°C durante 1 h) y luego en Citrato de Plomo al 3% (10 min en Atmósfera de Nitrógeno). Los análisis se realizaron en un MET JEOL JEM 1010 operando a 80 kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95. Las imágenes obtenidas se transfirieron a la computadora y analizadas mediante el programa Photoimpact de libre acceso.

3.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se realizó para examinar las características y la distribución de cilios en las células lumbinales de las paredes ventriculares a nivel del ventrículo telencefálico del BO. Tres peces adultos se perfundieron con Solución Salina al 0,9% y Glutaraldehído al 2,5% y se sumergieron en la misma solución durante 24 h. Pasado este tiempo, los cerebros se disecaron y se separaron ambos hemisferios longitudinalmente a la mitad del plano sagital para visualizar la superficie ventricular medial completa. Otros tres peces se anestesiaron; se extrajeron sus cerebros y se fijaron por inmersión en Glutaraldehído 2,5% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, los cerebros se lavaron en TF 0,1 M pH=7,2 y deshidratados inicialmente en alcoholes de graduación creciente hasta finalizar en acetona pura para su completa deshidratación. Los cambios se realizaron cada 15 min. Transcurrido este tiempo, el tejido se sometió a un secado por punto crítico (SPC) con CO₂ líquido en un equipo Denton SPC-1. El metalizado con Oro se realizó en un Denton Desk II durante 120 s. Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900 LV) a 20 kV de la Facultad de Ciencias.

3.3.4 Técnica de Cajal de Castro

Tres peces adultos se anestesiaron con Eugenol como fue descrito en la sección anterior y posteriormente se decapitaron bajo lupa. Las cabezas enteras se sumergieron en el líquido fijador (Hidrato de Cloral 5 g, Alcohol 96%, Agua Destilada 40/50 ml, Ácido Nítrico 1-2 ml), según el procedimiento técnico realizado por Ramón y Cajal De Castro (1933). Después de fijados, se procedió a la impregnación argéntica por varios días y luego se realizó el revelado de la plata. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, se incluyeron en Resina Epóxica de dureza media y se cortaron seriados en micrótopo de deslizamiento horizontal a 30 µm de grosor. Los cortes se montaron en forma seriada con la Resina Epóxica sin polimerizar entre 2 láminas de plástico transparente (Mylar) para su posterior observación y fotografiado.

3.3.5 Impregnación argéntica con el método de Golgi

Esta técnica es de gran utilidad para determinar la morfología celular. Para ello tres ejemplares adultos de *A. charrua* se fijaron por perfusión intracardíaca con PAF 10%. Los cerebros enteros se postfijaron en una mezcla de 5% de Bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con PAF al 4%, o con Tetróxido de osmio (OsO_4) 1% durante 1 a 3 días. Luego se sumergieron en Nitrato de plata ($AgNO_3$) 0,75% de 1 a 2 días. Los pasos de postfijación e impregnación se repitieron 2 veces según Ramón y Cajal y De Castro (1933). Las piezas se incluyeron en resina epóxica de dureza media y luego cortadas en un micrótopo de deslizamiento a 90-100 μm de grosor. Los cortes se montaron seriados en Araldita entre 2 láminas de plástico transparente (Mylar) para su posterior estudio al microscopio de luz.

3.3.6 Técnica de NADPH Diaforasa

Seis peces se utilizaron para realizar la técnica de la NADPH-Diaforasa para el revelado de la distribución de axones sensoriales y células positivas a la enzima en el BO. Los cerebros luego de fijados por perfusión al 4% se cortaron en el Vibrátomo a 30-50 μm de grosor a diferentes orientaciones. Luego de varios lavados en TF 0,1 M pH=7,4 se sumergieron en la siguiente mezcla de NADPH-Diaforasa [TF (0,1 M pH=7,4) + Tritón X-100 (0,3 %) + NADPH (0,5 mg/ml) + Nitro Azul de Tetrazolio (0,2 mg/ml)] durante 10 min en agitación, a TA y protegidos de la luz (Valtschanoff y col 1992). Pasado este tiempo se colocaron en la misma solución a 37°C durante 4 h. Para detener el revelado se lavaron varias veces con TF y finalmente se realizó el montaje en medio acuoso para su observación al Microscopio y la obtención de fotografías.

3.3.7 Inmunohistoquímica con Oro Coloidal

Algunos cortes de telencéfalo de *Austrolebias charrua* se procesaron por Inmunohistoquímica para detectar células gliales positivas con un anticuerpo glial

específico contra la Proteína de Unión a Lípidos en el Cerebro (BLBP, siglas en inglés). Se revelaron con un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal anti-conejo IgG hecho en cabra G7402 (Sigma) unido a partículas de oro coloidal de 10 nm de tamaño. La dilución utilizada fue de 1:200 con el objetivo de realizar inmunomicroscopía electrónica. Los cortes luego de revelados con el anticuerpo secundario unido a oro, se realizaron mediante un baño de plata que se pega al oro y permite por lo tanto que la señal sea visualizada al microscopio de luz (Fig. 7). Esta parte fue realizada en el marco de una pasantía en laboratorio del Dr. García-Verdugo en la Universidad de Valencia.

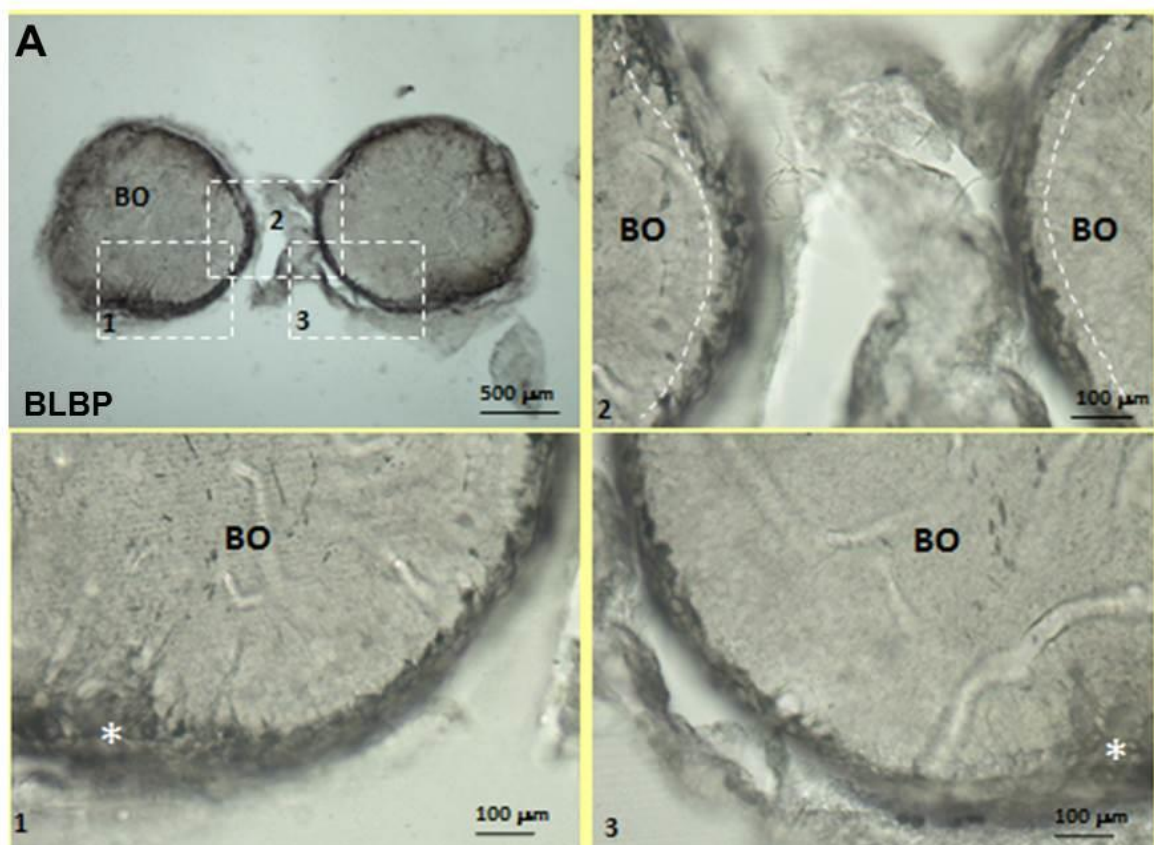
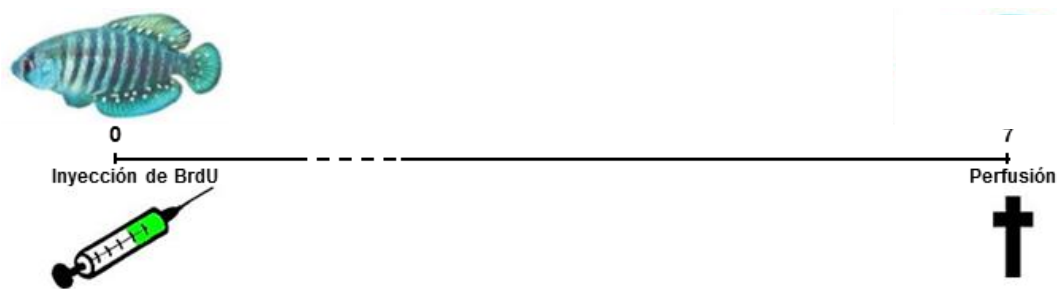


Figura 7. Corte transversal de Bulbos olfatorios a nivel más rostral de *A. charrua* con células gliales BLBP positivas detectadas por inmunohistoquímica y reveladas con oro coloidal. Los recuadros 1, 2 y 3 se muestran a mayor aumento. Se observa las células gliales distribuidas en las paredes dorsales, mediales (líneas discontinuas en 2 y ventrales (*)) de los BOs.

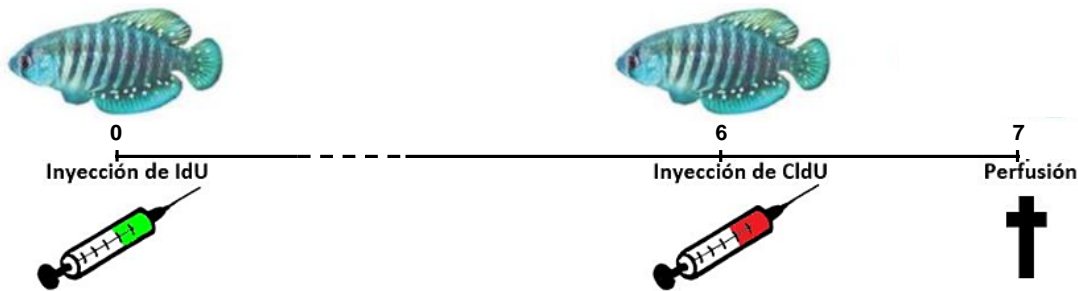
3.4 Administración de marcadores de proliferación celular en diferentes tiempos

La administración de los diferentes análogos halogenados de la Timidina puede distinguirse por anticuerpos primarios específicos junto con un tiempo bien definido entre las administraciones. Este experimento, ha permitido discriminar las subpoblaciones de células proliferantes en los cerebros de los *Amniotes* (Vega y Peterson, 2005; Llorens-Martin y col., 2010), *Anamniotes* (Grandel y col., 2006; Alunni y col., 2010) e Invertebrados (Sullivan y col., 2007). Por lo tanto, para estudiar la dinámica de la proliferación celular en nichos neurogénicos del cerebro de *A. charrua*, se inyectaron 18 peces adultos con tres análogos halogenados de Timidina (BrdU, IdU, CldU) a intervalos específicos. Con este propósito se utilizaron tres protocolos diferentes con 6 peces adultos por experimento:

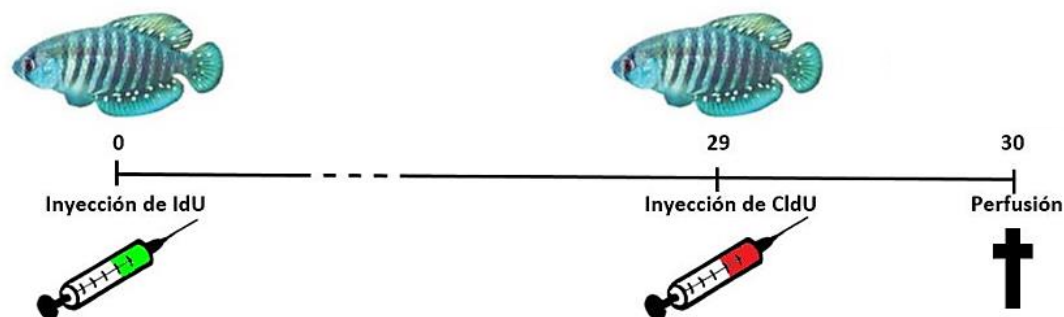
Experimento 1: Inyección de BrdU i.p a una dosis única (100 mg/kg de peso corporal) como se describe en Fernández y col. (2011). Al día 7, se anestesiaron los peces y se perfundieron con PAF al 10% (ver esquema siguiente);



Experimento 2: administración equimolar de IdU i.p (57,5 mg/kg de peso corporal) al día 0 y de CldU (42,5 mg/kg de peso corporal) al día 6. Al día 7, se anestesiaron y perfundieron con PAF 10% (ver esquema siguiente);



Experimento 3: inyección de IdU al día 0 y administración de CldU 29 días después. Al día 30, los peces se anestesiaron y fijaron con PFA al 10%. Las dosis de IdU y CldU fueron las mismas que las utilizadas en el experimento 2 (ver esquema siguiente).



En todos los experimentos, el BrdU e IdU se disolvieron en solución de NaCl 0,7% con NaOH 0,04 N, mientras que el CldU se disolvió solo en NaCl 0,7%.

El método de fijación utilizado fue la perfusión intracardíaca, descrito anteriormente. Los cerebros se disecaron cuidadosamente y permanecieron en la misma solución fijadora durante 1 h a 4 °C. Se lavaron varias veces con TF y se cortaron transversalmente en el Vibrátomo S1000 a 50 μ m de grosor. Una vez obtenidas, se procedió a detectar los marcadores de proliferación e identificar su fenotipo celular por Inmunohistoquímica como se describirá a continuación.

3.5 Detección inmunohistoquímica de marcadores de proliferación celular y su estirpe celular

Previo a la detección de los diferentes marcadores de proliferación celular, las secciones histológicas se trataron con Ácido Clorhídrico (HCl) 2 N diluido en TF 0,1 M pH=7,4 con Tritón X-100 0,3% (TX) (HCl 15% - TX 85%). El primero provoca el cambio conformacional del ADN bicatenario en una simple cadena y queden expuestos los sitios antigénicos compuestos por la Base Nitrogenada (Adenina) y su análogo halogenado a la Timidina específico (BrdU, IdU, CldU) inyectado. En cambio, el TF le otorga una mayor permeabilidad a la membrana celular que favorece la penetrabilidad de los anticuerpos utilizados detallados en la Tabla 1 y de acuerdo al procedimiento inmunohistoquímico siguiente:

Lavar en TF (3 veces por 10 min en agitación).

Incubar en la solución de TF-HCl (40 min).

Lavar en TF (3 veces por 10 min en agitación).

Incubar con los anticuerpos primarios disueltos en TF 0,1 M pH=7,4 con Tritón X-100 0,3%: Anti IdU: anti ratón-BrdU (IdU) - Anti CldU: anti rata-BrdU (CldU) (48 h a 4°C).

Lavar en TF (3 veces por 10 min en agitación).

Incubar con anticuerpo secundario biotinilado:- Biotinilado Burro anti-rata (1 h).

Lavar en TF (3 veces por 10 min en agitación).

Incubar con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos en TF 0,1 M pH=7,4 con Tritón X-100 0,3%:- Anti-ratón Alexa-fluor 488 para el IdU y Streptavidina-biotina Cy3 para el CldU. (90 min en oscuridad)

3.5.1 Cuantificación de las poblaciones de células proliferantes en Bulbo olfatorio y Telencéfalo

La cuantificación de los núcleos positivos al CldU, IdU y CldU/IdU detectados en los Bulbos olfatorios y paredes telencefálicas ventriculares se realizó en seis peces

adultos. Se contaron en secciones consecutivas y se representó el promedio total de células IdU (verde), CldU (rojo) e IdU/CldU (amarillo) en cada región por pez individual (\pm SD.) con el uso del programa Origin 8.0. El análisis estadístico descriptivo se realizó con el programa Sigma Stat 2.0.

3.5.2 Detección inmunohistoquímica de la estirpe de las células proliferativas

Entre los anticuerpos empleados para reconocer la estirpe celular en *Austrolebias*, el anticuerpo anti-Vimentina elegido para identificar las células gliales radiales (Fernández y col., 2012) el cual fue utilizado previamente por Forlano y col. (2001) en peces teleósteos. Otro de los marcadores específicos de estirpe glial probado en peces *Trachinotus blochii* fue el anticuerpo anti-BLBP empleado por Chiu-Ming y col (2010) y más recientemente por Rosillo y col. (2016). En ambos casos las concentraciones y condiciones de uso fueron las mismas que las publicaciones anteriores. Por su parte, para reconocer células de estirpe neuronal, utilizamos el anticuerpo anti-HuC el cual también puede utilizarse en el pez Cebra como indica el fabricante (Abcam) y el mismo utilizado por Arslan-Ergul y col. (2016). Por último para reconocer células madre /progenitoras utilizamos anticuerpos anti-Pax6 y anti-Sox2. (Sakurai y Osumi, 2008) (Tabla 1). Cabe señalar que la concentración óptima y la incubación se determinaron mediante la exposición de secciones cerebrales tanto del pez Cebra como de *Austrolebias* al mismo tiempo en igualdad de condiciones.

Tabla 1. Anticuerpos primarios usados en este estudio

Anticuerpo	Antígeno	Fabricante, # Catálogo, especie y tipo	Dilución
anti-HuC	Proteína ribosomal sintetizada en estadios tempranos de la diferenciación neuronal.	Abcam, ab78467, Conejo, Policlonal	1:100
anti NeuN	Proteína neuronal nuclear (neuronas indiferenciadas)	Abcam, Conejo, Policlonal	1:500
anti-BrdU	5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) análogo de la base nitrogenada Timidina del ADN	Dako, Copenhagen, Denmark. Ratón, Monoclonal	1:500
anti-CldU (BrdU Clon BU1/75 (ICR1)	5-Cloro-2'-desoxiuridina (CldU) análogo de la base nitrogenada Timidina del ADN	Accurate, Rata, Monoclonal	1:500
anti-IdU (BrdU Clon B44)	5-Iodo-2'-desoxiuridina (IdU) análogo de la base nitrogenada Timidina del ADN	Becton Dickenson, Ratón, Monoclonal	1:500
anti-BLBP	Péptido sintético correspondiente a BLBP humano (C-terminal) conjugado por Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH).	Abcam, ab110099, Cabra, Policlonal	1:500
anti-Vimentina (40E-C)	Filamento intermedio	Hybridoma Bank, Ratón, Monoclonal	1:50
anti-Nestina	Filamento intermedio	Abcam, Pollo, Policlonal	1:1000
anti-Conexina 43	Conexinas de uniones tipo "Gap"	Dr. Saez Conejo Policlonal	1:1000
anti-Neurofilamento	Neurofilamentos	Monoclonal Covance	1:1000
anti-S-100	Glias tempranas	Sigma	1:200
anti-PAX 6	Proteína sintética Humana PAX6 (secuencia interna)	Abcam, ab135147, Conejo, Policlonal	1:250
anti-SOX 2	Proteína sintética Humana SOX2 (C-terminal)	Abcam, ab97959, Conejo, Policlonal	1:500

3.5.3 Controles

Durante la puesta a punto de la técnica de detección de células inmunorreactivas al BrdU, IdU y CldU se utilizaron como controles positivas secciones histológicas de intestino delgado de pez (tejido que presenta gran proliferación celular). En otros casos, se incubaron simultáneamente los cortes de cerebro de pez junto con los de otras especies (ratas y ratones) para las cuales han sido generados los anticuerpos. Los controles negativos, a los que no se les aplicó los marcadores de proliferación celular mencionados, se procesaron simultáneamente con las secciones histológicas de cerebros de peces.

Diferentes controles se realizaron para todos los anticuerpos primarios que por primera vez se utilizaron en *Austrolebias charrua*.

HIPÓTESIS 2

Con respecto a nuestra segunda hipótesis, la estrategia experimental y ejecutar los objetivos específicos planteados la estrategia experimental fue la siguiente a seguir fue la siguiente:

- a) Para demostrar la existencia y el trayecto del complejo del NT en *Austrolebias charrua* se utilizaron sustancias trazadoras derivadas de las carbocianinas (DiI) utilizadas en material fijado y Peroxidasa de rábano (HRP) o Biocitina, en experimentos “*in vivo*”.
- b) La detección de la GnRH en las neuronas que integran la vía olfacto-retinal se realizó mediante su detección por la técnica Inmunohistoquímica.
- c) Para comparar la existencia del complejo del NT en otra especie del mismo género se aplicaron sustancias trazadoras en ejemplares de *A. affinis*,

3.6 Animales de experimentación

Diecisiete machos adultos de *A. charrua* (*Cyprinodontiformes-Rivulidae*) con un tamaño promedio de longitud estándar de 5 cm se utilizaron en este estudio. Entre 2 y 4 días, previo a los experimentos, los animales se transfirieron a las peceras del acuario con temperatura regulada de 19°C, bajo condiciones óptimas de mantenimiento y se alimentaron diariamente con *Tubifex sp.*

3.7 Fijación, disección y obtención de secciones histológicas del cerebro de los especímenes.

La fijación y corte de los cerebros fue realizada como se describió anteriormente. Los cerebros se disecaron y se mantuvieron en la misma solución fijadora durante 2 h a 4°C, y después se cortaron seriados, a 60 µm de grosor, en Vibrátomo. Los cortes se realizaron en planos transversal, parasagital y horizontal. Las secciones se

transfirieron a placas de pocillos múltiples en TF para su procesamiento por libre flotación.

3.8 Experimentos de trazadores para determinar el origen y la trayectoria del nervio terminal en *Austrolebias charrua*

Con el propósito de determinar la existencia y la trayectoria de la vía olfacto-retinal se utilizaron tres sustancias trazadoras diferentes. La Biocitina (Sigma) y la Peroxidasa de Rábano picante (HRP, Sigma) se utilizaron en los experimentos “*in vivo*”, mientras que el Dil (1,1'-Dioctadecil-3,3,3'-Tetrametil-Indocarbocianina Perclorato, Invitrogen, Eugene, OR, USA) fue utilizado en tejido fijado. En este experimento la conformación de los grupos se distribuyó de la siguiente forma; 10 peces recibieron la Biocitina, 4 conformaron el grupo con HRP y a 3 se les aplicó el Dil. La Biocitina y el HRP se inocularon en el humor vítreo del ojo izquierdo de peces vivos, previamente anestesiados y a concentraciones de 0,15 y 0,20 mg respectivamente diluidos en 10 µl de solución salina (desde una concentración inicial de 1,5% hasta 2% (Bell y col., 1997). Pasadas 48 h a 19°C, los peces se fijaron por perfusión, los cerebros se disecaron y cortaron con Vibrátomo como se describió anteriormente. Para evitar las tinciones falso-positivas se bloqueó la actividad de la biotina endógena con una pre incubación de los cortes de cerebros en Avidina 0,05% y Biotina 0,005%. Pasados 30 min, los cortes se incubaron en el conjugado fluorescente Streptavidina-Alexa 488 (Invitrogen, USA) a una dilución de 1: 200 (TF 0,1 M en Tritón X-100 al 3%) para su visualización. En algunos casos, se realizó una contratinción con Syto 64 (Invitrogen) a una dilución de 1:1000 que permitió observar el ácido nucleico teñido en rojo y por último las secciones se montaron con Glicerol (medio de montaje acuoso). Algunos cortes de los peces inyectados con Biocitina y todos los inyectados con HRP, se revelaron con 3',3'- Tetrahidrocloruro de Diaminobenzidina (DAB, Sigma) después de bloquear las peroxidasas endógenas con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) 1% (10 min).

Con el fin de visualizar las neuronas marcadas con Biocitina, las secciones del cerebro se incubaron en la Streptavidina-HRP (Vector Bulingame, CA, USA) 1:200

como dilución durante 1 h y por último reveladas con DAB 0,2 mg/ml en TF 0,1 M - Tritón X-100 0,3% + H₂O₂ 0,03% (Carlson y Mesulam, 1982). En el caso del Dil, los cristales se aplicaron directamente en el humor vítreo del ojo izquierdo de 3 especímenes fijados por perfusión. En el caso del Dil, los cristales se aplicaron directamente en el humor vítreo del ojo izquierdo de 3 peces fijados por perfusión. En este caso, al realizarse la disección, los ojos permanecieron conectados a través del nervio óptico al cerebro (Fig. 8).

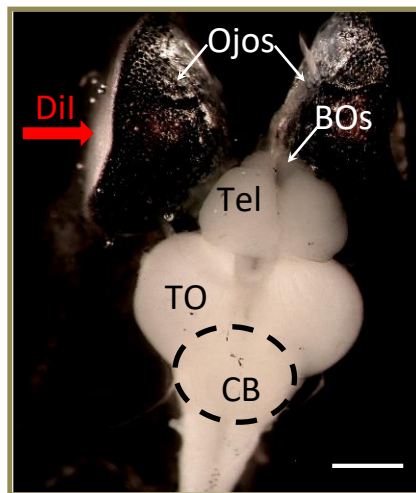


Figura 8. Aplicación de cristales de Dil. Vista Dorsal del cerebro de *Austrolebias* con los ojos conectados por los nervios ópticos al cerebro del pez y lugar de aplicación de los cristales de Dil. Abreviaturas: BOs, Bulbos olfatorios; Tel: Telencéfalo; TO, Tectum óptico; CB, Cerebelo. Barra de calibración: 1 mm.

Las muestras permanecieron sumergidas en PAF 10% a 37°C durante 2 semanas. Pasado este período se encastraron en la mezcla de Gelatina 1,5%-Albúmina 45% y se cortaron seriados en el Vibrátomo en los planos transversales, parasagitales y horizontales. Por último las secciones se mantuvieron en TF, se revelaron y contrastaron con el marcador nuclear DAPI (Diamino-2-Fenilindol) y se montaron seriados con glicerol. Las imágenes se tomaron en el microscopio Confocal OlympusFV300 del IIBCE.

3.8.1 Trazadores en combinación con Inmunohistoquímica

Algunos cortes revelados con Biotina-Alexa 488 se procesaron por inmunohistoquímica para determinar la naturaleza neuronal de las células marcadas. Los cortes se incubaron con el anticuerpo anti-HuC 1:200 (Invitrogen) diluido en Tritón X-100 en TF 0,3% durante 24 h a TA y luego con un anticuerpo secundario conjugado con el marcador fluorescente Alexa 633 1:100 (Invitrogen, USA.). Las secciones se montaron en glicerol y se observaron en el Microscopio Confocal.

3.9 Detección de células GnRH en la vía olfacto-retinal

La detección de GnRH se realizó por inmunohistoquímica. Los cortes de cerebro se incubaron con el anticuerpo primario Anti-GnRH (Santa Cruz) 1:500 y como anticuerpo secundario se aplicó el Anti conejo 1:1000 conjugado con el marcador fluorescente Alexa 488 1:1000 y contrastado con el marcador nuclear Syto 64 utilizado 1:1000 (Invitrogen, USA)

3.9.1 Análisis de Imágenes en Microscopio Confocal

Para toda la inmunohistoquímica y la detección de los trazadores fluorescentes, los cortes se montaron en glicerol, se observaron en el Microscopio Confocal (OLYMPUS FV300) del IIBCE y las imágenes obtenidas se procesaron a través del Programa Fluoview 5.0. Algunas imágenes se obtuvieron por combinación del confocal y el contraste de interferencia diferencial (DIC, *siglas en inglés*). Para demostrar la co-localización de la señal de dos marcadores en una misma célula se realizó el análisis de los planos ortogonales.

3.10 Aplicación de trazador retrógado en *Austrolebias affinis*

Para ello se realizó la inyección de la Biocitina en el ojo izquierdo de *A. affinis* adultas. Para visualizar el trayecto de la Biocitina se utilizó como revelado DAB (Sigma) 0,2 mg/ml in TF 0,1 M pH= 7,2 y H₂O₂ 0,03%. En algunos experimentos se reveló la Biocitina con Streptavidina Alexa 488 1:200. Algunos cortes se contratiñeron con Syto 64.

.



RESULTADOS
CAPÍTULO 1

4. RESULTADOS CAPÍTULO 1

4.1 Características de los peces anuales

Presentan dimorfismo sexual, los machos son más grandes que las hembras, en la mayoría de las especies, son muy coloridos y exhiben un patrón de barras verticales o puntos en los flancos del cuerpo típico de cada especie (Costa, 1998). Las hembras son pardas con dos manchas oscuras en la cola (Fig. 9).



Figura 9. Imágenes fotográficas de peces del género *Austrolebias* (*A. charrua*). Se muestra el marcado dimorfismo sexual del género. Hembra (izquierda) y macho (derecha). (Fotografía tomada por Casacuberta)

Este pronunciado dimorfismo sugiere que la selección sexual podría jugar un papel clave en la especiación y evolución de estos peces (García y col., 2008). Con respecto a las características de su hábitat natural, las *Austrolebias* habitan masas temporales de agua dulce y presentan un ciclo de vida anual (Fig. 10).

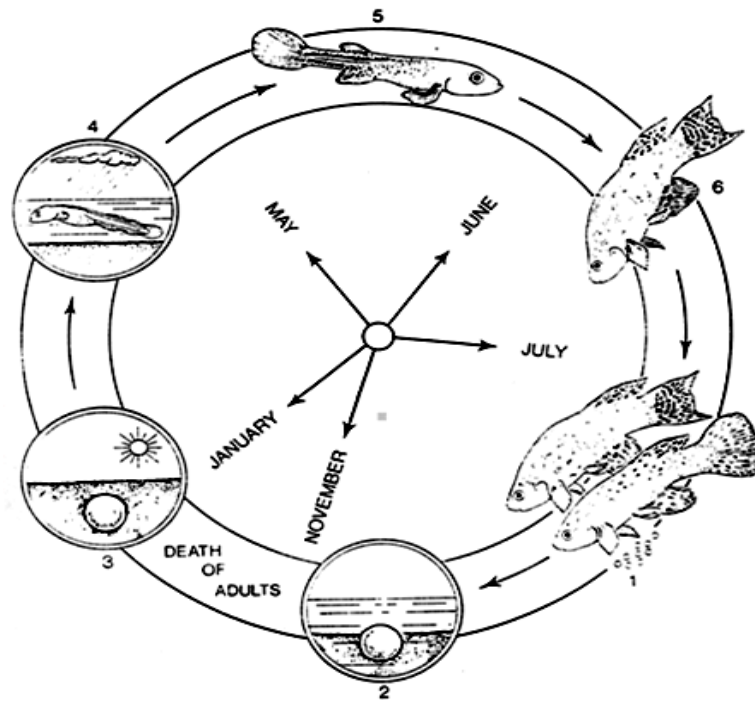


Figura. 10 Esquema que ilustra el ciclo de vida anual de las *Austrolebias sp.* (Wourms, 1972).

Durante el período de lluvias es posible localizar ejemplares juveniles y adultos en los cuerpos de agua antes mencionados. Cuando alcanzan su madurez sexual, las parejas se aparean mediante una elaborada conducta de cortejo, que culmina con la deposición de los huevos embrionados en el fondo del charco donde experimentan detenciones en su desarrollo denominadas “diapausas” (Wourms, 1972). En época de sequía estival ocurre la muerte masiva de todas las formas postnatales. Al arribo de la siguiente estación lluviosa, los huevos desecados eclosionan y reinician un nuevo ciclo de vida. Los huevos embrionados pueden mantenerse en el laboratorio e inducirse la eclosión a demanda, lo que facilita el trabajo experimental con edades precisas.

En la etapa de cortejo, las peceras son acondicionadas cubriéndoles el fondo con una turba de ramas y barro con una profundidad de 10 cm. De este modo se simula el substrato natural en que habitan estos peces (Fig. 11).

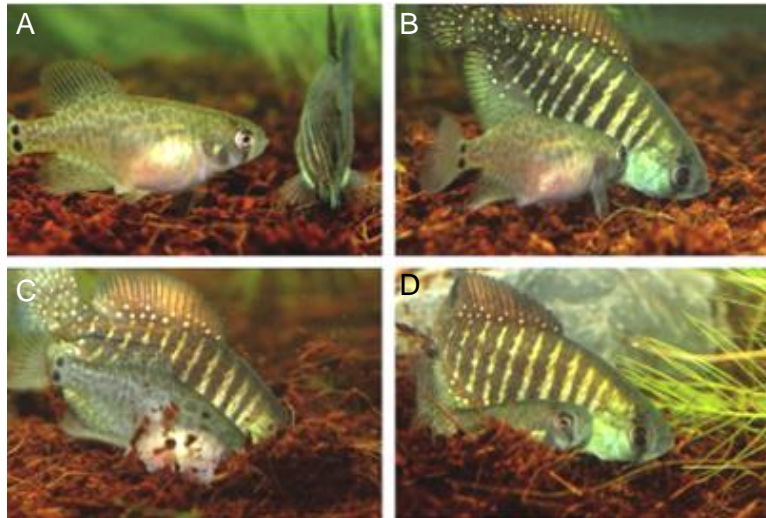


Figura 11. Secuencia de cortejo de *Austrolebias charrua*: **A)** Exhibición del macho frente a la hembra. **B)** Invitación del macho a hundirse en el substrato. **C)** Aceptación de la hembra y **D)** Apareamiento (esquina inferior derecha). (Foto: M. Casacuberta.) *Tomada del Capítulo 12 Libro Peces Anuales Passos y col., 2015.*

En Uruguay se han reportado aproximadamente 40 especies pertenecientes al género *Austrolebias* lo cual evidencia la gran especiación del género (Costa, 2006; Loureiro y col., 2011). Sus aspectos evolutivos, reproductivos y comportamentales son objeto de estudio de zoólogos, genetistas, etólogos y embriólogos de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR). Los enfoques multidisciplinarios, permiten un manejo experimental racional de forma que no se altere el equilibrio de sus ecosistemas ni la perpetuidad de las especies.

La alta especiación y anualidad de las *Austrolebias* sugieren que el estudio de la neurogénesis en estos peces puede proporcionar una herramienta comparativa valiosa.

Las *Austrolebias* son Euteleósteos más modernos que el pez Cebra. Por lo tanto es un modelo propicio, desde el punto de vista filogenético, para realizar estudios comparativos dentro del mismo género y con el pez Cebra. Este último es un modelo

clásico y actual en esta área del conocimiento y su cerebro presenta aspectos en común y diferencias con los cerebros de *Austrolebias*.

4.2 Estrategias de supervivencia en condiciones extremas del hábitat

Los pozos temporales de agua en que habitan cambian drásticamente en su corta vida. Estos charcos presentan al principio del ciclo condiciones claras y transparentes del agua y a medida que se van secando aumenta la turbidez del agua hasta quedar en el último mes prácticamente en condiciones de agua barrosa. Estas condiciones extremas han hecho que este grupo de peces desarrolle estrategias de supervivencia adaptadas a este medio tan cambiante como el hecho de que los huevos embrionados queden durante todo el verano (4 meses) inmersos en el barro seco y que sean capaces de seguir completando el desarrollo embrionario, experimentando al menos 3 detenciones del mismo (diapausas) que luego de la llegada de la lluvias terminan de completar. Estos peces presentan un desarrollo de su capacidad reproductiva tempranamente y su ciclo reproductivo no cesa hasta que los charcos terminan de secarse (Berois y col., 2015).

4.3 Anatomía del cerebro de *Austrolebias charrua*

En trabajos previos hemos descrito en detalle las características cerebrales de *A. charrua* (Rosillo y col., 2010). De todos modos nos parece importante destacar las características generales y en particular detenernos en el Bulbo olfatorio. En este pez las tres grandes divisiones del cerebro: anterior, medio y posterior, presentan un desarrollo similar. En cambio al compararse con el cerebro del pez Cebra es un cerebro de mayor tamaño. En el cerebro anterior se observaron los lóbulos telencefálicos y los Bulbos olfatorios son grandes y sésiles en lugar de pedunculados como ocurre en Cebra. En cerebro medio se encuentran los Tectum ópticos bien desarrollados, mayores que en el pez Cebra, y en el cerebro posterior se destaca el cerebelo también con un desarrollo importante. (Fig. 12).

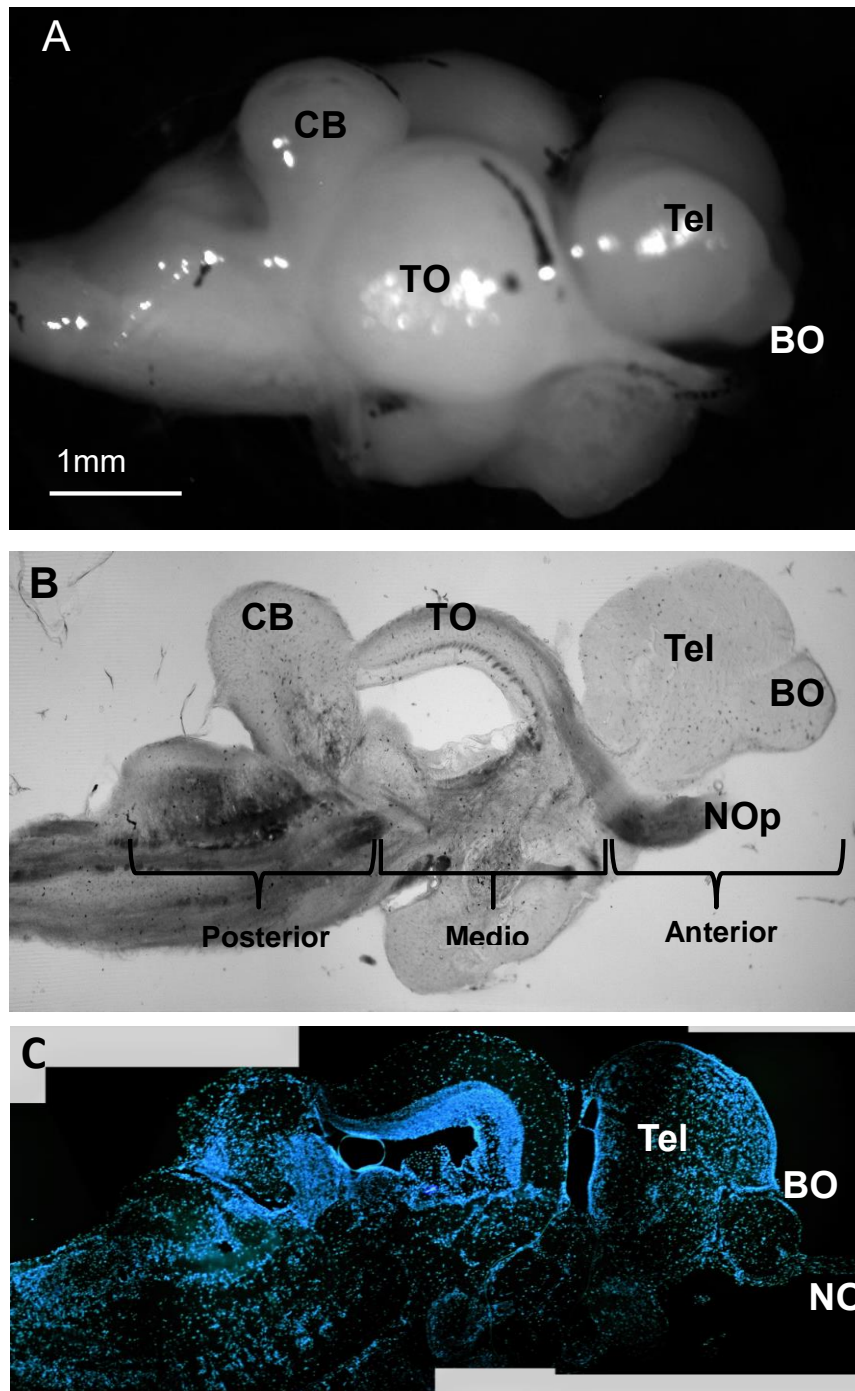


Figura 12. Imágenes macroscópica y microscópicas del cerebro de *Austrolebias charrua*. A) Vista panorámica. B) Corte parasagital al Vibrátomo sin ninguna tinción. C) Corte parasagital a diferente nivel teñido con DAPI. Se observa la posición y tamaño del BO con respecto al Tel, siendo este un BO sésil. BO, Bulbo olfatorio; Tel, Telencéfalo; TO, Tectum óptico; Nop, Nervio óptico; NO, Nervio olfatorio.

4.4 Anatomía del Bulbo olfatorio de *Austrolebias charrua*

El desarrollo embrionario de los peces teleósteos presenta una característica diferencial respecto a otros vertebrados y es lo que se denomina "eversión". En una etapa del desarrollo, la porción dorsal del tubo neural sufre una eversión de manera que lo que corresponde al *Pallium* queda expuesto hacia afuera y en el adulto parte del epitelio endodermico queda en los bordes exteriores del telencéfalo dorsal.

Dentro de los peces teleósteos también hay gran variedad de modelos anatómicos de BOs. En los peces del género *Austrolebias* existen características intra e interespecíficas propias. En primer lugar anatómicamente los BOs son prominentes, presentan una disposición sésil definida por encontrarse adyacentes a los lóbulos telencefálicos en posición rostro-ventral (Fig. 4). Sin embargo en otras especies como *Danio rerio* los Bulbos olfatorios se encuentran alejados de los lóbulos telencefálicos por un pedúnculo. En segundo lugar, existe un ventrículo único medial entre ambos BOs. A diferencia de los reptiles o roedores, en los que cada BO presenta un ventrículo y las capas celulares están dispuestas en círculo alrededor de ese ventrículo; en las *Austrolebias*, las capas celulares se disponen en paralelo a una única cavidad ventricular (Fig. 13).

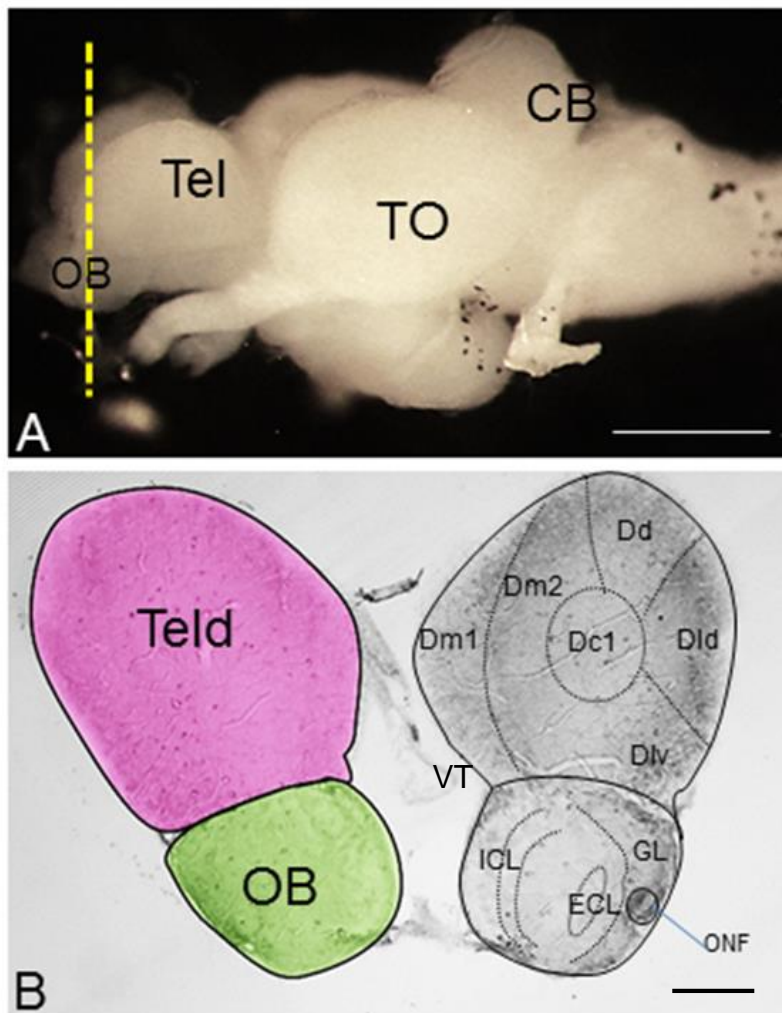


Figura 13. A) Vista lateral del cerebro de *Austrolebias charrua*. La línea indica el nivel de la sección transversal mostrada en B. **B) Divisiones telencefálicas y del BO en el cerebro de *Austrolebias charrua*.** La nomenclatura utilizada fue la misma que se usó para el pez anual *Nothobranchius furzeri* (D'Angelo, 2013). A nivel del BO encontramos algunas diferencias respecto a la capa glomerular de *Nothobranchius*. BO, Bulbo olfatorio; CB, Cerebelo; Teld, Telencéfalo dorsal; Dm 1,2, Dorso medial; Dd, Dorso-dorsal; Dld, Dorso-lateral dorsal; Dc1, Dorso-central 1; Div, Dorso-lateral ventral; CCI, Capa celular interna; CCE, Capa celular externa, CG, Capa glomerular; FNO, Fibras del nervio olfatorio; TO, Tectum óptico. Barras de calibración: A= 1 μ m; B= 200 μ m

Las capas celulares del BO en *Austrolebias* están alineadas con la luz ventricular similar a lo encontrado en otro pez anual africano el *Nothobranchius furzeri* (D'Angelo 2013). Las capas se denominan: capa celular interna (CCI), la más próxima a la luz ventricular y es la que contiene las células granos las más pequeñas, capa celular externa (CCE) se localiza alejada de la luz ventricular y contiene las células de mayor tamaño (mitrales) y por último la capa glomerular

donde están conformados los glomérulos sinápticos que es la más importante en *Austrolebias* y ocupa el tercio externo del BO. Las células que están en la primera línea contra la luz ventricular, serían las que contactan con el líquido cefalorraquídeo y no integran las capas antes mencionadas, esa es una región de proliferación celular. (Fig. 4). En cuanto al circuito olfatorio de los peces, se describe que no existen las células periglomerulares existentes en mamíferos (Andres, 1970; Butler 1996). Las células periglomerulares que se encuentran adyacentes a los glomérulos y cumplen una función importante en la discriminación de los olores (Breton y Saghatelyan, 2012). En *Austrolebias* se observa una población celular entre los glomérulos sinápticos que podrían interpretarse como células periglomerulares (Fig. 14). Este tema será tratado en el Capítulo 2.

Austrolebias charrua

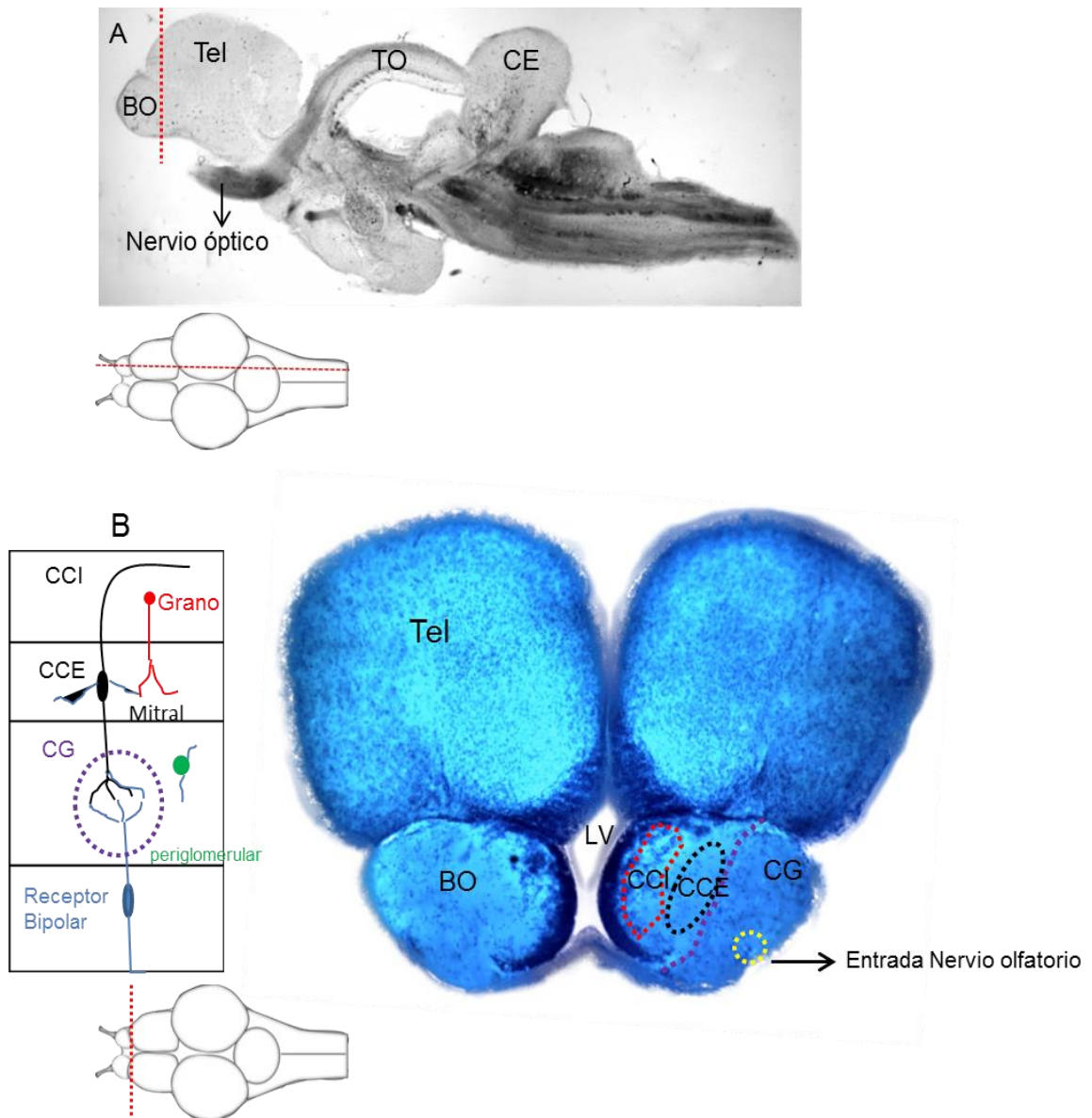


Figura. 14 Circuito en el Bulbo olfatorio. A) Corte parasagital realizado con vibrátomo, sin tinción del cerebro de *A. charrua*. La línea roja muestra el nivel del corte en B. **B)** Corte transversal teñido con Azul de Metileno donde se observa la zona del BO y del Tel dorsal. El punteado en colores representa las diferentes capas celulares que se distinguen en el BO de *A. charrua*. CCI células grano; CCE células mitrales; CG zona de los glomérulos sinápticos. En la parte izquierda se esquematiza el circuito con los tipos celulares. Los esquemas representan la vista dorsal del cerebro y las líneas punteadas en rojo indican los niveles y orientaciones de corte en A y B. Tel: Telencéfalo; BO Bulbo olfatorio.

5. DISCUSIÓN

Los peces del género *Austrolebias* pertenecen al Orden *Ciprinodontiformes*, son peces que poseen una característica única referida a su corto ciclo de vida dentro de los vertebrados que es menor a un año. Este único ciclo de vida está correlacionado con su hábitat que son pozos de agua dulce estacionales ubicados fundamentalmente en América del Sur y África. El hecho de que los pozos se sequen en pocos meses ha hecho que desarrollen estrategias únicas de reproducción referidas a la existencia de huevos embrionados que sobreviven en el barro, realizando detenciones en su desarrollo “diapausas”. Estos peces luego del nacimiento en la época de lluvia alcanzan la madurez sexual a partir de los 2 meses y en el laboratorio después de eclosionar llegan a la madurez sexual entre 8 y 12 semanas (Berois y col., 2015). Los peces mantienen el estado reproductivo hasta que los charcos se secan y todas las formas postnatales mueren.

Estas adaptaciones y su estilo de vida en charcos hacen que se generen numerosas especies con características particulares probablemente que respondan a cada posición geográfica en el medio ambiente. Nuestros estudios han mostrado que especies cercanas presentan cerebros similares pero no iguales y eso también se ha visto reflejado en las tasas proliferativas de diferentes regiones del encéfalo. (Fernández y col., 2011).

Si bien estos animales están considerados como peces macrópticos con grandes ojos y dimorfismo sexual en su colorido fenotipo, la visión puede no ser la modalidad sensorial preponderante cuando los charcos se vuelven turbios. Por consiguiente el olfato se convierte en la modalidad más importante al final de la vida de estos peces cuando se están reproduciendo. Estos hechos junto con nuestros datos previos sobre la presencia de una conexión importante entre BO y retina, más importante que en pez Cebra, nos hace pensar que la actividad neurogénica en Bulbo olfatorio es más exigida que en otros peces como el pez Cebra (Rosillo y col., 2013).

El estudio comparativo realizado en el cerebro de tres especies de *Austrolebias*, dos de ellas filogenéticamente muy cercanas, mostró algunas diferencias anatómicas e importantes diferencias en las tasas proliferativas de estructuras relacionadas con la visión y la olfacción. Estos resultados junto con otros datos comportamentales sugieren que la olfacción es una modalidad sensorial muy importante para la función reproductiva y la supervivencia en los charcos con poca luminosidad (Rosillo, 2010; Fernández y col., 2011; Passos y col., 2014).



RESULTADOS
CAPÍTULO 2

6. RESULTADOS CAPÍTULO 2

6.1 Citoarquitectura de los Bulbos olfatorios.

6.1.1 Cajal de Castro y Golgi

El método de impregnación de las neurofibrillas nos proporcionó información acerca de la correlación anatómica del Bulbo olfatorio (BO) en el cerebro y de la citoarquitectura, así como la distribución de los axones provenientes del nervio olfatorio que participan en los contactos sinápticos de los glomérulos sinápticos. Las células se tiñeron de color ámbar y mostraron su distribución. Por su parte, los axones adquieren una fuerte tonalidad oscura debido a la impregnación con las sales argénticas de las neurofibrillas. En los laterales externos del BO se observa una densa tinción en el lugar de entrada del nervio olfatorio. Luego de la entrada, los axones se ramifican en ramas más finas que se distribuyeron lateralmente y rodeando los bordes externos de ambos BOs desde su porción ventral hasta su porción dorsal, delineando toda la región que ocupan los glomérulos olfatorios (Fig.15).

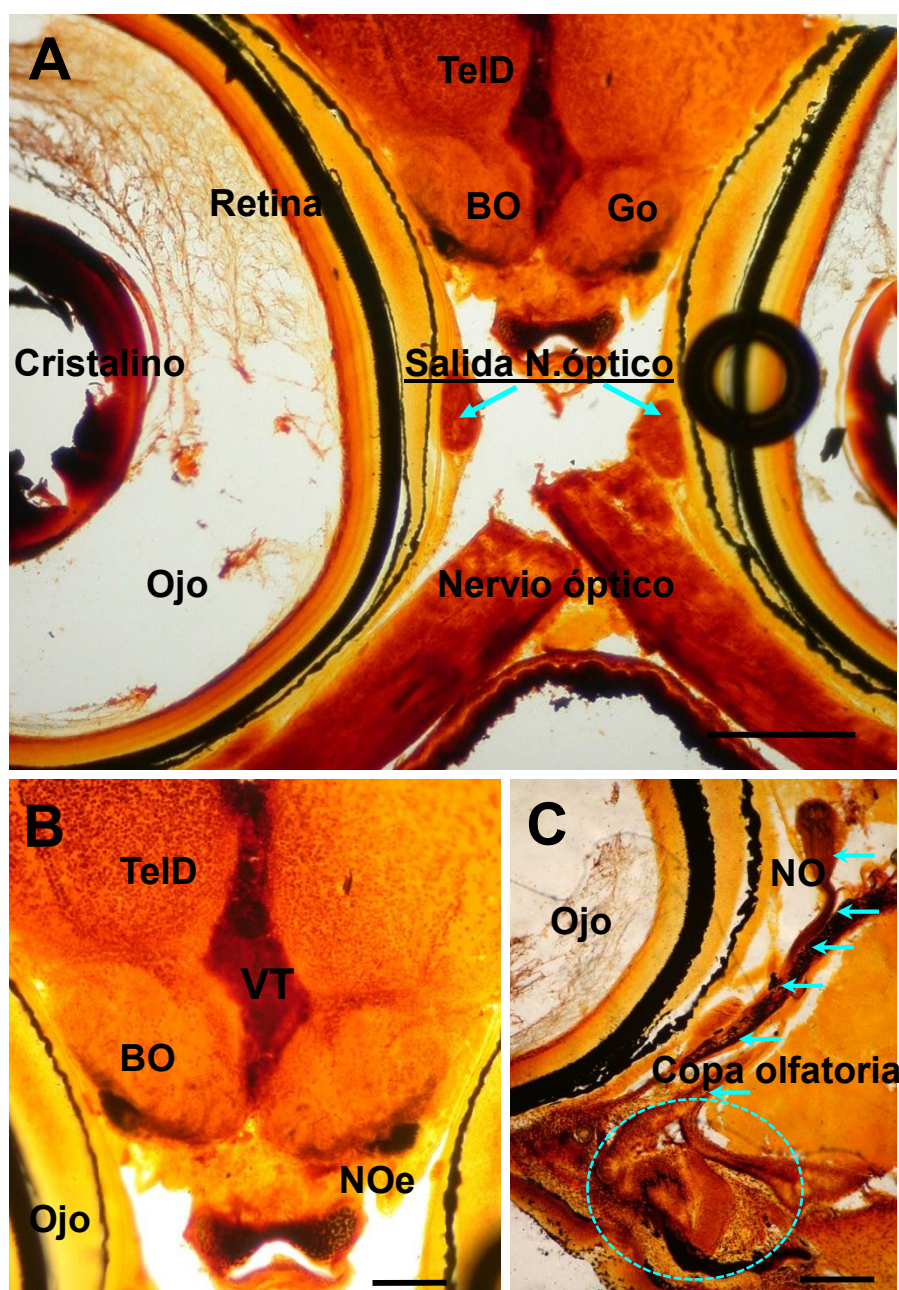


Figura 15. Cajal de Castro en el BO. **A)** Vista panorámica del BO en su ubicación anatómica en el cerebro. **B)** Se observa la entrada del Nervio olfatorio (NOe) fuertemente impregnados por las sales de plata, los axones entran para formar los glomérulos olfatorios (Go). **C)** Se señala con flechas celestes la trayectoria del NO desde la copa olfatoria (línea punteada en amarillo) en el que se encuentran las células sensoriales del epitelio olfatorio. Barras de calibración: A= 500 μ m; B=200 μ m; C= 100 μ m

Los cortes semifinos realizados a partir de cortes de 30 μ m procesados por el método Cajal de Castro permitieron observar con mayor detalle las células que conforman los glomérulos. Se observan células inmersas entre las arborizaciones axonales teñidas con el precipitado de plata y otras que están por fuera de las

arborizaciones. Por tal motivo interpretamos que existe una población celular que pueden considerarse como periglomerulares a diferencia de lo descrito para otros peces (Butler y Hodos, 1996) (Fig. 16).

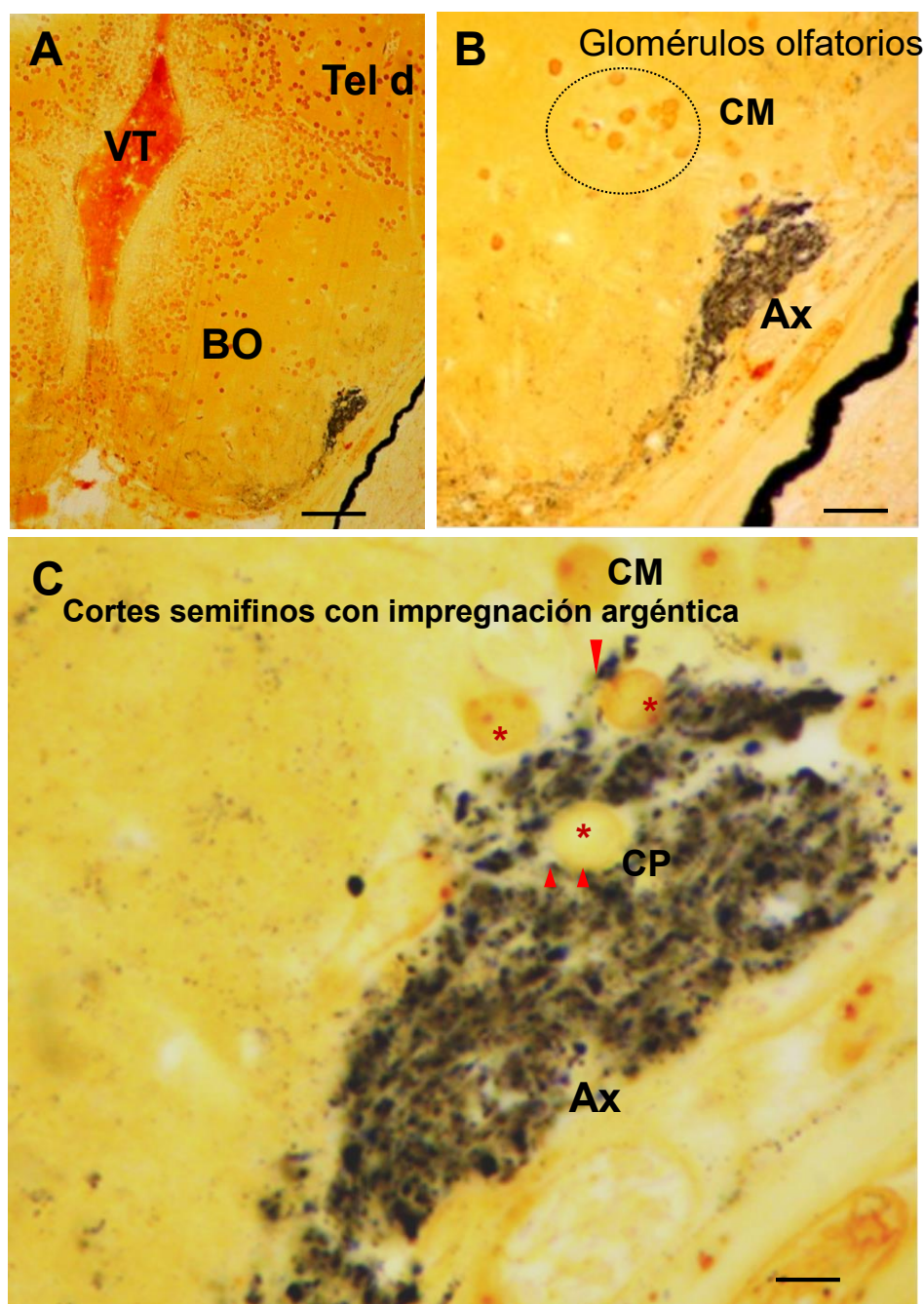


Figura 16. Cortes semifinos teñidos por el método de Cajal de Castro. A) Vista panorámica de un corte transversal a nivel del BO. **B)** Se observan la entrada de Axones (Ax) impregnados para formar parte de los circuitos olfatorios. **C)** A mayor aumento es posible ver los cuerpos de las células mitrales CM y periglomerulares CP (*) recibiendo contactos de axones del nervio olfatorio (cabeza de flechas rojas). Barras de calibración: A= 50 μ m; B= 30 μ m; C= 10 μ m.

El método de Golgi permitió la identificación morfológica de los tipos celulares característicos del BO que también fueron identificados con otras técnicas. En particular se observa la impregnación de la glía radial ubicada en la ZTr, y la característica célula grano con forma monopolar y pequeña así como células de mayor tamaño que por su ubicación podrían ser células mitrales o periglomerulares siendo difícil su distinción entre ellas. (Fig. 17).

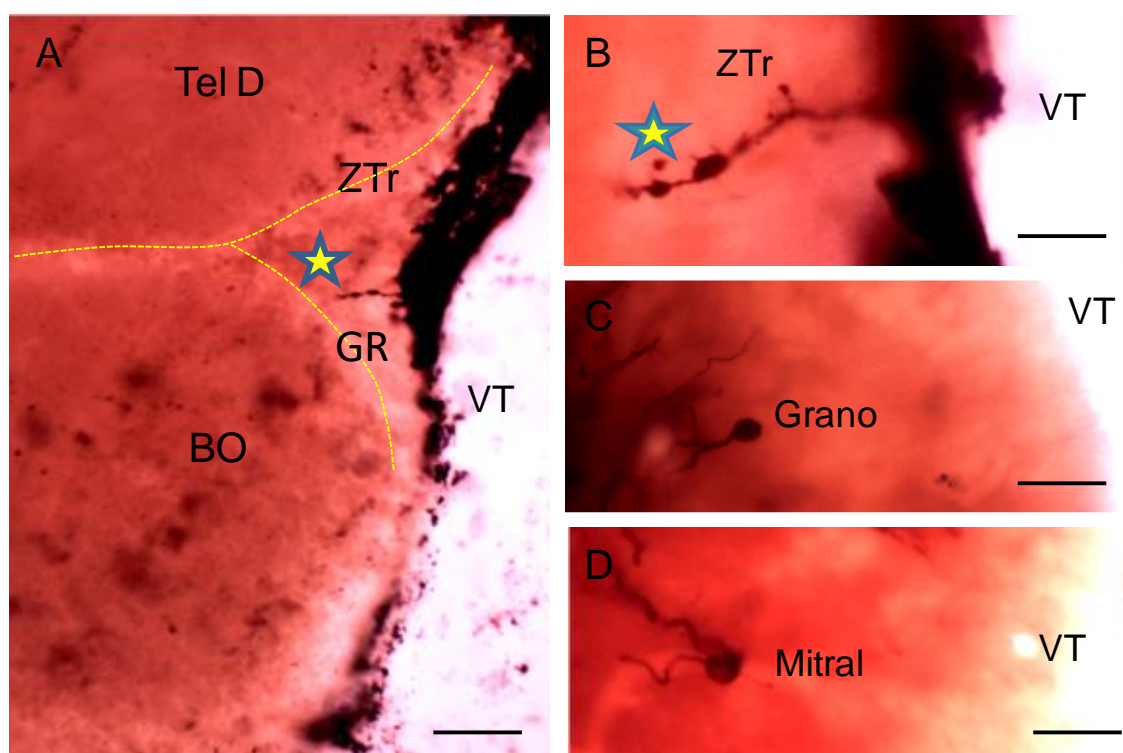


Figura 17 Técnica de Golgi en el BO. A) Vista panorámica de un corte transversal a nivel del Telencéfalo. Se observa una célula elongada en la ZTr (delimitada por la línea amarilla punteada). **B)** Mayor aumento de A donde se ven las características de la célula glial radial (GR). **C)** Célula grano en el BO. **D)** Célula mitral o periglomerular del BO. Barras de calibración: A= 100 μ m; B= 50 μ m; C y D= 30 μ m

6.1.2 Detección de NADPH-diaforasa

La enzima NADPH-diaforasa (enzima de síntesis del óxido nítrico (ON) neurotransmisor está presente en los sistemas sensoriales. Su detección por Histoquímica se observó en dos sitios particularmente: la zona de los glomérulos sinápticos y la zona de la transición (Fig. 18). Era esperable encontrar los axones

provenientes del nervio olfatorio positivos a la enzima. Sin embargo la presencia de la glía radial de la transición, fue más inesperada y sin duda la interpretación de los resultados difiere de lo tradicionalmente descrito ya que estas células no son neuronas. Aunque en las glías radiales Aromatasa positivas se ha reportado la presencia de la enzima (Diotel y col., 2010, Strobl-Mazzulla, y col., 2010), en numerosas zonas periventriculares de peces teleósteos se detectó la presencia de la enzima y se piensa que aquí la función del ON sería modular la actividad neurogénica (Pushchina y col., 2014).

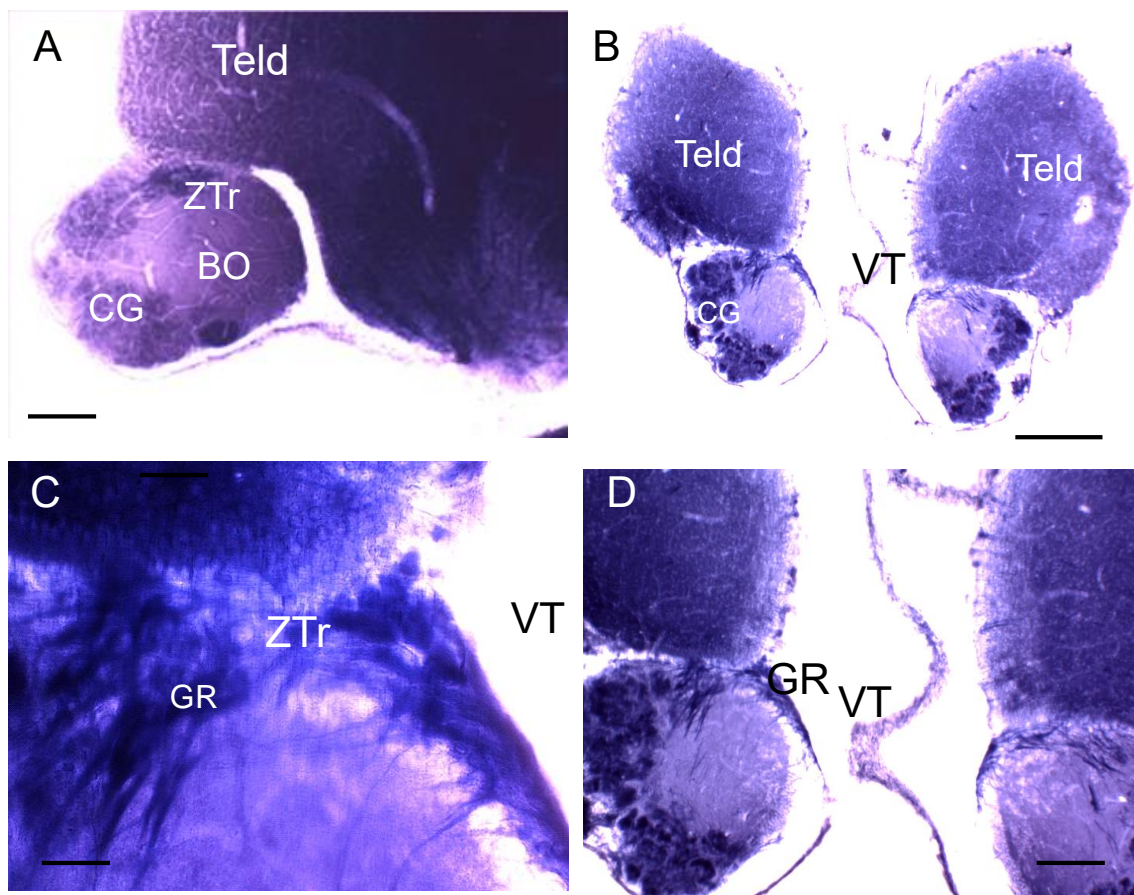


Figura 18. Detección de la NADPH- diaforasa en el BO. **A)** Corte parasagital del telencéfalo de *A.charrua*, donde se observa la presencia de la enzima en los glomérulos olfatorios que ocupan una importante porción del BO. **B)** Corte transversal donde se observa la expresión de la enzima en el tercio externo del BO. **C)** Mayor aumento de la zona de transición ZTr donde se localizan numerosas glías radiales positivas a la reacción. **D)** Corte transversal de mayor aumento donde se puede observar las glías radiales positivas en las ZTr en ambos hemisferios del Tel. Tel: Telencéfalo, VT: Ventrículo Telecefálico, BO: Bulbo olfatorio, CG: Capa glomerular, GR: Glías radiales, ZTr: Zona de transición. Barras de calibración: A= 300 μ m; B= 200; C= 30 μ m; D= 100 μ m.

6.1.3 Detalles estructurales de la capa glomerular

Las metodologías mostradas anteriormente permitieron delimitar la zona de capa glomerular (CG) donde se observó una profusa arborización axónica de origen del nervio olfatorio y los demás componentes celulares que integran el circuito, como las células mitrales, las periglomerulares y los granos. El análisis inmunohistoquímico con anti-S-100 (marcador glial) nos permite detectar las características de la glía que acompaña los glomérulos sinápticos. La glía presentó una arborización similar a la observada con la NADPH-diaforasa, ocupó el tercio externo del BO y este tipo de arborización glial solo aparece en esta localización en el cerebro de *Austrolebias charrua*. La combinación del anticuerpo anti-S-100 con un anticuerpo anti-Neurofilamento muestra la distribución de las neuronas que se encuentran comprendidas en la CG (Fig. 19A).

El estudio realizado con microscopía electrónica en esta zona muestra numerosos axones densos y cargados de vesículas que realizan contactos sinápticos con estructuras más claras que probablemente sean las dendritas de las células que participan en el circuito glomerular. Alrededor de las zonas sinápticas se observaron células gliales con núcleos provistos de cromatina compacta, que presentan prolongaciones de densidad intermedia. Estas prolongaciones gliales también se observaron acompañando los axones que realizan sinapsis (Fig.19.)

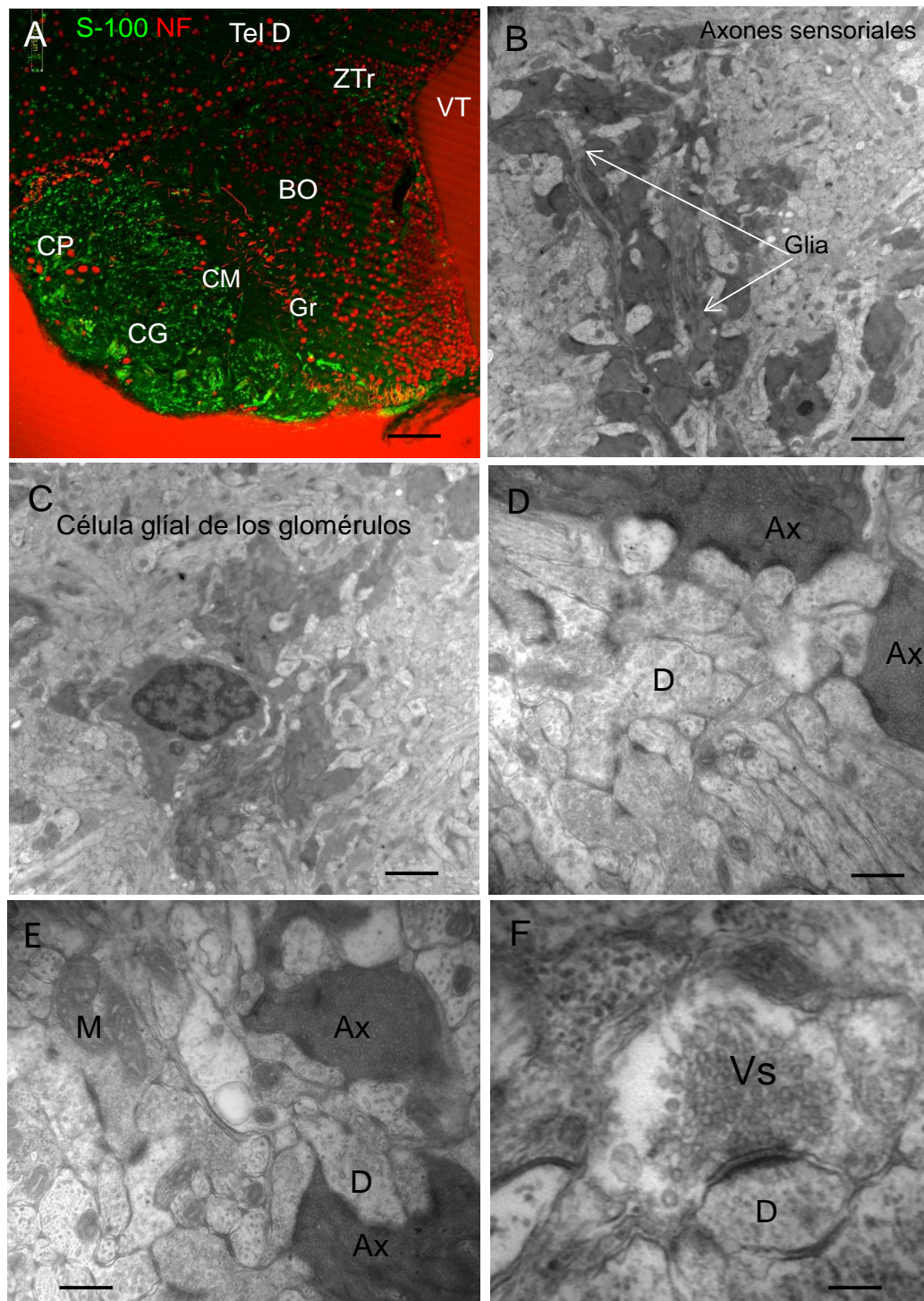


Figura 19. Glomérulos sinápticos del BO de *A. charrua*. **A)** Inmunohistoquímica en el BO donde se observa la glía S-100 positiva (verde) que acompaña los glomérulos olfatorios y las neuronas (rojo) marcadas con anticuerpo anti-Neurofilamentos, donde se aprecian los diferentes tamaños de células grandes mitrales (CM), células periglomerulares (CP) y células grano (Gr). **B)** Microfotografía electrónica de la Capa glomerular donde se observan axones oscuros, dendritas en claro (D) y glías de densidad intermedia que acompañan a los axones (flechas blancas). **C)** Célula glial de los glomérulos. **D y E)** mayor aumento de las zonas sinápticas donde se observa el contenido de los axones con abundantes vesículas (Vs) y mitocondrias (M). **F)** Sinapsis química típica de la zona glomerular. Barras de calibración: A= 100 µm; B= 2 µm; C= 3 µm; D,E= 0,5 µm; F= 0,1 µm.

6.2 Composición celular del Bulbo olfatorio y características histológicas de las paredes ventriculares en las zonas de mayor proliferación celular

El estudio de la citoarquitectura de las paredes ventriculares a nivel del BO y la transición del BO con el Telencéfalo (Tel) se realizó mediante las herramientas metodológicas anteriormente descritas en los procedimientos experimentales. La nomenclatura utilizada para nombrar las regiones cerebrales involucradas en este análisis fue basada en los atlas de pez Cebra (*Danio rerio*) y un pez anual africano *Nothobranchius furzeri*, (Wullimann y col., 1996; D'Angelo, 2013).

La mayor proliferación celular observada se localizó principalmente en regiones del BO y Tel que contactan con la luz ventricular. En este sentido identificamos tres regiones neurogénicas: 1- zona de transición BO-Tel (ZTr) localizada en la porción dorsal del BO limítrofe con los lóbulos telencefálicos. Es una región coincidente con el núcleo dorsal del área telencefálica ventral en las proximidades de la capa celular interna del BO; 2- la zona medial (ZM) localizada entre la ZTr y las zonas ventrales y por último; 3- la zona ventral del ventrículo telencefálico (VT) que se extiende a través de la interconexión de ambos BOs mediante un puente de fibras mielínicas que conforman el trayecto de la vía olfacto-retinal (Rosillo y col., 2013). Una vista panorámica de estas regiones se observa en cortes semifinos teñidos con AMB y los marcadores de proliferación celular utilizados CldU e IdU con 7 días de sobrevivencia entre uno y otro. (Fig. 20A,B). Como se puede observar, en la tinción con AMB se aprecia una composición celular no homogénea en el VT (Fig. 20A). En cuanto a los núcleos positivos a los marcadores de proliferación celular se observó una fuerte concentración de núcleos CldU e IdU positivos en la pared lindante con el ventrículo, así como algunos núcleos que captaron ambos marcadores de proliferación celular (Fig. 20B).

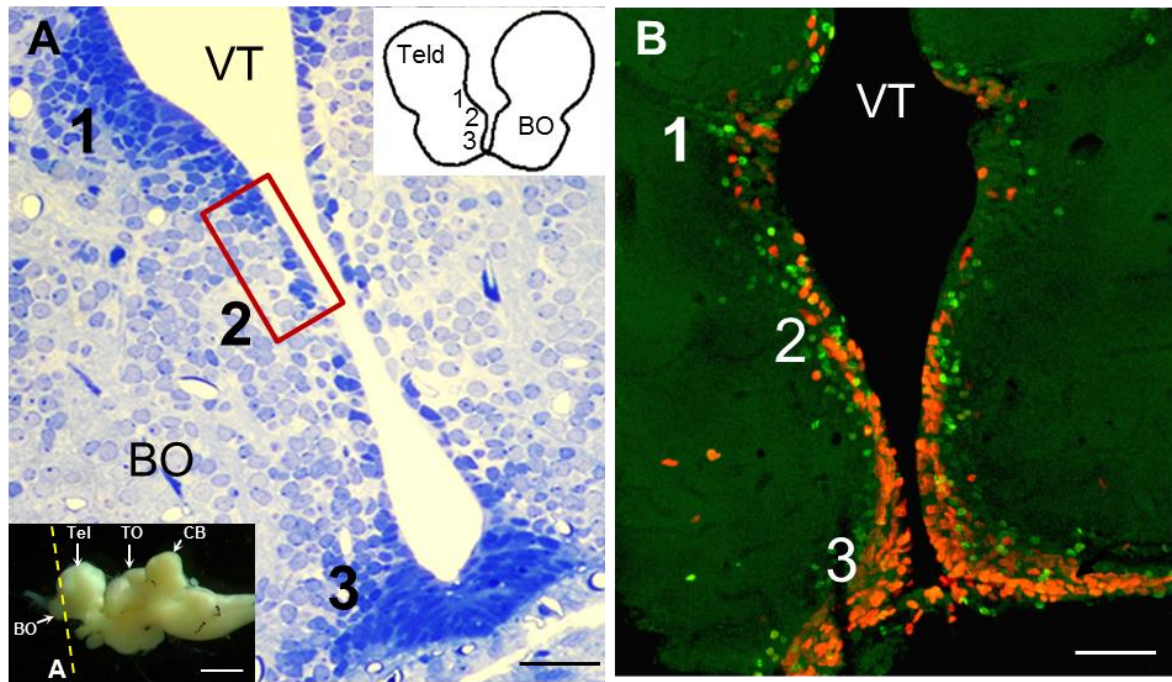


Figura 20. Regiones proliferativas en la pared medial del BO en *A. charrua*. **A)** Cortes semifinos transversales del telencéfalo a nivel del BO teñidos con AMB 1% que muestra la citoarquitectura de la pared ventricular telencefálica. El inserto en la esquina superior derecha muestra las tres regiones analizadas (1, 2 y 3). El inserto en la esquina inferior izquierda muestra una fotografía del cerebro de *A. charrua*; la línea discontinua indica el nivel y la dirección del corte obtenido y teñido con AMB. El rectángulo rojo muestra el área que observamos por MET. **B)** Proliferación celular CldU (rojo) e IdU (verde) en una sección transversal al mismo nivel de la sección teñida con AMB. Barra de calibración: A= 50 μm ; B= 100 μm .

6.2.1 Cuantificación del número de células proliferantes en el Bulbo olfatorio y Telencéfalo

La cuantificación de las poblaciones de células proliferantes IdU positivas (fluorescentes en verde) casi duplicaron el número de células CldU positivas (fluorescentes en rojo). Por su parte, el número de células IdU/CldU positivas (fluorescentes en amarillo) representaron solamente un 10% del total de células marcadas. Los resultados estimados se representaron en el (Gráfico 1).

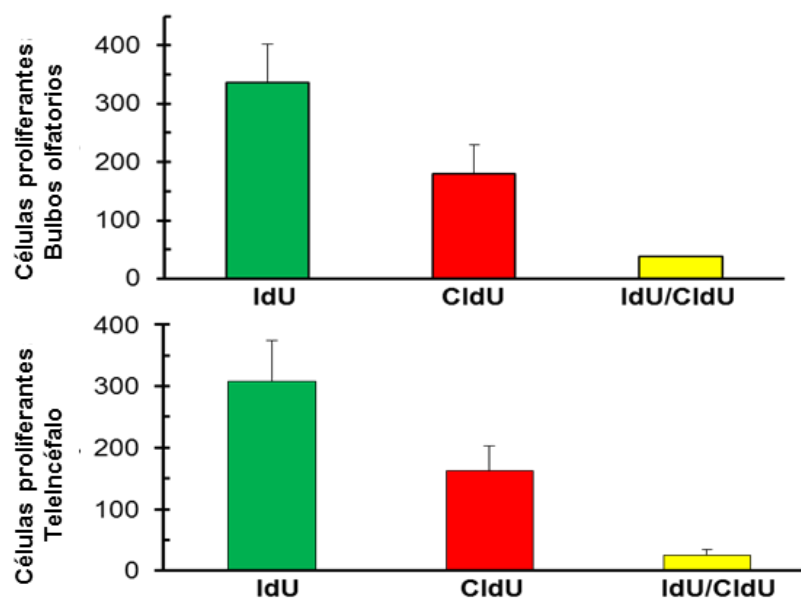


Gráfico 1. Cuantificación de núcleos positivos IdU, CldU e IdU/CldU en los niveles de BO y Tel. En ambas regiones las células amarillas representan el 10% del total de células proliferativas.

6.2.2 Identificación por Inmunohistoquímica de células proliferantes propuestas como candidatas a células madre

Al analizar la distribución de la glía radial en la porción rostral del cerebro anterior observamos células BLBP y Vimentina positivas (marcadores de células progenitoras). Los anticuerpos aplicados para detectar estas proteínas son específicos de células gliales y tuvieron una orientación y distribución particulares.

Las células BLBP positivas se localizaron a todo lo largo de la región medial y periférica del Telencéfalo. Mientras que, en el BO las prolongaciones de las células BLBP positivas se observaron orientadas en diferentes direcciones que podrían explicar la migración radial y tangencial de los neuroblastos (Fig. 7A).

Con respecto a las células gliales radiales Vimentina positivas, éstas presentaron una fuerte inmunorreactividad en la porción más ventral del BO unido a un bajo marcaje en la ZM y la ZTr (Fig. 21B). En la ZTr los cuerpos de las células BLBP

postivas estuvieron altamente concentrados y coincide con el sitio que presentó una alta inmunorreactividad de los factores de transcripción Sox2 y Pax6 (Fig. 21 CD).

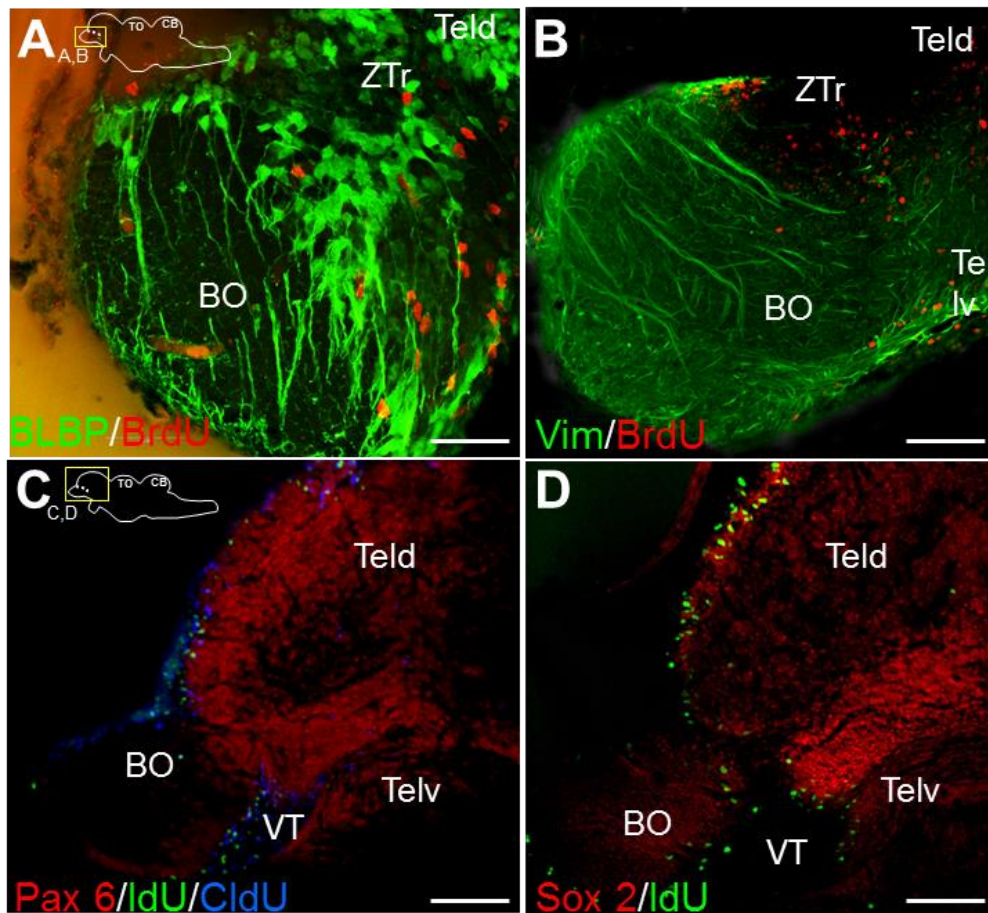


Figura 21. Inmunorreactividad diferencial de marcadores de células progenitoras en BO y Tel en secciones parasagitales. A) Inmunorreactividad significativa de BLBP (verde) en los procesos gliales radiales en el BO y en las zonas proliferativas. Los núcleos BrdU positivos aparecen en rojo. **B)** Señales de células Vimentina positivas (verde) y núcleos BrdU positivos (rojo) en el BO. Obsérvese la orientación diferente de los procesos de Vimentina positivos en comparación con la mostrada en A. **C)** Señal de Pax6 (roja) junto con el marcaje de IdU/CldU en BO y Tel. **D)** Señal de Sox2 positiva (rojo) combinada con IdU/CldU. Los cuadros amarillos que aparecen en ambos dibujos representan la región analizada en todas las imágenes. Barras de calibración: A,B= 50 μ m; C,D= 150 μ m.

Referente a su distribución, en la ZTr las células BLBP positivas están presentes en toda la región dorsal de la ZTr, mientras que las células Vimentina positivas están confinadas a la zona ventricular (Fig. 22A,C). La mayoría de las células que contactan el líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron inmunorreactivas al BLBP.

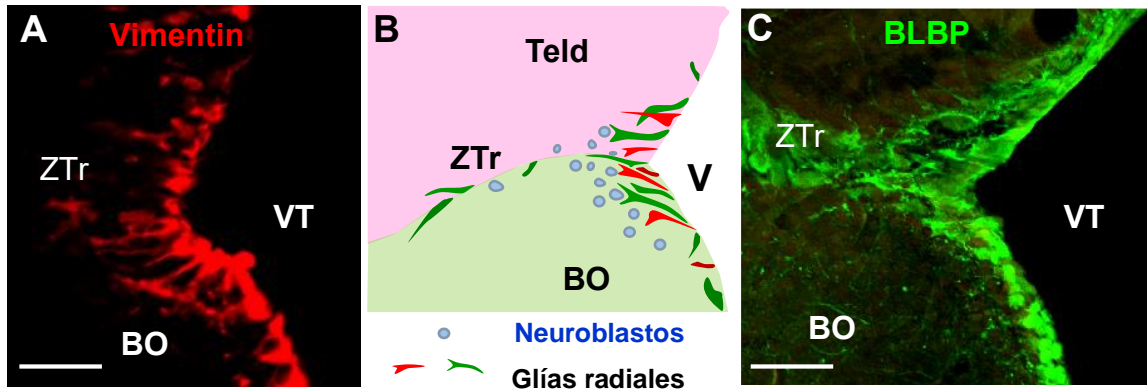


Figura 22. Expresión de marcadores de células progenitoras Vimentina y BLBP. A) Inmunohistoquímica que muestra células GRs Vimentina positivas en la ZTr. B) Dibujo que indica la ubicación de ZTr y las células GRs (verdes y rojas) cerca de los ventrículos. Los neuroblastos (azules) se localizan más internalizadas en el parénquima). C) Inmunorreactividad positiva para BLBP a lo largo de ZTr. BLBP, proteína de unión a lípidos del cerebro; BO, Bulbos olfatorios; VT, ventrículo telencefálico; Teld, telencéfalo dorsal; ZTr, zona de transición. Barras de calibración: A= 10 μ m; B= 20 μ m.

6.2.3 Las glías radiales están unidas por Conexina 43 (Cx 43)

El análisis inmunohistoquímico de la glía radial en la transición entre el BO y Tel muestra una población heterogénea donde algunas glías expresan Vimentina, otras BLBP y en algunos casos expresan ambos marcadores (Fig. 22). Estas glías que lindan con la luz ventricular muestran inmunorreactividad positiva de Cx 43 (marcador de las proteínas que integran las unidades proteicas de las uniones tipo "GAP"). La inmunorreactividad a Cx 43 se visualiza tanto entre los somas como en las prolongaciones de las glías radiales. La GR también se las observa en estrecho vínculo con los vasos sanguíneos donde parece también presentar uniones de tipo GAP (Fig. 23).

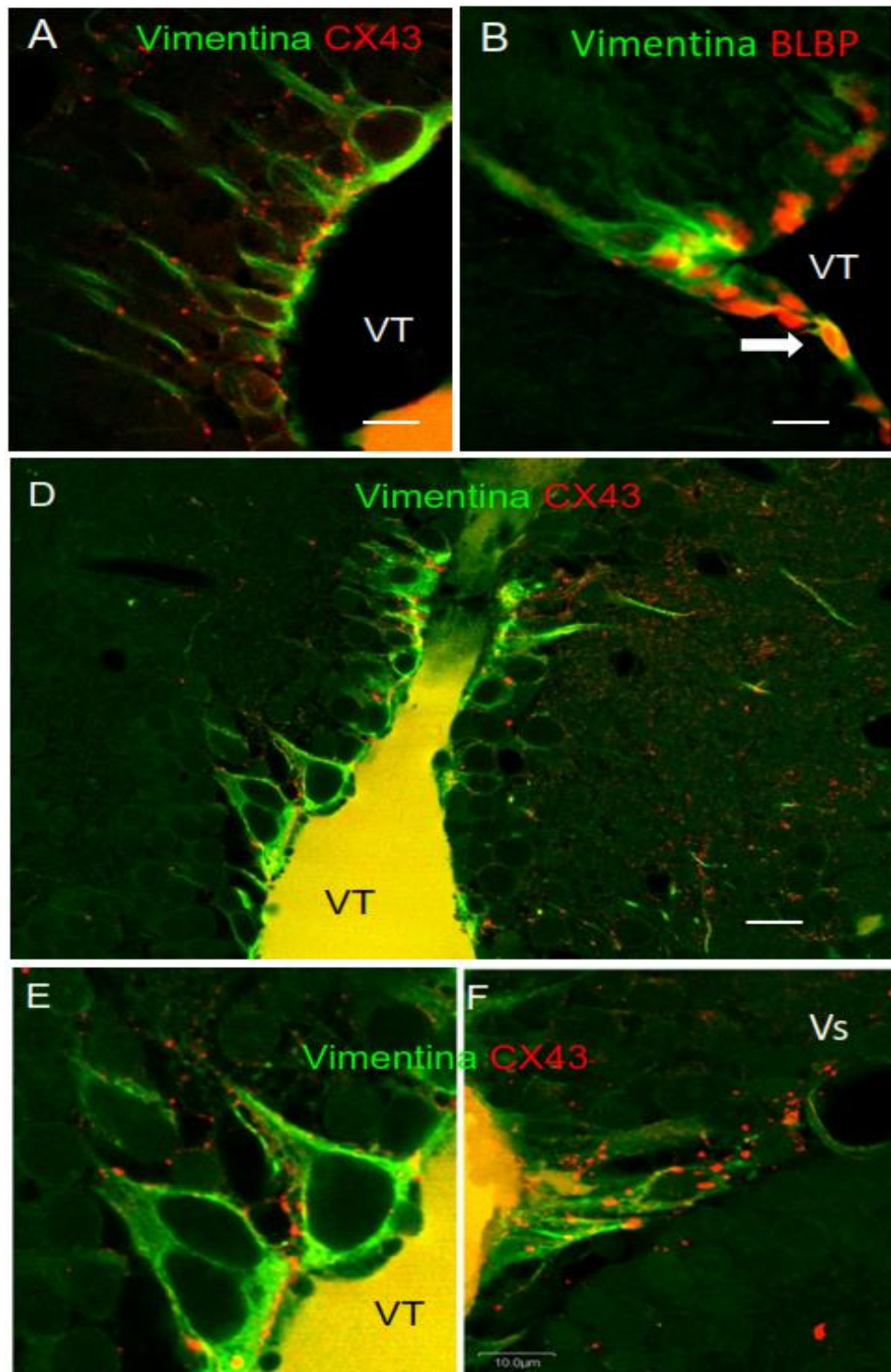


Figura 23. Inmunohistoquímica en la ZTr donde se muestra la inmunorreactividad de Vimentina y BLBP en las glías radiales. Las GRs se encuentran limitando la luz ventricular del VT, se encuentran unidas entre sí por uniones tipo GAP y con la presencia de Cx 43 (rojo) entre ellas. **A)** GRs positivas a la Vimentina y a Cx43 en soma y prolongaciones. **B)** Doble marcado de Vimentina y BLBP, la flecha blanca indica una célula doble marcada. **C)** vista panorámica de la ZTr. **D y E)** Mayor aumento de dos sitios de C. En E se observa una GR Vimentina positiva en estrecha vinculación con un vaso sanguíneo (Vs). Barras de calibración: A-B= 10 μm; D= 20 μm; D= 5 μm; E= 10 μm.

6.3 Composición celular y sus detalles estructurales

Al observar las imágenes por MET se describieron células con diferentes electrondensidades nuclear y citoplasmática respectivamente. Las células con mayor electrondensidad se localizaron en las proximidades de la luz ventricular en coincidencia con las regiones más proliferativas (Fig. 20A).

Al enfocarnos en las paredes del BO que proyectan hacia la luz ventricular, la ZM fue el nivel que mayor proliferación mostró en el BO y presenta una neurogénesis activa intrínseca poco explorada. Una proporción significativa de células mostraron fenotipos intermedios característicos de encontrarse en etapa transicional. Un dato relevante fue que en la ZM también se observaron tres tipos celulares principales, previamente reportados en otros sitios neurogénicos del cerebro adulto (Rosillo y col., 2010; Fernández y col., 2011). Asimismo se incluyeron los subtipos celulares para lograr una mejor descripción.

En primer lugar encontramos las células **Tipo I** que se encontraron densamente acumuladas en los sitios altamente proliferativos reconocidas por otros métodos. Estas células fueron las más pequeñas (4-5 μm), presentaron núcleos más electrondensos e irregulares. Su citoplasma mostró alta electrondensidad debido a la presencia de muchos ribosomas libres. En grupos de células **Tipo I** fue común observar figuras mitóticas en las células que se encuentran siempre en contacto con el LCR, pero rara vez lejos de la luz ventricular (Fig. 24A,B). Las células observadas en las proximidades de la luz ventricular exhibieron diferentes uniones intercelulares, también existieron grupos de células de este tipo que parecen interdigitarse con la membrana plasmática de las células vecinas. También fueron observados, espacios entre la membrana celular de células contiguas y un único cilio en el polo apical de las células que lindaron con la luz ventricular telencefálica. (Fig. 24C, asterisco). Las células **Tipo I** que no contactaron con el LCR se encontraron cercanas a la pared ventricular. Estas células tuvieron un núcleo más irregular con indentaciones y muy electrondenso que sugiere alta proliferación y se confirmó posteriormente con la presencia de altos niveles de células mitóticas en esta región. Dado

que estas células pueden ser amplificadoras/transitorias las denominamos como células **Tipo I t**. Otras células del **Tipo I** se ubicaron más alejadas de la luz, presentaron una apariencia más irregular y se observaron frecuentemente agrupadas y con espacios entre ellas.

Las células **Tipo II** presentan un núcleo con electrondensidad intermedia, sin indentaciones y tamaño aproximadamente entre 6 y 8 μm en su eje mayor. Presentaron citoplasma más claro, abundante con muchas mitocondrias agrupadas en el polo apical. En este polo fue común observar vacuolas de diferentes tamaños. Las células **Tipo II** son monociliadas con vacuolas y microvellosidades generalmente cercanas al cilio (Fig. 24C). Fue frecuente encontrarlas en contacto con la luz ventricular o intercaladas con las células **Tipo I** lindantes también con la luz ventricular.

Por último; las células **Tipo III**, presentan el núcleo redondo (6-8 μm de diámetro), más electronlúcido, con 1 o 2 nucléolos localizados próximos a la envoltura nuclear y presentan poco citoplasma y claro. Las células **Tipo III** se encuentran localizadas en la segunda fila de células o internalizadas en el parénquima escasamente en contacto con la luz ventricular.

Estas células coinciden con características propias de neuronas que se encuentran en diferentes estadios de diferenciación, desde neuroblastos con pequeñas cantidades de citoplasma hasta neuronas postmitóticas más maduras (Fig. 24D). En la zona 2 las células **Tipo III** parecieron no encontrarse en migración al no observarse espacios intercelulares entre ellas.

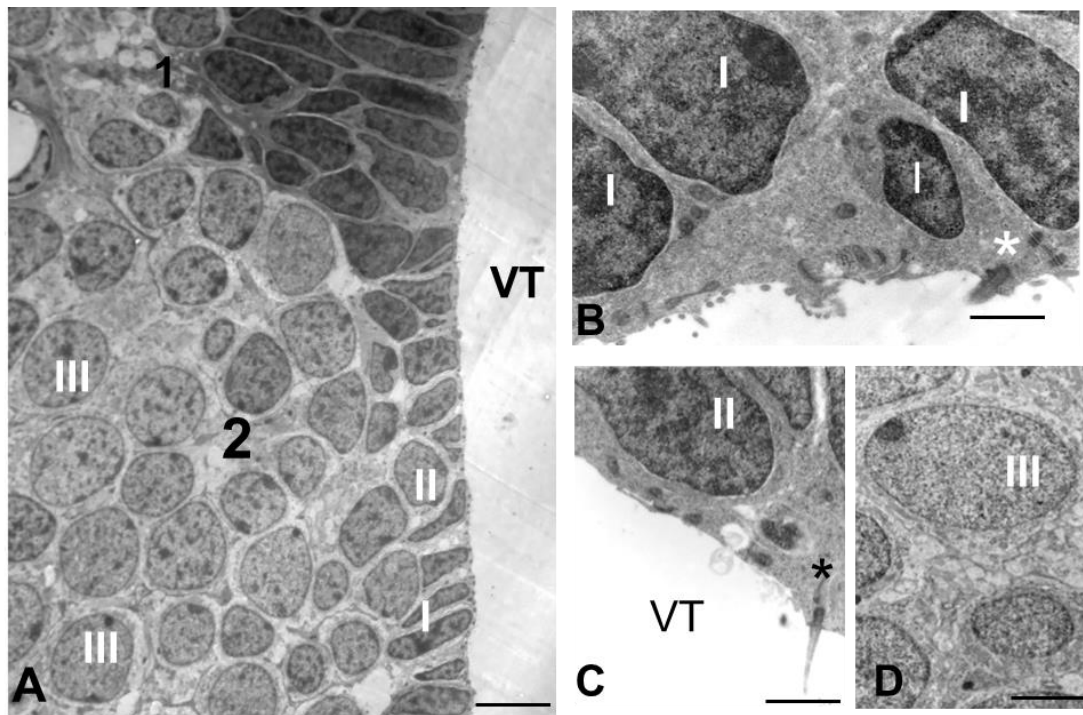


Figura 24. A) Micrografía electrónica a mayor aumento de las zonas 1 y 2. A) Algunas células están más alejadas del lumen y tienen una forma más regular con espacios entre las células Tipo II con electrondensidad intermedia; El Tipo III está compuesto por las células más electrónlúcidas que sugieren ser neuronas post-mitóticas. **B)** Mayor magnificación de las células de Tipo I que entran en contacto con la luz del ventrículo y son altamente electrondensas. También se observan uniones celulares y microvellosidades (*). **C)** Células de Tipo II a gran aumento que muestran la densidad de electrones intermedia y el contacto con la luz ventricular. Se muestra un solo cilio primario (*). **D)** Las células tipo III (neuronas post-mitóticas) tienen núcleos redondos con cromatina electrónlúcida. Barras de calibración: A= 5 μ m; B= 2 μ m; C= 1 μ m; D= 3 μ m

Como se observó anteriormente en los cortes semifinos (Fig. 20A), la ZTr y las zonas ventrales de los BOs mostraron una alta densidad celular y la mayoría de los núcleos celulares se tiñeron intensamente con AMB. Al analizar la ZTr por MET observamos un predominio de células **Tipo IV** con características típicas de **glía radial (GR)**. Las células **GRs** ocuparon la ZTr completa y se extendieron 30-40 μ m desde la luz ventricular hacia el parénquima. Las **GRs** presentaron una morfología elongada y organizadas en paralelo entre ellas con su eje mayor perpendicular a la luz ventricular (Fig. 25A). Una primera fila de **GRs** están en contacto con el LCR y la segunda fila estuvo entremezclada parcialmente con la primera fila sin contactar el LCR y con apariencia de epitelio pseudoestratificado. Las células **GRs** midieron en su eje mayor más de 17 μ m y presentan diferencias en su electrondensidad tanto en el núcleo como en el citoplasma. Teniendo en cuenta esta electrondensidad

diferencial se distinguieron 2 subtipos de **GRs**; GRs claras (**GR I**) y GRs oscuras (**GR II**). Estos dos subtipos celulares se alternan entre sí en una primera fila en contacto con el LCR (Fig. 25A-C).

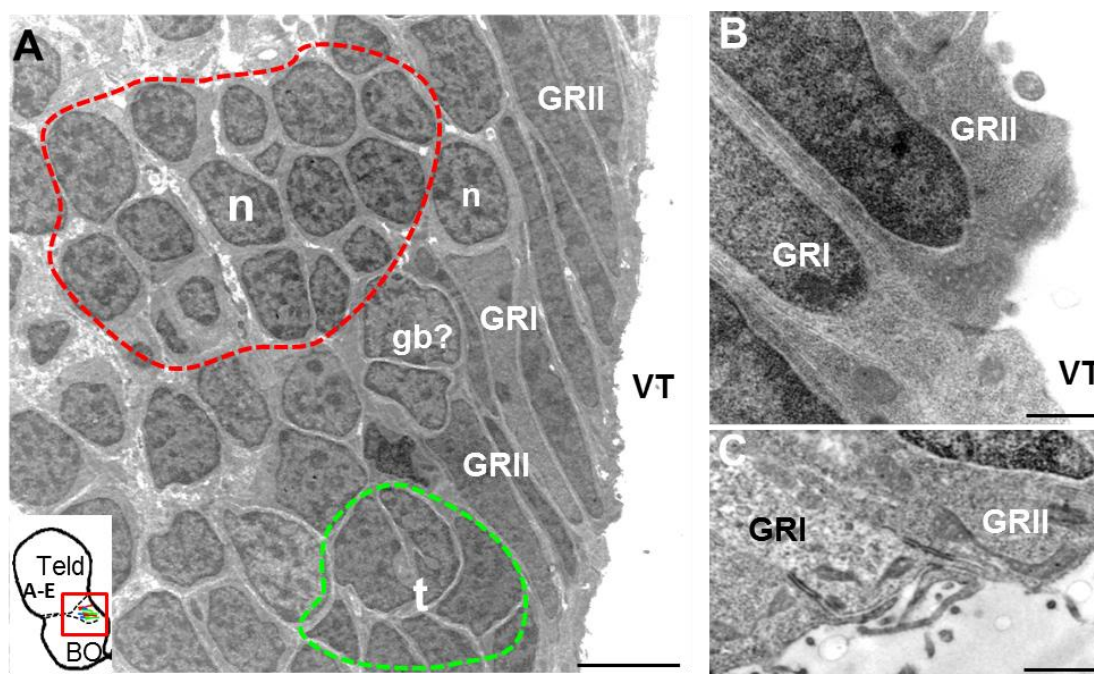


Figura 25. Análisis de la Ztr (zona 1). **A)** Micrografía por MET de la ZTr que muestra los dos subtipos de GRs identificados: Las GRI, más electronlúcidas están generalmente asociadas con neuroblastos, y las células GRII que son más oscuras y a menudo están asociadas con células que parecen ser glioblastos (¿gb?). La imagen también muestra grupos de neuroblastos migrantes (línea discontinua roja, n) y células más cercanas a la luz que tienen núcleos irregulares (línea discontinua verde, t). El esquema muestra la ubicación de ZTr en la pared ventricular (VT). **B)** A mayor magnificación se observan los subtipos de GRs que muestran diferencias en la electrondensidad nuclear y citoplasmática. **C)** Mayor magnificación de polos apicales celulares que muestran diferencias en la densidad de electrones citoplasmáticos, uniones intercelulares y microvellosidades que miran hacia la luz. **D)** Mayor magnificación de una célula GRII con un citoplasma electrondenso y un solo cilio (*). **E)** Neuroblastos migratorios (n) están estrechamente vinculados por uniones gap (flechas) y con espacios intercelulares entre ellos (*). Barra de calibración: A= 5 μ m; B= 2 μ m; C= 1 μ m.

Las **GR I** tiene muy pocos ribosomas libres a diferencia de la **GR II** que presentan muchos polirribosomas. En esta región, más internalizadas en el parénquima, observamos entremezcladas y adyacentes a las **GRs** tanto células migrantes (**n**) como células con características de células progenitoras (**t**). Las células migrantes parecen estar unidas por uniones tipo GAP y poseen espacios intercelulares que sugieren la migración (Fig. 25A).

6.4 Características de las superficies ventriculares.

Mediante la Microscopía Electrónica de Barrido los cerebros completos de *A. charrua* se disecaron y ambos hemisferios se dividieron en planos sagitales para exponer las superficies ventriculares de ambos hemisferios (Fig. 26A). Esta herramienta nos permitió explorar simultáneamente las superficies que tapizan los BOs, las ZTr y el Telencéfalo ventral (Telv) que proyectan hacia la luz ventricular. Como resultado se constató la superficie celular irregular en cada región y la presencia de cilios de diferentes longitudes, dirección de proyección, punto de origen variable y dos zonas con número variable de cilios (Fig. 26B,C). Las diferentes poblaciones de cilios describen una línea divisoria entre la región ventricular correspondiente al Telv y las paredes ventriculares del BO (Fig. 26A-C).

En el nivel del BO observamos células monociliadas con cilios entre 1-2 μm de longitud y que clasificamos como “cilio enano”. Estos cilios enanos parecen originarse en la parte media del polo apical de la célula y llevan una expansión en la punta que al analizarla por MET se observa como una estructura con bandas transversales (Fig. 26D-F). Se observó además, que el cilio enano está rodeado por un número variable de microvellosidades (Fig. 26G).

En cambio, las células que tapizan las paredes ventriculares telencefálicas son monociliadas con cilios más largos entre 10-12 μm . Estos cilios parecen originarse de la membrana celular sin ningún tipo de protrusión y van disminuyendo su diámetro desde la base hasta la punta que en general es fina y simple (Fig. 12G). Algunas microvellosidades están asociadas con la base de estos cilios largos (Fig. 26H). En la ZTr entre la pared ventricular del Telv y el BO existen cilios enanos y más largos entremezclados y presentaron organización 9+2 de sus microtúbulos lo cual se constató por MET (Fig. 26H).

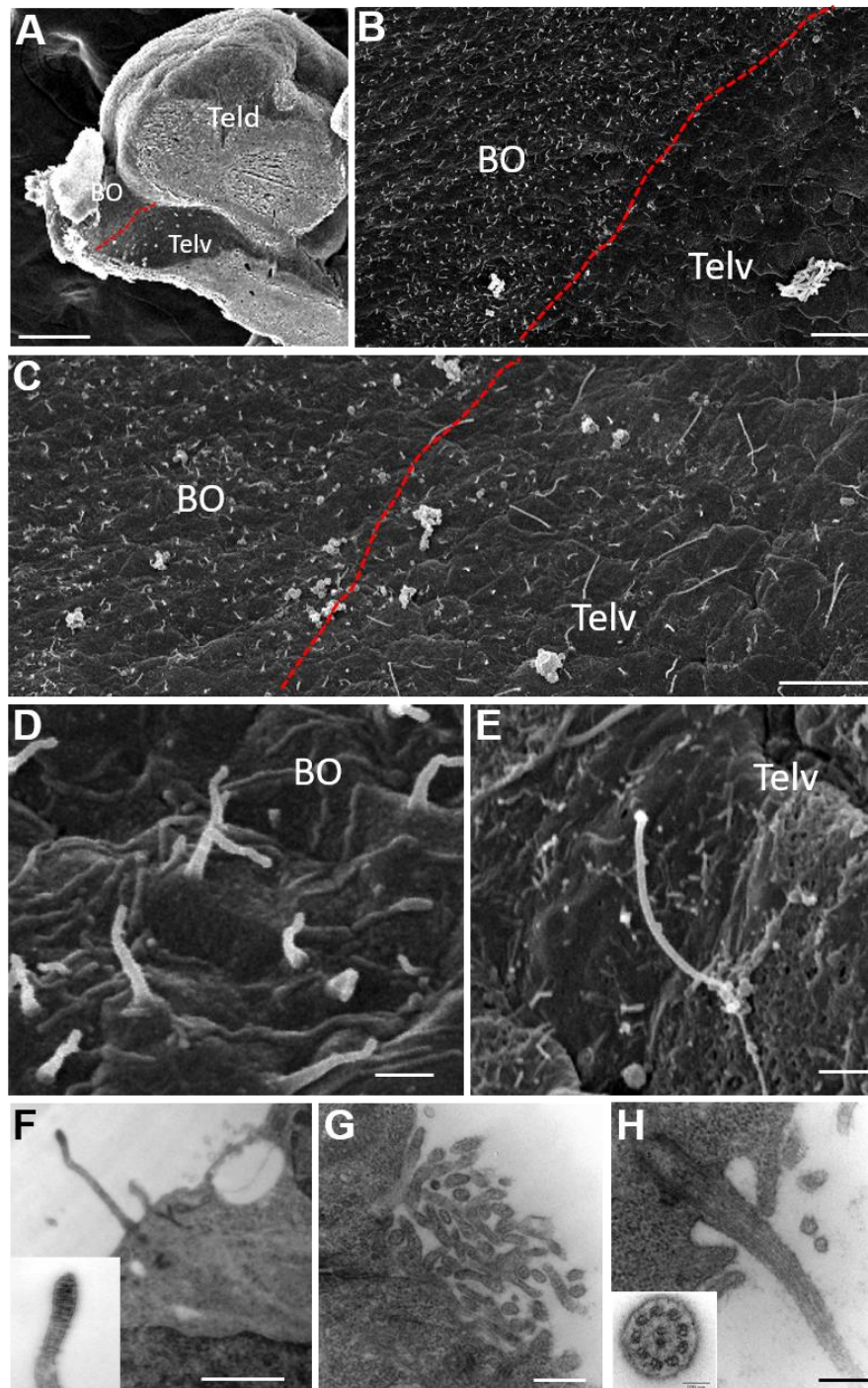


Figura 26. Análisis por MEB de las paredes ventriculares. **A)** Vista panorámica parasagital de gran parte del telencéfalo. **B)** Heterogeneidad de las paredes ventriculares entre el BO y el Tel dada la apariencia diferencial entre las células ciliadas. **C, D y E)** Mayores magnificaciones de (B) que muestran cilios más cortos y abundantes en el BO y cilios más largos y delgados en Tel. (C), así como también la morfología diferente de los cilios que componen el BO y el Tel. Nótese la apariencia general de los "cilios enanos" en el BO y la "protuberancia" en el lugar de emergencia de los cilios largos en el Tel. Las líneas discontinuas rojas en las figuras A, B y C muestran el límite entre las superficies ventrales del BO y Tel. **F)** Una vista de la especialización observada en la punta del cilio enano en el BO. El recuadro muestra la especialización de la punta a mayor magnificación. **G)** Abundantes microvellosidades que rodean al cilio enano. **H)** Una mayor magnificación del cilio del Tel que muestra su origen y pocas microvellosidades circundantes. El recuadro muestra la organización de los microtúbulos del cilio 9+2. Barras de calibración: A= 300 μm ; B= 20 μm ; C= 10 μm ; D,E=2 μm ; F= 1 μm ; G, H= 0,5 μm .

6.5 Capacidad proliferativa y neurogénesis en diferentes ventanas temporales de administración

La proliferación celular y la neurogénesis se evaluaron mediante la detección de los marcadores de proliferación BrdU, IdU y CldU aplicados en diferentes ventanas temporales.

En el **experimento 1**, los peces recibieron una inyección de BrdU con un tiempo de sobrevida de una semana. Después del sacrificio por perfusión intracardíaca la inmunodetección del BrdU se realizó combinado con el marcador neuronal HuC. Como resultado, identificamos neuroblastos localizados en la porción ventro-medial del BO.

En las secciones parasagitales observamos una fila de núcleos BrdU positivos en la transición ventral de la pared ventricular que se extienden ventralmente hasta la porción más rostral del BO con similares características a la BMR (RMS, Banda Migratoria Rostral siglas en inglés) (Fig. 27A-C). Algunas de las células positivas al BrdU colocalizaron con el marcador neuronal HuC (Fig. 27D-G). Los neuroblastos HuC positivos presentaron diferentes formas y tamaños, algunos fueron BrdU positivos, en cambio otros fueron BrdU negativos. Las células BrdU/HuC positivas generalmente se observaron con núcleos redondos y citoplasma con diferentes niveles de marcado del HuC. Se observó que las prolongaciones de las células HuC positivas transcurren en la dirección de migración y muchos núcleos celulares mostraron solamente señal BrdU positiva (Fig. 27F). En resumen observamos diferentes rutas migratorias desde la transición de la pared ventricular con mayor predominio del recorrido de la banda por la región ventral.

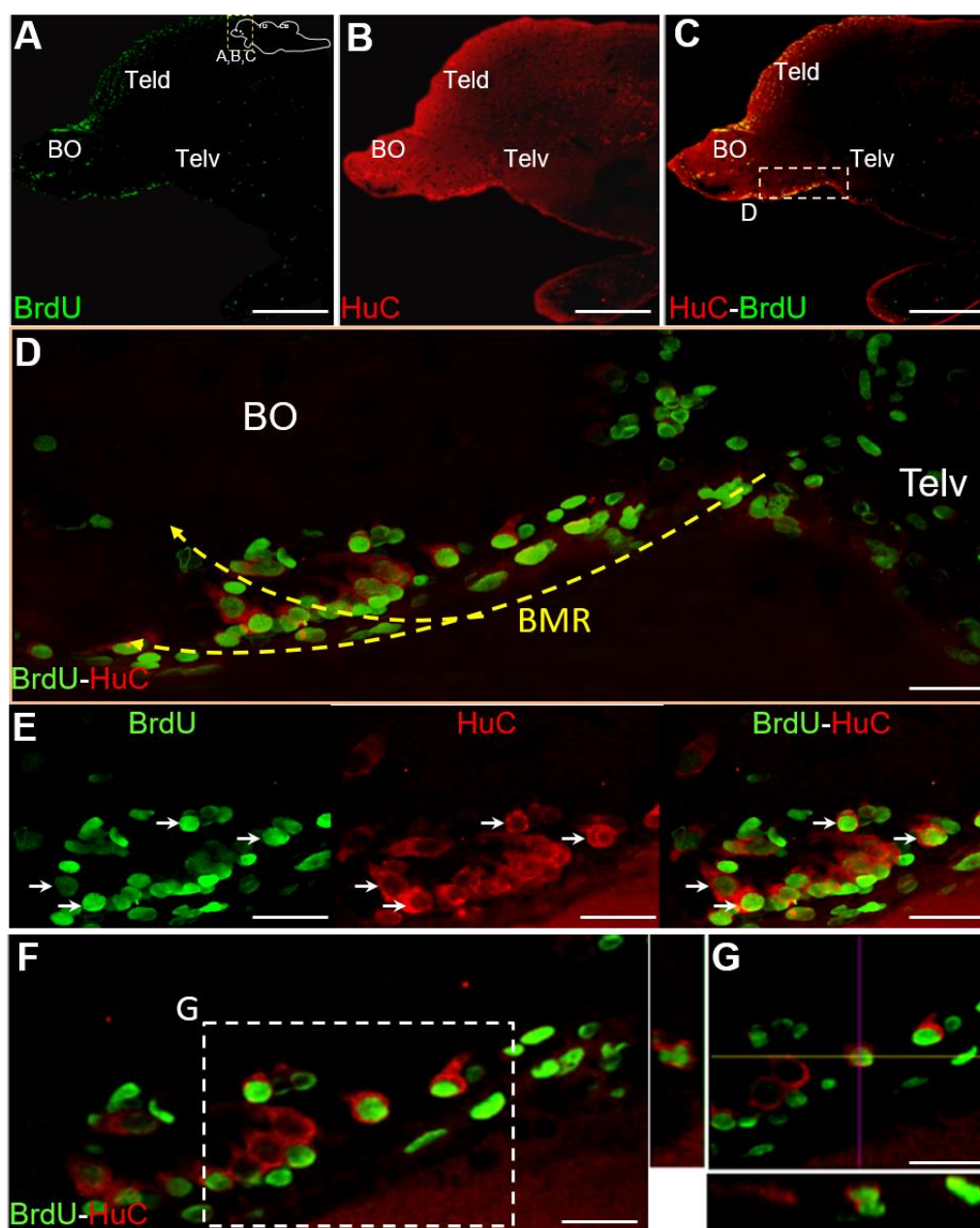


Figura 27. Neurogénesis a nivel de la BMR (Banda migratoria rostral). **A)** Vista panorámica del cerebro anterior en plano parasagital que muestra núcleos Brd positivos en la porción dorsal del BO y en la región ventral en la transición del BO-Telv. En la esquina superior derecha el rectángulo amarillo representa la región analizada en las imágenes A-B-C. **B)** El mismo compilado muestra la presencia de neuronas HuC positivas. **C)** Combinación de las señales de los núcleos BrdU positivos (verde) y las neuronas HuC positivas (rojo) que muestra su colocalización en la región ventral del BO (rectángulo). **D)** A mayor aumento se observa el área delimitada por el rectángulo en la Fig. C que muestra diferentes células doble marcadas BrdU/HuC positivas que demuestran la neurogénesis en la RMS indicada por las líneas amarillas. **E)** Canales confocales individuales que muestran los neuroblastos migratorios. El canal verde corresponde a la señal BrdU, el canal rojo muestra la señal de HuC y la tercera imagen muestra la combinación de ambos marcadores. **F)** Un solo plano fusionado que muestra la colocalización del BrdU con el HuC en varias células. **G)** Vista de planos ortogonales que confirman la co-localización de ambas señales en una misma célula. Barras de calibración: A-C= 300 μ m; D,E= 50 μ m; F,G= 30 μ m.

En el **experimento 2** utilizamos **dos** marcadores de proliferación celular administrados en dos momentos diferentes, 7 y 30 días respectivamente. Esta estrategia experimental nos brindó información acerca del origen y la dinámica de migración de las células proliferantes.

Sobrevida de 7 días (IdU) y 24 h (CldU): En primer lugar se administró el IdU (57,5 mg/kg Peso vivo) que lo tomamos como día 0. Pasados 6 días se inyectó el CldU (42,5 mg/kg Peso vivo), 24 h después se sacrificaron y fijaron por perfusión intracardíaca. Al combinar ambos marcadores con Pax6 observamos que la pared ventricular telencefálica es altamente proliferativa y coincide con la señal de Pax6 en la ZTr, la cual exhibió la mayor proliferación celular (Fig. 28A-C). Muchas de las células Pax6 positivas colocalizaron con células IdU/CldU positivas y su ubicación coincide con la de las células progenitoras que observamos por MET a 30-40 μ m distantes de la luz ventricular (Fig. 28D,E). Otro grupo de células IdU/Pax6/CldU positivas se encontraron en la ZM más cercanas a la luz ventricular (Fig. 28E).

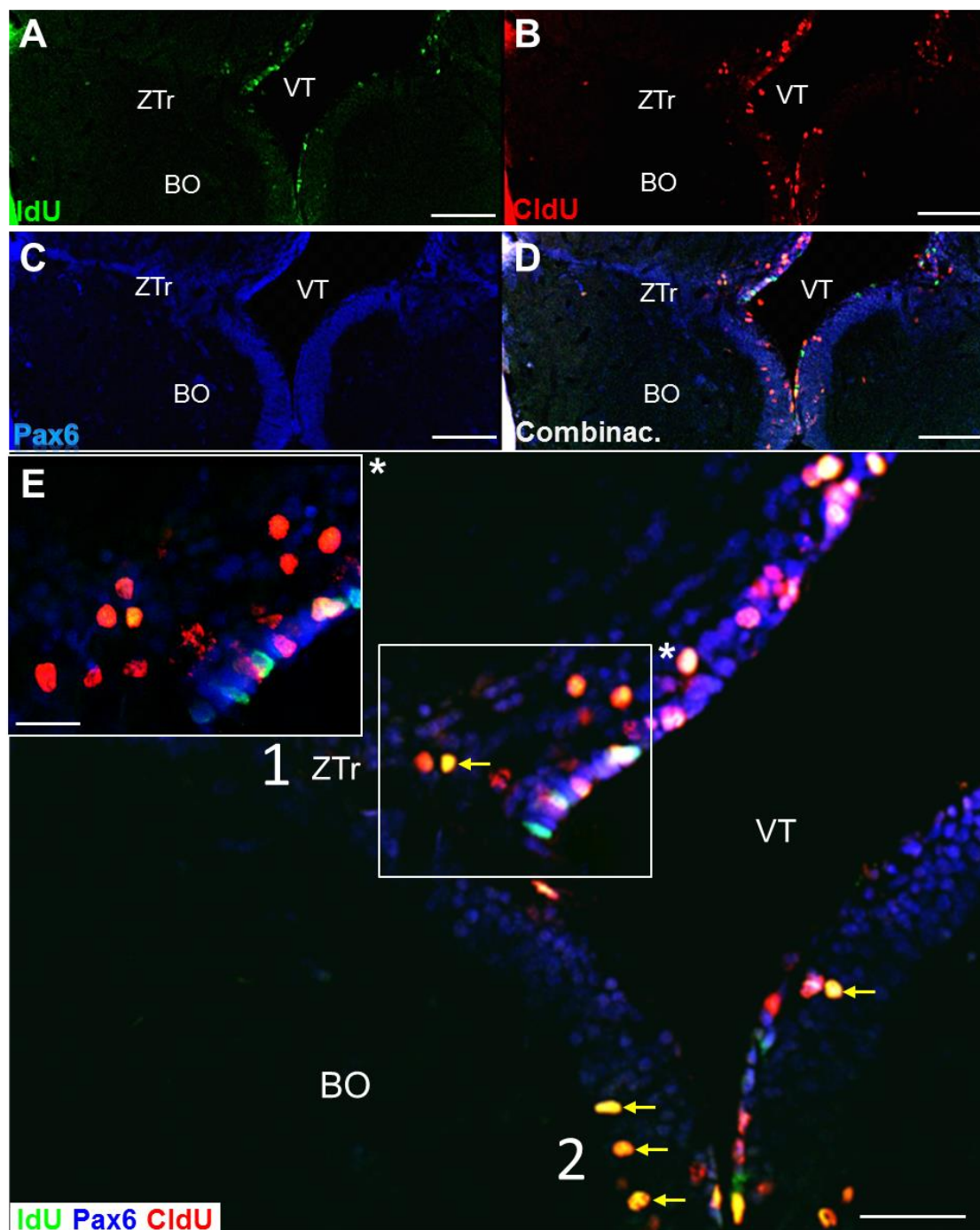


Figura 28. Imagen confocal del análisis inmunohistoquímico triple de IdU/CldU y Pax6 en cerebro de *A. charrua*. **A)** Sección transversal que muestra el inmunomarcaje IdU (verde) a nivel de BO. **B)** La misma sección que muestra que la señal CldU (roja) es coincidente con el inmunomarcaje del IdU. **C)** La señal de Pax6 se distribuye a lo largo de la pared ventricular y en la ZTr. **D)** Fusión de los tres canales de imágenes confocales que muestran la colocalización de Pax6 en los núcleos teñidos con ambos marcadores de proliferación utilizados. **E)** Triple marcado de células proliferativas IdU/CldU/Pax6 en la ZTr y la ZM. En la ZM la triple marcación coincide con las células Tipo II descritas por MET (flechas amarillas). El recuadro muestra a mayor magnificación un único plano confocal que muestra la triple colocalización más internalizada en la ZTr. ZM, Zona medial; BO, Bulbos olfatorios; ZTr, zona de transición; VT, Ventriculo telencefálico. Barras de calibración: A-D= 150 μ m; E= 50 μ m; recuadro= 30 μ m.

Sobrevida de 30 días (IdU) y 24 h (CldU): Con este intervalo temporal la colocación de ambos marcadores sugiere que estas células no migraron y reentraron en el ciclo celular. Este resultado junto con su morfología celular y la inmunorreactividad al Pax6 confirma la presencia de células madre en las ZTr y ZM. Estas células previamente las habíamos clasificado como células **Tipo II**. El protocolo de administración de los dos marcadores con la ventana temporal más prolongada mostró un alto porcentaje de células proliferativas a todo lo largo de la pared ventricular en la que la ZTr presentó los mayores niveles de marcaje.

A partir de la técnica inmunohistoquímica y el uso de la microscopía confocal reconocimos tres poblaciones de células proliferativas: 1) células próximas a la luz ventricular (CldU positivas); 2) células que migran diferentes distancias desde la pared ventricular (IdU positivas) y 3) células que no migran pero reingresan al ciclo celular constatado por la incorporación del segundo marcador de proliferación celular (CldU/IdU positivas) (Fig. 29).

En la ZM los núcleos doble marcados (amarillos) se encontraron próximos al tercio superior de la pared ventricular (Fig. 29A,B). Estas células grandes (de 10 μm aproximadamente), redondas y monociliadas (Fig. 29C,D) fueron las que previamente describimos como células **Tipo II** en la Fig. 24. La neurogénesis en esta región fue muy frecuente dada la inmunorreactividad al IdU y al HuC (Fig. 29E,F). De igual forma encontramos células amarillas (IdU/CldU positivas) que colocaron con la Vimentina (Fig. 29G).

De todas las regiones analizadas la región posterior de la ZTr BO-Tel (que limita con la región telencéfala ventral) fue la región que exhibió mayores niveles de proliferación celular.

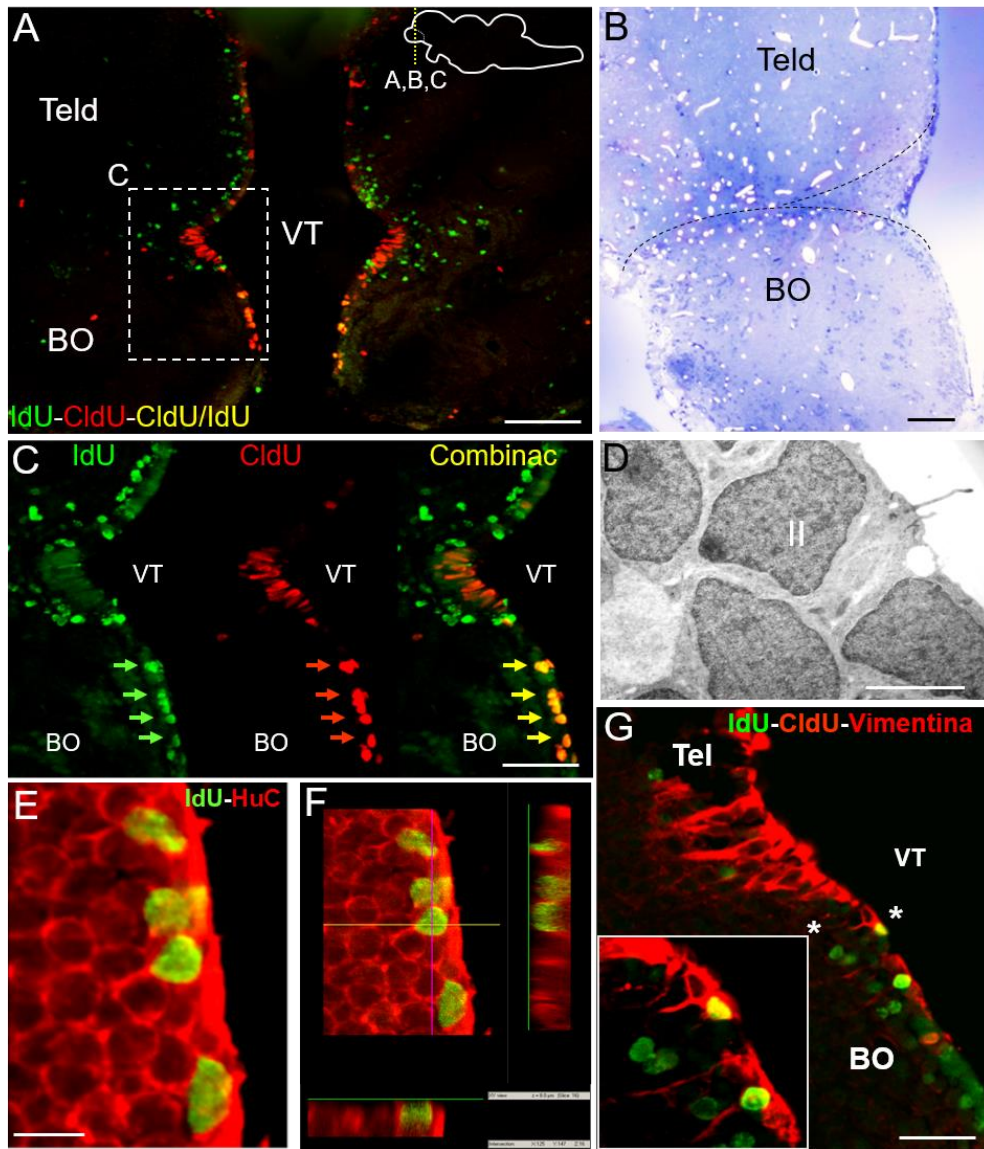


Figura 29. Análisis de la proliferación celular. **A)** Vista panorámica de una sección transversal a nivel de la transición BO-Tel con células inmunorreactivas al IdU y al CldU, administrados 30 días y 24 horas antes de la fijación. Células positivas IdU/CldU e IdU muestran la distribución de células en proliferación y en migración. Los núcleos dobles marcados se observaron en la zona medial (ZM) (rectángulo en líneas discontinuas), y células IdU positivas que migran radialmente en el área completa. **B)** Vista panorámica de un hemisferio teñido con AMB que enmarca la ZTr con líneas discontinuas. **C)** Mayor magnificación de zona enmarcada en A (30 μm de espesor). En la ZM se observan células que captaron los marcadores de proliferación celular IdU/CldU (flechas amarillas). Estas células son coincidentes con las células putativas mostradas en D por MET. **D)** Micrografía electrónica de célula Tipo II que presenta "cilio enano". **E)** Inmunohistoquímica de HuC e IdU (7 días) en el BO. **F)** Los planos ortogonales muestran la colocalización precisa de ambos anticuerpos. **G)** La colocalización con IdU/CldU/Vimentina muestra célula triplemarcada ampliada en el recuadro (*) en contacto con la luz ventricular (VT) en la ZM. Estas células amarillas son de Tipo II. Barra de calibración: A,B= 100 μm ; C= 50 μm ; D= 3 μm ; F= 10 μm ; G= 50 μm .

6.5.1 Ruta de migración de neuroblastos a lo largo del cerebro anterior hasta el Bulbo olfatorio

En los dos periodos de administración de los marcadores de proliferación celular (7 y 30 días), algunos cerebros de *Austrolebias* adultas se cortaron en su plano parasagital. Esta orientación nos aportó información complementaria acerca del posible recorrido de los neuroblastos. Al administrar el **CldU 7 días** después del IdU, se obtuvo como resultado que la mayoría de las células proliferativas se observaron confinadas o a pequeña distancia de la pared ventricular. Los cortes seriados evidenciaron diferencias en la distribución de los tipos de células proliferantes en dependencia de la proximidad a la pared ventricular. Los núcleos dobles marcados (IdU/CldU positivos) se localizaron con más frecuencia muy cercanos a las paredes ventriculares (Fig. 30A-C) con un número decreciente de núcleos a unos pocos micrómetros alejados de la luz ventricular (Fig. 30D,E).

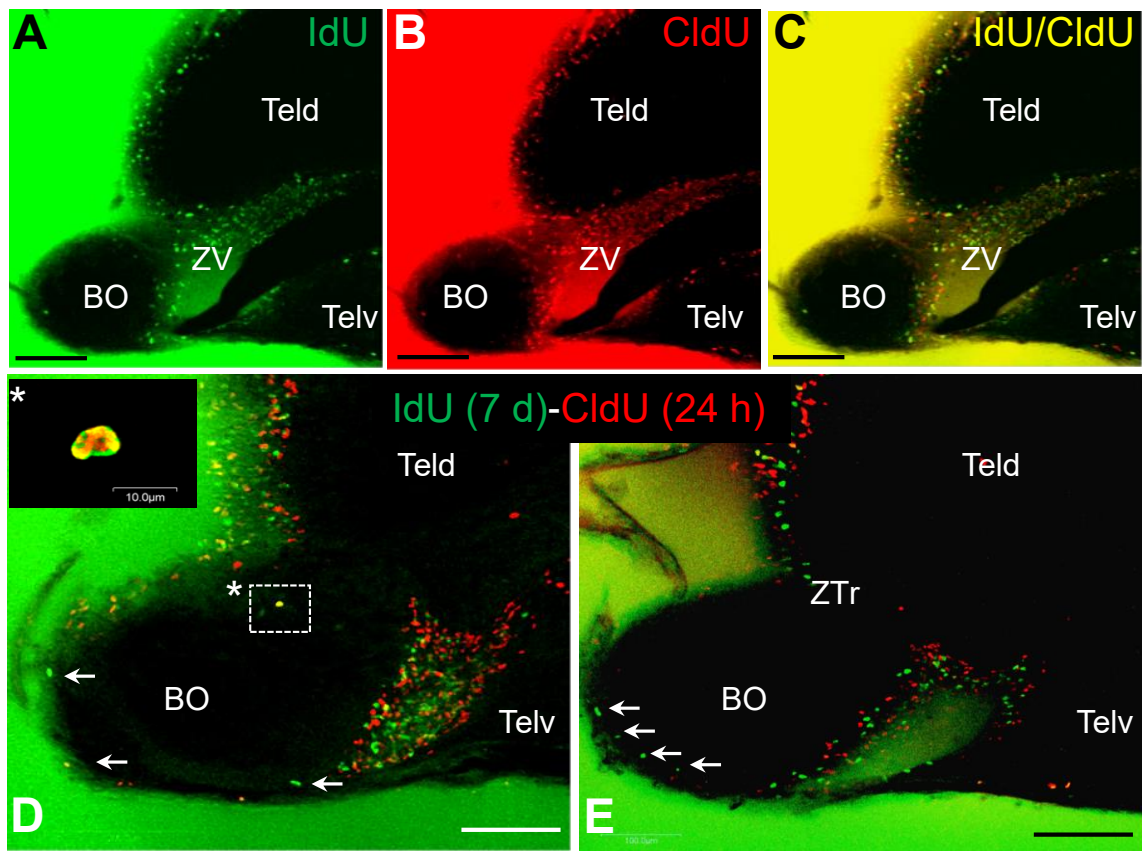


Figura 30. Curso temporal (7 días) de la proliferación celular en la pared ventricular. A) Imágenes confocales (eje Z 30 μm espesor) en planos parasagitales próximos a la zona ventricular que muestra núcleos IdU positivos pasados 7 días de inyectado. Estos núcleos están localizados principalmente en la pared ventricular próximos a la luz. **B)** Núcleos CldU

positivos (24 h postinyección) presentes en la misma ubicación de núcleos marcados con IdU. **C)** La combinación de las imágenes A y B muestran que ambos marcadores se encuentran casi en la misma ubicación. La colocación de IdU/CldU es poco frecuente en este tiempo experimental. **D)** Compilado de imágenes confocales (30 μm de espesor) que muestra el Ventrículo ventral en plano parasagital con 7 días del experimento. Se pueden notar algunos núcleos IdU positivos siguiendo el trayecto de la BMR hacia la porción más rostral del BO (flechas blancas). El inserto muestra un núcleo doble marcado con la típica señal y localización de células Tipo II. **E)** Corte parasagital del Ventrículo ventral en experimento de 7 días confirma la presencia de núcleos IdU positivos pertenecientes a la BMR (flechas blancas). Barra de calibración: A-C= 150 μm ; D,E= 50 μm .

Al administrar el **CldU 30 días** después de administrado el IdU, en los cortes parasagitales observamos que la porción posterior de la transición BO-Telencéfalo, limítrofe con el Telv, fue la región que exhibió mayor proliferación celular. Se pudieron distinguir diferentes rutas de migración que no se observaron en los cortes transversales (Fig. 31A,B).

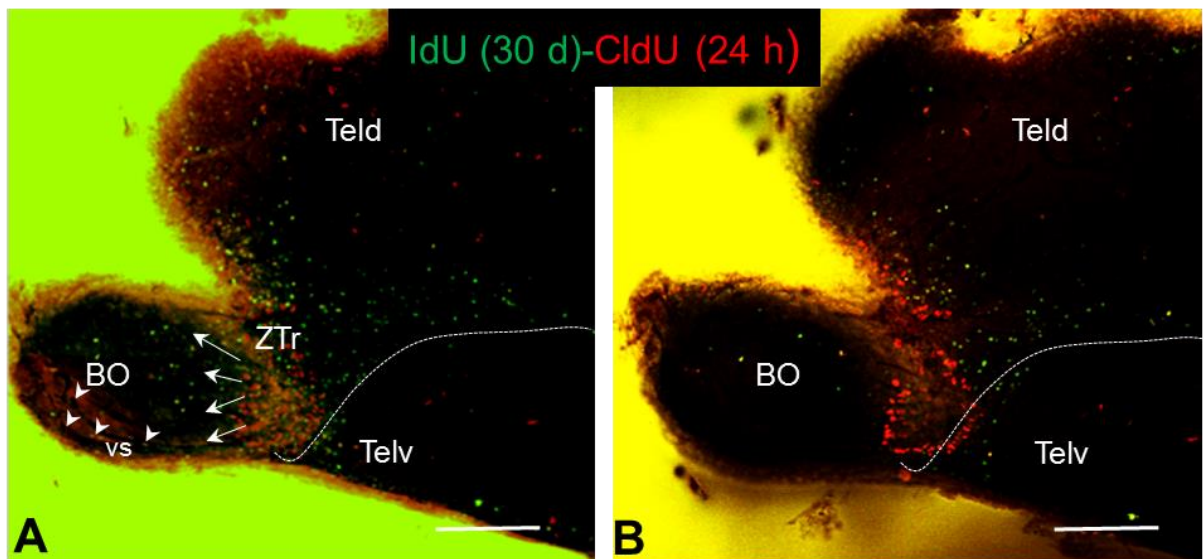


Figura 31. Discriminación temporal (30 días) de la proliferación celular en la pared ventricular. A) Compilado de imágenes confocales (30 μm de espesor) que muestra el ventrículo ventral del cerebro anterior en plano parasagital. Algunos núcleos IdU positivos son originados en la ZV y otros migran en diferentes direcciones hacia la porción más rostral del BO (flechas blancas). Otro grupo de células migran hacia la porción caudal del Tel (línea discontinua). Las cabezas de flecha indican algunas células inmunorreactivas al IdU y al CldU asociadas a vasos sanguíneos en la ZV. **B)** Simple plano confocal muestra células IdU positivas (verde) y CldU positivas (rojo) confinadas a la pared ventricular. *Abreviaturas:* BO, Bulbo olfatorio; Telv, Telencéfalo ventral; ZTr, Zona de transición; vs, vasos sanguíneos. Barras de calibración: A,B= 150 μm .

Las células proliferantes migran en toda la región y fue evidente un trayecto de migración hacia el telencéfalo. El trayecto preferencial parece dividir las áreas ventrales y dorsales (Fig. 32)

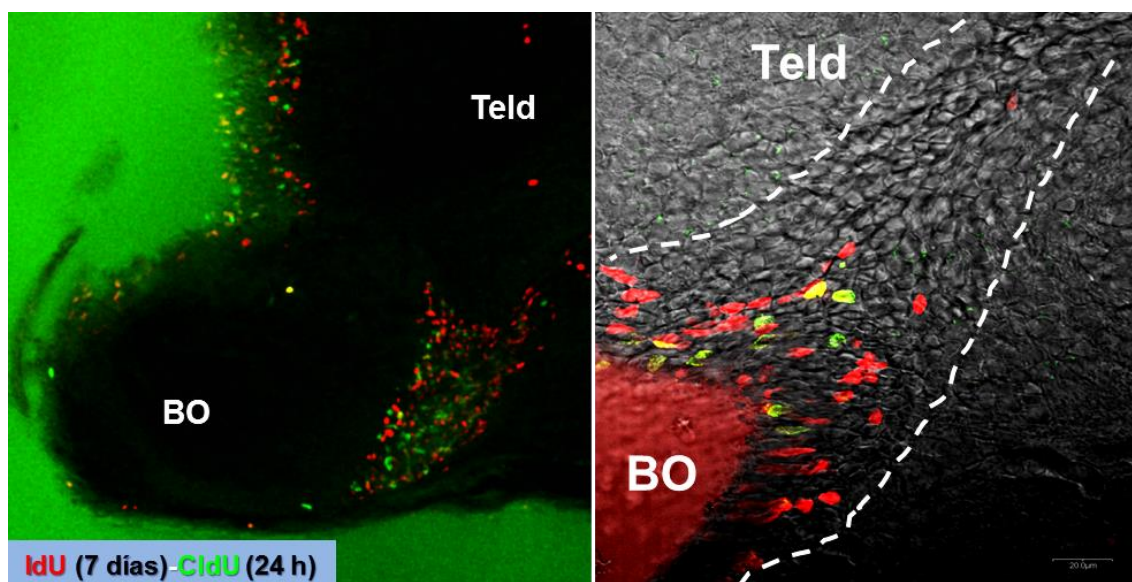


Figura 32. Discriminación temporal (7 días) de la proliferación celular en la pared ventricular. A) Compilado de imágenes confocales (30 μm de espesor) que muestra el ventrículo ventral en plano parasagital con 7 días del experimento. Se pueden notar algunos núcleos IdU positivos siguiendo el trayecto de la BMR hacia la porción más rostral del BO (flechas blancas). El inserto muestra un núcleo doble marcado con la típica señal y localización de células Tipo II. **B)** Vista en plano parasagital del ventrículo ventral en experimento de 7 días que confirma la presencia de núcleos IdU positivos pertenecientes a la BMR (flechas blancas). Barra de calibración: A= 150 μm ; B= 50 μm .

Por último, otro dato a resaltar es que algunos núcleos IdU y CldU positivos se encuentran en contacto con los vasos sanguíneos, los cuales pueden proporcionarles un soporte o andamiajes para dirigir los movimientos de las células migrantes (Fig. 33).

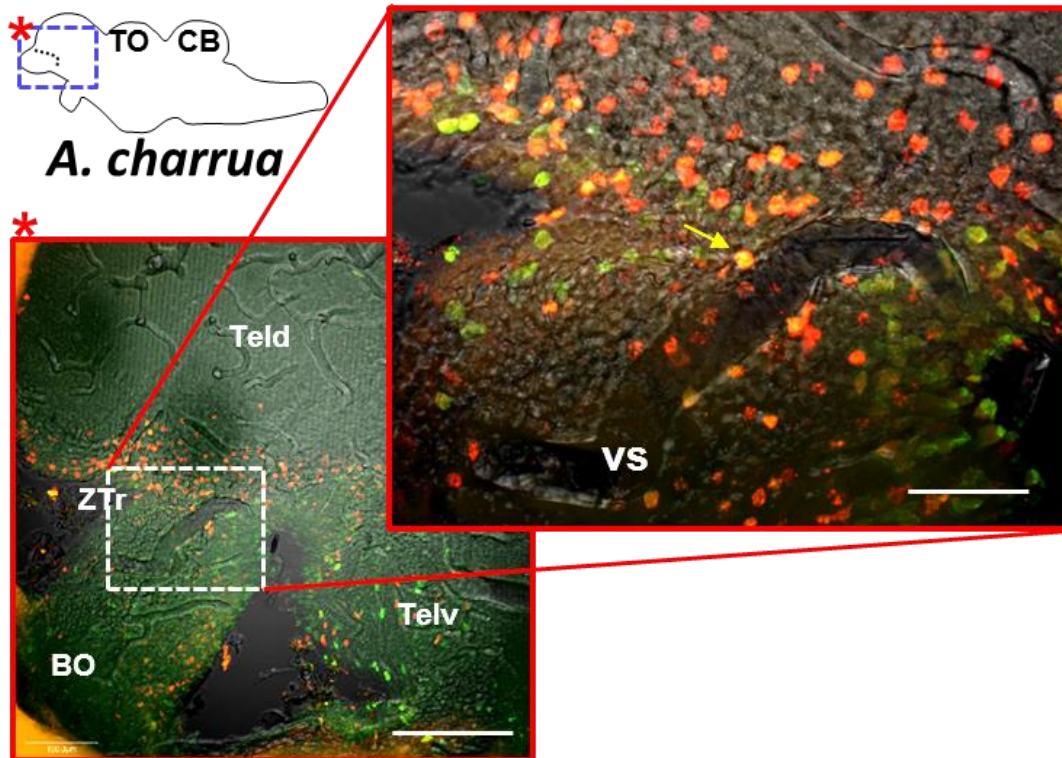


Figura 33. Vasos sanguíneos como soporte de migración a células proliferativas. Vista en plano parasagital del cerebro de *A. charrua*. Obsérvense algunas células proliferativas adosadas a los vasos sanguíneos, los cuales pueden proporcionarles a las células proliferativas el soporte y direccionalidad de migración. La flecha amarilla indica una célula CldU/IdU próxima al vaso sanguíneo (vs). Barras de calibración: 100 μm ; imagen ampliada: 50 μm

7. DISCUSIÓN

7.1 Tipos celulares de la pared ventricular

En este trabajo identificamos tres nichos neurogénicos que preservan la neurogénesis en el BO y Tel: ZTr (1), ZM (2) y zona ventral (3). Los nichos neurogénicos identificados presentan los mismos tres tipos celulares (**I, II y III**) previamente descritos en la zona ventricular telencefálica a nivel de Teld en *Austrolebias* (Rosillo y col., 2010). La composición celular observada concuerda con la descrita en la pared ventricular del tercer ventrículo en *Eigenmania* sp. (Zupanc y Zupanc, 1992). Las células **Tipo I** son las más proliferativas, captaron los marcadores de proliferación a las 24 h post inyección (CldU positivas, rojo), se encontraron agrupadas, algunas contactan con el LCR y tienen un único cilio primario. Nosotros proponemos a las células **Tipo I** como las mejores candidatas para ser las "células amplificadoras transitorias" descritas en mamíferos, reptiles, aves (Álvarez-Buylla y Kim, 1997; Doetsch y col., 1999; García-Verdugo y col., 2002) y en el pez eléctrico *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio y col., 2014).

Las células **Tipo I** son muy similares a las células **Tipo IVa** o **IVb** descritas en los nichos neurogénicos de los BOs del pez Cebra (Lindsey y col., 2012, 2014). Similar al pez Cebra, en *Austrolebias* estas "células amplificadoras transitorias" contactan la luz ventricular. Este dato es una importante diferencia con los mamíferos, en los que las células amplificadoras transitorias no contactan con el LCR.

Las células **Tipo II** presentan una densidad electrónica intermedia, son más grandes (6-8 μm) pero menos abundantes que las células **Tipo I**. Las primeras se localizan estratégicamente en áreas proliferativas entremezcladas con células de **Tipo I**, es decir, próximas a la luz ventricular o neuroblastos agrupados. Nosotros proponemos a las células **Tipo II** como las células madre porque incorporaron ambos marcadores de proliferación (células IdU/CldU positivas, en color amarillo) y no parecen migrar en experimentos de **30 días**. Cabe resaltar que además de ser células monociliadas,

inmunorreactivas a **Pax6**, **Sox2** y **Vimentina** (Figs. 15, 17 y 20), reúnen los principales criterios para considerarlas como **células madre neurales**. Las células madre se encontraron en la ZM adyacentes a la pared ventricular y en la ZTr más internalizadas en el parénquima. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Grandel y col., (2006) quienes también utilizaron dos marcadores de proliferación celular (IdU y BrdU) para identificar células que retienen los marcadores, mantienen activamente su ciclo celular y se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro del pez Cebra que incluyen las áreas telencefálicas. Las características morfológicas de estas células **Tipo II** son similares a las células **Tipo II** descritas en el pez Cebra por Lindsey y col., (2012). En peces teleósteos es la primera vez que el análisis cuantitativo mostró que las células madre representaron un 10% del total de células proliferativas identificadas en el BO y el Telencéfalo (Gráfico 1).

Por su parte las células **Tipo III** son neuronas que se encuentran en diferentes etapas de maduración como se han descrito en todos los nichos neurogénicos en diferentes grupos de vertebrados estudiados sin variación (Sawada y Sawamoto, 2013). Todas las neuronas **Tipo III** fueron inmunorreactivas al HuC y las más jóvenes retuvieron la señal de los marcadores de proliferación como BrdU y sus análogos halogenados utilizados (Figs. 25,27 y 29). Las células jóvenes de **Tipo III** se observan agrupadas y semejan los neuroblastos migrantes (células **Tipo A**) reportadas en mamíferos por Doetsch y col., (1997) y las del **Tipo "n"** descritas en pez Cebra por Lindsey y col., (2012).

En la ZTr y las regiones ventrales existe un cuarto tipo celular (**Tipo IV**) predominante. Las células **Tipo IV** son glías radiales elongadas de las cuales reconocimos al menos 2 subtipos; las **GRI** electronlúcidas y las **GRII** electrondensas. Ambos tipos celulares son morfológicamente similares a las células **Tipo III** descritas en las zonas periventriculares del cerebro anterior del pez Cebra por Lindsey y col., (2012).

7.2 Glías radiales

Las células **GRs I y II**, que expresan marcadores gliales radiales BLBP y Vimentina, parecen generar diferentes tipos de células. Nosotros podemos interpretar que estas células pueden ser las verdaderas células progenitoras de los neuroblastos o glioblastos. Por los detalles subcelulares analizados por MET, las células **GRs I** se observaron más relacionadas con los neuroblastos mientras que las células **GRs II** se encuentran más próximas a los glioblastos. No obstante consideramos que esta hipótesis debe ser investigada con más detalle para su confirmación. Estudios previos han propuesto que la glía radial es el mayor intermediario entre la células madre embrionarias y las neuronas del sistema nervioso central (Noctor y col., 2002; Götz y Barde, 2005; Pinto y Götz, 2007; Schmidt y col., 2013). Ellos demostraron que las células GRs son una población heterogénea que da origen a neuroblastos o glioblastos en dependencia de sus diferentes ubicaciones en el Sistema Nervioso Central. Dado que las células **GR I** y **GR II** coexisten en el mismo nicho nosotros podemos sugerir que los nichos neurogénicos pueden experimentar alta plasticidad neurogénica en respuesta a necesidades funcionales. Las células **GRs** persisten en la adultez en diferentes clases de vertebrados como aves, reptiles y anfibios. En los peces la glía radial en adultos participa tanto en la regeneración como en la reparación cerebral (Zupanc, 2001; Pinto y Götz, 2007). Numerosos estudios en vertebrados no mamíferos han reportado que las células **GRs** que expresan marcadores gliales representan la mayor población en la zona ventricular tanto en el cerebro en estadios embrionarios y adultos (Álvarez-Buylla y col., 1998; Font y col., 2001; García-Verdugo y col., 2002; Adolf y col., 2006; Grandel y col., 2006; Schmidt y col., 2013). Observamos una elevada marcación de BLBP en la mayoría de las zonas ventriculares tal como se observó en secciones parasagitales. En la ZM ventricular del BO, fue común encontrar células gliales Vimentina positivas colocalizadas con núcleos CldU positivos. Nuestros resultados son consistentes con los encontrados en estudios realizados en el telencéfalo del pez Cebra, región en la que se definieron 2 subtipos de células **GRs (I y II)** que fueron definidos por su inmunorreactividad a los marcadores de proliferación. Las células **GRs** del subtipo II se consideran como las que generan los neuroblastos por división asimétrica (ver la revisión de Schmidt y col., 2013) y son similares al subtipo **GR I** en la ZTr de peces

del género *Austrolebias* las cuales podrían dar origen a neuroblastos también. De acuerdo con nuestros resultados, podríamos postular que las células **GR II** pueden dar origen a las células gliales. En pez Cebra se reportó que muchas células gliales que expresan Aromatasa activamente se dividen y dan origen a nuevas neuronas (Pellegrini y col., 2007).

Por su parte, los estudios desarrollados en áreas ventriculares telencefálicas del pez Pejerrey demostraron que las células **GRs** son ciertamente progenitoras que generan neuronas y las células similares a astrocitos así como; algunas células **GRs** expresan Aromatasa (Strobl-Mazzulla y col., 2010). En nuestros resultados también encontramos que muchas células **GRs** son células proliferativas concentradas en zonas de alta proliferación como la ZTr y la zona ventral del BO (región 3). En mamíferos, la superficie ventricular está cubierta por un epitelio multiciliado mientras que en aves, reptiles y peces presentan una mayor proporción de células monociliadas comparado con las células multiciliadas (Sawada y Sawamoto, 2013). En nuestro estudio, al analizar la pared ventricular por MEB y MET nunca encontramos células multiciliadas en la pared ventricular del BO ni a nivel del Telv. Este hecho coincide con estudios previos realizados a nivel telencefálico (Rosillo y col., 2010; Casanova y col., 2015). Sin embargo, difiere de lo reportado en áreas telencefálicas del pez Cebra que está compuesta por células multiciliadas (Lindsey y col., 2012; Ogino y col., 2016).

Es posible pensar que las células monociliadas sean necesarias en aquellas áreas proliferativas y potencialmente neurogénicas dada la demanda funcional del sistema o las condiciones adaptativas a la que están sometidas las diferentes especies del género *Austrolebias* en su corto ciclo de vida. Esta idea es consistente con las altas y rápidas tasas de neurogénesis descritas en *Austrolebias* por Fernández y col., (2011) y compararse además con lo reportado en el pez Cebra.

7.3 Características de los cilios

Otras de las características notables y no descritas hasta el momento, observadas en las paredes ventriculares telencefálicas son las diferencias regionales en la longitud y morfología de los cilios. Los cilios enanos se encontraron a nivel de los BOs y los más largos a nivel de Telv, respectivamente. Según lo reportado por Ko (2012), la longitud del cilio primario depende de la etapa del ciclo celular. Por tanto la variación en el tamaño de los cilios sugiere que existen diferencias en la proliferación celular en ambas regiones de las cuales la región del BO es la más proliferativa. Sin embargo, es difícil pensar que las diferencias regionales en la longitud del cilio sólo puedan atribuirse a diferencias en la proliferación, ya que las diferencias de longitud fueron consistentes. El cilio primario también se considera esencial para el factor de crecimiento y la recepción y transducción del morfógeno (Ka Tong y col., 2014). Por tanto, las diferencias morfológicas encontradas entre las zonas apicales de los cilios del BO y Telv pueden atribuirse a un proceso de señalización diferencial en estas regiones.

De acuerdo a su organización, en aves y mamíferos, las células **GRs** presentan un cilio primario que contiene ocho o nueve pares de microtúbulos en la periferia y ninguno en el centro (Álvarez-Buylla y col., 1998, García-Verdugo y col., 2002, Tramontin y col., 2003). Por su parte, en peces adultos del género *Austrolebias*, en las zonas ventriculares a nivel de los BOs, las células **GRs** presentan un solo cilio con una disposición de microtúbulos 9+2 lo cual es característico de cilios móviles en células ependimarias. Esta organización es similar a la estructura 9+2 observada en las células **GRs** monociliadas del cerebro y la médula espinal de reptiles (Font y col., 2001; Fernández y col., 2002).

7.4 Banda migratoria rostral en los Bulbos olfatorios

En los roedores, los neuroblastos migran en cadenas desde la zona subventricular hasta el BO conformando lo que hoy se denomina banda migratoria rostral (Lois y

Álvarez-Buylla, 1994). Esta banda se ha descrito en la mayoría de los cerebros de mamíferos adultos estudiados, incluyendo el hombre (Curtis y col., 2007; Sawamoto y col., 2011). Además, estudios sucesivos han mostrado que la generación de neuroblastos que migran tangencialmente al llegar al BO luego se integran en los circuitos olfatorios (Lledo y col., 2006). Las secciones parasagittales del cerebro de *A. charrua* junto con el análisis de dos marcadores de proliferación en experimentos de 24 h y 30 días, permitieron identificar rutas migratorias distintas de los niveles dorsal y ventral de la transición BO-Tel (Figuras 27 y 31).

Desde la región dorsal emerge una vía migratoria que se dirige hacia el BO y otra que se dirige hacia atrás en dirección al telencéfalo. La primera puede ser el soporte de la neurogénesis del BO y puede estar relacionada con el grupo neuronal **GnRH** positivo que forma parte de la vía olfacto-retinal del NT (Rosillo y col., 2013). En nuestras observaciones encontramos además una banda migratoria prominente de células proliferantes procedentes de la zona ventral (3) hacia el BO (Fig. 27). Esta vía muestra muchos neuroblastos que parecen migrar en "cadena" tal como se ha descrito en diferentes vertebrados (Sawada y Sawamoto, 2013). En imágenes tomadas en diferentes intervalos temporales muestran que los vasos sanguíneos constituyen una guía o soporte migratorio para los neuroblastos que conforman la BMR en el pez Cebra (Kishimoto y col., 2011).

En los BOs de *Austrolebias* nosotros identificamos importantes vasos sanguíneos que integran las zonas con mayor migración. En nuestro modelo biológico también observamos que muchas células proliferativas en migración están íntimamente adosadas a los vasos sanguíneos los cuales le sirven de guía (Figs. 31A, 33). Sumado a esta función, las células **GRs** que observamos en diferentes orientaciones seguramente proporcionan una guía clave para la migración tangencial y radial (Fig. 21). Al analizar estas observaciones en conjunto, podemos concluir que los peces *A. charrua* cuentan con una **BMR** tangencial equivalente al trayecto de los precursores neuronales en roedores y en el pez Cebra.

Los peces teleósteos poseen un sistema olfatorio que les permite detectar y discriminar diferentes tipos de estímulos olfatorios (aminoácidos, nucleótidos, sales biliares, esteroides gonadales y prostaglandinas) que están relacionados a diferentes comportamientos, tales como alimentación, orientación y reproducción (Bazaes y col., 2013). El corto ciclo de vida de las *Austrolebias* puede estar adaptado a generar mecanismos activos plásticos para asegurar una adaptación exitosa ante las variaciones ambientales para la reproducción.

Por lo tanto, podemos suponer que estos peces necesitan un alto recambio celular en el BO para proporcionar nuevos tipos de células diferentes, necesarias para el buen funcionamiento y adaptación del circuito neural, bien sea para las necesidades de reproducción como para los desafíos ambientales.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que en la pared ventricular de los Bulbos olfatorios existen tres regiones neurogénicas diferentes con sus propias características: composición celular, tasa de proliferación y rutas de migración. En la ZM (Región 2) encontramos muchas células altamente proliferativas (células transitorias migratorias, células madre “stem cells” y neuroblastos). Este hecho nos indica que este sitio podría ser el responsable del crecimiento del parénquima a nivel del BO. En la ZTr (Región 1) y ventral (Región 3), a diferencia de la ZM, coexisten células **GRs** alargadas con características morfológicas y moleculares específicas (**GR I** y **GR II**). De este resultado podemos plantear la hipótesis que existen al menos dos poblaciones de células **GRs** que dan lugar a diferentes tipos de células neurales. La ZTr mostró migración dorsalmente hacia la porción rostral del BO, y hacia atrás en dirección al Tel posterior a través de la transición Teld y Telv. La zona neurogénica 3 sustenta la BMR que se extiende ventralmente desde el Telencéfalo hacia el BO. El análisis por MEB evidenció la presencia exclusiva de células monociliadas en toda la pared ventricular, que muestra un claro predominio de cilios enanos en el BO. Debemos señalar que en nuestro estudio, nunca encontramos células multiciliadas. El conjunto de estos hallazgos descritos, nos permiten proponer que existen diferentes nichos neurogénicos capaces de generar células que pueden participar tanto en la modalidad sensorial olfatoria como también contribuir al crecimiento del BO. Un esquema resumen de este capítulo se muestra en la Fig. 34.

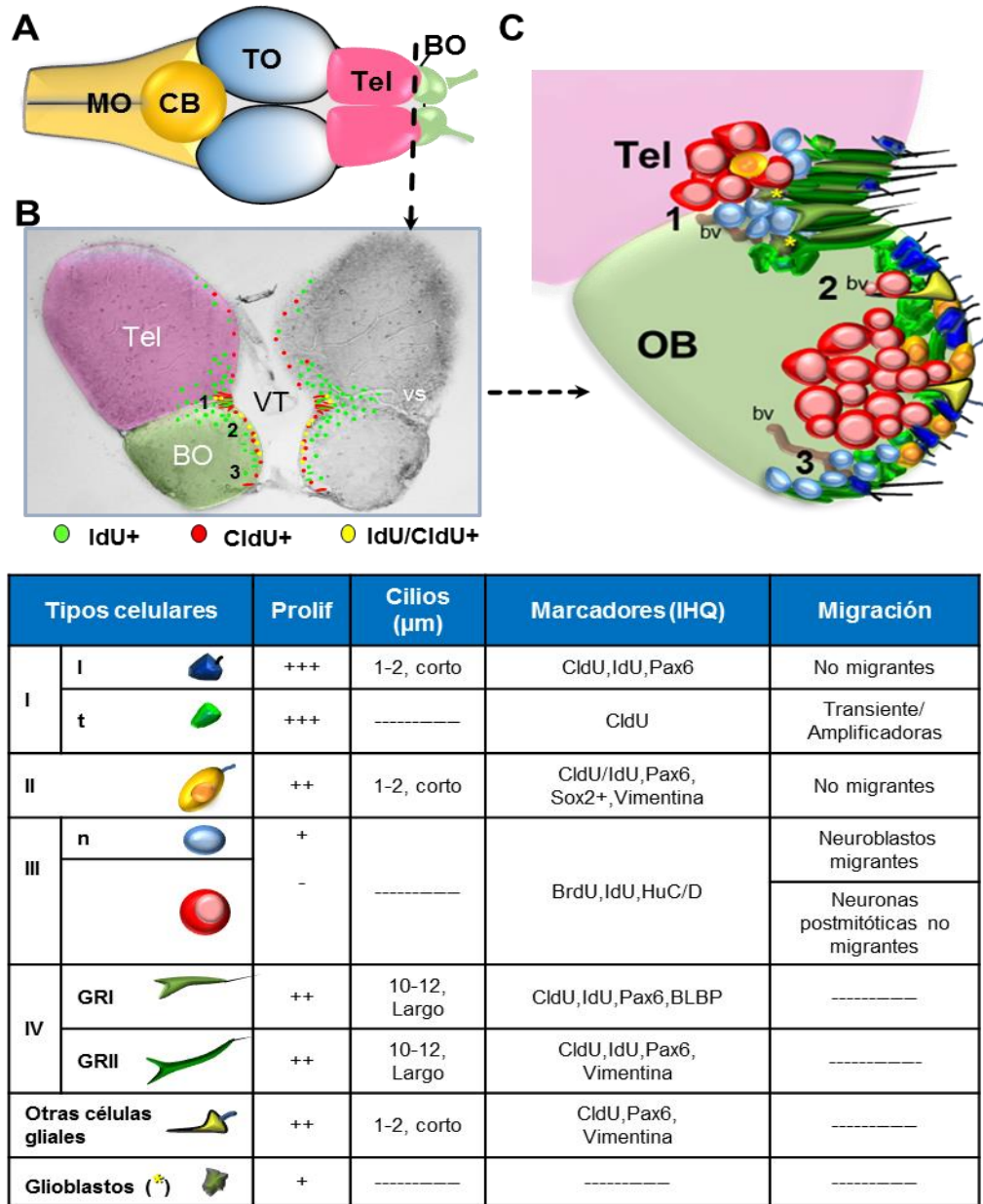


Figura 34. Resumen de los principales resultados encontrados en la organización de la pared ventricular telencefálica-BO. **A)** Esquema de una vista dorsal del cerebro que muestra el nivel de la sección histológica mostrada en B. **B)** Sección transversal del cerebro que muestra la inmunorreactividad de marcadores proliferativos (IdU, CldU e IdU / CldU) y evidenciado por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). Algunos núcleos etiquetados estaban íntimamente relacionados. Se asignó un código de color para cada marcador utilizado. **C)** Representación esquemática de la composición celular de las tres regiones proliferativas (1, 2, 3) mostradas con respectivos componentes celulares principales en diferentes colores. El cuadro muestra el código de color y un resumen de las características distintivas de cada tipo de célula, junto con una comparación de niveles de proliferación y la señal del marcador. +, pocos; ++, intermedio; +++, alto; vs, vasos sanguíneos; CB, Cerebelo; MO, Médula oblongada; BO, Bulbo olfatorio; Tel, Telencéfalo; TO, Tectum óptico.



RESULTADOS
CAPÍTULO 3

9. RESULTADOS CAPÍTULO 3

9.1 Experimentos de trazadores para determinar el origen y la trayectoria del nervio terminal en *A. charrua*

En este estudio utilizamos tres métodos complementarios diferentes con el fin de describir la vía olfacto-retinal en *A. charrua*: trazadores “*in vivo*” con Biocitina y HRP revelados a través de conjugados fluorescentes (Alexa 488) y cromógenos (DAB) respectivamente. En el caso del Dil sólo se aplicó en experimentos posfijados. A pesar de que los datos obtenidos por cada trazador son complementarios, la conjugación de la Biocitina-Alexa 488 produjo por sí mismo los datos más completos y serán los primeros en abordar.

9.1.1 Experimentos con Biocitina-Alexa 488

Los experimentos con Biocitina fluorescente ofrecieron una información sustancial acerca del origen y trayecto del NT. Las secciones obtenidas en plano parasagital evidenciaron neuronas marcadas con Biocitina localizadas en tres regiones diferentes y un gran número de fibras en el nervio óptico (Fig. 35A). En el BO (denominada como Región 1), la mayoría de las células marcadas se localizaban en la porción rostro-dorsal en las capas granular y glomerular. También se identificó un pequeño grupo de fibras muy finas las cuales se unen a axones positivos del nervio óptico. Estas fibras pasan a lo largo de la zona marginal ventral telencefálica y la región ventral del BO hacia su porción rostro-dorsal (Fig. 35B,C) y podrían conectarse con un gran grupo de pequeñas neuronas (6-8 μm diámetro) rostrales marcadas con Biocitina (Fig. 35D). Estas neuronas tienen un tamaño similar a células granulares y están rodeadas por grandes botones (inserto en la Fig. 35D). El conjunto de estas observaciones al parecer nos indican que las finas fibras que constituyen el NT podrían originarse en estas pequeñas neuronas localizadas en la región rostro-dorsal del BO.

En la ZTr del BO/Tel (denominada como Región 2) en el lado contralateral de la inyección, encontramos dos tipos de neuronas marcadas con Biotina con diferentes morfologías. El primer tipo de neuronas marcadas son células multipolares grandes (más de 10 μm de diámetro) con una dendrita principal y prolongaciones secundarias que al parecer proyectan hacia las pequeñas neuronas ubicadas en la porción más rostro-dorsal de la Región 1 (Fig. 35D, flechas blancas).

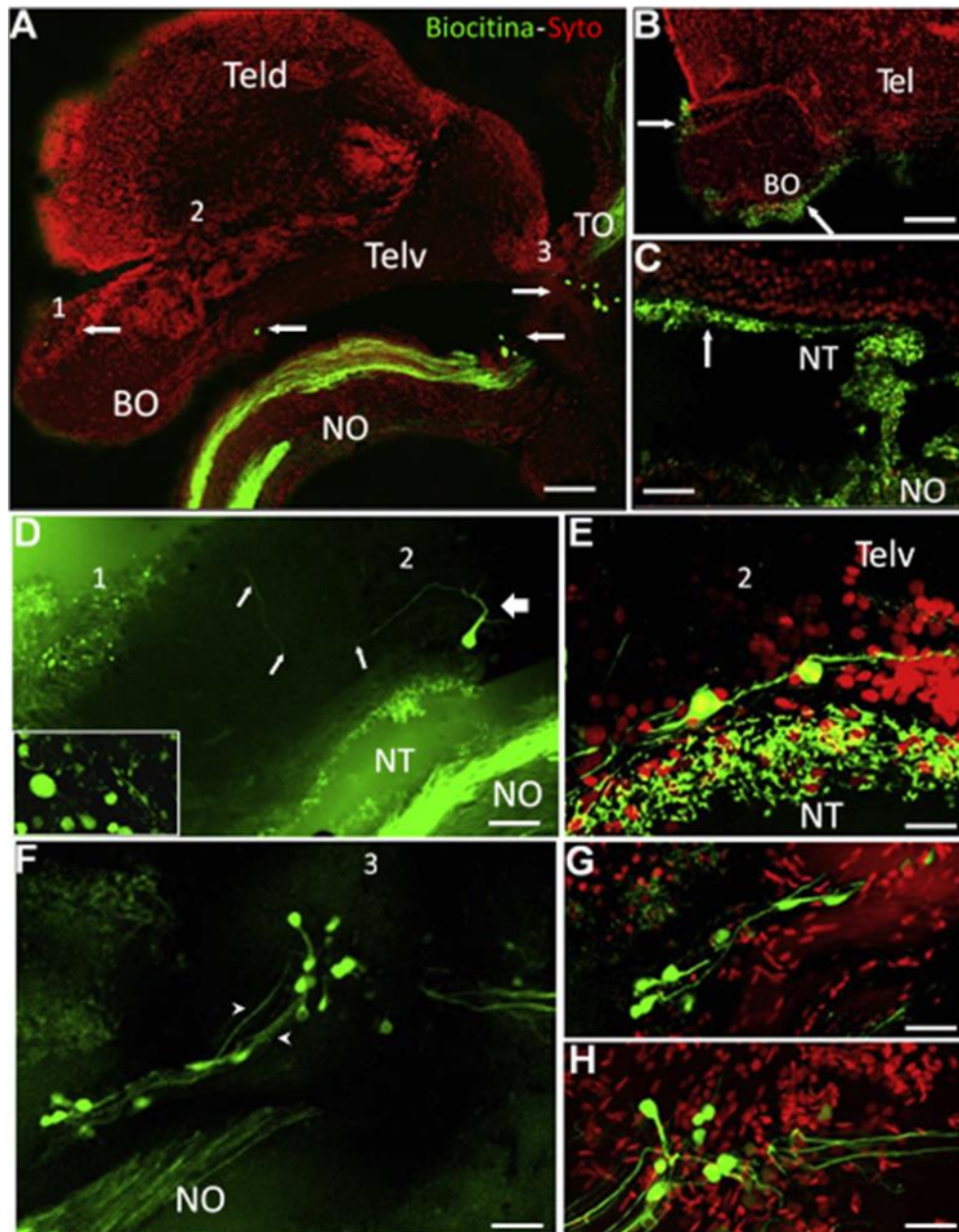


Figura 35. Experimento de Biotina-Alexa 488 “in vivo” aplicada en el ojo izquierdo de *A. charrua*. A) Corte del cerebro en plano parasagital a nivel telencefálico muestra los grupos neuronales (flechas blancas) y abundantes fibras del nervio óptico teñidas por la Biotina y reveladas con Alexa 488. Los números indican las regiones en las que aparecen

las células marcadas. **B)** Imagen a menor aumento del BO que muestra el trayecto de las fibras del NT que corren ventral y rostralmente (flechas blancas). **C)** La imagen confocal muestra los paquetes de fibras marcadas que se separan del nervio óptico para constituir el NT (flechas). **D)** Imagen confocal que muestra una prominente neurona marcada con Biocitina en la Región 2 (flecha blanca gruesa). Esta neurona envía una de sus fibras (flechas) hacia el grupo de células localizadas en la porción rostral del BO (Región 1). El inserto muestra a mayor magnificación neuronas marcadas de la región rostral. Estas neuronas tienen apariencia de célula granular y están rodeadas por grandes botones. **E)** Se observó un importante tracto de fibras del nervio óptico teñido con Biocitina a través de la retina. De la misma forma se observaron células bipolares en el Telv próximas a las fibras del NT (Región 2). **F)** Un compilado de imágenes confocales (60 μm en el eje Z) de la Región 3 (área preóptica/pretectal) muestra ambos grupos marcados y su interacción entre ellas (flechas blancas). **G)** Neuronas en forma de pera marcadas en el área preóptica. **H)** Neuronas pseudounipolares teñidas presentes en el área prepectal a la entrada del Tectum óptico. Abreviaturas: BO, Bulbo olfatorio; NO, Nervio óptico; NT Nervio Terminal; Teld, Telencéfalo Dorsal; Telv, Telencéfalo Ventral. Barra de calibración: A =100 μm ; B,F =50 μm ; C, D =30 μm ; G, H=20 μm ; E =10 μm .

El segundo tipo de neuronas marcadas mostró un cuerpo bipolar de redondeado a fusiforme con procesos opuestos que se extienden horizontalmente; uno dirigido hacia el BO y el otro hacia la región telencefálica (Fig. 35E). Dos grupos celulares se encontraron en la región preóptica/tectal contralateral, denominada Región 3 (Fig. 35A). En algunas secciones parece existir una continuidad entre ambos grupos, sugerido por los axones de las células marcadas en la región preóptica que parecen dirigir hacia las neuronas marcadas encontradas en la región prepectal (Fig. 35F, flechas blancas). Ambos grupos estuvieron constituidos por neuronas monopolares (Fig. 35G) y neuronas pseudounipolares (Fig. 35H) con 12-15 μm de diámetro respectivamente.

El análisis de secciones transversales y horizontales permitió una mayor descripción de la trayectoria de las fibras del NT y las células marcadas (Fig. 36).

La imagen de dos BOs (Región 1) en un simple plano revela proyecciones bilaterales con predominio del marcaje contralateral. Los tractos de fibras marcadas desde la retina cruzaron la línea media en estrecha relación con las membranas meníngeas alcanzando de esta forma, el lado contralateral del BO. (Fig. 36A). Las secciones transversales mostraron que la mayoría de las neuronas marcadas con

Biocitina se localizaron en la porción más rostral de la capa superficial (Glomerular) del BO (Fig. 36A,B, flechas) y son pequeñas neuronas redondas con diámetros menores que 10 μm . Algunas neuronas marcadas con Biocitina se encontraron tanto aisladas como en grupos de 2 o 3 células, algo mayores que 10 μm , localizadas en la capa más profunda del BO (Granular, Fig. 36A,B, estrella). A pesar de que todas las neuronas tienen diferentes tamaños, mostraron una morfología similar. Próximo al soma de todas las neuronas observamos procesos varicosos o grandes botones de 2-3 μm de tamaño. Se encontró además que la arborización dendrítica extiende sus ramificaciones al territorio de células vecinas. Algunos botones grandes son visualizados próximos al soma, el cual están conectados por procesos muy finos que probablemente sean colaterales axonales (Fig. 36C, cabeza de flecha). En las secciones transversales, las células multipolares previamente descritas en los cortes parasagitales se encontraron en la Región 2 colateral (Fig. 36D). A este nivel se observó el pasaje de los axones contralaterales ante la aplicación del fue retrógrado y fuertemente marcado con la aplicación de la Biocitina desde la retina (Fig. 36E).

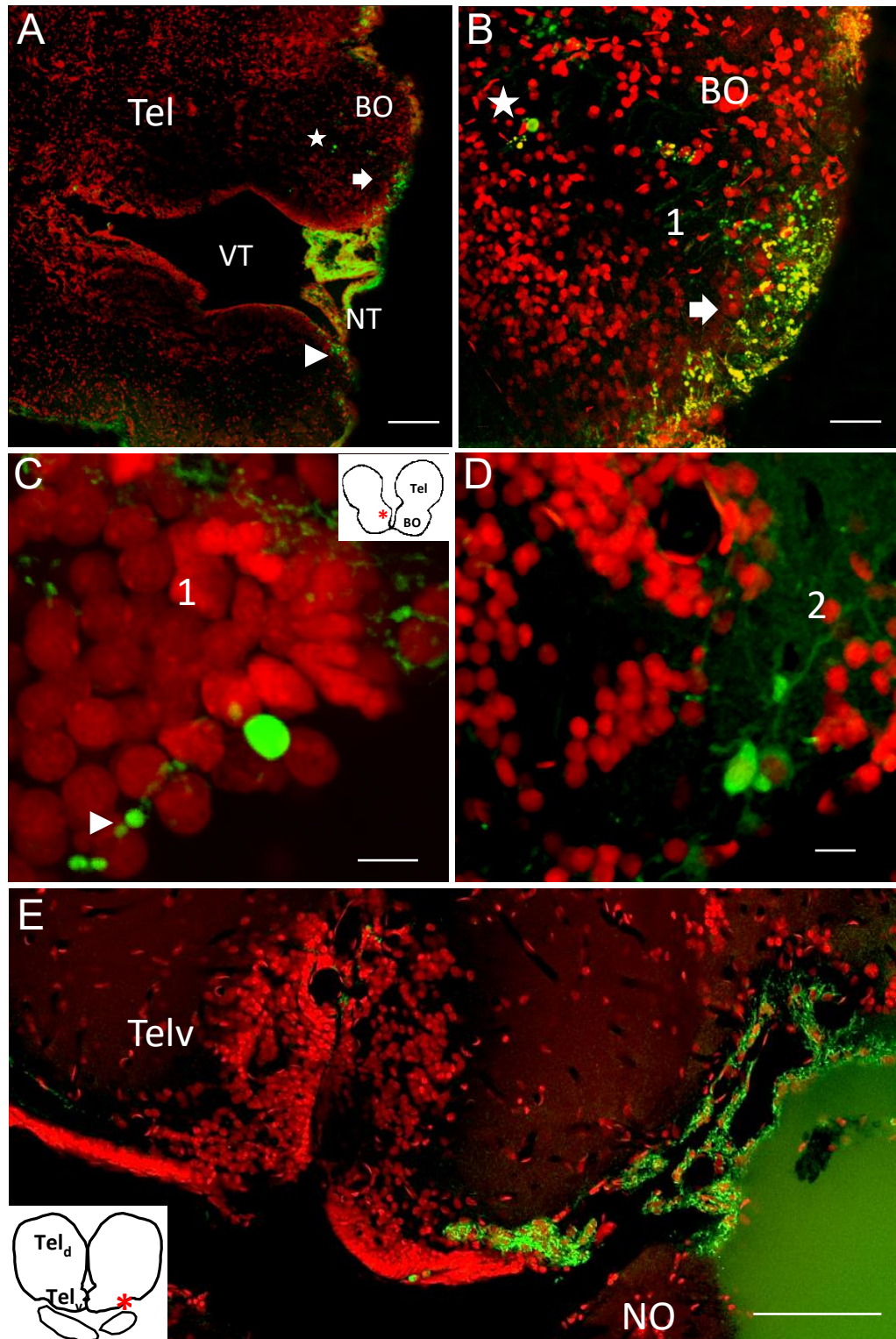


Figura 36. Vistas horizontales y transversal de la fibras del NT y cuerpos celulares marcados con Biocitina y Syto. A) Vista panorámica horizontal del BO y los lóbulos telencefálicos (Tel) que muestra células Biocitina-positivas del NT y la ruta de la fibras de lados ipsi y contralateral a la inyección (flechas y cabezas de flechas, respectivamente). La estrella blanca muestra una célula marcada en el BO medial. **B)** Compilado a mayor magnificación (20 μ m en el eje Z) en el que se observa la porción rostral del BO (Región 1). Se observa una gran célula marcada en la mitad del BO (estrella) y

abundantes neuronas pequeñas marcadas en la porción más rostral del BO (flecha). Las células marcadas en amarillo representan la combinación entre los núcleos (rojo) con la marca de Biocitina (verde). **C)** Secciones transversales (22 μm en el eje Z) muestran una de las células marcadas localizadas en la región dorsal del BO (Región 1) próxima a los lóbulos telencefálicos (asterisco en el esquema). La célula marcada muestra 2 tipos de procesos, uno con apariencia de dendritas y otra semeja axones “*en passant*” (cabeza de flecha blanca). **D)** La imagen muestra células multipolares prominentes marcadas (aprox. 15 μm de diámetro) localizadas en la transición ventral entre el BO y los Lóbulos Telencefálicos (Región 2). **E)** Simple plano confocal transversal del tracto del NT a nivel del Lóbulo Telencefálico posterior mostrando un marcado específico y selectivo (el dibujo muestra el área fotografiada). Barra de calibración: A= 50 μm ; B= 25 μm ; C= 10 μm ; D= 10 μm ; E= 100 μm .

Para corroborar la naturaleza neuronal de las células marcadas con Biocitina encontradas en la Región 1, usamos dos estrategias; la primera con la combinación de la Microscopia Confocal con DIC; la segunda mediante la inmunohistoquímica para reconocer el HuC/D, un marcador específico de proteína de unión al RNA (Fig. 37). En las porciones rostral y lateral del BO, encontramos neuronas marcadas con Biocitina con morfología similar (Fig. 37A). El análisis a mayor magnificación mostró pequeñas neuronas redondas (8-10 μm) y botones de 2 a 3 μm de diámetro (Fig. 37B, flechas y cabezas de flechas respectivamente). Por DIC se evidenció que células no marcadas tienen forma y tamaño iguales que aquellas marcadas con Biocitina (Fig. 37A,B). Los botones muy próximos al soma y los finos procesos de arborización dendrítica se muestran a mayor magnificación en la Fig. 37C. La Fig. 37D, E muestra una célula marcada con Biocitina/DIC y observada solamente con DIC para distinguir los bordes celulares (flechas) y un botón (cabeza de flecha) muy cercano al cuerpo celular. Las células marcadas con Biocitina fueron positivas al HuC/D lo cual confirmó la estirpe neuronal de las células marcadas. La inmunohistoquímica contra HuC/D nos confirmó también el tamaño y morfología de las neuronas marcadas con Biocitina y aquellas no marcadas. Por último, se encontraron abundantes botones marcados con Biocitina rodeando a células HuC/D positivas y algunas de ellas presentaron colocalización con la Biocitina (Fig. 37F-H, cabezas de flecha).

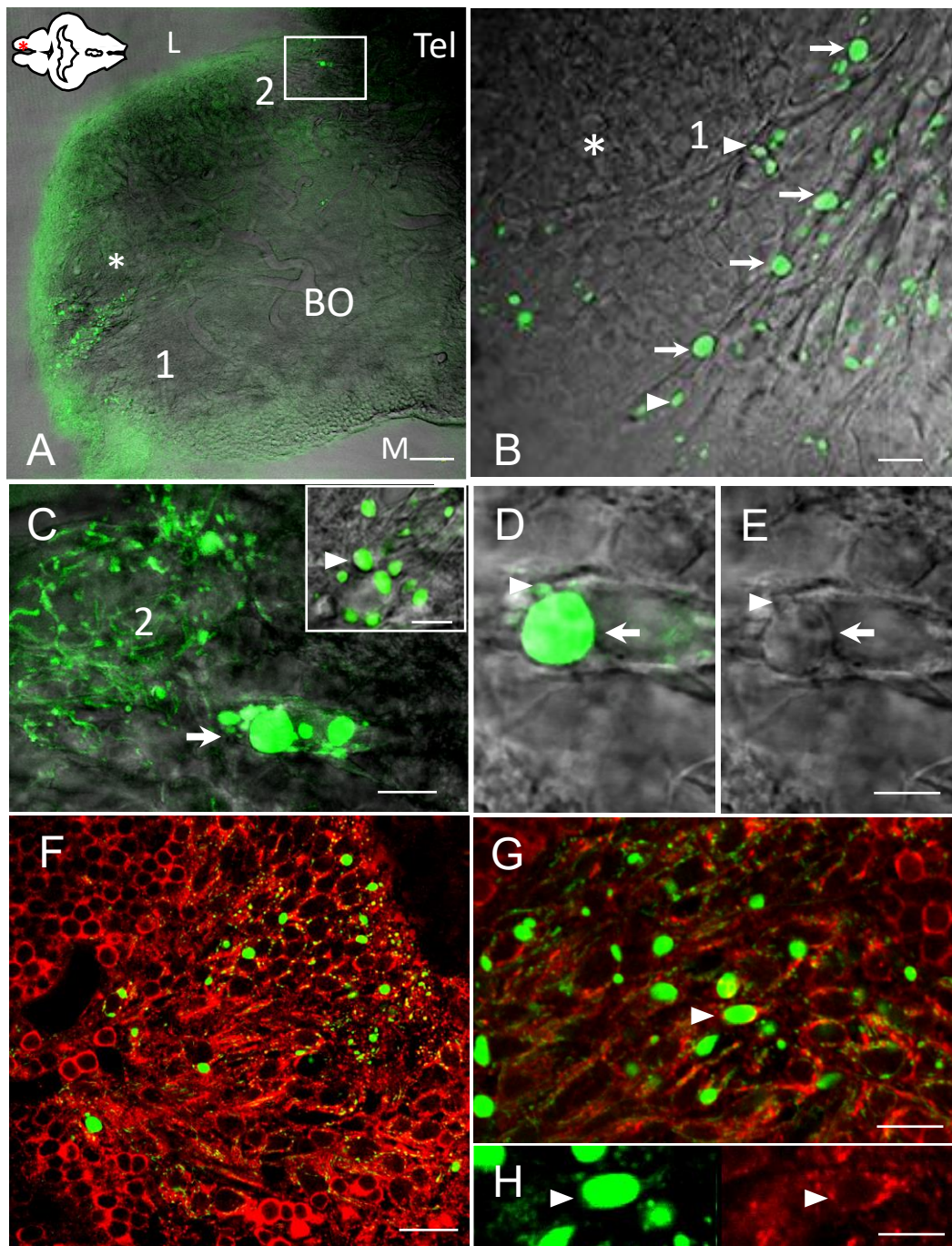


Figura 37. Biocitina fluorescente con DIC y/o inmunohistoquímica del HuC/D. A) Planos confocales (20 μm del eje Z) de un corte horizontal a nivel del BO que muestra la disposición de las células marcadas con Biocitina (verde) superpuestas por DIC. La imagen también revela la presencia de células no marcadas en la región medial (M). Células Biocitina positivas se localizaron en la porción rostral del BO (Región 1, asterisco) cercanas a la transición lateral (L) entre el BO y el Lóbulo Telencefálico (Tel, recuadro blanco, Región 2). El asterisco rojo indica el área fotografiada de la figura completa. B) La imagen muestra una mayor magnificación de células Biocitina positivas (flechas) encontradas en la Región 1. Se encontraron procesos marcados semejantes a los botones terminales dados por su tamaño y cercanía a los cuerpos celulares (cabezas de flechas). El tamaño de las células no marcadas (asterisco) es el mismo que aquellas células Biocitina positivas lo que

evidencia la especificidad del marcado. **C)** Una mayor magnificación del compilado de planos en el eje Z (16 μm) de las células presentes en recuadro blanco dibujado en A permitió observar los cuerpos celulares, fibras y abundantes procesos en forma de botones terminales (flecha blanca) que son grandes en comparación con el tamaño de la célula (recuadro superior derecho, cabeza de flecha). **D-E)** Simple plano confocal de células que se muestra en C que evidencia la marca de Biocitina a la izquierda y DIC a la derecha. Se observa un proceso con apariencia de botón terminal (cabeza de flecha) muy cerca del cuerpo de la célula (flecha). **F)** Vista panorámica de un compilado de imágenes en el eje Z (25 μm) obtenida de una sección horizontal de la porción rostral del BO que muestra neuronas HuC/D positivas (rojo) y algunas de ellas NAL con Biocitina (verde). Muchos botones Biocitina positivos están muy cerca de otras neuronas HuC/D positivas. **G)** A mayor magnificación se observan algunas células doblemarcadas (cabeza de flecha blanca) y botones con mayores detalles. **H)** La célula señalada en G se muestra en canales verdes y rojos separados para evidenciar su doble marcado. Barra de calibración: A, F=50 μm ; B, G=20 μm ; C=10 μm ; inserto en C=5 μm ; D, E=10 μm ; H=15 μm .

9.1.2 Experimentos “in vivo” con Biocitina y HRP

En algunos experimentos la Biocitina se reveló con el cromógeno DAB y analizado bajo microscopio óptico de campo claro. En la Región 2 se observó una marca clara y homogénea (Fig. 38A, B). Un pequeño grupo de 3 o 4 células prominentes (12-15 μm de diámetro), solamente se observó en 2 secciones consecutivas de la serie completa realizada en planos parasagitales del lado contralateral de inyección. Estas neuronas exhibieron dendritas largas y lisas, y axones finos y lisos que abandonan el cuerpo celular por el lado opuesto a las dendritas (Fig. 38B). Otro grupo importante de células marcadas con Biocitina fue observado consistentemente en la Región 3 (Fig. 38C). Este grupo estuvo compuesto por numerosas neuronas (10-12 μm de diámetro) con una intensidad del marcado variable desde muy intenso a uno débil, y es coincidente con el grupo pretectal que fue observado previamente por fluorescencia (Fig. 35H). Sin embargo, aunque los cuerpos celulares fueron marcados con preferencia, algunos procesos se tiñeron otorgándoles una apariencia pseudounipolar a estas neuronas.

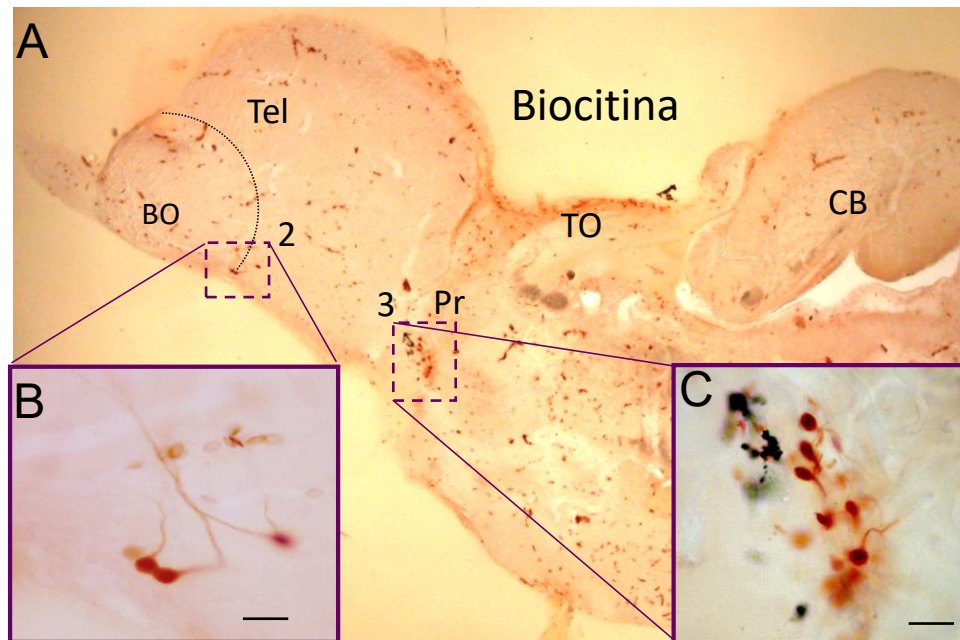


Figura 38. Experimentos con Biocitina revelada con DAB. **A)** Imagen de una sección del cerebro en plano parasagital que muestra dos grupos de neuronas marcadas (Recuadros). **B)** Grupo de pocas, pero prominentes, neuronas marcadas con Biocitina que forman parte del NTB localizadas entre los límites del BO y Telencéfalo y presentan significativos procesos celulares (Región 2). **C)** El segundo grupo de células marcadas con Biocitina está compuesto por numerosas neuronas de pequeño tamaño ubicadas en la región prepectal (Región 3). Abreviaturas: CB, Cerebelo; BO, Bulbo olfatorio; Tel, Telencéfalo; Pr, región prepectal; TO, Tectum óptico. Barras de calibración: B, C =20.

El análisis de las secciones horizontales mostró una localización precisa de dos grupos de células contralaterales marcadas con HRP, uno en la Región 1 y el otro en la Región 2 (Fig. 39). Todas las células marcadas mostraron un precipitado HRP granular sobre los cuerpos pero no se observaron procesos celulares marcados. El grupo localizado en la Región 1 consiste de numerosas células que bordean el margen externo del cerebro. Es un grupo de neuronas marcadamente muy pequeño (menos de 10 μm de diámetro) y tamaño variable (Fig. 39A,B). El segundo grupo marcado, consistió de neuronas un poco más grande (aproximadamente 15 μm de diámetro) localizado en la Región 2 (Fig. 39A-C), mostró una tinción granular en el cuerpo sin exhibir procesos celulares. Este grupo también se observó previamente tanto con Biocitina-Alexa 488 (Fig. 35H) y Biocitina-DAB (Fig. 38C) con respecto al número y tamaño de células muy similares.

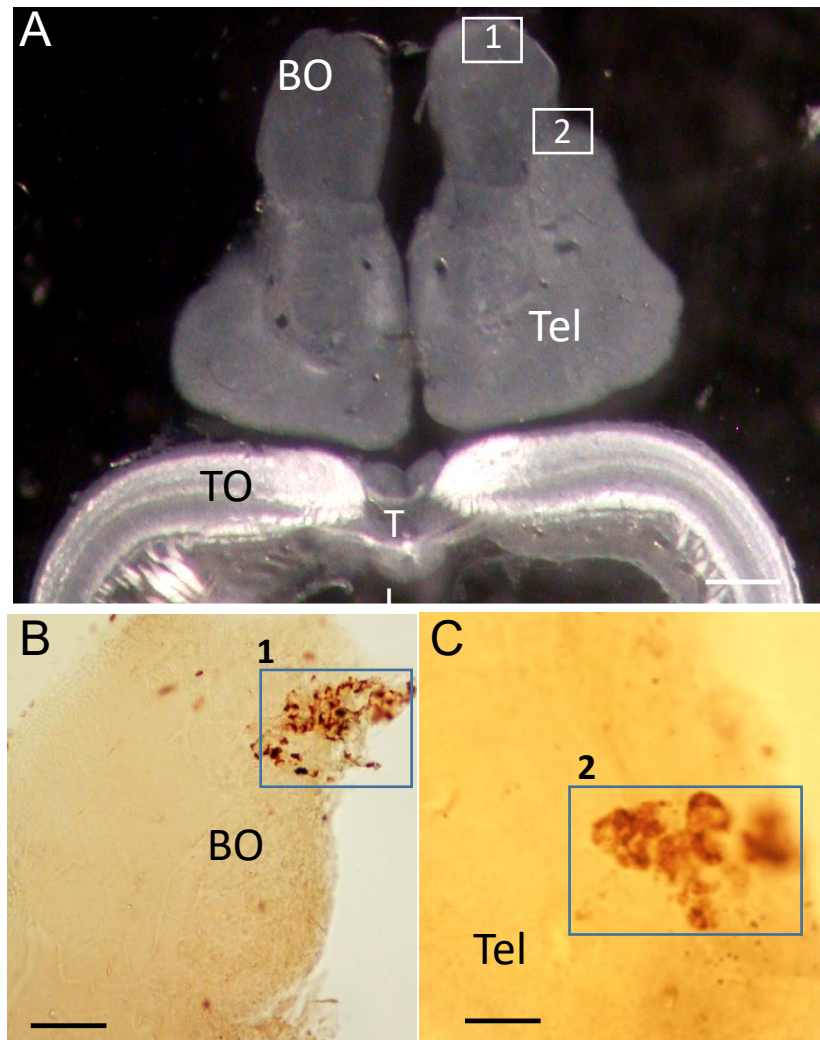


Figura 39. Experimento con HRP. A) Corte horizontal de los Bulbos olfatorios y parte del Tectum óptico que muestra la localización de las células marcadas con HRP (cuadros 1 y 2). **B)** A mayor magnificación del recuadro 1 se observa un gran grupo de pequeñas células exhibiendo un precipitado HRP granular. **C)** La imagen muestra un pequeño grupo de células marcadas con HRP en la zona de transición entre el BO y el Telencéfalo. Abreviaturas: BO, Bulbo olfatorio; Tel, Telencéfalo; TL, Torus Longitudinalis; TO, Tectum óptico. Barra de calibración: A= 200 μ m; B= 50 μ m; C= 20 μ m.

9.1.3 Experimentos en tejidos postfijados con el Dil

El Dil carbocianina se utilizó en peces fijados. Unos pocos cristales de Dil se colocaron en el humor vítreo del ojo izquierdo que se mantuvo conectado al cerebro (Fig. 40A). El análisis de panorámico realizado después de 2 semanas mostró un marcado intenso de la señal de Dil en el ojo izquierdo, la retina y el nervio óptico; así

como una importante presencia del Dil en el Tectum óptico, Lóbulos Telencefálicos y BOs (Fig. 40B).

En el área preóptica se localizó un grupo de fibras claramente marcadas (Región 3, Fig. 40C). Mientras que, en la porción rostral y dorsal del BO se observó otro grupo de fibras marcadas del nervio olfatorio (Región 1, cabeza de flecha). A mayor magnificación, los cuerpos y procesos celulares se observaron mejor. Los cuerpos celulares se encontraron en dos sitios principales. Numerosos grupos de células pequeñas sin arborizaciones dendríticas visibles se observaron a la entrada del nervio olfatorio. Por su parte, en el BO próximo a la transición con los lóbulos telencefálicos se encontraron otros grupos de neuronas menos abundantes, pequeñas y redondas con una arborización dendrítica prominente con ramificaciones (Fig. 40D). Estas células parecen enviar ramificaciones dendríticas alrededor de células cercanas, lo que sugiere una interacción funcional entre las células que se originan en el NT y sus vecinas. En algunos casos se visualizó un fino axón con una disposición de botones ‘*en passant*’. (Fig. 40D, flecha).

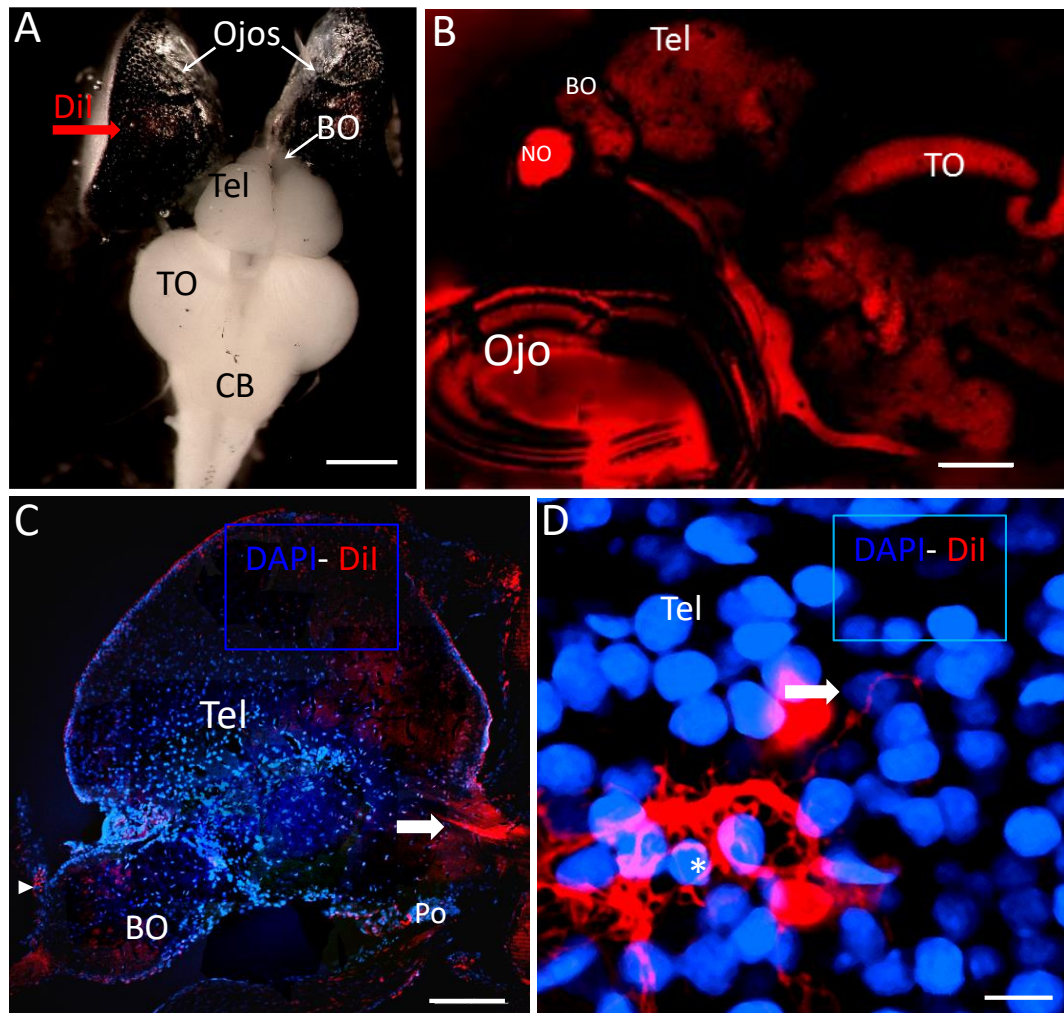


Figura 40. Experimentos con aplicación del Dil. **A)** Vista dorsal del cerebro de *A. charrua* con los ojos conectados al cerebro por los nervios ópticos y el sitio de aplicación del Dil (flecha roja). **B)** Vista panorámica confocal de una sección parasagital que muestra un fuerte marcaje de Dil en la retina y el nervio óptico. **C)** Imagen confocal de un plano parasagital panorámico que muestra fibras marcadas con Dil (Región 3, flecha blanca) y tinción positiva en el Bulbo olfatorio (cabeza de flecha). **D)** Neuronas marcadas por transporte retrógrado desde la retina que se encuentran en la parte dorsal del BO próxima de los Lóbulos Telencefálicos. Obsérvense las dendritas prominentes que parecen estar en contacto con las células vecinas (asterisco), y el axón delgado con una disposición de "en passant" (flecha blanca). Abreviaturas: CB, Cerebelo; BO, Bulbo olfatorio; NO, Nervio óptico; Po, área preóptica; Tel, Telencefalo; TO, Tectum óptico. Barras de calibración: A= 1 mm; B= 300 μ m; C= 100 μ m; D= 10 μ m.

9.2 Detección de células GnRH en la vía olfato-retinal

La detección inmunohistoquímica de la GnRH permitió identificar células GnRH positivas en las Regiones 1 y 2 correspondientes a la zona rostradorsal del BO y la zona de la transición BO-Telencéfalo respectivamente (Figs. 41 y 42).

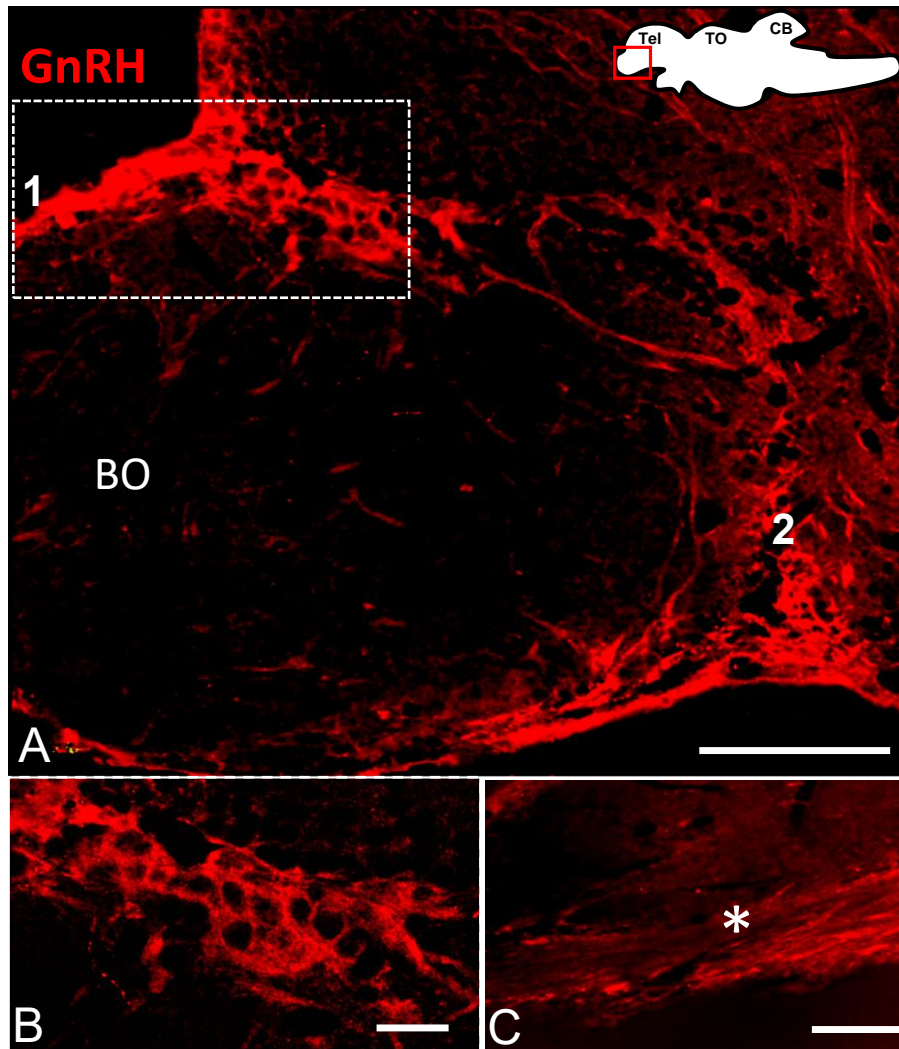


Figura 41. Inmunohistoquímica contra GnRH en el BO de *A. charrua*. **A)** Compilado de imágenes confocal (18 μm eje Z) de una sección parasagital que muestra cuerpos GnRH positivos en Regiones 1 y 2, y un intenso marcaje de fibras positivas en la porción ventral (asterisco). **B)** Mayor magnificación de un simple plano focal que muestra somas positivos de la Región 1. **C)** Mayor magnificación del paquete de fibras que transcurren por la región ventral de BO. Obsérvense las finas fibras que están selectivamente teñidas. Barra de calibración: A= 100 μm , B y C= 20 μm .

Esta localización es coincidente con la distribución de las fibras que conforman el trayecto de la vía olfacto-retinal del complejo NT. Este trayecto incluye la zona ventral del BO y su transición con el Telencéfalo en su porción medial y en contacto con el Ventrículo Telencefálico. (Fig. 42)

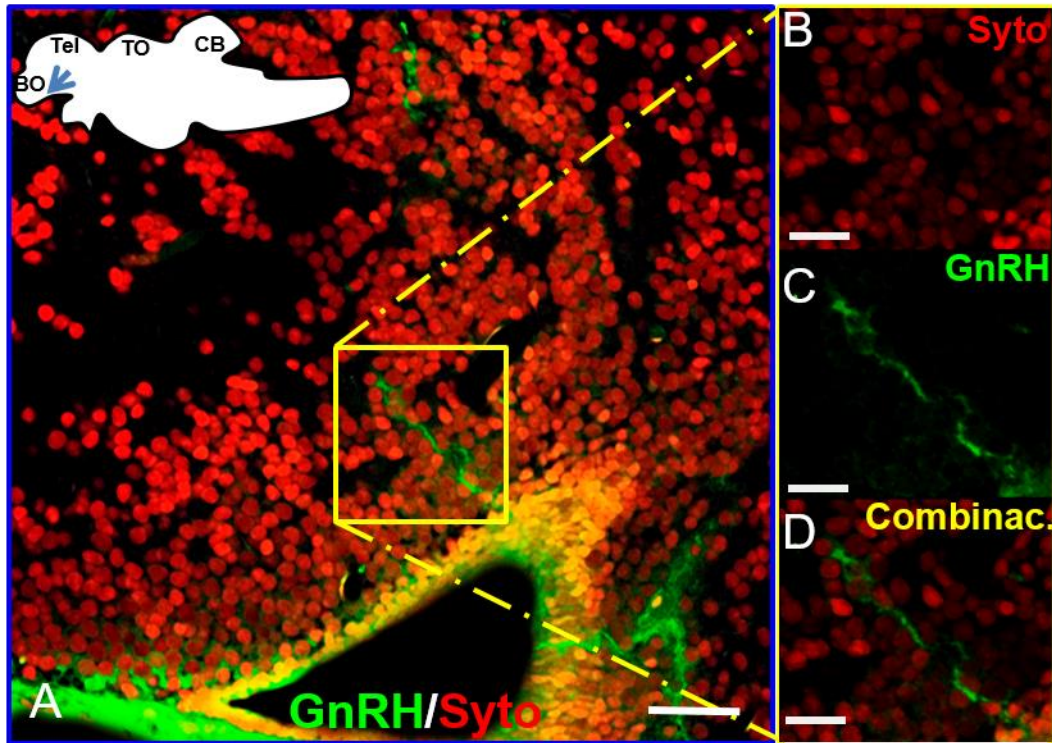


Figura 42. Imagen confocal que muestra la detección inmunohistoquímica de células GnRH en BO de *A. charrua*. A) Representación esquemática de un corte parasagital de cerebro de *Austrolebias*. Como se puede observar tanto en la Región 1 como en la Región 2 se observan células GnRH positivas. Las células GnRH positivas forman parte del complejo NT. B-D) Marcadores en canales individuales y combinados Planos individuales Canales Abreviaturas: Teld, Telencéfalo Dorsal; Telv, Telencéfalo ventral; NO, Nervio óptico; TO, Tectum óptico; CB, Cerebelo. Barras de calibración: A=100 μ m; B,C,D=20 μ m

9.3 Demostración de la presencia del Nervio Terminal en *Austrolebias affinis* con el uso de Biotina como sustancia trazadora.

Para cumplir con este objetivo también se realizó la inyección de la Biotina en el ojo izquierdo de *A. affinis* adultas. Tal como se observó en *A. charrua* fue identificada la ramificación olfacto-retinal del nervio terminal y cuerpos neuronales asociados diferenciables por su localización, forma y tamaño. Para visualizar el trayecto de la Biotina se utilizó como revelado la DAB (3',3'-Tetrahidrocloruro Diaminobenzidina, SIGMA) 0,2 mg/ml in TF 0,1 M pH=7,2 y peróxido de hidrógeno 0,03%. Como resultado de esta reacción, el precipitado formado se observó de color marrón. Tal como se encontró en *A. charrua* se observó el mismo trayecto de la vía olfacto-retinal con un trayecto aferente encontrado (Fig. 43).

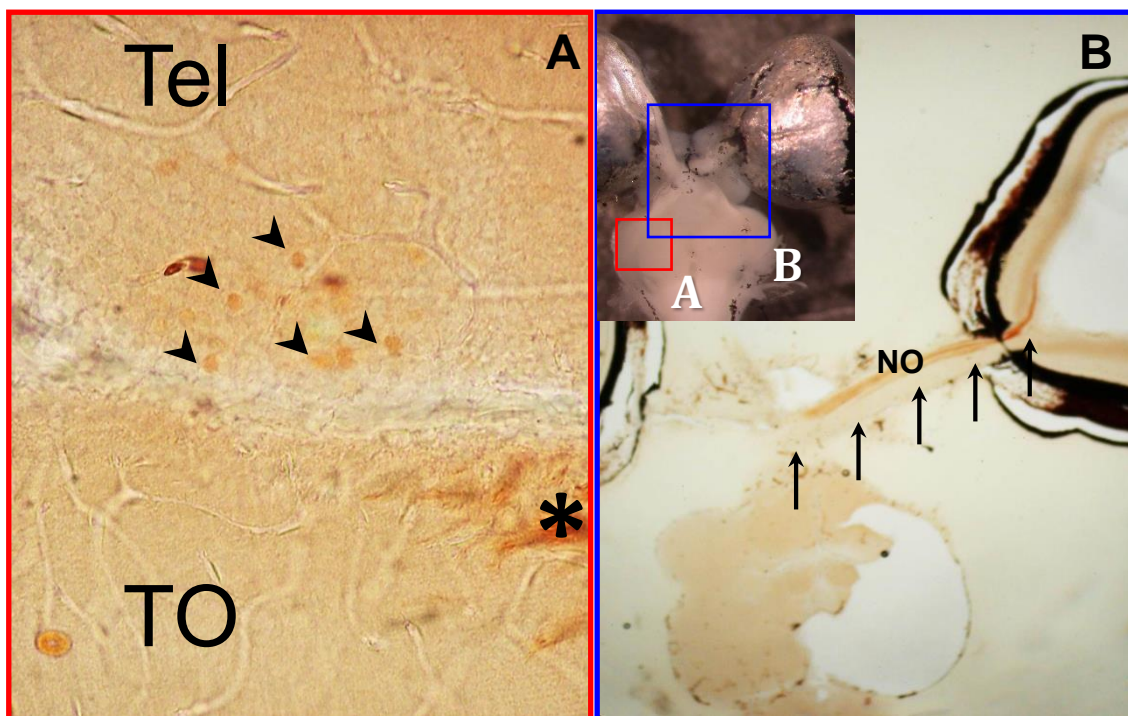


Figura 43. Vía olfacto-retinal marcada con Biotina revelada con DAB (color marrón) en *A. affinis*. **A)** Grupo de neuronas Biotina positivas localizadas en el área preóptica/pretectal del telencéfalo (cabeza de flechas). El asterisco señal grupo de prolongaciones de neuronas Biotina positivas inervando el Tectum óptico. **B)** Se muestra el trayecto de axones aferentes que inervan la retina (flechas). La fotografía de la esquina superior izquierda muestra un cerebro visto desde la región ventral y los recuadros indican las regiones correspondientes a las imágenes A y B. Barra de calibración: A= 50 μ m; B, Inserto= 1 mm.

Tal como se observó en *A. charrua*, la ramificación olfacto-retinal en las dos especies, está compuesta por axones que corren ventralmente a lo largo del BO y los lóbulos telencefálicos. Estos axones parecen originarse de un pequeño grupo de numerosas neuronas monopolares localizadas en la porción rostral de los BOs ipsi y contralateralmente (Región 1).

En ambas especies, las células marcadas también se encontraron en otras dos regiones: algunas neuronas monopolares y bipolares se localizaron en la transición entre el BO y el Tel (Región 2) y otros dos grupos en el área preóptica/pretectal (Región 3).

Se debe destacar que en *A. affinis* observamos además, un grupo de neuronas en el Telencéfalo caudal lo cual sugiere una Región 4 de esta vía olfacto-retinal (Figura 43A).

10. DISCUSIÓN

La descripción detallada del complejo del NT que conforman la vía olfacto-retinal en el pez *A. charrua* fue posible mediante el uso de tres trazadores neuronales diferentes. Este nervio se ha descrito como vínculo entre los sistemas sensoriales visual y olfatorio (Whitlock, 2011). La demostración de la existencia del NT constituyó un punto de partida para indagar la correlación entre la neurogénesis adulta y su funcionalidad en el BO y TO en un aspecto comparativo y de significado evolutivo.

En la Figura 44 se muestra un resumen de los hallazgos principales obtenidos. Independientemente de la sustancia trazadora y sus protocolos de administración utilizados, se encontró un grupo conspicuo de abundantes neuronas marcadas en la porción rostral del BO (Región 1). Se encontraron otras células marcadas, aisladas o en pequeños grupos diseminadas por todo el BO. También se encontraron células marcadas con diferentes formas, tamaños y arborizaciones en la transición de los lóbulos olfatorios y telencefálicos (Región 2). Finalmente, se encontraron dos grupos de células marcadas en la región preóptica/pretectal (Región 3); una a la entrada del nervio óptico y la segunda en el *pretectum*. Las células Biocitina-Alexa 488 positivas mostraron una interacción entre ambos grupos de la Región 3.

10.1 Comparación de sustancias trazadoras utilizadas

Si bien todos los trazadores arrojaron resultados similares, la Biocitina fluorescente junto con la microscopía confocal mostró una mayor intensidad en la señal y mejor calidad. La Biocitina conjugada con Alexa 488 ofreció información completa sobre las fibras y arborizaciones de neuronas involucradas en el trayecto del NT (Lapper y Bolam, 1991), así como una relación entre las neuronas teñidas en el área preóptica/pretectal (Región 3).

El HRP y la Biocitina-DAB, tiñeron los mismos grupos de cuerpos neuronales, pero la forma del marcaje fue diferente. La Biocitina mostró un marcado homogéneo y el HRP un marcado granular. El Dil es un colorante lipofílico fluorescente que se ha utilizado tradicionalmente para conocer y estudiar los trayectos axonales (Perrin y Stoeckli, 2000; Rink y Wullimann, 2004). Posee como la ventaja de que no requiere transporte activo axonal, lo cual permite su uso en el tejido fijado. En nuestros experimentos, el Dil tiñó las zonas en las cuales transcurre el complejo NT y algunos somas y procesos celulares. Sin embargo, el marcaje fue significativamente más difuso que la Biocitina fluorescente, posiblemente porque el transporte de Dil se realiza a través de las membranas lipídicas en lugar de transportarse de forma activa como ocurre en los sistemas vivos. La mayoría de nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que demostraron previamente las proyecciones olfacto-retinal en *Cíclidos*, *Poecílicos*, *Centraquidos* (Munz y Claas, 1981); *Gasterosteus*, *Oncorhynchus* y *Salmo* (Ekström y col., 1988) y pez Cebra (Whitlock, 2011).

Las células marcadas bilateralmente por transporte retrógrado han sido descritas previamente en *Cyprinodontiformes* por Stell y col., (1987), aunque no con características detalladas como las encontradas en este trabajo. Interesantemente, el único lugar de decusación de las fibras encontrado fue a través de un puente de meninge grueso que une ambos Bulbos olfatorios a nivel ventromedial. Las fibras marcadas que no se entrecruzan se encontraron en localizaciones reportadas

previamente en otros teleósteos (Repérant y col., 2006; Whitlock, 2011). En relación a las células marcadas encontradas en la Región 3, descripciones anteriores se realizaron en otros Cyprinodontiformes (Munz y col., 1982). Al menos uno de estos grupos parece ser un núcleo conservado en otros grupos de vertebrados, que están localizados en la entrada del Tectum óptico. Por su parte, el otro grupo pertenece al complejo septo-preóptico del nervio terminal según Repérant y col., (2006,2007). Sin embargo, el marcaje con Biocitina fluorescente parece evidenciar una continuidad entre ambos grupos (Fig. 35F).

10.2 Fibras que conforman el tracto olfacto-retinal del nervio terminal

Los estudios anatómicos de la retina del pez y los registros electrofisiológicos realizados en el nervio óptico sugieren que la inervación centrífuga de la retina está presente en los peces (Bullock y Northcutt, 1984; Nieuwenhuys y col., 1998). Una parte de estas inervaciones dan lugar a lo que se denomina nervio terminal. Mientras que la inervación centrífuga de la retina en caimanes (Ferguson y col., 1978), las serpientes (Halpern y col., 1976), las aves (Cowan, 1970) y las ratas (Itaya, 1980), se origina principalmente en el Diencefalo, en diferentes especies de peces incluyendo *A. charrua*, la inervación centrífuga relacionada con el NT se origina en el BO (Munz y col., 1982; Stell y col., 1984; Walker y Stell, 1986; Repérant y col., 2006).

También se describió que en los peces, el NT está asociado con el nervio olfatorio. Existen procesos que se extienden en el epitelio olfatorio y los ganglios ubicados en varios puntos a lo largo de sus proyecciones que transcurren a través del BO/Telv (Whitlock, 2011). El trabajo realizado en dogfish por Bullock y Northcutt (1984) mostró que el NT está compuesto por aproximadamente 1000 fibras amielínicas cuyos diámetros varían desde 0,6 a 1,5 μm . Los experimentos con Dil mostraron algunas fibras teñidas en el nervio olfatorio y células marcadas adyacentes a las fibras del nervio olfatorio. En *Austrolebias* encontramos un pequeño paquete de múltiples fibras nerviosas que emergen de un grupo de neuronas ubicadas en la porción rostral del BO que corren a lo largo del telencéfalo ventral, y luego continúan el trayecto del nervio óptico hacia la retina. Estas fibras eran delgadas,

aproximadamente de 1 μm , y no constituían un paquete compacto. Las fibras del NT rodean a las células y neuronas que se encuentran en el área telencefálica ventral marginal. Algunas de estas fibras cruzan la línea media y parecen originarse en los cuerpos de las neuronas localizadas en el lado ipsilateral del BO. En el pez cebra se describió que algunas fibras del NT cruzan la línea media pero no está claro por dónde lo hacen (Whitlock, 2011).

10.3 Cuerpos celulares marcados a través del trayecto del Nervio Terminal

Las neuronas que seguramente contribuyen a la vía del nervio terminal se encontraron consistentemente en el BO (Región 1), en la transición BO/Tel (Región 2) y en el área preóptica/pretectal (Región 3). Las células encontradas en la Región 1 parecen ser el componente más importante que conforma el NT. Este grupo tiene abundantes células monopolares que se asemejan a las células granulares del BO observadas en ratas (Millhouse, 1987). Estas células tienen un diámetro de 5-8 μm , cuerpo en forma globular y finas ramas dendríticas.

En cambio, las neuronas observadas en *A. charrua* son pausidendríticas y son similares a las células esféricas monopolares descritas en el lóbulo electrosensorial de los peces eléctricos (Rethelyi y Szabo, 1973; Castello y col., 1998). Es importante destacar que existe una variación importante en el tamaño y la forma que puede atribuirse a la alta actividad neurogénica del BO previamente descrita en esta y otras especies del género *Austrolebias* (Fernández y col., 2011). En este sentido, se ha reportado que las células granulares del BO presentan un alto recambio y una neurogénesis aumentada en respuesta a los cambios en el fotoperíodo (Walton y col., 2012). La mayoría de las células de la Región 1 estaban rodeadas por grandes botones marcados que probablemente se originan de los axones colaterales de la misma célula. Sin embargo, no podemos descartar que algunos de los botones sean terminales de los axones que se originan en los cuerpos celulares en la retina que se marcaron con el trazador aplicado en el ojo.

Las células bipolares y multipolares marcadas encontradas en la Región 2 (transición BO/Tel) están localizadas ventralmente y muy cercanas o intercaladas con fibras que forman parte del NT. Estas células probablemente están interactuando con células de la Región 1, porque las ramificaciones dendríticas de las células multipolares parecen dirigirse hacia el grupo de células rostral de la Región 1. Las células marcadas encontradas en la Región 2 podrían corresponder al núcleo olfacto-retinal presente en peces, como *Cíclidos*, *Poecilidos* y *Centrarquidos*, y se han propuesto como conexión anatómico-funcional y parte integrante de los sistemas olfatorios y visuales (Munz y Claas, 1981). Teniendo en cuenta los tipos de células marcadas en la Región 2, las células bipolares marcadas con Dil similar a nuestros resultados se han reportado en la misma localización en tiburones (Yanez y col., 2011). Las células multipolares de mayor tamaño (diámetro 25 μm) que proyectan hacia el BO fueron descritas como pertenecientes a células ganglionares del NT en *Cichlasoma* y *Haplochromis* (Crapon de Caprona y Fritsch, 1983) como fue citado por Repérant y col., (2006).

En cuanto a los dos grupos encontrados en la Región 3, según Repérant, los núcleos ubicados en la entrada del nervio óptico (área preóptica) podrían pertenecer al complejo septo-preóptico del NT, un sistema que incluye las células retinopetales del área preóptica debido a su origen común en la placoda olfatoria (Repérant y col., 2006, 2007). Los núcleos encontrados en el área pretectal no pertenecen al complejo NT, pero está conservado entre los vertebrados (Repérant y col., 2006, 2007). En otras especies, se ha descrito que los cuerpos celulares del NT se encuentran agrupados (ganglios) asociados con el nervio olfatorio y el BO. Esta posición varía según la especie (Nieuwenhuys y col., 1998; Whitlock, 2011, ver Repérant y col., 2006 para una revisión). El ganglio NT en peces con BOs sésiles está claramente compuesto por dos tipos de células diferentes, una grande y una pequeña (Rusoff y Hapner, 1990). En *Heterotilapia*, las células grandes, alrededor de 100, son fuertemente inmunorreactivas a GnRH (Rusoff y Hapner, 1990). En nuestro estudio, encontramos neuronas marcadas en el BO de diferentes tamaños, pero ninguna excedió las 10 μm . De acuerdo con nuestros resultados preliminares, algunas de estas neuronas marcadas en el BO y en la transición entre los BOs y los lóbulos telencefálicos fueron inmunorreactivas a GnRH (Fig. 41).

10.4 Posibles implicaciones funcionales de los hallazgos actuales

La gran variabilidad del complejo NT reportada en teleósteos, evidencia que esta actividad nerviosa puede reflejar comportamientos específicos de las especies. Las *Austrolebias* tienen una característica reproductiva anual y un cortejo sexual elaborado; teniendo la visión un papel importante en ambos eventos (García y col., 2008). Se ha sugerido que el sistema NT-GnRH está involucrado en comportamientos reproductivos y sexuales (Abe y Oka, 2011), y la concentración de GnRH en los cambios del sistema olfatorio de acuerdo con la reproducción (Whitlock, 2011). Además, la proyección del NT a la retina tiene una influencia directa sobre las células interplexiformes dopaminérgicas en el pez, lo que sugiere que la actividad del NT puede influir en la adaptación a la luz (Zucker y Dowling, 1987). El NT también podría estar involucrado en el aumento de la sensibilidad retiniana para estímulos sexualmente relevantes, ya que la estimulación del olor en *Pterophyllum* cambia el electroretinograma (Weiss y Meyer, 1988; Maaswinkel y Li, 2003).

11. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos el vínculo anatómico entre el BO y la retina. Los datos completos obtenidos del marcado retrógrado de retina sugieren que parte del NT se origina a partir de los cuerpos celulares presentes en la porción rostral de OB. Algunos de los axones que formaron el NT corren ventralmente a lo largo de las áreas oblicua y telencefálica hasta que encuentran las fibras del nervio óptico y continúan en un camino común hacia la retina. Las otras células relacionadas con el NT son las células multipolares y bipolares ubicadas en la transición del BO/Lóbulos Telencefálicos. Las células que se encuentran en el área preóptica pueden pertenecer al sistema NT. Nuestros resultados que muestran diferentes grupos neuronales del complejo NT que comparten un árbol dendrítico particular y elaborado, sugieren una gran complejidad circuital entre la visión y el olfato que merece mayor elucidación.



**CONCLUSIONES
Y PERSPECTIVAS**

12. CONCLUSIONES GENERALES

El estudio de los Bulbos olfatorios en *Austrolebias charrua* posee características distintivas. En primer lugar se demostró consistentemente en la pared ventricular de los BOs la presencia de tres regiones neurogénicas con características propias; composición celular, tasa de proliferación y rutas de migración.

En la zona medial (ZM) (Región 2) predominan células altamente proliferativas (células amplificadoras, con poca migración, células madre no migrantes y neuroblastos). Este hecho nos indica que este sitio podría ser el responsable del crecimiento del parénquima a nivel del BO.

En las regiones neurogénicas, Zona transicional (ZTr o Región 1) y Ventral (Región 3), a diferencia de la ZM coexisten células **GRs** alargadas con características morfológicas y moleculares específicas (**GR I** y **GR II**). A partir de este resultado podríamos postular que existen al menos dos poblaciones de células **GRs** que pueden generar diferentes tipos de células neurales.

La ZTr mostró migración hacia la porción rostral del BO, y en dirección al Telencéfalo caudal a través de la Transición Teld y Telv.

La Región 3 sustenta la Banda Migratoria Rostral que se extiende ventralmente desde el Telencéfalo hacia el BO. El análisis por MEB evidenció la presencia exclusiva de células monociliadas en toda la pared ventricular, que muestra un claro predominio de cilios enanos en el BO.

El conjunto de hallazgos descritos nos permiten proponer que; los diferentes nichos neurogénicos son capaces de generar células que pueden participar en la

renovación neuronal de los circuitos sensoriales en las diferentes regiones de los glomérulos olfatorios. Pueden contribuir al crecimiento de la pared del BO y además generar neuronas que se dirigen a otras regiones telencefálicas.

Por otra parte, quedó demostrada la existencia de la vía olfacto-retinal, originada en un importante grupo de neuronas localizadas en la región rostro-dorsal de los Bulbos olfatorios. Esta región es coincidente con la ZTr. Algunos axones que forman parte del trayecto del NT corren ventralmente a través del Bulbo olfatorio y las áreas Telencefálicas donde coinciden con las fibras del Nervio óptico y continúan en una vía común hacia la Retina. Los otros grupos de células relacionados con el NT son células bipolares y multipolares localizadas en la Transición Bulbo olfatorio/Lóbulos Telencefálicos de la región ventral, coincidente con la zona neurogénica 3. Tanto en la región dorsal 1 y ventral 3, la expresión de GnRH estuvo presente confirmando que las neuronas que participan en la vía olfacto-retinal están vinculadas a la actividad sexual y reproductiva que en estos peces abarca la mayor parte de su vida.

En el área preóptica, las neuronas marcadas también podrían pertenecer al sistema NT. Todo el conjunto de resultados que muestran los diferentes grupos neuronales que coinciden con la zona neurogénica 3 o de la banda migratoria rostral presentan ramificaciones dendríticas particulares, sugiriendo una gran complejidad circuital entre la visión y la olfacción que merece dilucidar en estudios posteriores.

13. PERSPECTIVAS

Como perspectivas se plantea continuar con algunas de las interrogantes de este trabajo. En relación a la existencia de una neurogénesis intrínseca en el BO deberíamos profundizar y demostrar aspectos funcionales aquí postulados de la actividad neurogénica asociada a las 3 regiones proliferativas de la pared ventricular.

Estas 3 regiones presentan diferentes poblaciones celulares y las glías radiales juegan un papel preponderante en la neurogénesis de la transición BO/Tel. Dada la existencia de diferentes tipos de glías radiales nos preguntamos si será posible identificar aquellas que generan neuronas. Una forma de avanzar en esto es realizar la inmunomicroscopía electrónica para determinar características de uno y otro tipo de glía.

La demostración en esta Tesis de un vínculo anatómico entre el BO y la Retina nos induce a pensar que la actividad neurogénica de los sistemas olfatorio y visual está fuertemente correlacionada, lo cual implicaría la modulación de un sistema sobre el otro de acuerdo a la demanda particular de la olfacción o la visión. Podemos postular que el nervio terminal está implicado en la actividad de cortejo y apareamiento. Aquí se demuestra que en los peces existe un importante grupo de neuronas cercanas a la transición BO/Tel que están conectadas a la retina. Este aspecto es novedoso frente a los estudios realizados en otras especies. El hábitat en que viven estos peces es muy cambiante en condiciones lumínicas, y los peces terminan su cortejo enterrados en el barro. Este comportamiento sugiere que la exploración para el sitio de la ovoposición donde los embriones permanecerán varios meses enterrados en el barro se da a través del olfato. Con esta idea pretendemos extender el estudio de la modulación del proceso neurogénico de las *Austrolebias* en función de las variaciones de la luminosidad de su entorno. En tal sentido este aspecto será uno de los objetivos a desarrollar próximamente en la Tesis de Maestría iniciada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Inés Berrosteguieta. Se propone continuar con experimentos de luz-oscuridad, ya iniciados en *A. charrua* donde se observa un incremento de la proliferación en peces que se mantuvieron en la oscuridad por un mes. Desearíamos complementar estos datos con estudios comportamentales.

Como otro aspecto a continuar, desde un punto de vista comparativo nos queda pendiente estudiar el rol funcional del grupo de neuronas que encontramos en el Telencéfalo caudal (Región 4) de la *A. affinis* el cual no se observó en la *A. charrua*. Poder conocer su trayecto y sus inervaciones puede aportar información valiosa desde un punto de vista evolutivo en especies dentro del mismo género que no comparten los mismos hábitats.



**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C.S., Topp, S., Tanhauser, B., Strahle, U., Gotz, M., & Bally-Cuif L. (2006) Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.*, 295, 278–293.
2. Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., & Joly, J.-S. (2010) Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.*, 70, 693–713.
3. Almlil, L.M. y Wilczynski, W. (2012) Socially modulated cell proliferation is independent of gonadal steroid hormones in the brain of the adult green treefrog (*Hyla cinerea*) *Brain Behav. Evol.* 79, 170-180.
4. Arey, L. B (1916) The function of the afferent fibers of the optic nerve of fishes. *J. Comp. Neurol.* 26, 213-245.
5. Arezo M.J., Pereiro J.L, Berois N (2005) Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology* 66 (5):1357-1370.
6. Altman, J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals. *Science*, 135(3509), 1127-1128.
7. Altman, J. y Chorover, S. L. (1963 a) Autoradiographic investigation of the distribution and utilization of intraventricularly injected adenine-3H, uracil-3H and thymidine-3H in the brains of cats. *The Journal of physiology*, 169(4), 770-779.
8. Altman, J. (1963 b) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical Record*, 145(4), 573-591.
9. Altman, J. y Das, G. D. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207(5000), 953-956.
10. Altman, J. (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Experimental neurology*, 16(3), 263-278.
11. Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433-457.

12. Álvarez-Buylla, A. y García-Verdugo, J.M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J of Neurosci.* 22:629-634.
13. Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 287-293.
14. Álvarez-Buylla, A., Theelen, M., Nottebohm, F. (1990) Proliferation “Hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5, 101-109.
15. Álvarez-Buylla, A. y Kim, J.R. (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol.*, 33, 585–601.
16. Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Mateo, A.S., Merchant Larios, H. (1998) Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J. Neurosci.*, 18, 1020–1037.
17. Anderson, M.J. y Waxman, S.G. (1985) Neurogenesis in tissue culture of adult teleost spinal cord. *Dev Brain Res* 20:203-212.
18. Andres, K. H. (1970) Anatomy and Ultkastkuctuke of the Olfactory Bulb in Fish, Amphibia, Reptiles, Birds and Mammals. In *Ciba Foundation Symposium-Taste and Smell in Vertebrates* (pp. 177-196) John Wiley & Sons, Ltd.
19. Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., Drucker-Colín, R. (2007) Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol*, 44(9), 541-550.
20. Arai, O. y Saito, N. (1995) Thyroxine reduces the production rate of BrdU-labeled cells in the ventricular zone of the adult canary brain. *Neurosci Lett* 198:135-138.
21. Arslan-Ergul A, Erbaba B, Karoglu ET, Halim DO, Adams M (2016), Short-Term Dietary Restriction in Old Zebrafish Changes Cell Senescence Mechanisms, *Neuroscience* 334:64-75.
22. Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM (2011) From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:963-977.
23. Barnea, A. y Pravosudov, V. (2011) Birds as a model to study adult neurogenesis: Bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *Eur. J. Neurosci.* 34: 884-907.

24. Bayer, S. A. (1982) Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and ³H-thymidine autoradiographic study. *Experimental Brain Research*, 46(3), 315-323.
25. Bazáes, A., Olivares, J., Schmachtenberg, O. (2013) Properties, projections, and tuning of teleost olfactory receptor neurons. *Journal of chemical ecology*, 39(4), 451-464.
26. Bédard, A. y Parent, A. (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 151, 159-168.
27. Bell C., Caputi A., Grant K. (1997) Physiology and plasticity of morphologically identified cells in the mormyrid electrosensory lobe. *J Neurosci.* 17:6409-6423.
28. Bernocchi, G., Scherini, E., Giacometti, S., Mares, V. (1990) Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): an autoradiographic ³H-thymidine study. *Anat. Rec.* 228:461-470.
29. Bick, M.D. y Davidson R.L. (1974) Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71.5: 2082-2086.
30. Biechl, D., Tietje, K., Ryu, S., Grothe, B., Gerlach, G., Wullimann, M. F. (2017) Identification of accessory olfactory system and medial amygdala in the zebrafish. *Scientific Reports*, 7.
31. Birse, S.C., Leonard, R.B., Coggeshall, R.E. (1980) Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *Lebistes*. *J. Comp. Neurol.* 194, 291-301.
32. Breton-Provencher, V. y Saghatelyan, A. (2012) Newborn neurons in the adult olfactory bulb: unique properties for specific odor behavior. *Behavioural brain research*, 227(2), 480-489.
33. Butler, A. y Hodos, W. (1996) Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. Wiley-Liss (NY); *J. Comp. Physiol. A.* 192:649-670.
34. Brooke, R N L, Downer, J.C., Powell, T P S (1965) Centrifugal fibers to the retina in the monkey and cat. *Nature* 207:1365-1367.
35. Bullock T.H y Northcutt R.G (1984) Nervus terminalis in dogfish (*squalus acanthias*, Elasmobranchid carries tonic efferent impulses. *Neuroscience Letters*, 44 (1984) 155-160 155.

36. Byrd, C. A., y Brunjes, P. C. (1995) Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 358(2), 247-259.
37. Byrd, C. A., y Brunjes, P. C. (2001) Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neuroscience*, 105(4), 793-801.
38. Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344.
39. Carbajo Pérez, E., Carbajo Pérez, S., Triviño, A., Hernández, L.C., López, A. (1994) Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica. *Univ. Cor. Serv. Pub.* p.135-156.
40. Carlson, K.A y Mesulam, M.M. (1982) Electron microscopic tracing of neural connections with horseradish peroxidase. In M-M Mesulam (ed.): *Tracing Neural connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley & Sons, p.1-151.
41. Casanova, G., Rosillo, J.C., Olivera-Bravo, S., Fernández, A.S. (2015) Comparative anatomy and proliferative zones of adult *Austrolebias* Brain. In Berois, N., García, G. & De Sá, R.O. (eds.), *Annual Fishes Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. Taylor & Francis Group, pp 231-250.
42. Chapouton, P., Jagasia, R., Bally-Cuif, L. (2007) Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays* 29, 745-757.
43. Chapouton, P., Webb, K. J., Stigloher, C., Alunni, A., Adolf, B., Hesi, B., & Bally-Cuif, L. (2011) Expression of hairy/enhancer of split genes in neural progenitors and neurogenesis domains of the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 519(9), 1748-1769.
44. Chiu-Ming W, Chun-Shun W, Tzu-Chuan Ch, Shih-Ting Ch, Fan-Hua N (2010), Immunochemical and molecular characterization of a novel cell line derived from the brain of *Trachinotus blochii* (Teleostei, Perciformes): A fish cell line with oligodendrocyte progenitor cell and tanyocyte characteristics. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 156: 224-231.
45. Costa W.J.E.M. (2006) The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213:1-162.

46. Cowan, W.M (1970) Centrifugal fibers to the avian retina. *Brit. Med. Bull.* 2:112-118.
47. Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelse, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., Frisen, J., Dragunow, M., Faull, R.L. & Eriksson, P.S. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 315, 1243–1249.
48. D'Angelo, L. (2013) Brain Atlas of an Emerging Teleostean Model: *Nothobranchius furzeri*. *The Anatomical Record*, 296, 681–691.
49. Dawley, E.M., Nelsen, M., Lopata, A., Schwartz, J., Bierly, A. (2006) Cell birth and survival following seasonal periods of cell proliferation in the chemosensory epithelia of redbacked salamanders, *Plethodon cinereus*. *Brain Behav.* vol. 68, 26-36.
50. Demski L.S (1993) Terminal nerve complex. *Acta Anat*; 148(2-3):81-95.
51. Demski L.S y Northcutt R.G (1983) The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates? *Science*. April 22; 220(4595):435-7.
52. Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Vaillant, C. & Kah, O. (2010) Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(2), 172-192.
53. Doetsch, F. y Scharff, C. (2001) Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav. Evol.*, 58, 306–322.
54. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M. & Álvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716.
55. Dowling, J.E. y Cowan, W.M. (1966) An electron microscope study of normal and degenerating centrifugal fiber terminals in the pigeon retina. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 71(1):14-28.
56. Eisthen, H.L. y Northcutt, R.G (1996) Silver lampreys (*Ichthyomyzon unicuspis*) lack a gonadotropin-releasing hormone- and FMRFamideimmunoreactive terminal nerve. *J Comp Neurol* 370:159–72.
57. 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.

58. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.* 4, 1313-1317.
59. Ferguson, J.L., Mulvanny, J.P., Brauth, S.E. (1978) Distribution of neurons projecting to the retina of *Caiman crocodilus*, *Brain Behav. Evol.*, 15:294-306.
60. Fernández, A., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O. (2002) Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J Comp Neurol* 453:131-144.
61. Fernández A.S., Rosillo J.C., Casanova G., Olivera S. (2011) Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (cyprinodontiform: rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189: 12–24.
62. Fernández A.S., Rosillo J.C., Olivera S., Casanova G. (2012) Characteristics of the progenitor cells in the neurogenic niches of *Austrolebias charrua* brain. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Book of Abstract: p 63 No. 159.
63. Font, E., Desfilis, E., Pérez-Cañellas, M.M., García-Verdugo, J.M. (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav. Evol.* 58:276-295.
64. Forlano P.M., Deitcher D.L., Myers D.A, Bass A.H. (2001) Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J. Neurosci.* 21: 8943-8955.
65. Fujita I., Satou M., Ueda K (1985) Ganglion cells of the terminal nerve: Morphology and electrophysiology. *Brain Res.* 335, 148-152.
66. Galvin, K. A. y Jones, D. G. (2002) Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Medical journal of Australia*, 177(6), 316-318.
67. García-Verdugo, J.M., Llahi, S., Ferrer, I., López-García, C. (1989) Postnatal neurogenesis in the olfactory bulb of a lizard: a tritiated thymidine autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* 98:247-252.
68. García-Verdugo, J.M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E. & Font, E. (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.*, 57, 765–775.

69. Goldman, S.A. y Nottebohm, F. (1983) Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2390-2394.
70. Goldman, S. (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci.*, 26, 590–596.
71. Gould, E. y Gross, C.G. (2002) Neurogenesis in adult mammals: Some progress and problems. *J. Neurosci.* 3, 619-623.
72. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2, 260-265. <http://dx.doi.org/10.1038/6365>.
73. Götz, M., y Barde, Y.A. (2005) Radial Glial Cells: Defined and Major Intermediates between Embryonic Stem Cells and CNS Neurons. *Neuron*, 46(3), 369-372.
74. 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.
75. Graziadei, P.P.C y Metcalf, J.F. (1971) Autoradiographic and ultrastructural observations on the frog's olfactory mucosa. *Z. Zellforsch.* 116, 305-318.
76. Gross, C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of the dogma. *Nat. Rev. Neurosci.* 1:67-73.
77. Hamdani H, Døving KB. (2007) The functional organization of the fish olfactory system. *Prog Neurobiol.* Jun; 82(2):80-6.
78. Halpern, M., Wang, R.T. and Colman, D.R. (1976) Centrifugal fibers to the eye in a nonavian vertebrate: source revealed by horseradish peroxidase studies. *Science*, 194:1185-1188.
79. Itaya, S.K. (1980) Retinal efferents from the pretectal area in the rat, *Brain Res*, 201:436-441.
80. Ka Tong, C., Hana, Y-G., Shaha, J.K., Obernier, K., Guintoa, C.D. & Álvarez-Buylla, A. (2014) Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *PNAS*, 111(34), 12438–12443.
81. Kaplan, M. S., y Hinds, J. W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.

82. Kaplan, M. S., McNelly, N. A., & Hinds, J. W. (1985) Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 239(1), 117-125.
83. Kaslin, J., Ganz, J. & Brand, M. (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1489), 101-122.
84. Kaslin, J., Ganz, J., Geffarth, M., Grandel, H., Hans, S., & Brand, M. (2009) Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *Journal of Neuroscience*, 29(19), 6142-6153.
85. Kaslin, J., Kroehne, V., Benato, F., Argenton, F., & Brand, M. (2013) Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish: from embryo to adult. *Neural development*, 8(1), 9.
86. Kawai T., Oka Y., Eisthen H (2009) The role of the terminal nerve and GnRH in olfactory system neuromodulation. *Zoological Science* 26: 669–680.
87. Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., & Wojtowicz, J. M. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods*, 115(1), 97-105.
88. Kempermann, G., Gast, D., & Gage, F. H. (2002) Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Annals of neurology*, 52(2), 135-143.
89. 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), 3549-3565.
90. Ko, H.W. (2012) The primary cilium as a multiple cellular signaling scaffold in development and disease. *BMB Reports*, 45(8): 427-432.
91. Kornack, D.R. y Rakic, P. (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (8):4752-4757.
92. Kotrschal, K., Van Staaden, M. J., & Huber, R. (1998) Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(4), 373-408.

93. Kuroyanagi, Y., Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., & Takeuchi, H. (2010) Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain research*, 1323, 33-40.
94. Lapper S.A y Bolam J.P (1991) The anterograde and retrograde transport of neurobiotin in the central nervous system of the rat: comparison with biocytin. *Journal of Neuroscience Methods*, 39:163-174.
95. Lema, S.C, Hodges, M.J., Marchetti, M.P., Nevitt, G.A (2005) Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 141:327-335.
96. Lima, L. y Urbina, M. (1998) Serotonergic projections to the retina of rat and goldfish. *Neurochem. Intl.* 32, 133-141.
97. Lindsey, B.W. y Tropepe, V. (2006) A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80:281-307.
98. Lindsey, B. W., Darabie, A., & Tropepe, V. (2012) The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 520(10), 2275-2316.
99. Lindsey, B. W., Di Donato, S., Kaslin, J., & Tropepe, V. (2014) Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain. *European Journal of Neuroscience*, 40(11), 3591-3607.
100. Ling, C., Zuo, M., Álvarez-Buylla, A., Cheng, M.F. (1997) Neurogenesis in juvenile and adult ring doves. *J Comp Neurol* 379:300-312.
101. Lledo, P.M., Alonso, M., Grubb, M.S. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:179-193.
102. Llorens-Martín M., Tejeda G.S., Trejo J.L. (2010) Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birth dating analysis. *PLoS One* 5 e12188.
103. Lois, C., y Álvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1149.
104. Lois, C., García-Verdugo, J. M., Álvarez-Buylla, A., (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981
doi:[10.1126/science.271.5251.978](https://doi.org/10.1126/science.271.5251.978); PMID: [8584933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8584933/)

105. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295(5556), 868-872.
106. Loureiro, M., Duarte, A., & Zarucki, M. (2011) A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology*, 9(2), 335-342.
107. Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. & Götz, M. (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37, 751–764
108. Maaswinkel H y Li L. (2003) Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *J. Exp. Biol.* 206:2201-2209.
109. Mackay-Sim, A. y Patel, U. (1984) Regional differences in cell density and cell genesis in the olfactory epithelium of the salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Exp. Brain. Res.* 57:99-106.
110. Margotta, V., Fonti, R., Palladini, G., Filoni, S. & Lauro, G.M. (1991) Transient expression of glial-fibrillary acidic protein (GFAP) in the ependyma of the regenerating spinal cord in adult newts. *J. Hirnforsch.*, 32(4), 485-490.
111. Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. & Gruss, P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, 105, 43–55.
112. Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P.D., Weston, J.A. (1994) Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J. Neurobiol.* 25: 143:155.
113. Maruska, K.P., Carpenter, R.E., Fernald, R.D. (2012) Characterization of cell proliferation throughout the brain of the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and its regulation by social status. *J. Comp. Neurol.* 520:3471-3491.
114. Maeyama, K., y Nakayasu, H. (2000) Postembryonic neurogenesis in zebrafish (*Danio rerio*) brain: presence of two different systems. *Zoological Science*, 17(7), 959-966.
115. Maaswinkel H and Li L (2003) Olfactory input increase visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *J Exp Biol* 206:2201-2209.

116. Miller, M. W., y Nowakowski, R. S. (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain research*, 457(1), 44-52.
117. Meek J. y Nieuwenhuys R (1998) Holosteans and teleosts, in: R. Nieuwenhuys, H.J. ten Donkelaar, C. Nicholson (eds.), *The Central Nervous System of Vertebrates*, Springer, Berlin, 1998, pp. 759– 937.
118. Münz, H., Claas, B., Stumpf, W. E. & Jennes, L (1982) Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes. *Cell Tissue Res.* 222, 313-323.
119. Münz, H. y Claas, B. (1981) Centrifugal innervation of the retina in cichlid and poeciliid fishes. A horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett* 22, 223-226.
120. Nelson, J. S. (1994) *Fishes of the World*, Wiley, Inc., Tokyo, p. 600.
121. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821), 714-720.
122. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K. & Kriegstein, A.R. (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.*, 22(8), 3161-3173.
123. Nottebohm, F. (1985) Neuronal replacement in adulthood. In: *Hope for a new neurology*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 457:143-161.
124. Nowakowski, R.S. & Hayes, N.L. (2001) Stem cells: the promises and pitfalls. *Neuropsychopharmacology* 25:799-804.
125. Ogino, T., Sawada, M., Takase, H., Nakai, C., Herranz-Pérez, V., Cebrián-Silla, A., y Sawamoto, K. (2016) Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 524(15), 2982-2992.
126. Olivera-Pasilio, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E. (2014) Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost *Gymnotus omarorum*. *Front Neuroanat* 8:1-19.
127. Paredes, M. F., Sorrells, S. F., García-Verdugo, J. M., & Álvarez-Buylla, A. (2016) Brain size and limits to adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 524(3), 646-664.

128. Passos, C., Tassino, B., Reyes, F., & Rosenthal, G. G. (2014) Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PloS one*, 9(7), e101649.
129. Peretto, P., Schellino, R., De Marchis, S. & Fasolo, A. (2014) The interplay between reproductive social stimuli and adult olfactory bulb neurogenesis. *Neural Plast*, 497657. doi: 10.1155/2014/497657. Epub 2014 Jul 22.
130. Pixley, S.K.R. y De Vellis, J. (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Dev. Brain. Res.*, 15, 201–209.
131. Pérez-Cañellas, M.M., Font, E., García-Verdugo, J.M. (1997) Postnatal neurogenesis in the telencephalon of turtles: Evidence for non radial migration of new neurons from distant proliferative ventricular zones to the olfactory bulbs. *Dev. Brain Res.* 101, 125-137.
132. Perrin F.E. y Stoeckli E.T (2000) Use of Lipophilic Dyes in Studies of Axonal Pathfinding *In Vivo*. *Microscopy research and technique* 48:25–31.
133. Pinelli C., D’Aniello B., Sordino P., Meyer D.L., Fiorentino M., Rastogi R.K. (2000) Comparative immunocytochemical study of FMRFamide neuronal system in the brain of *Danio rerio* and *Acipenser ruthenus* during development. *Dev. Brain Res.* 119, 195-208.
134. Pinto, L., y Götz, M. (2007) Radial glial cell heterogeneity—the source of diverse progeny in the CNS. *Progress in neurobiology*, 83(1), 2-23.
135. Polenov, A.L. y Chetverukhin, V.K. (1993) Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus: II. Types of neuronal cells produced. *Cell Tissue Res* 271: 351-362.
136. Rakic, P. (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227(4690), 1054-1056.
137. Ramón y Cajal S. y De Castro F. (1933) Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Salvat, Barcelona.
138. Rahmann, H. (1968) Autoradiographic studies on the DNA metabolism (mitosis frequency) in the CNS of *Brachydanio rerio* Ham. Buch.(Cyprinidae, Pisces) *Journal fur Hirnforschung*, 10(3), 279.

139. Raymond, P. A. y Easter, S. S. (1983) Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I. Location of germinal cells and numbers of neurons produced. *Journal of Neuroscience*, 3(5), 1077-1091.
140. Reynolds, B.A. y Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710.
141. Rink E. y Wullimann M.F. (2004) Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*) *Brain Res*, Jun 18;1011(2):206-20.
142. Rosillo Martí, J. C. (2010) Zonas proliferativas y neurogénicas en el cerebro de peces adultos del género *Austrolebias* (No. 591.18 ROS).
143. Rosillo, J.C., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., & Fernández, A. S. (2013) Olfacto-retinalis pathway in *Austrolebias* charrua fishes: a neuronal tracer study. *Neuroscience*, 253, 304-315.
144. Rosillo, J.C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., & Fernández, A. S. (2016) Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias* charrua: Cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience*, 336, 63-80.
145. Rusoff A.C. y Hapner S.J. (1990) Organization of retinopetal axons in the optic nerve of the cichlid fish, *Herotilapia multispinosa*. *J Comp Neurol* 294:418-430
146. Sakurai, K Osumi, N. (2008) The Neurogenesis-Controlling Factor, Pax6, Inhibits Proliferation and Promotes Maturation in Murine Astrocytes. *Journal of Neuroscience* 28 (18) 4604-4612.
147. Sawamoto, K., Hirota, Y., Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., He, X., Hayakawa-Yano, Y., Yamada, M., Hikishima, K., Tabata, H., Iwanami, A., Nakajima, K., Toyama, Y., Itoh, T., Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. & Okano, H. (2011) Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J. Comp. Neurol.*, 519 (4), 690–713.
148. Sawada, M. y Sawamoto, K. (2013) Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J Med.*, 62(1), 13-28.
149. Seki, T. y Arai, Y. (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport*, 6(18), 2479-2482.

150. Simmons, A.M., Horowitz, S.S., Brown, R.A. (2008) Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behav. Evol.* 71:41-53.
151. Schmidt, R., Strähle, U., & Scholpp, S. (2013) Neurogenesis in zebrafish-from embryo to adult. *Neural development*, 8(1), 3.
152. Schnitzer, J., Franke, W.W. & Schachner, M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* 90, 435–447.
153. Sullivan JM, Benton JL, Sandeman DC, Beltz BS. (2007) Adult neurogenesis: a common strategy across diverse species. *J Comp Neurol.* 500:574-84.
154. Springer, A.D. (1983) Centrifugal innervation of goldfish retina from ganglion cells of the nervus terminalis. *J. Comp. Neurol.* 214:404-415.
155. Stuermer, C.A., Bastmeyer, M., Bähr, M., Strobel, G., & Paschke, K. (1992) Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *Developmental Neurobiology*, 23(5), 537-550.
156. Stell W.K, Walker S.E., Chohan K.S. & Ball A.K (1984) The goldfish nervus terminalis: A luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 940-944.
157. Strobl-Mazzulla, P. H., Nuñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Kah, O., & Somoza, G. M. (2010) Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain, behavior and evolution*, 76(1), 20-31.
158. Taupin, P. (2006a) Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 35(11), 814.
159. Taupin, P. (2006b) Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 35(11), 814.
160. Topp, S. y Gallivan, J. P. (2008) Riboswitches in unexpected places a synthetic riboswitch in a protein coding region. *RNA*, 14(12), 2498-2503.
161. Torres-Pérez, M., Rosillo, J. C., Berrosteguieta, I., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2017) Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain Research*, 1673, 11-22.

162. 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* 11:241-251.
163. Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Lim, D.A. & Álvarez-Buylla, A. (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb. Cortex*, 13(6), 580-587.
164. Tseng, Y-Y., Gruzdeva, N., Li, A., Chuang, J-Z. & Sung, C-H. (2010) Identification of the Tctex-1 regulatory element that directs expression to neural stem/progenitor cells in developing and adult brain. *J. Comp. Neurol.*, 518, 3327–3342.
165. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., & Rustioni, A. (1992) NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *Journal of Comparative Neurology*, 321(2), 209-222.
166. Vanegas, H. y Ito, H. (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: A review. *Brain Res. Rev.* 6, 117-137.
167. Vega, C. y Peterson, D. (2005) Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat Methods* 2:167-170.
168. Von Bartheld Ch.S. y Baker C.V.H. (2004) Nervus Terminalis Derived From the Neural Crest? A Surprising New Turn in a Century-Old Debate. *The anatomical record (part b: New Anat.)* 278b:12–13.
169. Walker, S.E. y Stell, W.K (1986) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), molluscan cardioexcitatory peptide (FMRFamide), enkephalin and related neuropeptides affect goldfish retinal ganglion cell activity. *Brain Res.* 384, 262-273.
170. Weiss, O. y Meyer, D.L. (1988) Odor stimuli modulate retinal excitability in fish. *Neurosci Lett* 93:209-213.
171. Whitlock K.E. (2010) Olfactory Behavior: Making Scents of a Changing World. *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research in Neuromethods*, Volume 52, 47-71, DOI: 10.1007/978-1-60761-922-2_2.
172. Whitlock K.E, (2011) Olfactory Behavior: Making Scents of a Changing World. [Zebrafish Models in Neurobehavioral Research](#) in [Neuromethods](#), Volume 52, 47-71, DOI: 10.1007/978-1-60761-922-2_2.

173. Winner, B., Cooper-Kuhn C.M., Aigner R., Winkler J., Kuhn H.G. (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 16:1681-9.
174. Wirsig-Wiechmann, C.R (2004) Introduction to the anatomy and function of the nervus terminalis. *Microsc Res Tech*; Sep; 65(1-2):1.
175. Wourms JP. (1972) The developmental biology of the annual fishes. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J Exp. Zool* 182:389-414.
176. Wullimann, M.F., Rupp, B. & Reichert, H. (1996) *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. Birkhauser Verlag Press, Basel, Switzerland.
177. Wullimann, M.F. y Rink, E. (2002) The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res. Bull.*, 57, 363–370.
178. Yamamoto N., Oka Y., Amano M., Aida K., Hasegawa Y., Kawashima S. (1995) Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J Comp Neurol*; 355; 354–368.
179. Yau, S.-Y., Li, A., So, K.-F., (2015) Involvement of adult hippocampal neurogenesis in learning and forgetting. *Neural Plast.* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/717958>, 13pp.
180. Zikopoulos, B., Kentouri, M., & Dermon, C.R. (2000) Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*) *Brain, behavior and evolution*, 56(6), 310-322.
181. Zippel, H.P. (1993) Regeneration in the peripheral and the central olfactory system: a review of morphological, physiological and behavioral aspects. *Journal fur Hirnforschung*, 34(2), 207-229.
182. Zucker C.L. y Dowling J.E. (1987) Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature*. Nov 12-18; 330 (6144):166-8.
183. Zupanc, G.K. y Zupanc, M.M. (1992) Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia* sp.) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9539-9543.

184. Zupanc, G.K.H. y Horschke, I. (1995) Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J Comp Neurol* 353:213--233.
185. Zupanc, G.K. (1999) Up-regulation of somatostatin after lesions in the cerebellum of the teleost fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Neurosci. Lett.* 268:135-138.
186. Zupanc, G.K.H. (2001) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav. Evol*, 58, 250–275.
187. Zupanc, G.K. y Clint, S.C. (2003) Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia*, 43(1), 77-86.
188. Zupanc, G.K., Hinsch, K., Gage, F.H. (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 488(3), 290-319.
189. Zupanc G.K.H. (2006) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A.* 192:649-670.
190. Zupanc, G. (2008) Adult neurogenesis in teleosts fish. In F. Gage, G. Kempermann, & H. Song (eds.), *Adult Neurogenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 571–592.A



ANEXOS

15. ANEXOS

Artículos publicados sobre el tema de Tesis

- 1- Rosillo J.C.; Olivera Bravo; Casanova. G; García-Verdugo; Fernández A. (2013) Olfacto-Retinalis Pathway In Austrolebias Charrua Fishes: A Neuronal Tracer Study. *Neuroscience*, v.: 253, p.: 304-315.
- 2- Rosillo J.C.; Torres M.; Casanova. G; Olivera Bravo S.; García-Verdugo; Fernández A. (2016) Organization of telencephalic-olfactory bulb ventricle wall in *Austrolebias charrua*: cytoarchitecture, dynamics of proliferation, neurogenesis and migration. *Neuroscience*, 336, 63-80.
- 3- Torres M; Rosillo JC; Berrosteguieta I; Olivera-Bravo S.; Casanova G.; García-Verdugo JM.; Fernández A. (2017) Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *1673*, p: 11-12

Capítulo de libro

(2015) Capítulo 13 “Comparative Anatomy and Proliferative Zones of adult *Austrolebias* brain” **Autores:** Casanova Larrosa G.; Rosillo J.C; Olivera-Bravo S.; Fernández A. **Libro:** Annual Fishes: Life Strategy, Diversity and Evolution. **Eds:** Berois N/ García G/ De Sá R **Editorial:** Francis & Taylor Groups , Miami

OLFACTO-RETINALIS PATHWAY IN *AUSTROLEBIAS CHARRUA* FISHES: A NEURONAL TRACER STUDY

J. C. ROSILLO,^a S. OLIVERA-BRAVO,^b G. CASANOVA,^c
J. M. GARCÍA-VERDUGO^d AND A. S. FERNÁNDEZ^{a,e,*}

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

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

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

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

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

Abstract—The olfacto-retinal centrifugal system, a constant component of the central nervous system that appears to exist in all vertebrate groups, is part of the terminal nerve (TN) complex. TN allows the integration of different sensory modalities, and its anatomic variability may have functional and evolutionary significance. We propose that the olfacto-retinal branch of TN is an important anatomical link that allows the functional interaction between olfactory and visual systems in *Austrolebias*. By injecting three different neuronal tracers (biocytin, horseradish peroxidase, and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (Dil)) in the left eye of *Austrolebias charrua* fishes, we identified the olfacto-retinal branch of TN and related neuronal somas that were differentiable by location, shape, and size. The olfacto-retinal TN branch is composed of numerous thin axons that run ventrally along the olfactory bulb (OB) and telencephalic lobes, and appears to originate from a group of many small monopolar neurons located in the rostral portion of both the ipsi- and contralateral OB (referred to as region 1). Labeled cells were found in two other regions: bipolar and multipolar neurons in the transition between the OB and telencephalic lobes (region 2)

*Correspondence to: A. S. Fernández, Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable” (IIBCE), Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. Tel: +598-24871616; fax: +598-24875461. E-mail addresses: jrosillo@iibce.edu.uy (J. C. Rosillo), solivera@iibce.edu.uy (S. Olivera-Bravo), casanova@fcien.edu.uy (G. Casanova), j.manuel.garcia@uv.es (J. M. García-Verdugo), afernandez@iibce.edu.uy (A. S. Fernández).

Abbreviations: CB, cerebellum; DAB, 3',3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride; DIC, differential interference contrast; Dil, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; HRP, horseradish peroxidase; OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; PB, phosphate-buffer; PFA, paraformaldehyde; Po, preoptic area; Pr, pretecal area; Tel, telencephalon; Teld, dorsal telencephalon; Telv, ventral telencephalon; TL, *torus longitudinalis*; TN, terminal nerve; TO, *tectum opticum*; TV, telencephalic ventricle.

and two other groups in the preoptic/pretecal area (region 3). In this last region, the most rostral group is constituted by monopolar pear-shaped neurons and may belong to the septo-preoptic TN complex. The second group, putatively located in the pretecal region, is formed by pseudounipolar neurons and coincides with a conserved vertebrate nucleus of the centrifugal retinal system not involved in the TN complex. The found that connections between the olfactory and visual systems via the olfacto-retinal TN branch suggest an early interaction between these sensory modalities, and contribute to the identification of their currently unknown circuitual organization. © 2013 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: terminal nerve, *Austrolebias*, centrifugal innervation, neuronal tracing.

INTRODUCTION

Modulation of environmental information transmitted by sensory organs enables animals to respond appropriately to external cues (Kawai et al., 2009). Centrifugal modulation, a widespread mechanism among vertebrate sensory organs, allows the tuning of sensory responses related to both the internal and external environmental contexts.

Retinal centrifugal innervation has been described in many fish species (Münz et al., 1982; Arey, 1916; Whitlock, 2011). Several fish brain areas or nuclei such as the olfactory bulb (OB), telencephalic area (Tel), preoptic area (Po), dorsomedial optic nucleus, lateral pretecal, and *tectum opticum* (TO), may project axons to the retina (Vanegas and Ito, 1983; Lima and Urbina, 1998). However, the centrifugal pathway that has drawn the widest attention, originates in the cell bodies of the terminal nerves (TN) that are located in the OB (Fujita et al., 1985; Pinelli et al., 2000). TN has been described in diverse species of vertebrates, including all fishes except jawless fish (Eisthen and Northcutt, 1996). TN, or the *nervus terminalis* as named in latin, or the “cranial nerve 0” as it appears just ahead of the other rostral cranial nerves, is a nerve, or a complex of nerves, that is a diffusely organized system of neurons located in the nasal cavity and rostral forebrain (Demski, 1993; von Bartheld, 2004; von Bartheld and Baker, 2004; Wirsig-Wiechmann, 2004).

Despite being present in most vertebrates, the function of TN has not been clarified yet. Neurochemical and neuroanatomical data suggested that TN participates in neuromodulation, mediation of responses

to sex pheromones, reproductive physiology, behavior and/or development (Stell et al., 1984; Oka, 1992; Demski, 1993; Yamamoto et al., 1995, 1997; Eisthen and Northcutt, 1996; Wirsig-Wiechmann, 2004; Kawai et al., 2009; Yañez et al., 2011). The terminal nerve system has been associated to sensory modalities as visual (Behrens and Wagner, 2004) and somatosensory (Yamamoto and Ito, 2000). The cells that originate in the TN contain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) that has been suggested to function as a neuromodulator in the olfactory bulb (Kawai et al., 2009).

The anatomical data indicate that TN is more complex and heterogeneous in teleosts than in other fish studied (Nieuwenhuys et al., 1998). Cells that originate in the TN could be arranged as a ganglion and running close to or with the olfactory tract and OB or as scattered cells within them (Bullock and Northcutt, 1984).

Moreover, it seems that TN mediates the interaction between visual and olfactory information in teleosts. In goldfish, TN ganglion cells are located in the olfactory nerve and OB and send peripheral processes into the olfactory epithelium and central processes to the supracommissural nuclei of the telencephalon and to the retina (Demski and Northcutt, 1983; Springer, 1983; Whitlock, 2011). In zebrafish, it was demonstrated that visual sensitivity increased upon presentation of amino acids as an olfactory stimuli. This effect was eliminated after injuring the olfactory bulbs or destroying dopaminergic interplexiform cells (neural retina), both suggesting that TN axons terminate on neural retina and are the prime candidates for the olfactory modulation of zebrafish light adaptation (Maaswinkel and Li, 2003).

In euteleosteans belonging to the *Austrolebias* genus, we found that the species with different habitats or phylogeny showed different cell proliferation in brain regions involved in vision and olfaction. While the less evolved *Austrolebias* species exhibited the highest proliferation index in visual regions and the lowest in the olfactory bulb, the newest species showed an exactly inverse pattern (Fernández et al., 2011). Although no previous data reported the presence of TN in *Austrolebias*, we hypothesize the anatomical pattern of this nerve will give us information about the importance of the interaction between these two systems. In addition, this information could provide data related to the phylogeny of this group.

Moreover, our interest in identifying the part of TN involving the visual with the olfactory system, is trying to understand the changes in neurogenic activity observed in both systems in closely related species within the genus *Austrolebias* (Fernández et al., 2011).

This article shows the presence and describes an olfacto-retinal pathway in *Austrolebias charrua*, the fish that shows an intermediate pattern of proliferation index in visual regions and OB (Fernández et al., 2011). By employing *in vivo* and *in vitro* neural tracers, we demonstrated, (1) the presence and origin of the path of the terminal nerve involved in the olfactory bulb and retina relationship, (2) groups of labeled neurons located in the transition between the OB and telencephalic lobes

(region 2) and, (3) labeled neurons located in region 3 (preoptic–pretectal area). The complexity of the TN cells and fibers described here suggests a robust interaction of visual and olfactory systems in *Austrolebias*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Seventeen adult male *A. charrua* fishes (Cyprinodontiformes – Rivulidae) with an averaged standard length of 5 cm were used in this study. Specimens were collected with hand nets in temporary ponds close to the major rivers of Rocha and Treinta y Tres in Uruguay. Two to four days before the experiments, animals were transferred to a fresh water aquarium, and maintained at 19 °C under natural photoperiod and fed daily with live *Tubifex* sp. All experiments were approved by the local Committee for Animal Care and Research (CHEA, UdelaR and CNEA, IIBCE), which follows NIH guidelines for maintenance and use of laboratory animals.

Fixation and sectioning of brains

Fishes were deeply anesthetized by adding Eugenol (Sigma–Aldrich, Milwaukee, WI, USA) at a final concentration of 0.01% to the aquarium water. Animals remained in the aquarium until opercular movement ceased, then each fish was intracardially perfused, first with saline solution to wash the vascular system, and then with 10% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffer (PB, 0.1 M, pH 7.2–7.4). Brains were removed from the skulls, kept in the same fixative solution for 2 h at 4 °C, and then serially sectioned (60- μ m thickness) in a Vibratome S1000 (Leica Buffalo Grove, IL, USA) following sagittal, horizontal and transverse planes. Sections were transferred to multi-well plates in PB for further free-floating processing.

Tracer experiments to determine the origin and path of the terminal nerve

Three different tracers were employed to follow the olfacto-retinal route. Biocytin (Sigma) and horseradish peroxidase (HRP, Sigma) were the two markers used in *in vivo* experiments, whereas the carbocyanine dye 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was applied in fixed tissue (Perrin and Stoekli, 2000). Ten animals were used for biocytin, four were used with HRP and the last three with DiI experiments, respectively.

Biocytin and HRP were administered into the left eye of anesthetized living fishes. Between 0.15 to 0.20 mg of each dye was diluted in 10 μ l of saline solution (initial concentration ~1.5% to 2%, Bell et al., 1997), and then injected into the humor vitreous of the left eye of 10 and four anesthetized fishes, respectively. After a survival time of 48 h at 19 °C, fishes were fixed and brains dissected and sectioned as described above. To avoid positive false staining endogenous biotin-like activity was blocked in biocytin-injected fishes by preincubating

brain sections with 0.05% avidin and 0.005% biotin. 30 min after, sections were incubated with 1:200 (PB plus 0.3% Triton X-100) of the fluorescent conjugate streptavidin-Alexa 488 (Invitrogen, USA), and then visualized. In some cases, it was made a counterstain with a 1:1000 dilution of the red fluorescent nucleic acid stain Syto[®] 64 (Invitrogen). Sections were mounted with glycerol. Some sections of the fishes injected with biocytin and all of those injected with HRP, were revealed with 3',3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB, Sigma) after blocking endogenous peroxidases with 1% hydrogen peroxide (10 min). To visualize biocytin-labeled neurons, brain sections were exposed to a 1:200 dilution of streptavidin–HRP (Vector Burlingame, CA, USA) for 1 h, then to 0.2 mg/ml DAB in 0.1 M PB–0.3% Triton X-100 plus 0.03% hydrogen peroxide (Carlson and Mesulam, 1982). HRP activity was recognized as a brown precipitate obtained after exposing sections directly to DAB and hydrogen peroxide, in the conditions described above.

Few crystals of the Dil were directly applied to the vitreous of the left eye of three fixed specimens that were dissected maintaining the eyes connected to the brain (Fig. 6A). Whole samples were kept in 10% PFA at 37 °C for 2 weeks, then embedded in a 1.5%:45% gelatin–albumin mixture and further serially cut following horizontal, sagittal and transverse planes. Sections were maintained in PBS, counterstained with diaminobenzidine (DAPI) and mounted serially with glycerol.

Immunohistochemistry

Some of the sections developed with Biocytin-Alexa 488 were processed for immunohistochemistry to determine the neuronal nature of labeled cells. Free-floating sections were incubated with a 1:200 anti-HuC/D antibody (Invitrogen) diluted in 0.3% Triton X-100–PB for 24 h at room temperature, and then with a secondary antibody conjugated with the fluorescent marker Alexa 633 (Invitrogen, USA). Sections were mounted in glycerol.

Imaging

All fluorescent images were obtained using a confocal FV300 Olympus microscope. Differential interference contrast (DIC) combined with confocal imaging was performed in a set of experiments. Sequential imaging and multi-plane view analysis were performed to determine co-localization of signals.

RESULTS

We used three different complementary methods for describing the olfacto-retinal pathway in *A. charrua*: *in vivo* tracing with Biocytin revealed through fluorescent (Alexa 488) and chromogen (DAB) techniques, *in vivo* tracing with HRP, and *in vitro* tracing with Dil. Although data obtained using different techniques are complementary, Biocytin-Alexa 488 yielded by itself the most complete data and is presented first.

Biocytin-Alexa 488 experiments

Biocytin-fluorescence gave substantial information about the origin and pathway of TN. Parasagittal sections evidenced biocytin-labeled neurons located in three different regions and a large number of fibers in the optic nerve (Fig. 1A). In the OB (named as region 1) the majority of labeled cells were located at the rostro-dorsal part in the granular and glomerular layers. We also identified a small group of very fine fibers which will join the positive axons of the optic nerve. These fibers run along the telencephalic ventral marginal zone and the ventral part of the OB toward its rostro-dorsal portion (Fig. 1B, C), and could connect with a large group of rostral small biocytin-labeled neurons (6–8 μm in diameter) that have similar size to granule cells and are surrounded by large buttons (inset Fig. 1D). Taken together, it seems the labeled thin fibers that constitute the TN may originate in these small neurons located in the rostro-dorsal OB.

In the transition OB-telencephalic lobes (named as region 2) in the contralateral side of the injection, two types of biocytin-labeled neurons with different morphology were found. The first type of labeled neurons are large multipolar cells (diameter bigger than 10 μm) with a main dendrite and secondary branches arising from it one of which appears to be toward the more rostro-dorsal small neurons of region 1 (Fig. 1D, white arrows). The second type of labeled neurons showed a bipolar rounded to fusiform body with opposing processes that extend horizontally, one directed toward the OB and the other toward the rear telencephalic region (Fig. 1E).

Two groups were found in the contralateral preoptic/pretectal region (named as region 3, Fig. 1A). In some sections it appears as a continuity between both groups, as suggested by the axons from the preoptic labeled cells that seem to be directed toward the labeled neurons found in the pretectal region (Fig. 1F, white arrows). Both groups were constituted by labeled monopolar (Fig. 1G) and pseudounipolar (Fig. 1H) neurons (12–15 μm of diameter), respectively.

The analysis of horizontal and transverse sections allowed a better description of the trajectory of the TN fibers and labeled cells (Fig. 2). The image of the two olfactory bulbs (region 1) in a single slice reveals bilateral projections with a predominance of contralateral labeling. The bundle of fibers labeled from the retina crossed the midline in close relationship with the meningeal membranes reaching the contralateral OB. (Fig. 2A).

Transverse sections show that the majority of biocytin-labeled neurons were located in the most rostral portion of the OB superficial layer (glomerular) (Fig. 2A, B, arrows), and are small rounded neurons with a diameter less than 10 μm. Some biocytin-labeled neurons were also found as isolated or in groups of two or three cells, little bigger than 10 μm, located in OB deeper layer (granular, Fig. 2A, B, star). In spite of all neurons have different sizes they showed similar morphology.

Near to the soma of all neurons are observed varicose processes or large buttons of 2–3 μm of size. It was found to be extended dendritic arborization with branches that

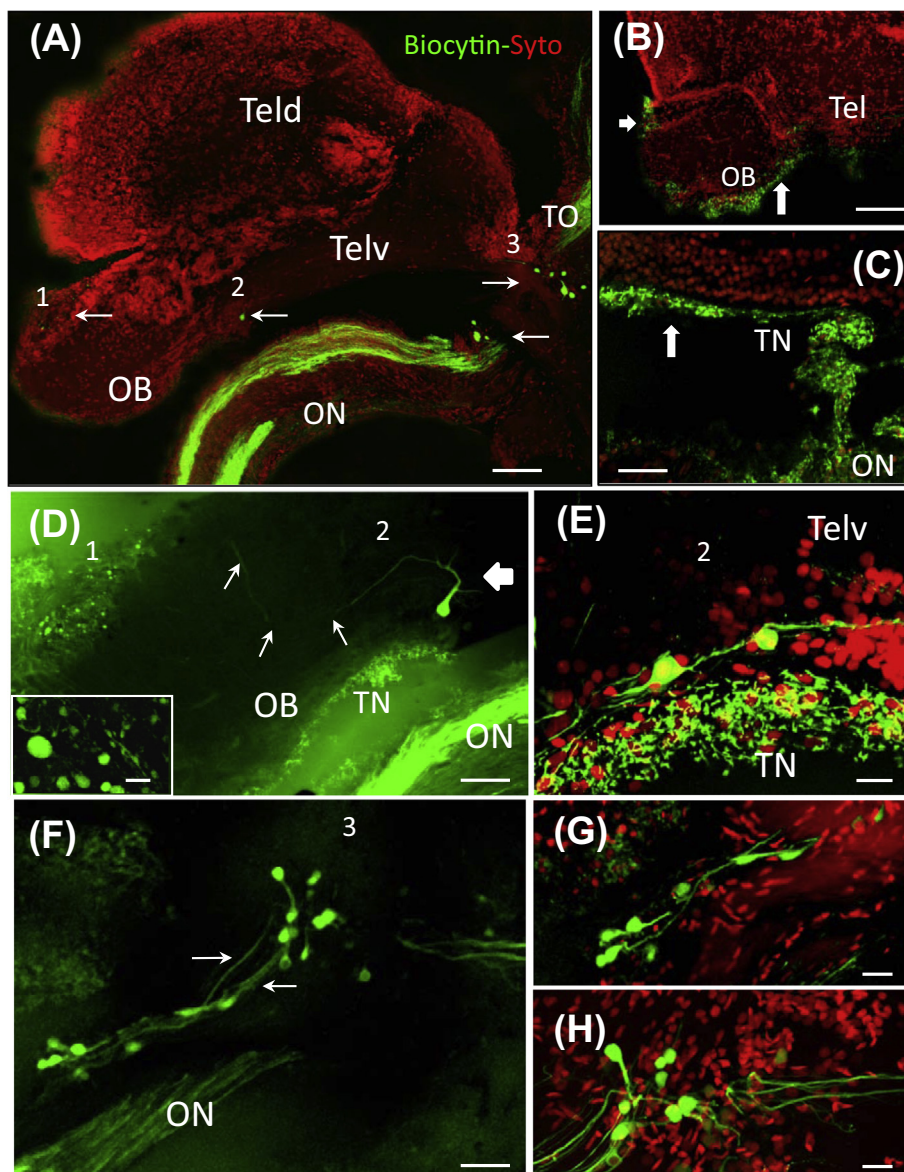


Fig. 1. *In vivo* Biocytin-Alexa 488 experiments: (A) A panoramic parasagittal brain section at the telencephalic level showing neuronal clusters (white arrows) and abundant fibers of the optic nerve (ON) stained with biocytin and revealed with Alexa 488. Numbers indicate regions where labeled cells appear. (B) Low magnification of the OB showing the tract of TN fibers running ventrally and rostrally (white arrows). (C) The confocal image shows the bundles of labeled fibers that separate from the ON to constitute the TN (arrow). (D) Confocal picture showing a prominent biocytin-labeled neuron in region 2 (big white arrow). This neuron sends a long process (arrows) to the group of cells located in the rostral OB (region 1). Inset shows a higher magnification of the rostral-labeled neurons. Such neurons have a granule cell-like appearance and are surrounded by large buttons. The important bundle of optic nerve fibers that was stained with biocytin through the retina (E) was also seen. Bipolar cells in the Telv close to the TN fibers (region 2) were also seen. (F) A 66- μm Z-stack confocal images of region 3 (preoptic/pretectal area) showing both labeled groups and its putative interaction (white arrows). (G) Labeled pear-shaped neurons in the preoptic area. (H) Stained pseudounipolar neurons present in the pretectal area at the entry of the optic tectum. *Abbreviations:* OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; TN, terminal nerve; Telv, ventral telencephalon. Scale bars A = 100 μm ; B, F = 50 μm ; C, D = 30 μm ; G, H = 20 μm ; E = 10 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

are occupying the territory of neighboring cells. Some large buttons are visualized near of the soma, which are connected by a very thin process probably being axonal collaterals (Fig. 2C, arrowhead). On the transverse sections, the multipolar cells previously described in parasagittal sections were found in the contralateral region 2 (Fig. 2D). At that level the passage of contralateral axons that were retrogradely and strongly labeled from the retina was observed (Fig. 2E).

To corroborate the neuronal nature of biocytin-labeled cells found in region 1, we used two strategies, the first one combined confocal and DIC microscopy, and the second one used immunohistochemistry to recognize HuC/D, a specific marker of neuronal ribosomal proteins (Fig. 3). In the rostral and lateral portions of the OB biocytin-labeled neurons of similar morphology were found (Fig. 3A). The analysis at higher magnification showed labeled small rounded neurons (8–10 μm) and

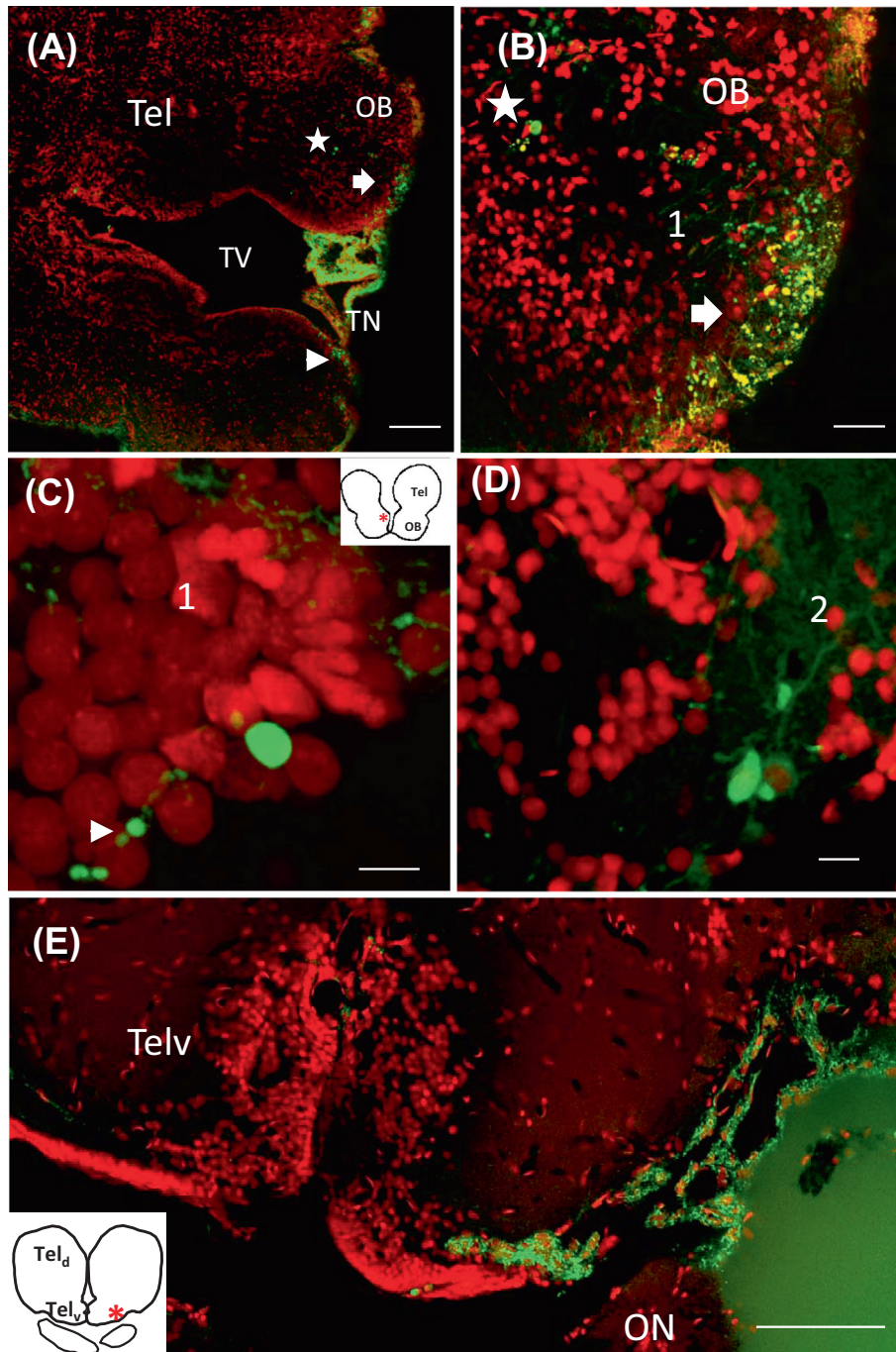


Fig. 2. Horizontal and transversal views of TN fibers and cells bodies labeled with fluorescent biocytin plus Syto. (A) A panoramic horizontal view of the OB and telencephalic lobes (Tel) showing TN biocytin-positive cells and the route of fibers in the ipsi- and contralateral side to the injection (arrow and arrowhead, respectively). White star shows a labeled cell in mid OB. (B) A higher magnification of a 20- μm Z-stack showing the rostral portion (region 1) of the OB. A large labeled cell in the mid OB (star), and abundant small labeled neurons in the most rostral part of the OB (arrow) were found. Yellow results from merging red nuclei staining and green biocytin label were obtained. (C) 22- μm Z-stack of transversal sections showing one of the labeled cells located in the dorsal region of the OB (region 1) near to the telencephalic lobes (asterisk in the scheme) was seen. The labeled cell shows two types of processes, one with the appearance of dendrites and the other resembling an axon with an “*en passant boutons*” (white arrowhead). (D) The image shows prominent multipolar labeled cells (diameters around 15 μm) located in the ventral transition between OB and telencephalic lobes (region 2). (E) A single transversal confocal plane of the TN tract at level of the posterior telencephalic lobes showing the specific and selective label (drawn showing the area imaged). Scale bars A = 50 μm ; B = 25 μm ; C = 10 μm ; D = 10 μm ; E = 100 μm , respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

buttons of 2 to 3 μm in diameter (Fig. 3B, arrows and arrowheads respectively). DIC evidenced that unlabeled cells have equal size and shape than those labeled with

biocytin (Fig. 3A, B). The very close buttons around the soma and the thin process of the dendritic arborization are shown at higher magnification in Fig. 3C, Fig. 3D,

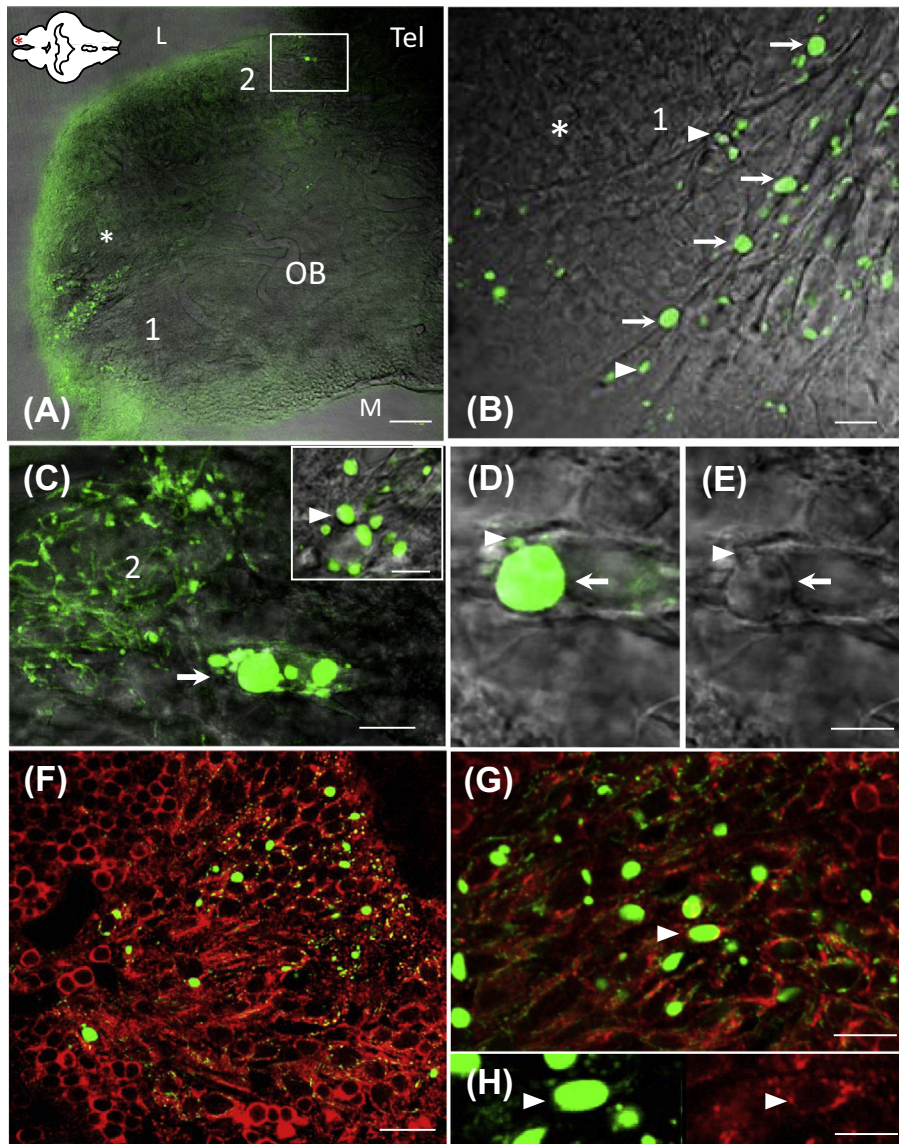


Fig. 3. Biocytin-fluorescence with DIC and/or HuC/D immunohistochemistry. (A) A 20- μm Z-stack of confocal planes of a horizontal section at level of the OB showing the arrangement of biocytin-labeled cells (green) superimposed to DIC. The image also reveals the presence of non-marked cells in the medial region (M). Biocytin-positive cells are located in the rostral portion of the OB (region 1, asterisk) close to the lateral (L) transition between the OB and the telencephalic lobe (Tel, white box, region 2). The red asterisk in the scheme shows the area imaged in the whole figure. (B) The picture shows a higher magnification of the biocytin-positive cells (arrows) found in region 1. Labeled processes that resemble terminal buttons because of their size and closeness to cell bodies (arrowheads) were found. The size of unlabeled cells (asterisk) are the same that those of biocytin positive, evidencing the specificity of the labeling. (C) A higher magnification of 16- μm Z-stack of the cells present in the white box drawn in A (region 2) allows showing the cell bodies, fibers, and abundant terminal button-like processes (white arrow) that are large when compared to the cell size (upper right inset, arrowhead). (D–E) A single confocal plane of the cells shown in C evidencing the biocytin label at the left and DIC on the right. Note one process with an appearance of terminal button (arrowhead) very close to the cell body (arrow). (F) A panoramic view of a 25- μm Z-stack obtained from a horizontal section of the rostral OB portion showing HuC/D-positive neurons (red) and some of them co-labeled with biocytin (green). Many biocytin-positive buttons are very close to other HuC/D neurons. (G) A higher magnification that shows the double labeling of some cells (white arrowhead) and buttons with greater details. (H) The cell pointed in G is shown in separated green and red channels to evidence the double labeling. Scale bars A, F = 50 μm ; B, G = 20 μm ; C = 10 μm ; C insert = 5 μm ; D, E = 10 μm ; H = 15 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

E shows a cell marked with biocytin plus DIC and DIC alone to see the cell boundaries (arrows) and a button (arrowheads) very close to the cell body. Biocytin-labeled cells were positive to HuC/D confirming the neuronal nature of marked cells. The immunohistochemistry against HuC/D also confirmed the similar size and morphology of biocytin-labeled neurons with those unlabeled. Abundant biocytin-labeled

buttons were found surrounding HuC/D-positive cells and some of them are co-labeled with biocytin (Fig. 3F–H, arrowheads).

Biocytin and HRP *in vivo* experiments

In some experiments biocytin was developed with chromogen (DAB) and analyzed under light microscopy.

A clear and homogeneous label was found in region 2 (Fig. 4A, B). A small group, consisting of three or four prominent cells (12–15 μm of diameter), was only observed in two consecutive sections of the whole parasagittal series of the contralateral side of the injection. These neurons showed smooth and long dendrites, and one fine and smooth axon that leaves the cell body from the opposite side than dendrites (Fig. 4B).

Another important group of biocytin-labeled cells was consistently observed in region 3 (Fig. 4C). This group is composed of numerous neurons (10–12 μm of diameter) with a label ranging from very strong to weak, and is the pretectal group seen previously with fluorescence (Fig. 1H). Although cell bodies were preferably labeled, some processes were stained giving a pseudounipolar appearance to these neurons.

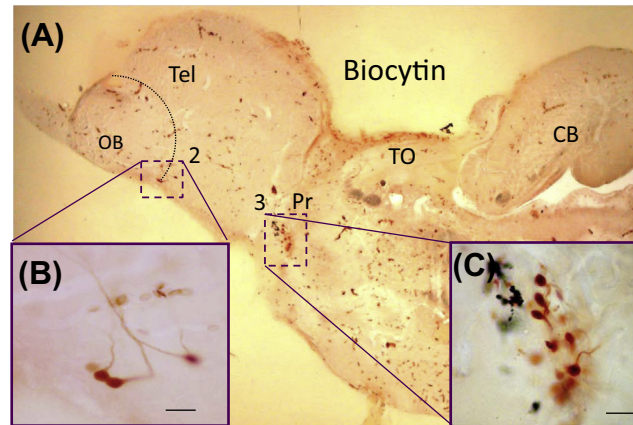


Fig. 4. Biocytin-chromogen experiments. (A) Light image of a parasagittal section showing two groups of labeled neurons (boxes). (B) A group of few but prominent biocytin-labeled neurons that take part of the TN and are located between the Tel and OB border and have significant cell processes (region 2) are shown. (C) The second group of biocytin-labeled cells is composed by numerous small-sized neurons located in the pretectal region (region 3). *Abbreviations:* CB, cerebellum; OB, olfactory bulb; Tel, telencephalon; Pr, pretectal region; TO, tectum opticum. Scale bars B, C = 20 μm .

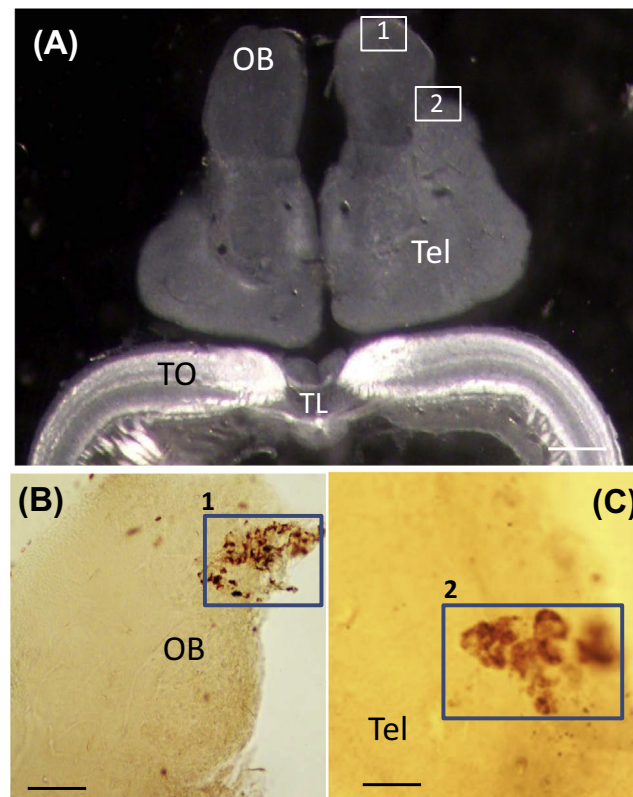


Fig. 5. HRP experiments. (A) A horizontal section of olfactory bulbs and a part of the tectum opticum showing the location of HRP-labeled cells (1 and 2 boxes). (B) Higher magnification of box 1 showing a large group of small cells exhibiting granular HRP precipitates. Type of labeling is better seen in the inset. (C) The image shows a small cluster of prominent HRP-labeled cells in the border between the OB and Tel. *Abbreviations:* OB, olfactory bulb; Tel, telencephalon; TL, torus longitudinalis; TO, tectum opticum. Scale bars A = 200 μm ; B = 50 μm ; C = 20 μm .

The analysis of the horizontal sections showed the precise location of two contralateral groups of cells labeled with HRP, one in region 1 and the other in region 2 (Fig. 5). All of the labeled cells showed a granular HRP precipitate on the somas but no marked cell processes were observed. The group located in region 1 consists of numerous cells that line the outer margin of the brain. This is a very remarkable group of small (less than 10 μm in diameter) but variable sized neurons (Fig. 5A, B). The second labeled group, consisting of few large neurons (around 15 μm of diameter) found in region 2 (Fig. 5A–C) showed a granular stain in the body without exhibiting cellular processes. This group was also observed previously with both Biocytin-Alexa 488 (Fig. 1H) and biocytin–DAB (Fig. 4C) with very similar cell size and number.

In vitro experiments using Dil

The carbocyanine Dil was used in fixed fishes. Few crystals of Dil were placed in the vitreous of the left eye that was kept connected to the brain (Fig. 6A). The analysis of panoramic views made two weeks later showed a sharp and strong Dil label in the left eye, the retina and the optic nerve, as well as an important

presence of Dil in the TO, telencephalic lobes and olfactory bulb (Fig. 6B). A group of highly labeled fibers located in the preoptic area was identified (region 3, Fig. 6C). Another obvious group of Dil labeled fibers was found in the olfactory nerve in the rostral and dorsal portion of the OB (region 1, arrowhead). At higher magnification, cell bodies and processes were better observed. Cell bodies were found in two main locations. Numerous groups of small cells without visible dendritic arbors were found at the entrance of the olfactory nerve. Other groups of less abundant, small and rounded neurons with a prominent dendritic arborization with thick and irregular branches were found in the dorsal OB next to the transition with the telencephalic lobes (Fig. 6D). Such cells seem to send dendritic branches around the nearby cells, suggesting a functional interaction between the cells that originate in the TN and their neighbors. In some cases a thin axon with an arrangement of “*en passant*” buttons was visualized (Fig. 6D, arrow).

DISCUSSION

The olfacto-retinal terminal nerve branch in the *A. charrua* fish was described in detail by using three different

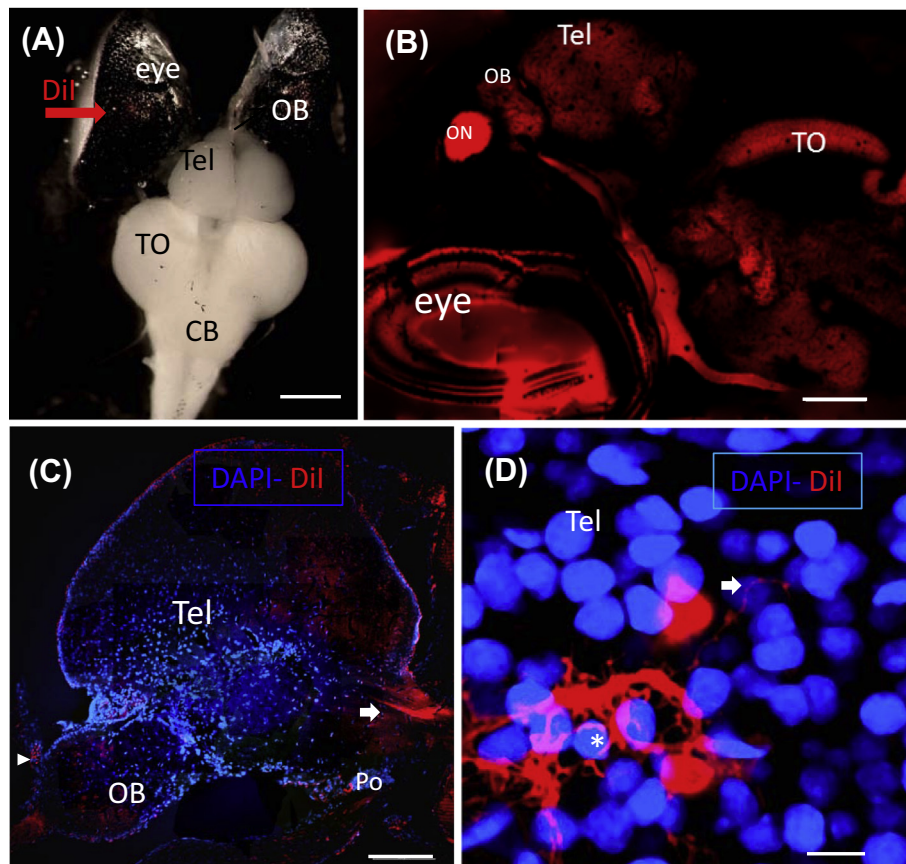


Fig. 6. *In vitro* Dil experiments. (A) Dorsal view of *Austrolebias* brain with the eyes attached and the place of Dil application (red arrow). (B) Confocal panoramic view of a parasagittal section and the attached eye showing a strong Dil labeling in the retina and optic nerve. (C) Confocal image of a panoramic parasagittal plane showing Dil-labeled fibers (region 3, white arrow), and positive staining in the olfactory bulb (arrowhead). (D) Neurons labeled by retrograde transport from the retina that are located in dorsal OB close to the telencephalic lobes. Note the prominent dendrites that seem to contact neighboring cells (asterisk), and the thin axon with an “*en passant*” arrangement (white arrow). *Abbreviations:* CB, cerebellum; OB, olfactory bulb; ON, optic nerve; Po, preoptic area; Tel, telencephalon; TO, tectum opticum. Scale bars A = 1 mm; B = 300 μm ; C = 100 μm ; D = 10 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

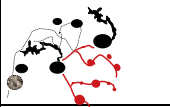


neuronal tracers. A summary of central findings obtained is shown in Fig. 7. Independent of the tracer and developer used, a conspicuous group of abundant labeled neurons in the rostral portion of the OB (region 1) was found. Other labeled cells, isolated or in small groups were found widespread through the whole OB. Labeled cells with different shapes, sizes and arborizations were also found in the transition of OB and telencephalic lobes (region 2,). Finally, two groups of labeled cells were found in the preoptic/pretectal region (region 3), one at the entry of the optic nerve and the second in the pretectum. Biocytin-Alexa 488 showed an interaction among both groups of region 3.

Comparison of tracers used

Although all tracers yielded similar results, biocytin-fluorescence together with confocal microscopy gave much more quality and quantity of labeling. Biocytin-Alexa 488 gave complete information about the fibers, arborizations of neurons involved in the TN tract (Lapper and Bolam, 1991), as well as a relationship among

neurons stained in the preoptic/pretectal area (region 3). HRP and biocytin-DAB, stained the same clusters of neuronal bodies, but the style of labeling was different. Biocytin showed a homogeneous label and HRP a granular one. Dil is a fluorescent lipophilic dye traditionally used to study axonal path findings (Perrin and Stoeckli, 2000; Rink and Wullimann, 2004) with the advantage of not requiring active axonal transport thus allowing its use in fixed tissue. In our approaches, Dil stained the zones in which TN runs and some cell somas and processes. However, the labeling was significantly more diffuse than biocytin-fluorescence, probably because Dil transport is through lipid membranes instead of the active one used in living systems. Most of our results were in accordance with those shown by other authors that demonstrated the olfacto-retinal projections in cichlids, poecilids, centrachids (Münz and Claas, 1981); *Gasterosteus*, *Oncorhynchus* and *Salmo* (Ekström et al., 1988), and zebrafish (Whitlock, 2011). Bilateral marked cells by retrograde transport has been described previously in Cypriniformes (Stell et al., 1987), although not with the

(A) LOCATION AND CELLS TYPES LABELED WITH THE DIFFERENT DYES EMPLOYED

		Dil	HRP	Biocytin-DAB	Biocytin-Alexa 488	Cellular types
1	OB	Rostral Dorsal	Rostral		Rostral Dorsal Ventral	
2	Tel	OB-Tel Transition	OB-Tel Transition	OB-Tel Transition	OB-Tel Transition	
3	Dien	Pretectal	Pretectal	Pretectal	Preoptic Pretectal	

(B)

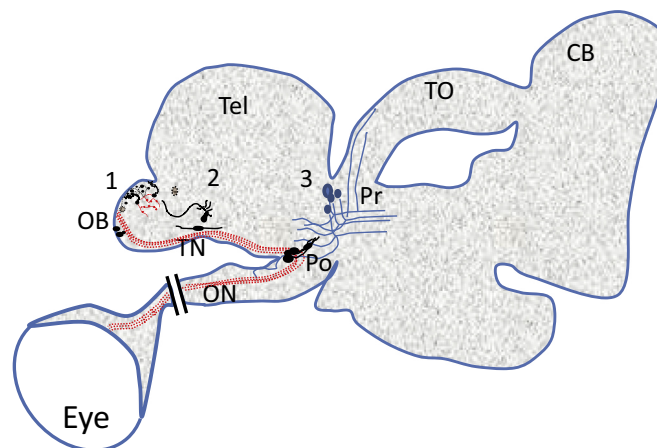


Fig. 7. Summary of the main experimental results found in *Austrolebias charrua* brain. (A) The table shows a summary of the location and type of cells labeled with the different tracers employed. (B) Scheme of a parasagittal section showing the TN route outlined in red, and the location and different neuronal types labeled by axonal transport from the retina. Black cells are those that belong to the TN tract while the light blue cells are those projecting to the TO. *Abbreviations:* OB, olfactory bulb; TN, terminal nerve; TV, telencephalic ventricle; ON, optic nerve; Po, preoptic area; Pr, pretectal area; Tel, telencephalon; CB, cerebellum; TO, tectum opticum. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

detailed features found here. Interestingly, the only place of decussation found was through a thick meningeal bridge that links both OB at medial level. No labeled decussating fibers were found in the locations reported previously in other teleosts (Repérant et al., 2006; Whitlock, 2011). Regarding the labeled cells found in region 3, previous descriptions were made in other cyprinodontiforms (Münz et al., 1982). At least one of these groups seems the conserved nuclei in other taxa of vertebrates (that located at the entry of the TO), and the other belongs to the septo-preoptic TN complex according to Repérant et al. (2006, 2007). However, biocytin-fluorescence seems evidencing continuity between both groups (Fig. 1F).

The fibers comprising the olfacto-retinal branch of the terminal nerve

Anatomical studies of fish retina and electrophysiological recordings made in the optic nerve have suggested that a centrifugal innervation of retina is present in fishes (Bullock and Northcutt, 1984; Nieuwenhuys et al., 1998), and that part of these innervations give rise to what it is known as terminal nerve. While centrifugal innervation of the retina in caimans (Ferguson et al., 1978), snakes (Halpern et al., 1976), birds (Cowan, 1970) and rats (Itaya, 1980), originates mainly in the diencephalon, in different species of fishes including *A. charrua*, centrifugal innervation related to TN is originated in the olfactory bulb (Münz et al., 1982; Stell et al., 1984; Walker and Stell, 1986; Repérant et al., 2006). It was also described that in fishes, the TN is associated with the olfactory nerve. There are processes extending into the olfactory epithelium and ganglia located at various points along its projections that run through the ventral olfactory bulb/telencephalon (Whitlock, 2011). The work done in dogfish by Bullock and Northcutt (1984) showed that TN is composed by about 1000 unmyelinated fibers whose diameters range from 0.6 to 1.5 microns. Dil experiments showed some stained fibers in the olfactory nerve and labeled cells close the olfactory nerve fibers. In *Austrolebias* we found a small package of multiple nerve fibers that appears emerging from an important group of neurons located in the rostral portion of olfactory bulb that runs along the ventral telencephalon, and then take the optic nerve pathway to the retina. These fibers were thin, around 1 micron, but did not constitute a compact bundle. The TN fibers course around the cells and neurons that lie in the marginal ventral telencephalic area. Some of these fibers cross the midline and seem to originate in the neuronal cell bodies located in the ipsilateral side of olfactory bulb. In zebrafish it was described that some TN fibers crossed the midline but is not clear where the fibers cross (Whitlock, 2011).

Cell somas labeled through the terminal nerve

Neurons surely contributing to the terminal nerve path were consistently found in the OB (region 1),

OB/telencephalic transition (region 2), and preoptic/pretectal area (region 3).

Cells found in region 1 seem to be the most important component forming the TN. This group has abundant monopolar cells that resemble those OB granule cells observed in rats (Millhouse, 1987). These cells have 5–8 μm in diameter, globular-shaped somata and thin branched dendrites. Instead the neurons found in *A. charrua* are pausidendritic and are rather similar to the monopolar spherical cells described in the electrosensory lobe of electric fishes (Rethelyi and Szabo, 1973; Castelló et al., 1998). It is important to stress that there is an important variation in size and shape that can be attributed at the high OB neurogenic activity previously described in this and other species of *Austrolebias* genus (Fernández et al., 2011). In accordance, olfactory bulb granule cells are reported as having a high turnover and increased neurogenesis in response to photoperiod changes (Walton et al., 2012). Most of the region 1 cells were surrounded by large labeled buttons that probably arise from collateral axons of the same cell. However, we cannot discard that some of the buttons are terminals of the axons originating from the cell bodies in the retina that were labeled by the marker applied to the eye.

The bipolar and multipolar labeled cells found in region 2 (the transition OB/Tel) are located ventrally and very close or interspersed to the fiber identified as part of the TN. These cells are probably interacting with those of region 1, because the dendritic branches from multipolar cells seem to be directed toward the region 1 cell rostral group. Labeled cells found in region 2 could correspond to the nucleus olfactoretinalis present in fishes, such as cichlids, poecilids and centrarchids, and proposed as anatomically and functionally interconnecting and integrating parts of the olfactory and optic systems (Münz and Claas, 1981). Regarding types of cells labeled in region 2, bipolar Dil-labeled cells similar to ours have been reported in the same location in sharks (Yañez et al., 2011). Large multipolar cells (diameter 25 μm) projecting toward the OB were described as belonging to the ganglionic cells of the TN in *Cichlasoma* and *Haplochromis* (Crapon de Caprona and Fritzsche, 1983) as was cited by Repérant et al. (2006).

Regarding the two groups found in region 3, according to Repérant, the nuclei located at the entry of the optic nerve (preoptic area) could belong to the septo-preoptic TN complex, a system that includes the retinopetal cells of the preoptic area due to its common origin in the olfactory placode (Repérant et al., 2006, 2007). The nuclei found in the pretectal area does not belong to the TN complex but is conserved among the vertebrate taxa (Repérant et al., 2006, 2007).

In other fishes it has been described that cell bodies of the terminal nerve are located in clusters (ganglia) associated with the olfactory nerve and bulb, and whose position varies according to the species (Nieuwenhuys et al., 1998; Whitlock, 2011, for a review see Repérant et al., 2006). The TN ganglion in fishes with sessile OB is clearly composed of two different cell types, a large

and a smaller type (Rusoff and Hapner, 1990). In *Heterotilapia*, the large cells, about a 100, are strongly immunoreactive for GnRH (Rusoff and Hapner, 1990). We found labeled neurons in the OB with a different size, but never exceeding 10 μm . According to our preliminary results, some of these labeled neurons in the OB, and in the transition between OB and telencephalic lobes were immunoreactive to GnRH (data not shown).

Possible functional implications of the present findings

The great variability in TN reported in teleosts, evidences that this nerve activity may reflect species-specific behaviors. *Austrolebias* are shaped with a reproductive annual feature and an elaborated sexual courtship, having the vision an important role in both events (García et al., 2008). The TN–GnRH system has been suggested to be involved in reproductive and sexual behaviors (Abe and Oka, 2011), and the concentration of GnRH in olfactory system changes in accordance with reproduction (Whitlock, 2011). In addition, the projection of terminal nerve to the retina has a direct influence on dopaminergic interplexiform cells in fish, suggesting the activity of the terminal nerve can influence light adaptation (Zucker and Dowling, 1987). TN also might be involved in the increased retinal sensitivity for sexually relevant stimuli, since odor stimulation in *Pterophyllum* changes the electroretinogram (Weiss and Meyer, 1988; Maaswinkel and Li, 2003).

CONCLUSIONS

We demonstrated the anatomical link between the olfactory bulb and the retina. The whole data obtained from retrograde labeling from retina suggest that part of the TN originates from the cell bodies present in the rostral portion of OB. Some of the axons that formed the TN run ventrally along the OB and telencephalic areas till they find the optic nerve fibers and continue in a common path toward the retina. The other cells related to TN are the multipolar and bipolar cells located in the transition OB/telencephalic lobes. Cells found in the preoptic area may belong to the TN system. Our results showing different TN neuronal groups bearing particular and elaborated dendritic trees, suggest a great circuitual complexity among vision and olfaction that merits further elucidation.

Acknowledgments—The authors wish to thank the multidisciplinary team of the Faculty of Sciences working with fish of the genus *Austrolebias* for their generosity in sharing the aquarium. Also for academic enrichment we enjoyed interacting with them. Thanks to Nicolás Papa by fish maintenance and care. This work was partially supported by PEDECIBA-BIOLOGÍA, Uruguay.

REFERENCES

Arey LB (1916) The function of the afferent fibers of the optic nerve of fishes. *J Comp Neurol* 26:213–245.

- Abe H, Oka Y (2011) Mechanism of neuromodulation by a non hypophysiotropic GnRH system controlling motivation of reproductive behavior in the teleost brain. *J Reprod Dev* 57:665–674.
- Behrens U, Wagner HJB (2004) Terminal nerve and vision. *Microsc Res Tech* 65:25–32.
- Bell C, Caputi A, Grant K (1997) Physiology and plasticity of morphologically identified cells in the mormyrid electrosensory lobe. *J Neurosci* 17:6409–6423.
- Bullock TH, Northcutt RG (1984) Nervus terminalis in dogfish (*Squalus acanthias*, Elasmobranchid) carries tonic efferent impulses. *Neurosci Lett* 44:155–160.
- Castelló ME, Caputi A, Trujillo-Cenóz O (1998) Structural and functional aspects of the fast electrosensory pathway in the electrosensory lateral line lobe of the pulse fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Neurol* 401:549–563.
- Carlson KA, Mesulam MM (1982) Electron microscopic tracing of neural connections with horseradish peroxidase. In: Mesulam MM, editor. *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. New York: John Wiley and Sons. p. 1–151.
- Cowan WM (1970) Centrifugal fibers to the avian retina. *Br Med Bull* 2:112–118.
- Demski LS (1993) Terminal nerve complex. *Acta Anat* 148:81–95.
- Demski LS, Northcutt RG (1983) The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates? *Science* 220:435–437.
- Eisthen HL, Northcutt RG (1996) Silver lampreys (*Ichthyomyzon unicuspis*) lack a gonadotropin-releasing hormone and FMRFamide immunoreactive terminal nerve. *J Comp Neurol* 370:159–172.
- Ekström P, Honkanen T, Ebbesson SOE (1988) FMRFamide-like immunoreactive neurons of the nervous terminalis of teleosts innervate both retina and pineal organ. *Brain Res* 460:68–75.
- Ferguson JL, Mulvanny JP, Brauth SE (1978) Distribution of neurons projecting to the retina of *Caiman crocodilus*. *Brain Behav Evol* 15:294–306.
- Fernández AS, Rosillo JC, Casanova G, Olivera S (2011) Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189:12–24.
- Fujita I, Satou M, Ueda K (1985) Ganglion cells of the terminal nerve: morphology and electrophysiology. *Brain Res* 335:148–152.
- García D, Loureiro M, Tassinio B (2008) Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop Ichthyol* 6:243–248.
- Halpern M, Wang RT, Colman DR (1976) Centrifugal fibers to the eye in a non-avian vertebrate: source revealed by horseradish peroxidase studies. *Science* 194:1185–1188.
- Itaya SK (1980) Retinal efferents from the pretectal area in the rat. *Brain Res* 201:436–441.
- Kawai T, Oka Y, Eisthen H (2009) The role of the terminal nerve and GnRH in olfactory system neuromodulation. *Zool Sci* 26:669–680.
- Lapper SA, Bolam JP (1991) The anterograde and retrograde transport of neurobiotin in the central nervous system of the rat: comparison with biocytin. *J Neurosci Methods* 39:163–174.
- Lima L, Urbina M (1998) Serotonergic projections to the retina of rat and goldfish. *Neurochem Int* 32:133–141.
- Maaswinkel H, Li L (2003) Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *J Exp Biol* 206:2201–2209.
- Millhouse OE (1987) Granule cells of the olfactory tubercle and the question of the islands of Calleja. *J Comp Neurol* 265:1–24.
- Münz H, Claas B, Stumpf WE, Jennes L (1982) Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes. *Cell Tissue Res* 222:313–323.
- Münz H, Claas B (1981) Centrifugal innervation of the retina in cichlid and poeciliid fishes. A horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett* 22:223–226.
- Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) Holostean and teleosts. In: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C,

- editors. The central nervous system of vertebrates, vol. 2. Berlin: Springer-Verlag. p. 759–938.
- Oka Y (1992) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells of the terminal nerve as a model neuromodulator system. *Neurosci Lett* 142:119–122.
- Perrin FE, Stoeckli ET (2000) Use of lipophilic dyes in studies of axonal pathfinding “*In vivo*”. *Microsc Res Tech* 48:25–31.
- Pinelli C, D’Aniello B, Sordino P, Meyer DL, Fiorentino M, Rastogi RK (2000) Comparative immunocytochemical study of FMRFamide neuronal system in the brain of *Danio rerio* and *Acipenser ruthenus* during development. *Dev Brain Res* 119:195–208.
- Repérant J, Ward RJ, Miceli D, Rio JP, Médina M, Kenigfest NB, Vesselkin NP (2006) The centrifugal visual system of vertebrates: a comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain Res Rev* 52:1–57.
- Repérant J, Médina M, Warda R, Miceli D, Kenigfest NB, Rio JP, Vesselkind NP (2007) The evolution of the centrifugal visual system of vertebrates. A cladistic analysis and new hypotheses. *Brain Res Rev* 53:161–197.
- Rethelyi M, Szabo T (1973) Neurohistological analysis of the lateral lobe in a weakly electric fish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Exp Brain Res* 18:323–339.
- Rink E, Wullimann MF (2004) Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011:206–220.
- Rusoff AC, Hapner SJ (1990) Organization of retinopetal axons in the optic nerve of the cichlid fish, *Heterotilapia multispinosa*. *J Comp Neurol* 294:418–430.
- Springer AD (1983) Centrifugal innervation of goldfish retina from ganglion cells of the nervus terminalis. *J Comp Neurol* 214:404–415.
- Stell WK, Walker SE, Chohan KS, Ball AK (1984) The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoryretinal pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:940–944.
- Stell WK, Walker SE, Ball AK (1987) Functional–anatomical studies on the terminal nerve projection to the retina of bony fishes. *Ann N Y Acad Sci* 519:80–96.
- Vanegas H, Ito H (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res Rev* 6:117–137.
- von Bartheld CS (2004) The terminal nerve and its relation with extrabulbar “olfactory” projections: lessons from lampreys and lungfishes. *Microsc Res Tech* 65:13–24.
- Von Bartheld CS, Baker CV (2004) Nervus terminalis derived from the neural crest? A surprising new turn in a century-old debate. *Anat Rec (Part B: New Anat)* 278b:12–13.
- Walker SE, Stell WK (1986) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), molluscancardioexcitatory peptide (FMRFamide), enkephalin and related neuropeptides affect goldfish retinal ganglion cell activity. *Brain Res* 384:262–273.
- Weiss O, Meyer DL (1988) Odor stimuli modulate retinal excitability in fish. *Neurosci Lett* 93:209–213.
- Walton JC, Pyter LM, Weil ZM, Nelson RJ (2012) Photoperiod mediated changes in olfactory bulb neurogenesis and olfactory behavior in male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *PLoS One* 7:e42743.
- Whitlock KE (2011) Olfactory behavior: making scents of a changing world. In: Kalueff AV, Cachat JM, editors. *Neuromethods*, vol. 52, Chapter 2. Springer Science-Business Media. p. 47–71.
- Wirsig-Wiechmann CR (2004) Introduction to the anatomy and function of the nervus terminalis. *Microsc Res Tech* 65:1.
- Yamamoto N, Oka Y, Amano M, Aida K, Hasegawa Y, Kawashima S (1995) Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J Comp Neurol* 355:354–368.
- Yamamoto N, Oka Y, Kawashima S (1997) Lesions of gonadotropin releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65:403–412.
- Yamamoto N, Ito H (2000) Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *J Comp Neurol* 428:355–375.
- Yañez J, Folgueira M, Köhler E, Martínez C, Anadon R (2011) Connections of the terminal nerve and the olfactory system in two Galeomorph shark: an experimental study using a carbocyanine dye. *J Comp Neurol* 519:3202–3217.
- Zucker CL, Dowling JE (1987) Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature* 330:166–168.

(Accepted 24 August 2013)
(Available online 3 September 2013)

NEUROSCIENCE

Volume 336, November 12, 2016
ISSN 0306-4522

INTERNATIONAL BRAIN
IBR 
RESEARCH ORGANIZATION

TELENCEPHALIC-OLFACTORY BULB VENTRICLE WALL ORGANIZATION IN *AUSTROLEBIAS CHARRUA*: CYTOARCHITECTURE, PROLIFERATION DYNAMICS, NEUROGENESIS AND MIGRATION

JUAN CARLOS ROSILLO,^a MAXIMILIANO TORRES,^a SILVIA OLIVERA-BRAVO,^b GABRIELA CASANOVA,^c JOSÉ MANUEL GARCÍA-VERDUGO^d AND ANABEL SONIA FERNÁNDEZ^{a,e,*}

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

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

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

^d Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, Paterna, 46180, CIBERNED, Spain

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

Abstract—Adult neurogenesis participates in fish olfaction sensitivity in response to environmental challenges. Therefore, we investigated if several populations of stem/progenitor cells that are retained in the olfactory bulbs (OB) may constitute different neurogenic niches that support growth and functional demands. By electron microscopy and combination cell proliferation and lineage markers, we found that the telencephalic ventricle wall (VW) at OB level of *Austrolebias charrua* fish presents three neurogenic niches (transitional 1, medial 2 and ventral 3). The main cellular types described in other vertebrate neurogenic niches were identified (transient amplifying cells, stem cells and migrating neuroblasts). However, elongated vimentin/BLBP+

radial glia were the predominant cells in transitional and ventral zones. Use of halogenated thymidine analogs chloro- and iodo-deoxyuridine administered at different experimental times showed that both regions have the highest cell proliferation and migration rates. Zone 1 migration was toward the OB and telencephalon, whereas in zone 3, migration was directed toward the OB rostral portion constituting the equivalent of the mammal rostral migratory band. Medial zone (MZ) has fewer proliferating non-migrant cells that are the putative stem cells as indicated by short and long proliferation assays as well as cell lineage markers. Sparse migration observed suggests MZ may collaborate with VW growth. Scanning electron microscopy evidenced that the whole VW has only monociliated cells with remarkable differences in cilium length among regions. In OB there are monociliated cells with dwarf cilium whereas ventral telencephalon shows long cilium. Summarizing, we identified three neurogenic niches that might serve different functional purposes. © 2016 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: olfactory bulb, ventricular wall, neurogenesis, migrations, radial glia, stem cells.

INTRODUCTION

Neurogenesis in the developing central nervous system consists of induction and proliferation of neural progenitor cells and their subsequent differentiation into mature neurons. External as well as internal cues orchestrate neurogenesis in a precise spatial and temporal way (Schmidt et al., 2013). Numerous studies have revealed that neural stem cell niches are widely conserved in the ventricle wall (VW) of adult vertebrates (Álvarez-Buylla and Kim, 1997; Doetsch and Scharff, 2001; García-Verdugo et al., 2002; Goldman, 2003; Sawada and Sawamoto, 2013). However, there is little understanding on how adult neurogenesis may contribute functionally to modify species behavior or information processing (Barnea and Pravosudov, 2011; Lindsey and Tropepe, 2014). The ability to give rise to new neurons in adults is associated with continuous growth throughout life and regeneration (Adolf et al., 2006; Zupanc, 2008), however adult neurogenesis may serve other functional purposes. Teleost fishes retain populations of stem/pro-

*Correspondence to: A. S. Fernández, Instituto de Investigaciones, Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Avenida Italia 3318, Montevideo 11600, Uruguay. Fax: +598-24875461.

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

Abbreviations: BLBP, brain lipid-binding protein; BMB, Borax Methylene Blue; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; bv, blood vessels; CB, cerebellum; CldU, 5-chloro-2'-deoxyuridine; CSF, cerebrospinal fluid; IdU, 5-iodo-2'-deoxyuridine; MZ, medial zone; *n*, migrant neuroblasts; OB, olfactory bulbs; PB, phosphate buffer; PFA, paraformaldehyde; RG, radial glial; RMS, rostral migration stream; SEM, scanning electron microscopy; *t*, transient/amplifying type I cells; Tel, telencephalon; Teld, dorsal telencephalon; Telv, ventral telencephalon; TEM, transmission electron microscopy; TrZ, transitional zone; VW, ventricular wall.

genitor cells within sensory processing structures of the mature brain.

Levels of neurogenesis are regulated by a variety of environmental factors suggesting that new neurons could be important for coping with changing environmental demands (Lledo et al., 2006; Feierstein, 2012). Olfaction and vision play important roles in adaptation to such varying conditions, as well as for reproduction and survival. In addition, the adult brain has the capacity for sensory-specific modulation of neurogenesis (Rochefort et al., 2002).

Austrolebias are annual fishes that live less than one year in temporary fresh water ponds that are initially clear and transparent but become absolutely turbid as the ponds begin to dry. This suggests a needed change in the hierarchy of sensory modalities. Olfaction is a very important sensory modality for *Austrolebias* mating and reproduction because this all happens in near complete darkness for them (Passos et al., 2014). We found that *Austrolebias charrua* has an anatomical connection between the olfactory bulb and retina (a branch of the terminal nerve complex) that is more complex and well-developed than in zebrafish (Rosillo et al., 2013). Moreover, a comparative analysis in three species of *Austrolebias* have shown that brain cell proliferation indexes varied among regions involved in different sensory modalities that may be related to phylogeny or habitat (Fernández et al., 2011). Recent studies on olfactory bulbs (OB) showed that social stimuli elicit reproductive behaviors and that such cues modulate adult neurogenesis at two levels, i.e., increasing proliferation of neuronal progenitors and integration of newborn neurons into functional circuits (Peretto et al., 2014). Importantly, the ability of the adult brain to modulate sensory systems by neurogenesis may be associated with the types of stem cells present in the niche (Lindsey et al., 2012, 2014).

Therefore, we propose that the continuous environmental and social challenges during the short *Austrolebias* sp. lifespan may require a high demand for newly formed neurons in olfaction-related regions. Such continuous generation of new neurons could take place in multiple neurogenic niches composed of different cell types. To test our hypothesis we analyzed the cellular composition and ultrastructural features of the telencephalic VW at the OB and OB-telencephalon (Tel) levels by transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and immunohistochemistry. We also studied cell proliferation using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU), and 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) at different survival times in the VW of the OB-Tel zone.

We identified three different neurogenic regions designated as: zones 1 (transitional), 2 (medial) and 3 (ventral). In zones 1 and 3 we recognized transient amplifying cells, few slowly dividing not migrating cells and migrating neuroblasts that take tangential routes aligned with blood vessels (bv) or migrate radially. However, the main population in both zones is formed by elongated radial glial cells with different electron density that likely generates neuroblasts and glioblasts. Putative stem cells were mostly found in the medial

zone (MZ). SEM analysis showed regional differences with respect to monociliated cells in the OB VW and the ventral zone of the Tel ventricle. This work contributes to know the precise location of different neural progenitor cell types that contribute to OB adult neurogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Thirty-two adult male *A. charrua* fish (Cyprinodontiformes-Rivulidae) were collected during the rainy season (September to November) in transient ponds close to the major rivers in Rocha and Treinta y Tres, Uruguay. Specimens were kept in 30-L glass aquariums with aerated, dechlorinated tap water (pH 7–7.5) and exposed to natural light (14 h light/10 h darkness). When courtship began, the bottom of the special aquariums was covered with peat moss (10 cm deep) to resemble the natural substrate these annual fish inhabit. Water (temperature $19 \pm 1^\circ\text{C}$) was partially changed every 5 days and the fish were fed daily with live *Tubifex* sp. Fishes used in experiments were between 3 and 6 months of age and had an average length of 5 cm. Before processing the fishes were deeply anesthetized by adding a 1:1000 v/v solution 10% Eugenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) to the aquarium water until opercular movement ceased. After that, each fish was intracardially perfused with saline solution to wash the vascular system and then with specific fixative solutions according to the method employed. All procedures were approved by the local Committee for Animal Care and Research (CHEA, UdelaR and CEUA, IIBCE), which follows NIH guidelines for maintenance and use of laboratory animals.

TEM

TEM was used to examine the ultrastructural profile of cells in the neurogenic niches located along the VW at the OB and OB-Tel levels. OB was chosen for analysis because these are one of the dominant structures utilized by *Austrolebias* sp. to process sensory information from the external environment (Passos et al., 2014). Eight fishes were perfused with 2.5% glutaraldehyde plus 2% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). Brains were removed and kept in the same fixative for 2 h at 4°C . Then, tissue was transferred to PB overnight. Whole brains of smallest fish or 200 μm vibratome sections were postfixed in 2% osmium tetroxide for 1.5 h, rinsed with PB, dehydrated through an ascending ethanol series (50%, 75%, 95% and 100%) and then with anhydrous acetone before final embedding with araldite resin (Durcupan, Sigma). Semi-thin sections (1 micron) were obtained using a Leica ultramicrotome (PowerTome XL) and stained with 1% Boraxic Methylene Blue (BMB) before being observed using a Nikon Eclipse E 200 microscope. Images were taken using a Nikon COOLPIX 8400 digital camera. Ultrathin (60 nm) sections were cut with a glass knife, mounted on Formvar-coated slot grids (2×1 mm) and contrasted

with 2% uranyl acetate and lead citrate in accordance with Reynolds' method. Individual cell types were characterized by examination using both a Jeol 100CX-II and a Jeol JEM1010 TEM equipped with 4000 AM DVC and HAMA-MATSU C-4742-95 digital cameras, respectively.

SEM

SEM was done to examine characteristics and distribution of cilia on luminal cells of the ventricular walls. Three adult fish were perfused with 0.9% saline and 2.5% glutaraldehyde and left immersed in the same fixative for 24 h. Then, brains were removed and separated longitudinally at the mid-sagittal plane for visualization of the complete medial ventricular surface. Three other fish were anesthetized; fresh brain tissue was then removed and fixed overnight by immersion in 2.5% glutaraldehyde at 4 °C. After that, brains were washed in 0.1 M PB pH 7.2 dehydrated at increasing ethanol concentrations and finally with acetone. Then, tissue was submitted to critical point drying with CO₂ in a Denton SPC-1 Critical Point Vacuum Drying Apparatus. Then, gold plating was done in a Denton Vacuum Desk-II for 120 s. Samples were analyzed in a Jeol-5900 LV SEM that acquires and displays the video signal through X-Stream Imaging System.

Experimental procedures to evaluate temporal discrimination of cell proliferation

The administration of different halogenated thymidine analogs that can be distinguished by specific primary antibodies together with careful timing between administrations has allowed for discriminating proliferating cell subpopulations in the brains of amniotes (Vega and Peterson, 2005; Llorens-Martín et al., 2010), anamniotes (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) and invertebrates (Sullivan et al., 2007). Therefore, to study dynamics of cell proliferation in neurogenic niches of the *A. charrua* brain, 18 adult fishes were injected with three halogenated thymidine analogs (BrdU, IdU, CldU) at specific intervals. This also allowed for identifying possible locations of candidate stem cells. Three different protocols were used with 6 adult fish per experiment:

- *Experiment 1*: i.p. BrdU administration of a single dose (100 mg/kg body weight) as described in Fernández et al. (2011). At day 7, fishes were anesthetized and perfused with 10% PFA;
- *Experiment 2*: Equimolar administration of IdU (57.5 mg/kg body weight) at day 0 and of CldU (42.5 mg/kg body weight) at day 6. At day 7, anesthesia and perfusion were done;
- *Experiment 3*: IdU injection at day 0 and CldU administration 29 days later. At day 30, fishes were anesthetized and fixed with 10% PFA. IdU and CldU doses were the same than those used in experiment 2. In all experiments, IdU was dissolved in 0.7% NaCl containing 0.04 N NaOH, and CldU in 0.7% NaCl, respectively.

Sectioning of brains

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

Immunohistochemistry

Proliferation markers incorporated during S-phase were analyzed in tissue sections pretreated to break double-stranded DNA into single strands by incubation in 2 N HCl in PB containing 0.3% Triton X-100 (PB-T) for 45 min at room temperature. After several washes with PB (3 × 10 min), proliferating cells were recognized immunohistochemically using antibody to detect BrdU (see below). In addition, double immunolabeling against BrdU+ and the neuronal protein marker HuC was done to identify proliferating cells that differentiated into a neuronal phenotype. Sections were incubated for 48 h (4 °C) with a 1:500 dilution of a monoclonal mouse anti-BrdU antibody (Dako, Copenhagen, Denmark) together with a 1:100 dilution of a polyclonal rabbit anti-HuC (Abcam, Cambridge, UK). After rinsing with PB (3 × 10 min), recognition of each label was done with secondary antibodies conjugated to fluorescent markers Alexa 488 and Alexa 633 (Invitrogen, CA, USA), both diluted 1:1000 in PB-T.

To visualize CldU and IdU, tissue sections were incubated 48 h at 4 °C with 1:500 dilutions of both rat anti-CldU/BrdU (Accurate, New York, USA) and mouse anti-IdU/BrdU (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Sections were rinsed in PB (3 × 10 min) and incubated in donkey anti-rat biotinylated secondary antibody at 1:500 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in PB-T for 1 h. After that, sections were quickly washed 3 times in PB and incubated in a mixture of streptavidin conjugated to Cy3 at 1:500 and donkey anti-mouse Alexa 488 at 1:500 in PB-T for 90 min. Combinations of CldU and IdU together with Pax6 and Sox2 (both transcription factors of neurodevelopment differentiation usually expressed in stem cells), vimentin or brain lipid-binding protein (BLBP) were employed to identify progenitor and radial glial cells. All sections were mounted with glycerol mounting medium and photographed. Fluorescent images were obtained using a confocal FV300 Olympus microscope with Fluoview 5.0 software. Sequential imaging and multi-plane view analysis were done using 20× (0.50 N.A.), 40× (0.75 N.A.) and 60× (1.42 N.A.) lenses.

Primary antibodies used

A summary of antibodies used is given in Table 1. All antibodies were previously validated for other researchers and ourselves or indicated by the manufacturer as able to be used in zebrafish.

Antibodies used to label proliferation markers such as the anti-BrdU antibody was employed in many fish like

Table 1. Primary Antibodies used in this study

Antibody	Immunogen	Manufacturer, catalog number, species, type	Dilution
Anti-HuC	Protein synthesized early during neuronal differentiation	Abcam, ab78467, Rabbit polyclonal	1:100
Anti-BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) analog nitrogenous base thymidine of DNA	Dako, Copenhagen, Denmark, M0744, Mouse Monoclonal	1:500
Anti-CldU (BrdU Clone BU1/75 (ICR1)	5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU) analog nitrogenous base thymidine of DNA	Accurate, J0066, Rat Monoclonal	1:500
Anti-IdU (BrdU Clone B44)	5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU) analog nitrogenous base thymidine of DNA	Becton Dickenson, 6-17-08, Mouse monoclonal	1:500
Anti-BLBP	Synthetic peptide corresponding to Human BLBP (C terminal) conjugated to Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH)	Abcam, ab110099, Goat polyclonal	1:500
Anti-Vimentin	Intermediate filament	Hybridoma Bank, 40E-C, Iowa, USA, Mouse Monoclonal	1:50
Anti-Pax6	Synthetic peptide corresponding to Human Pax6 (internal sequence)	Abcam, ab135147, Rabbit	1:250
Anti-Sox2	Synthetic peptide conjugated to KLH derived from within residues 300 to the C-terminus of Human SOX2	Abcam, ab97959, Rabbit	1:500

zebrafish (Grandel et al., 2006) and *Austrolebias* (Rosillo et al., 2010; Fernández et al., 2011). IdU and CldU antibodies were used in *Gymnotus omarorum* by Olivera-Pasilio et al. (2014). In all cases, to determine optimal conditions for antibody incubation including its dilution, intestine sections from rats injected with BrdU, CldU, IdU or vehicle were used as positive or negative controls, respectively.

Among the antibodies employed to recognize cell phenotype in *Austrolebias*, the anti-vimentin antibody selected was previously used by Forlano et al. (2001) in teleost fish to label radial glial cells; and by ourselves (Fernández et al., 2012). Anti-BLBP antibody was employed by Chiu-Ming et al. (2010) in fish *Trachinotus blochii*. In both cases concentrations and conditions of use were the same as those previously published.

Anti-HuC antibody is able to be used in zebrafish as the manufacturer (abcam) indicates and the same used by: Arslan-Ergul et al. (2016). Anti-Pax6 and anti-Sox2 antibodies were used to recognize stem/progenitor cells (Sakurai and Osumi, 2008). We determined optimal concentration and incubation of each antibody by exposing *Austrolebias* and zebrafish brain sections at the same time in equal conditions.

Quantitation of proliferating cell number in the OB and Tel

Positive CldU and IdU nuclei present in consecutive sections containing all olfactory bulb and ventricular telencephalic walls were counted in six adult fish. The total average number of IdU (green), CldU (red), and IdU/CldU (yellow) cells in each region per fish (\pm S.D.) was plotted using Origin 8.0. Descriptive statistical analysis was done using Sigma Stat 2.0.

RESULTS

Cytoarchitecture of the VW at OB and OB-Tel levels

The nomenclature used in this study is based on that employed in atlases of Wullimann et al. (1996) and

D'Angelo (2013). Previous studies on neurogenesis of VW of the *Austrolebias* brain showed high proliferation rates mainly in cells that contact the lumen of ventricles. We also reported three different main cellular types (I, II, III) with distinctive morphology, electron density and location along the VW of dorsal telencephalon (Teld) (Rosillo et al., 2010; Fernández et al., 2011). In this study, we analyzed characteristics of the VW at the OB and OB-Tel levels.

We identified three neurogenic regions: 1- the transitional zone (TrZ) located in the dorsal portion of OB bordering the telencephalic lobes. This region is coincident with the dorsal nucleus of ventral telencephalic area bordering the internal cellular layer of the OB (Wullimann et al., 1996; D'Angelo, 2013); 2- the MZ that is located between the TrZ and ventral zones, and 3- the ventral zone or fund of the telencephalic ventricle (VT) that extends up to the interconnection of both OB through a bridge where myelinated fibers of the olfactory pathway runs (Rosillo et al., 2013).

A panoramic view of OB and OB-Tel VW showing the three neurogenic regions identified is illustrated with BMB staining and proliferation markers (Fig. 1A, C). Staining with BMB shows that the VW is not homogeneously formed (Fig. 1A). Electron microscopy images further show cells with different electron density with those having the highest density closest to the ventricle wall. Darkest cells were also the most proliferative (Fig. 1B, C). TEM analysis of the MZ enabled identifying the three main cell types previously reported (Rosillo et al., 2010; Fernández et al., 2011) in spite of the observation that a significant proportion of cells show intermediate phenotypes typical of transitional stages. Type I cells were found densely aggregated at sites recognized as highly proliferative by other methods. These cells are the smallest and had the most irregular and dense nuclei (4–5 microns). The cytoplasm of these cells is very limited and displays high electron density due to the presence of many free ribosomes. Within the type I group we saw that some cells were in contact with cerebrospinal fluid (CSF) and others that did not which were frequently clustered

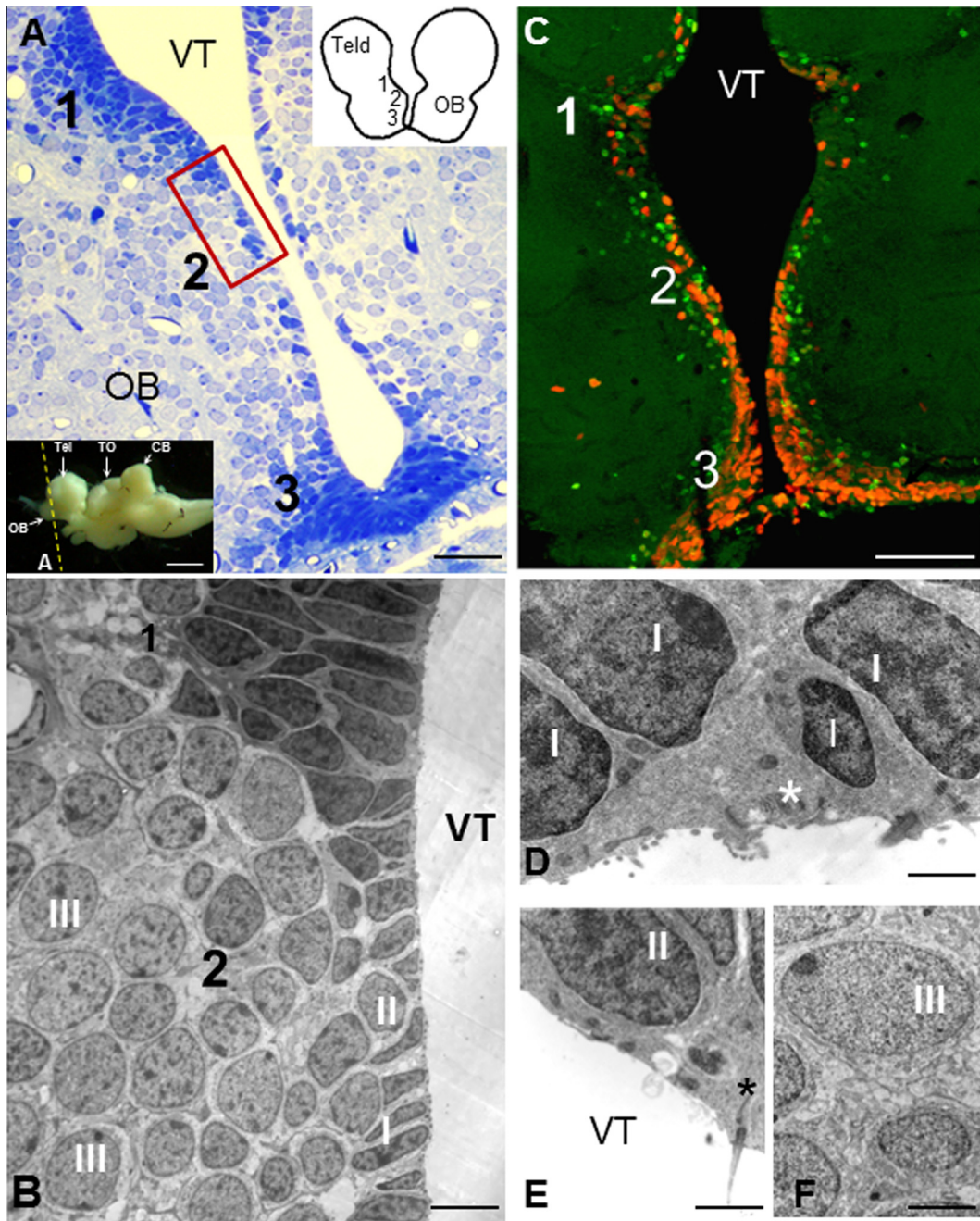


Fig. 1. Ultrastructural organization and cell types of the OB ventricular wall. (A) Semi-thin transverse section of telencephalon stained with BMB showing the cytoarchitecture of telencephalic ventricular wall. The inset on the upper right schematizes a forebrain cross section showing the three regions analyzed and designated as 1, 2 and 3. On the bottom is shown a photograph of the *Austrolebias charrua* brain with a dashed line indicating the level and direction of the section stained with BMB. The red box shows the area magnified in B. (B) Electron micrograph at higher magnification of the medial zone (2). Three types of cells are observed: type I are the most electron-dense and have irregular nuclei. Some cells are further away from the lumen and have a more regular shape with spaces between cells; type II with intermediate electron-density cells; type III is composed of the most electron-lucid cells recognized as post-mitotic neurons. (C) Cell proliferation (CldU in red and IdU in green) in a telencephalon section taken at same level as that stained with BMB. (D) Higher magnification of type I cells that contact the ventricle lumen and are highly electron dense. Cellular junctions and microvilli (*) are also observed. (E) Type II cells at high magnification showing intermediate electron density and contact with the ventricular lumen. A single primary cilium is shown (arrow). (F) Type III cells (post-mitotic neurons) have round nuclei with light chromatin. BMB, Boraxic Methylene Blue; CB, *Cerebellum*; OB, *Olfactory bulbs*; Tel, *Telencephalon*; Teld, *Dorsal telencephalon*; TO, *Tectum opticum*; VT, *Telencephalic ventricle*. Scale bars, A: 50 μ m; B: 5 μ m; C: 100 μ m; D: 1 μ m; E-F: 2 μ m; Inset scale bar: 1 mm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Fig. 1A, B, D). Those cells facing the ventricular lumen had distinct intercellular junctions compared with other cells that appeared to interdigitate with the plasma membrane and with neighboring cells. Spaces between cell

membranes and a single cilium were also observed (Fig. 1D, asterisk). Type I cells that did not contact CSF were found to be close to the VW. These cells had the most irregular indented nuclei and were very electron

dense suggesting high proliferation which was further confirmed by seeing high levels of mitotic cells in this region. Since they can be the transient/amplifying cells we named them as *t* cells. Other type I cells often appeared to be further away from the lumen; they had a more regular appearance, and were frequently clustered with spaces among them. Type II cells had an intermediate electron density and size with normal nuclei lacking indentations and major axis around 6–8 microns. These cells are fewer than type I cells and have abundant cytoplasm with many mitochondria at the apical pole. Type II cells are monociliated with vacuoles and microvilli commonly close to the cilium (Fig. 1E). They were frequently in contact with the ventricular lumen or intermingled with type I cells in contact with the CSF. Type III cells are the most electron lucid and have round nuclei (6–8 microns in diameter) with one or two nucleoli located next to the nuclear envelope. Their cytoplasm was light and small. Type III cells were located in the second row or deeper into the parenchyma rarely contacting the lumen. These cells resembled the main features of neurons that are in different stages of differentiation ranging from neuroblasts with small amounts of cytoplasm to more mature post-mitotic neurons (Fig. 1F). Very few type III cells seemed to be migrating.

Semi-thin sections of the TrZ and ventral zones of the OB had high cellular densities and a majority of cell nuclei were stained intensely with BMB (Fig. 1A). TEM analysis of the TrZ showed a fourth predominant cell type characteristic of typical radial glial cells (RG). RG cells occupied the entire zone and extended 30–40 microns from the ventricular lumen toward the parenchyma. Radial glial cells were elongated and arranged in parallel with each other with the major axis perpendicular to the VW (Fig. 2A). A first row of RGs contacted the CSF and a second row was partially intermingled with the first row without contacting the CSF and having the appearance of a pseudostratified epithelium. RG cells have a major nuclear axis of up to 17 microns and have differences in electron density in both the cytoplasm and nucleus. Based on variations in electron densities we distinguished two RG subtypes: light (RGI) and dark (RGII). These two cell types alternate with each other in a first row in contact with the CSF (Fig. 2A–D). RGI have many fewer free ribosomes than do RGII, which in contrast are abundant with polyribosomes. Intermingled and adjacent to the RG cell types, but deeper in the parenchyma are what we consider to be both migrant cells (*n*) and others with characteristics of progenitor cells (*t*). Migrant cells appeared to be linked by gap junctions and as well with intercellular spaces that suggest migration (Fig. 2E). Radial cells in the TrZ express progenitor markers BLBP and vimentin. BLBP+ cells are present in the entire dorsal transition zone, whereas vimentin+ cells are confined to the ventricular zone (Fig. 2F–H). The majority of cells that contact the CSF expressed BLBP.

Cell proliferation and neurogenesis

We used IdU/CldU labeling in short (7 days) and long (30 days) experiments to obtain information about origin,

dynamics and migration of proliferating cells. The second marker was injected at either 6 or 29 days after the first, and fixation was done 24 h after the administration of the second marker. The use of both halogenated thymidine analogs together with Pax6 labeling demonstrated that the telencephalic VW is highly proliferative and Pax6 positive with the TrZ exhibiting the highest cell proliferation (Fig. 3A–C). Many Pax6-positive cells co-localized with IdU/CldU and have a location coincident with the progenitor cells previously observed by TEM at 30–40 microns from the ventricular lumen (Fig. 3D, E). Another cluster of Pax6/IdU/CldU+ cells was found in the MZ closer to the lumen (Fig. 3F). Since there were 30 days between IdU and CldU administrations, co-localization of both signals suggests that these cells did not migrate and reenter in the cell cycle in this time period. This, together with morphological appearance and Pax6 signaling confirms the presence of stem cells in TrZ and MZ. These cells were those previously identified as type II cells.

The long protocol of administration of the two thymidine analogs showed a high percentage of proliferative cells along the entire ventricular wall with TrZ having the highest levels. Three populations of proliferative cells were recognized: 1) cells close to the VW (CldU+); 2) cells that migrate different distances from the VW (IdU+), and 3) cells that do not migrate but that reenter the cell cycle by virtue of the presence of the second proliferation marker (CldU/IdU+) (Fig. 4). In the MZ, double-labeled nuclei (yellow) were found close to the upper third of the VW (Fig. 4A, B). These round, large and monociliated cells (Fig. 4C–D) were those previously described as type II cells (Fig. 1). Neurogenesis was frequently found in this region as shown with cells positive for IdU and HuC (Fig. 4F). Yellow IdU/CldU+ cells that co-localize with vimentin (Figs. 4G, 5) were also found. Quantitation of three proliferating cell populations indicated that there were twice as many IdU+ cells (green) compared with those labeled with CldU (red) and that IdU/CldU+ cells accounted only for about 10% of total marked cells (Fig. 4E).

Migration routes in sagittal sections

Sagittal sectioning and analysis of *Austrolebias* brain gave complementary information about proliferation and migration in zones analyzed. Forebrain parasagittal sections with 7 days between IdU and CldU administrations showed that the majority of proliferative cells were confined to the VW. Serial sections evidenced differences in the distribution of types of proliferating cells depending on proximity to the VW. Double-labeled IdU/CldU nuclei (yellow) were most frequently identified very close to the VW (Fig. 5A–C) with their number decreasing a few microns away from the lumen (Fig. 5D, E). Parasagittal sections in 30-day experiments allowed for visualizing different migratory routes that could not be observed in transverse sections (Fig. 5F, G). The posterior portion of the OB-Tel transition zone bordering the ventral telencephalon (Telv) was the region that exhibited highest cell

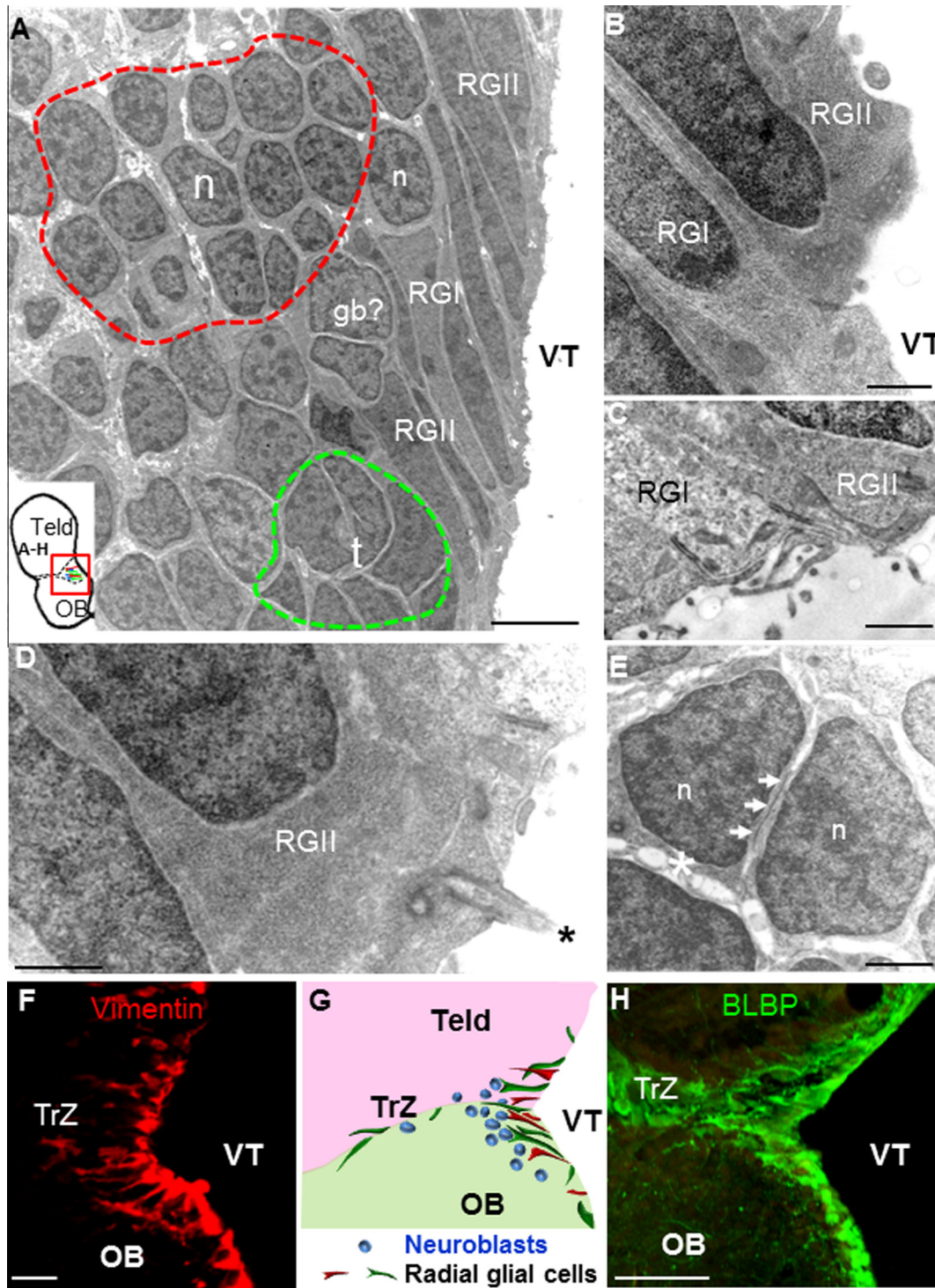


Fig. 2. Analysis of the TrZ (zone 1). (A) TEM image of TrZ showing the two subtypes of RG identified: RGI the most electron lucid cells that are usually associated with neuroblasts, and RGII which are darker and often associated with cells that seem to be glioblasts (gb?). The image also shows grouped migrant neuroblasts (red dashed line, *n*), and cells closer to the lumen that have irregular nuclei (green dashed line, *t*). The scheme shows TrZ location in the VW. (B) Higher magnifications of both RG subtypes showing differences in nuclear and cytoplasmic electron density. (C) Higher magnification of cell apical poles showing differences in cytoplasmic electron density, intercellular junctions and microvilli facing the lumen. (D) Higher magnification of a RGII cell with an electron-dense cytoplasm and a single cilium (•). (E) Migratory neuroblasts (*n*) closely linked by gap junctions (arrows) and with intercellular spaces between them (asterisk). (F) Immunohistochemistry showing vimentin+ radial glial cells in the TrZ. (G) Schematic drawing pointing to the location of TrZ and radial glial cells (green and red) close to ventricles. Neuroblasts (blue) are located deeper in the parenchyma. (H) BLBP-positive immunolabeling along the TrZ. BLBP, Brain lipid-binding protein; OB, olfactory bulbs; RG, radial glial cells; VT, telencephalic ventricle; Teld, dorsal telencephalon; TrZ, transitional zone. Scale bars, A: 5 μ m; B: 2 μ m; C: 1 μ m; D: 2 μ m; E: 2 μ m; F: 10 μ m; H: 20 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

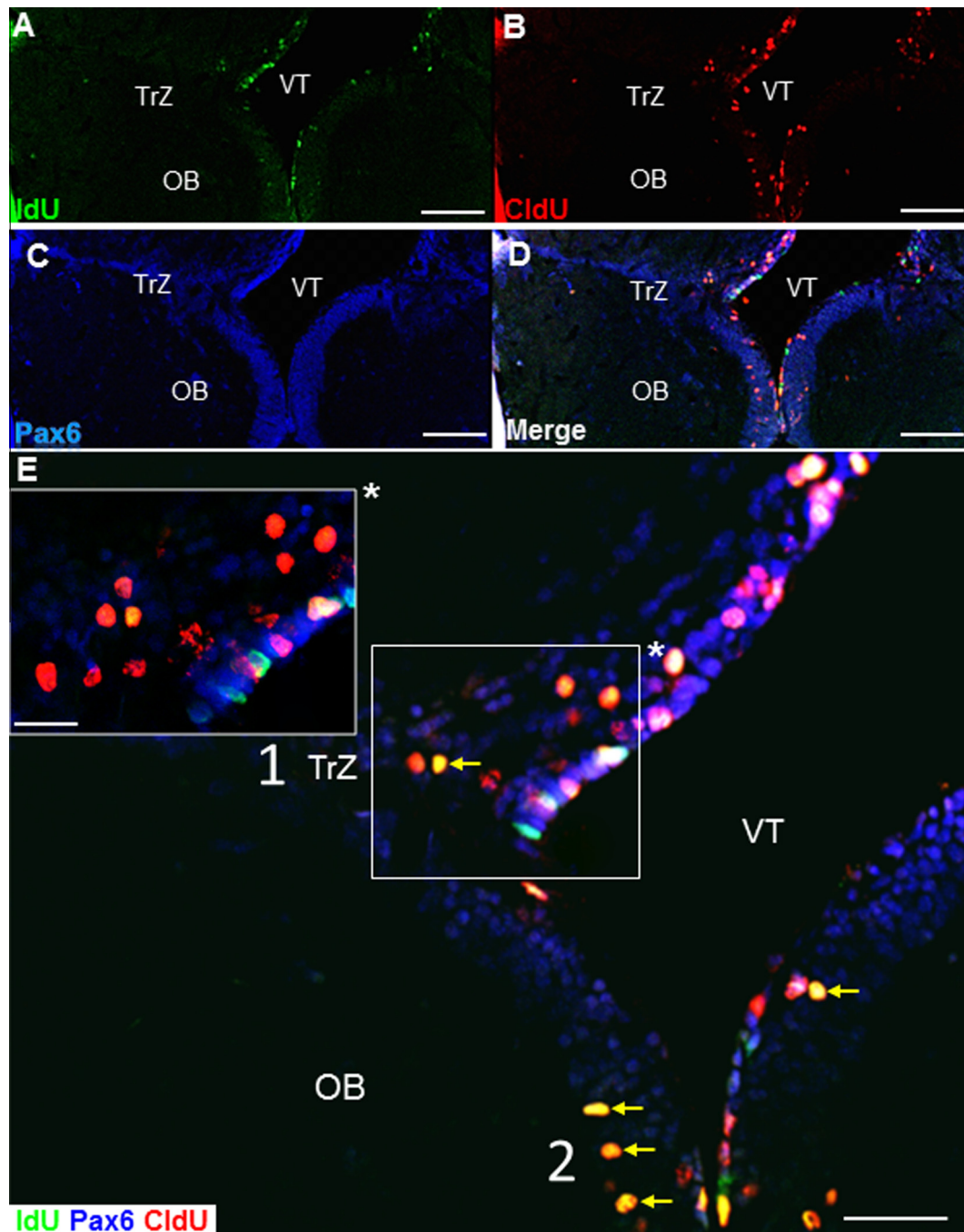


Fig. 3. Confocal image of triple immunohistochemical analysis of IdU/CldU and Pax6. (A) Telencephalic transverse section showing IdU (green) immunolabeling at level of OB. (B) The same section showing that CldU signal (red) is coincident with the IdU immunolabel. (C) Pax6 expression is distributed throughout the ventricular wall as well as in the TrZ. (D) Merge of the three channels of confocal images showing colocalization of Pax6 in the nuclei stained with both proliferation markers used. (E) Stack of 16 microns allows detecting triple-labeled nuclei at MZ and TrZ zones. In MZ, triple label coincides with type II cells identified by TEM analysis (yellow arrows). The inset shows a higher magnification of a single confocal plane showing the triple co-localization deeper into the TrZ. MZ, medial zone; OB, olfactory bulbs; TrZ, transitional Zone; VT, telencephalic ventricle. Scale bars, A–D: 150 μ m; E: 50 μ m; inset: 30 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

proliferation levels. Proliferating cells migrate from the entire region toward the front of the OB. A clear migration route backward to the Tel was also evident. The preferential pathway through the Tel seems to divide ventral and dorsal areas (Fig. 5F, G). Positive nuclei that appeared very close to bv (Fig. 5F, white

arrowheads) suggest that bv participate in migration providing the scaffold for movement of migrating cells.

Analysis of the distribution of radial glia in the rostral portion of the forebrain by immunohistochemistry in parasagittal sections provided evidence for a distinct distribution and orientation of vimentin+ and BLBP+

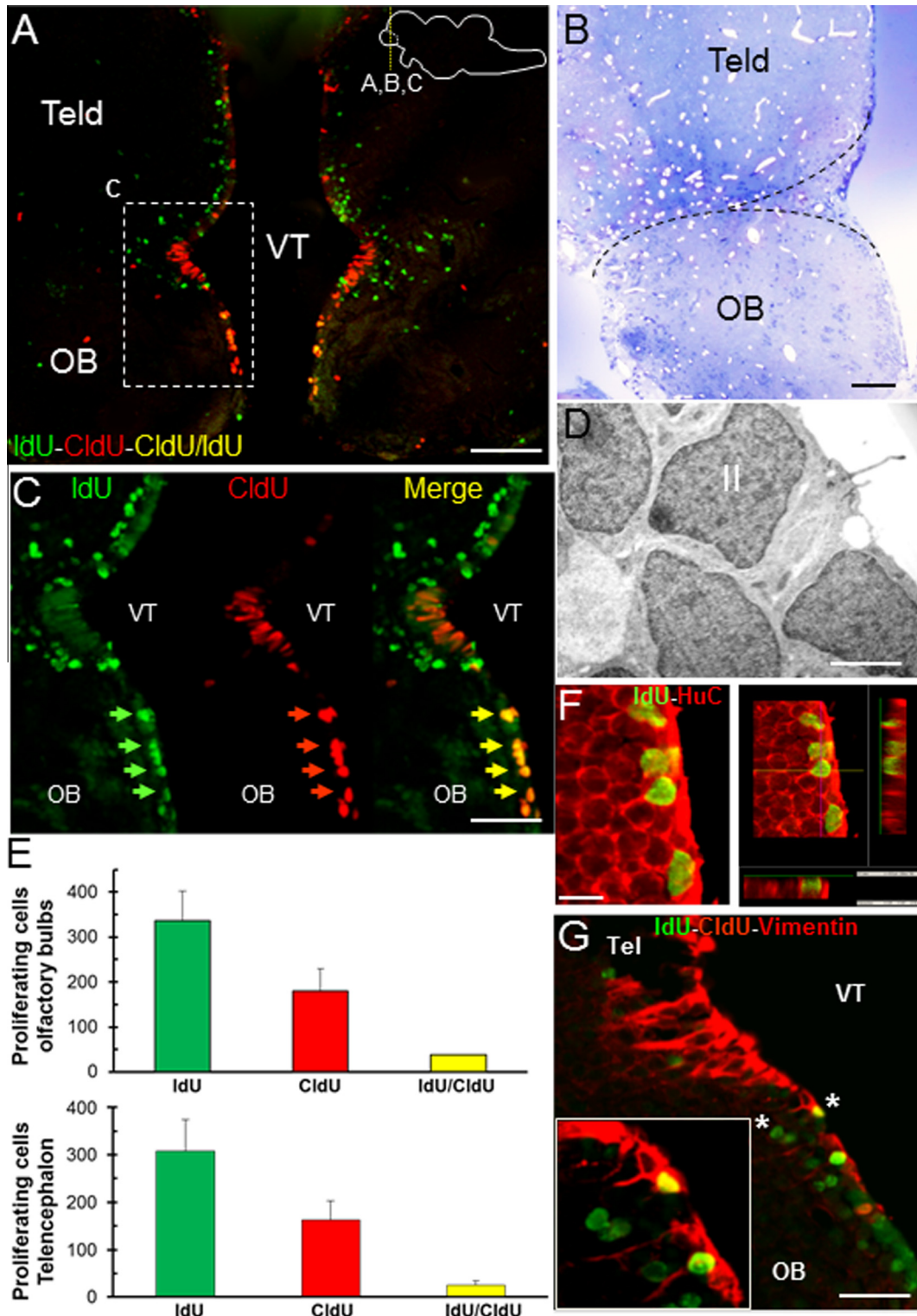


Fig. 4. Proliferation analysis. (A) Panoramic view of a transverse section at Tel-OB level stained with IdU and CldU that were administered 30 days and 24 h prior to fixation. IdU/CldU+ and IdU+ labeling show both the distribution of proliferative and migrating cells. Double-labeled nuclei where observed in MZ (framework), and IdU cells migrate radially throughout the whole area. (B) Panoramic view of a hemi-brain section stained with BMB (dotted triangle). (C) A higher magnification of A imaged as a stack of 30 microns. In MZ are observed cells that uptake both proliferating markers IdU/CldU (yellow and arrows). These cells are coincident with putative stem cells shown in D by TEM. (D) Electron micrograph of type II cells having “dwarf cilia”. (E) Quantification of IdU, CldU and IdU/CldU+ nuclei at the OB and Tel levels. In both regions, yellow cells are around 10% of the total proliferative cells. (F) Immunohistochemistry of HuC and BrdU (7 days) at the OB level. Orthogonal planes show the precise co-localization of both markers. (G) Co-immunostaining against IdU/CldU/vimentin showing a triple positive cell (*) facing the ventricular lumen in the MZ. These cells are type II yellow cells. Scale bars, A–B: 100 μ m; C: 50 μ m; D: 3 μ m; F: 10 μ m; G: 50 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

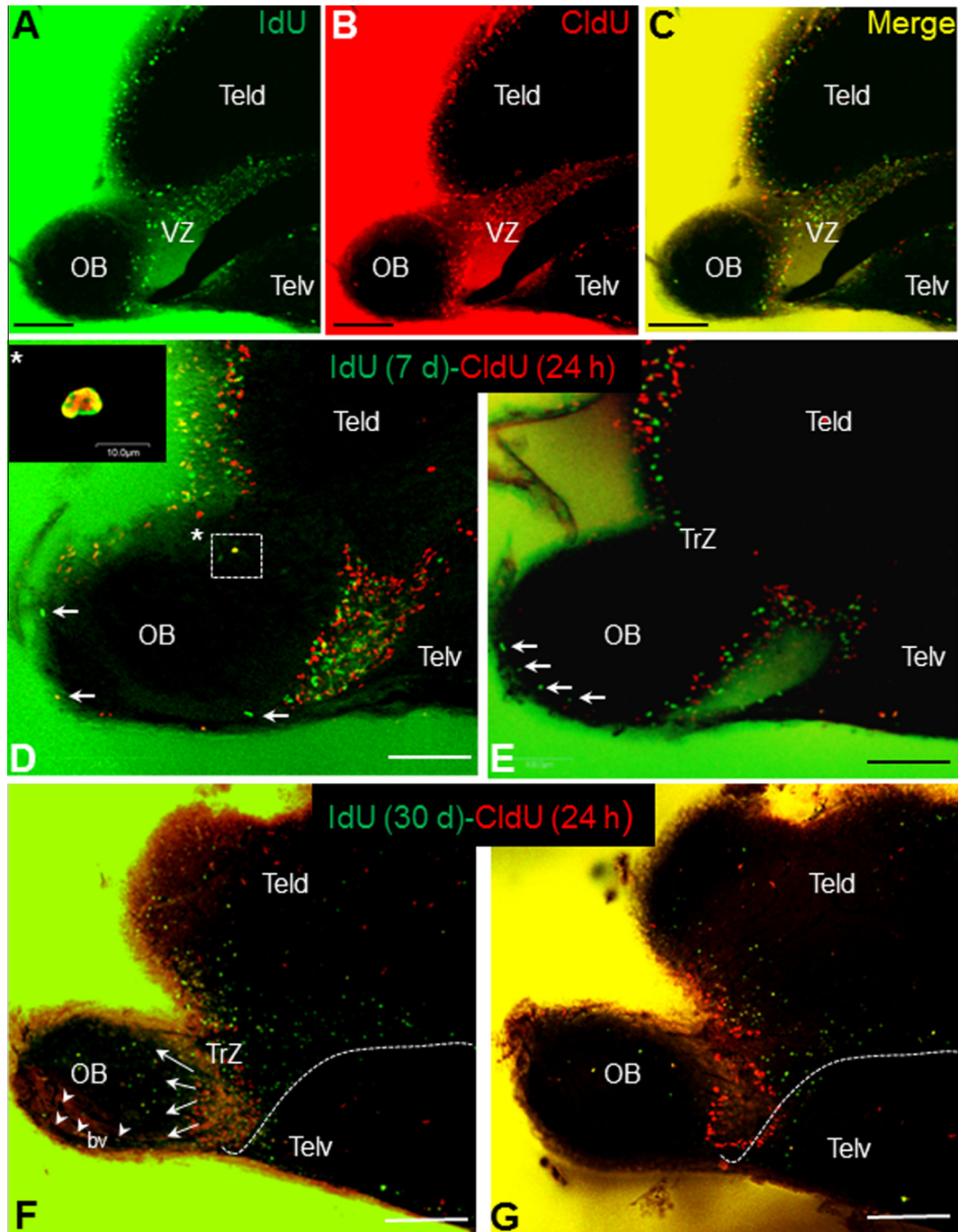


Fig. 5. Temporal discrimination of VW cell proliferation. (A) Stack of 30 confocal images taken in 1 micron steps by parasagittal sectioning at the VZ level showing IdU immunolabeling at 7 days post-injection. IdU+ nuclei are located mainly in the VW close to the lumen. (B) CldU (24 h post-injection)-positive nuclei present in the same location with IdU labeling. (C) Merged image of A and B showing that despite the fact that both signals are at the same location, IdU/CldU co-localization is infrequent at this experimental time. (D) 30- μ m confocal stack (1 μ m per step) of the ventral ventricle in a parasagittal plane in the 7-day experiment. Note several IdU+ nuclei likely following the RMS toward the rostral OB (white arrows). Inset is a higher magnification of the dashed area showing a double-labeled nucleus that bears the typical morphology and location of type II cells. (E) Another parasagittal plane of ventral ventricle of a 7-day experiment confirming the presence of IdU+ nuclei belonging to the RMS (white arrows). (F) 30 confocal images stacked after being taken at 1 μ m showing IdU originated in the VZ and migrating in different directions toward the rostral OB (white arrows). Other proliferative cells migrate toward the caudal Tel (dashed line). Arrowheads indicate some IdU- and CldU-positive cells associated to blood vessels in the ventral zone. (G) A single plane showing IdU-positive cells (green) and CldU+ cells (red) are confined to VW. bv, blood vessels; RMS, rostral migration stream; VW, ventricular wall; VZ, ventricular zone of the telencephalon. Scale bars, A–C: 150 μ m; D–E: 50 μ m; F–G: 150 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cells. BLBP+ cells were found throughout the entire mid-region and periphery of the Tel. BLBP+ cell processes were observed to be oriented in different directions

throughout the OB, perhaps explaining the radial and tangential migration of neuroblasts (Fig. 6A). Somata of BLBP+ cells were highly concentrated in proliferative

TrZs where Sox2 and Pax6 were highly expressed (Fig. 6A–D). Vimentin+ RG cells have the strongest expression in the most ventral portion of the OB with low labeling in medial and TrZs (Fig. 6B).

Newborn cells in the rostral migratory stream toward OB

Neuroblasts generated in the subventricular zone migrate radially from the center to the periphery forming the rostral migration stream (RMS) to the OB in rodents (Lois and Álvarez-Buylla, 1994). Analysis made 7 days after BrdU injection combined with HuC detection were used to identify neuroblasts arriving at the OB. Parasagittal sections showed a row of BrdU+ nuclei that comes from the transitional ventral VW and runs ventrally toward the most rostral part of the OB with similar features than RMS (Fig. 7A–C). Some of the BrdU+ cells co-localized with the neuronal marker HuC (Fig. 7D–G). We found HuC+ neuroblasts with different sizes and forms, some positive for BrdU+ and others not. The BrdU/HuC+ cells gener-

ally have round nuclei and cytoplasm with different levels of HuC expression. HuC-positive cell processes running in the direction of migration were found. Many cell nuclei showed only the BrdU signal (Fig. 7F). We also observed different migratory routes from the whole transitional ventricular wall with the most frequent path being ventrally.

Analysis of VW by SEM

Fixed adult *A. charrua* whole brains were dissected and divided following the sagittal plane to expose the ventricular surfaces (Fig. 8A). This preparation allowed simultaneous study of the whole telencephalic ventricular surface. SEM of the forebrain VW revealed differences in OB, the transition zone and Telv likely caused by the presence of cilia with particular features in each region. Such differences allowed for seeing a dividing line between the ventricular region corresponding to Telv and VW in the OB (Fig. 8A–C). At OB level, a single cilium per cell was observed. This cilium of 1 or 2 microns was named “dwarf cilium”.

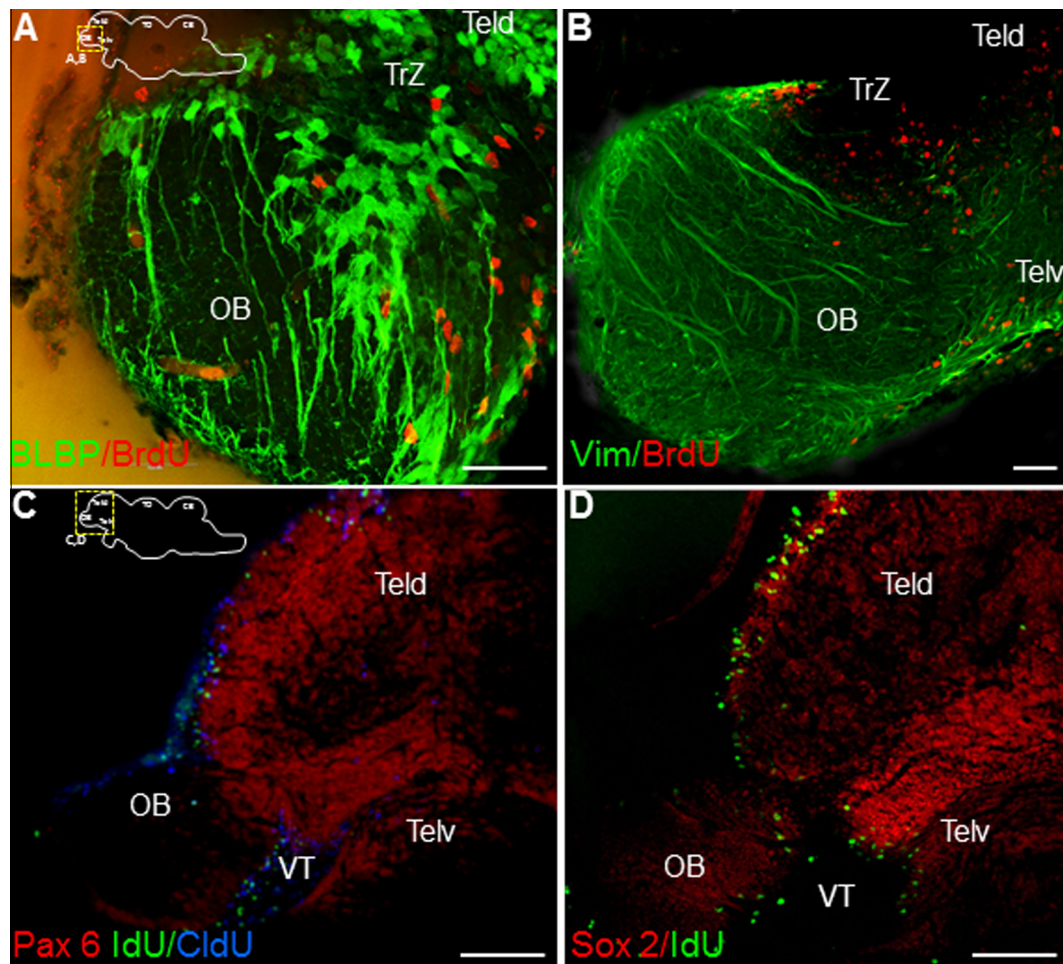


Fig. 6. Differential expression of progenitor cell markers in OB and Tel in parasagittal sections. (A) BLBP (green) significant expression in radial glial processes in the OB and in the proliferative zones. BrdU+ nuclei appear in red. (B) vimentin+ signals (green) and BrdU proliferating nuclei (red) in the OB. Note the different orientation of vimentin+ processes as compared with that shown in A. (C) Pax6 expression (red) together with IdU/CldU labeling in OB and Tel. (D) Sox2+ signals (red) combined with IdU/CldU. The yellow boxes that appear in both insets represent the region analyzed in all images. Scale bars, A–B: 50 μ m; C–D: 150 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

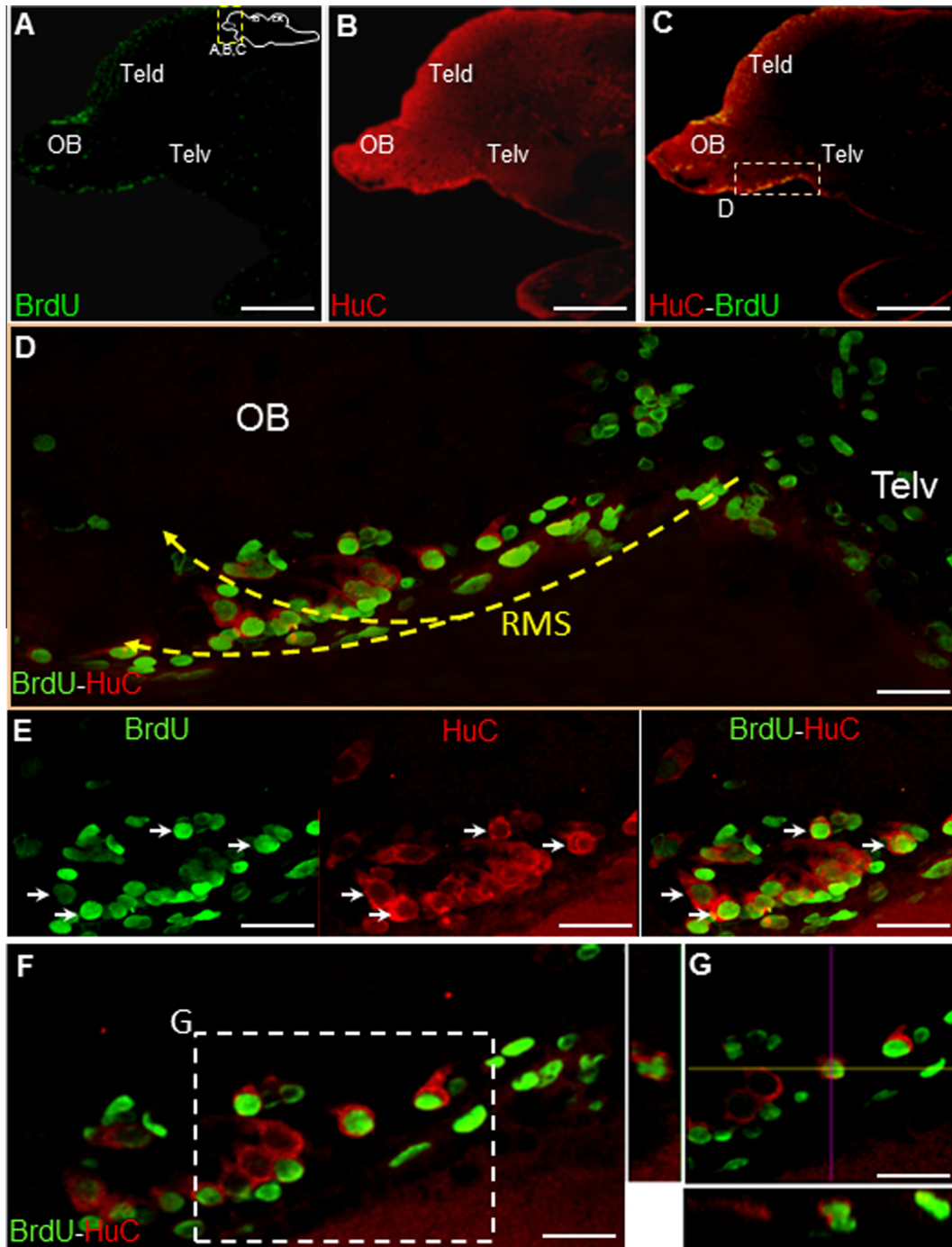


Fig. 7. Neurogenesis at level of the RMS. (A) Panoramic view of BrdU+ nuclei in a confocal stack of parasagittal planes at the level shown in the upper right. The yellow box represents the region analyzed in images A-B-C. (B) The same stack showing the presence of neuronal HuC-positive cells. (C) Merge of signals shown in A and B demonstrating significant co-localization in the ventral region (dashed box). (D) A higher magnification of the dashed area displaying several double BrdU/HuC-positive cells showing neurogenesis in the RMS (indicated by yellow dashed lines). (E) Single confocal channels showing migrating neuroblasts. The green channel corresponds to the BrdU signal, the red channel shows HuC and the merging of both markers together. (F) A single merged plane showing co-localization of BrdU and HuC in many cells. (G) Multiple plane view confirming co-localization of both signals in a cell. Scale bars, A–C: 300 μ m; D–E: 50 μ m; F–G: 30 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Dwarf cilium arises from a bump in the mid part of the apical pole of the cell and bears an expansion on the tip that appears as a structure with transverse bands by TEM analysis (Fig. 8D–F). Dwarf cilium is surrounded by variable numbers of microvilli (Fig. 8G). The cells that cover the telencephalic VW are monociliated and have a

long cilium. This cilium is between 10 and 12 microns in length, seems to arise from the cell membrane without any kind of protrusion (Fig. 8G) and has a slightly decreasing diameter toward the tip that in general is thin and simple. Some microvilli are associated with the base of long cilium (Fig. 8H). At the transitional level

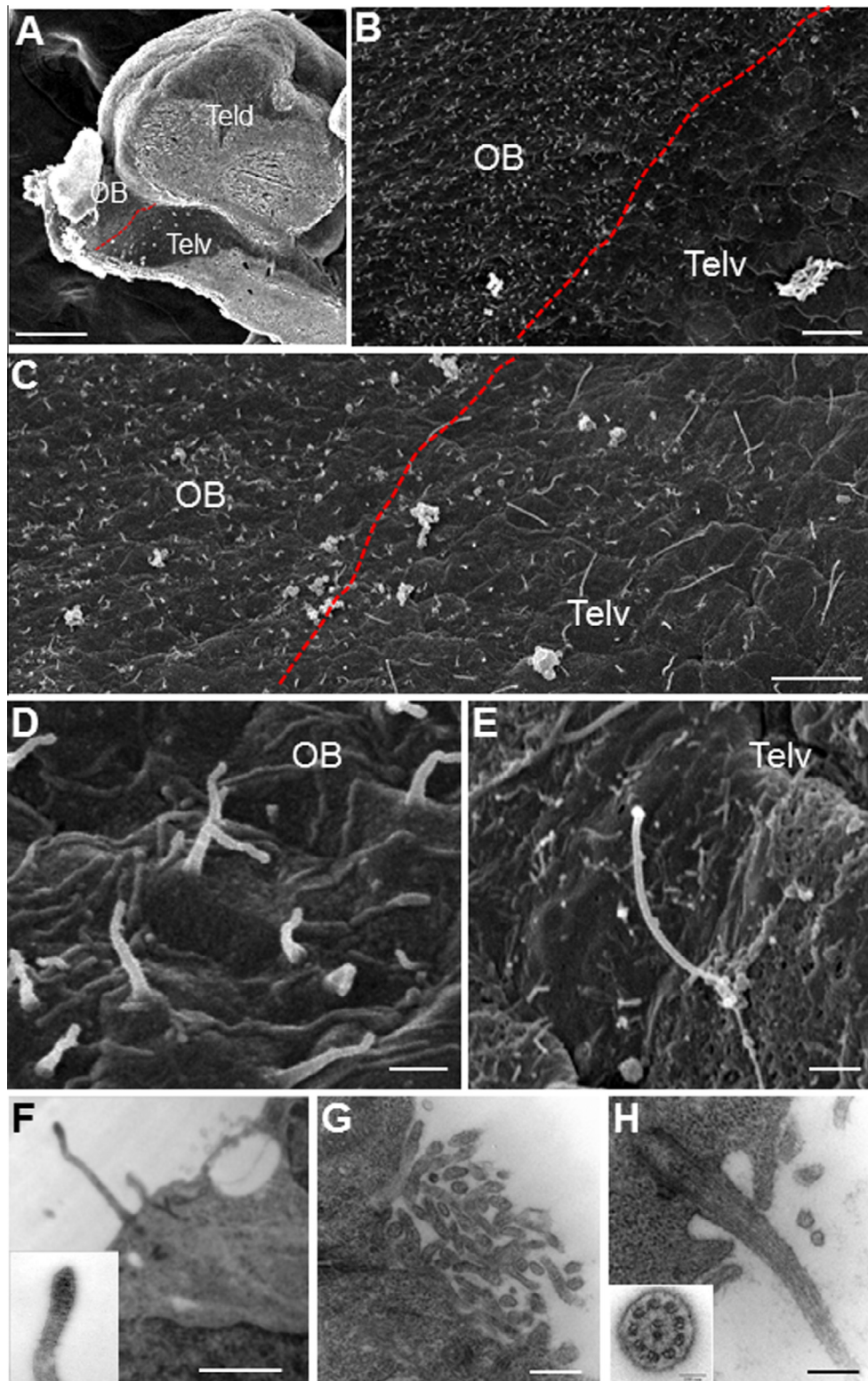


Fig. 8. SEM analysis of ventricular walls. (A) Panoramic sagittal view of a complete telencephalon. (B) Heterogeneity of ventricular walls between the OB and Tel due to different appearance of ciliated cells. (C–E) Higher magnifications of B showing shorter and more abundant cilia in the OB and long and thin cilia in Tel (C) as well as the different cilium morphology comparing those in the OB and Tel. Note the general appearance of OB “dwarf cilia” and the “bump” at the location of emergence and the long cilia in the Tel. Red dashed lines in A to C show the border between the OB and Tel ventral surfaces (F) A view of the specialization observed in the tip of dwarf cilium in the OB. Inset shows the tip specialization at higher magnification. (G) Abundant microvilli that surround a dwarf cilium. (H) A higher magnification of a Tel cilium showing its origin and few surrounding microvilli. The inset shows the 9 + 2 cilium microtubule arrangement. Scale bars, A: 500 μm ; B: 200 μm ; C: 20 μm ; D: 1 μm ; F: 1 μm ; G–H: 0.5 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

between the ventricular wall of Telv and OB there are dwarf and long cilia intermingled. The 9 + 2 microtubule arrangement of cilium is also observed (Fig. 8H).

DISCUSSION

We identified three neurogenic niches that support neurogenesis in the OB and Tel: TrZ (1), MZ (2), and ventral zone (3). Neurogenic niches identified have the same three cell types (I, II and III) previously described in the telencephalic ventricular zone at the Teld level in *Austrolebias* (Rosillo et al., 2010). Cell composition found is also consistent with that described in the ventricular wall of the third ventricle in *Eigenmania* sp. (Zupanc and Zupanc, 1992). Type I cells are the most proliferative; uptake proliferation markers at 24 h post injection (CldU +, red) appeared in clusters where some cells contact the CSF and have a single primary cilium. We believe Type I cells are the best candidates to be the “transient amplifying cells” described in mammals, reptiles, birds (Álvarez-Buylla and Kim, 1997; Doetsch et al., 1999; García-Verdugo et al., 2002) and in the electric fish *Gymnotus omarorum* (Olivera-Pasilio et al., 2014). Type I cells are very similar to types IVa or IVb cells as described in neurogenic niches of zebrafish OB (Lindsey et al., 2012, 2014). Similar to zebrafish in *Austrolebias*, these “transient amplifying cells” face the ventricle lumen. This is an important difference with mammals, where the transient amplifying cells never contact the CSF.

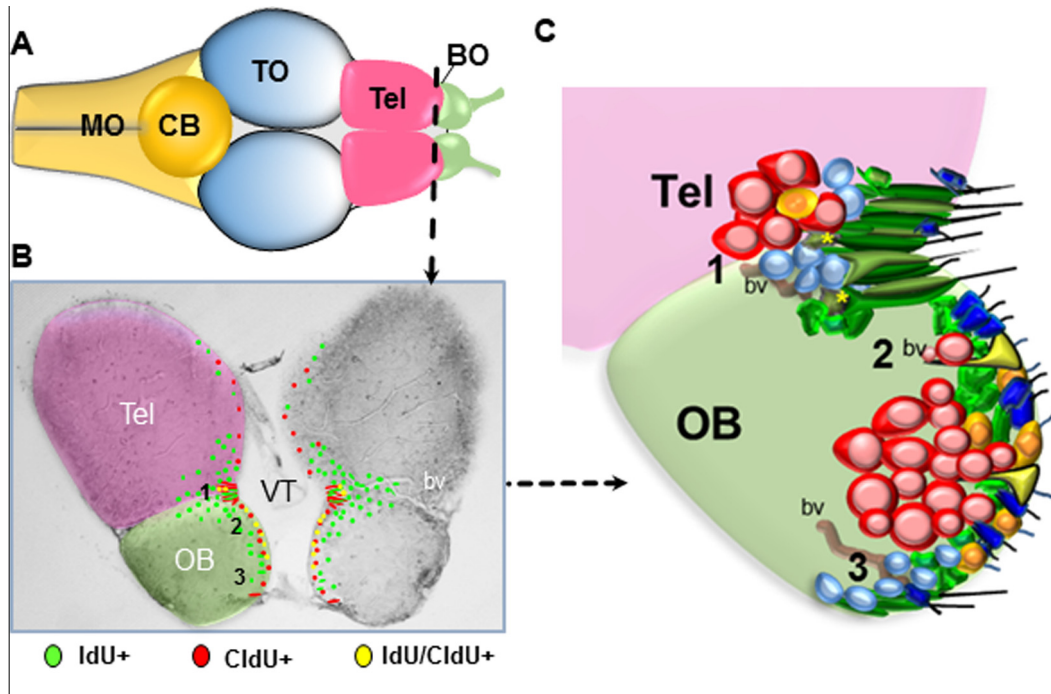
Type II cells are those of intermediate electron density, are bigger but less abundant than type I cells. They are strategically located in proliferative areas intermingled with type I cells, i.e., close to ventricular lumen or neuroblast clusters. We propose that type II cells are the stem cells because they incorporated both proliferation markers (yellow, IdU/CldU+ cells) and did not appear to migrate in 30-day experiments. Moreover, these cells are Pax6+, Sox2+ or vimentin+ and are monociliated (Figs. 1, 3 and 6), meeting the main criteria for neural stem cells. Stem cells were found in the MZ adjacent to the ventricular wall and in TrZs deeper in the parenchyma. This is in accordance with data shown by Grandel et al. (2006) that used two proliferation markers to recognize label-retaining, actively cycling cells widespread in zebrafish brain including telencephalic areas. Morphological features of type II cells resembled that of type IIa described in zebrafish by Lindsey et al. (2012). For the first time in teleosts, quantitation analysis showed that stem cells were 10% of the total proliferative cells identified in *Austrolebias* OB and Tel (Fig. 4).

Type III cells are neurons in different stages of maturation as described in all neurogenic niches in diverse vertebrates without variation (Sawada and Sawamoto, 2013). All cells of type III were HuC+ and the youngest retained the label of proliferation markers like BrdU or their halogenated analogs (Figs. 2, 4 and 7). Young type III cells appear clustered reminiscent of migrant neuroblasts (Type A cells) found in mammals (Doetsch et al., 1997) and type “n” described in zebrafish by Lindsey et al. (2012).

In the TrZ and ventral regions a fourth cell type (type IV) predominates. These cells were elongated radial glia in which we recognized at least two subtypes, RGI clear and RGII dark cells. Both cell types have a shape similar to that of type III cells described in zebrafish forebrain periventricular zones (Lindsey et al., 2012). However, type III cells described by Lindsey have the length of the major nuclear axis of 7 microns, whereas those of *Austrolebias* TrZ are between 7 and 17 microns. Radial glial cells I and II express the radial glial markers BLBP or vimentin and seem to generate different types of cells. We interpret this as these cells being the true progenitors of neuroblasts or glioblasts. While further research is necessary to confirm this, RGI appear more closely related to neuroblasts whereas RGII seem related to glioblasts (Fig. 2). Previously, Pinto and Götz (2007) demonstrated that radial glial cells are a heterogeneous population that gives rise to neuroblast or glioblast depending on their different locations in the CNS. As RGI and RGII coexist in the same niche we can suggest that *Austrolebias* neurogenic niches may undergo higher neurogenic plasticity in response to functional needs.

Radial glial cells persist into adulthood in several classes of vertebrates such as birds, reptiles and amphibians. In fishes, radial glia persists in adults to participate in both regeneration and brain repair (Zupanc, 2001; Pinto and Götz, 2007). Numerous studies in non-mammalian vertebrates have reported that neurogenic radial glial cells expressing glial markers represent the largest population in the ventricular zone of both the adult and the embryonic brain (Álvarez-Buylla et al., 1998; Font et al., 2001; García-Verdugo et al., 2002; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Schmidt et al., 2013). We found highest BLBP expression in the most proliferative ventricular zones as seen in parasagittal sections (Fig. 6). In the OB ventricular MZ, it was common to find vimentin+ glial cells colocalized with CldU+ nuclei. In some respects, our results are consistent with findings in studies of zebrafish Tel, where two subtypes of radial glial cells (I and II) were defined by expression of proliferation markers. The subtype II cells are considered to give rise to neuroblasts by asymmetric division (see the review Schmidt et al., 2013) and are similar to the RGI subtype in TrZ of *Austrolebias* fish that may generate neuroblasts also. We also propose that RGII cells may give rise to glial cells. In zebrafish it was shown that many radial glial cells expressing aromatase actively divided to give rise to new neurons (Pellegriani et al., 2007). Studies performed in telencephalic ventricular areas of pejerrey fish demonstrated that radial glial cells are true progenitors generating neurons and possibly astrocyte-like cells and some of the proliferating radial glial cells expressing aromatase (Strobl-Mazzulla et al., 2010). Our data also showed that many of the radial glial cells are proliferating cells concentrated in zones of high proliferation such as the TrZ and ventral zone (3).

In mammals, the ventricular surface is covered by a multiciliated epithelium whereas birds, reptiles and fishes have a higher number of monociliated compared with the number of multiciliated cells (Sawada and Sawamoto, 2013). We never found multiciliated cells on



Cell types		Prolif	Cilium (µm)	Markers (IHC)	Migration
I	I	+++	1-2, dwarf	CldU, IdU, Pax6	No migrant
	t	+++	-----	CldU	Transient/amplifying
II		++	1-2, dwarf	CldU/IdU, Pax6, Sox2+, Vimentin	No migrant
III	n	+	-----	BrdU, IdU, HuC/D	Neuroblast migrant
		-			Postmitotic neuron no migrant
IV	RGI	++	10-12, long	CldU, IdU, Pax6, BLBP	-----
	RGI	++	10-12, long	CldU, IdU, Pax6, Vimentin	-----
Other glial cells		++	1-2, dwarf	CldU, Pax6, Vimentin	-----
Glioblast (*)		+	-----	-----	-----

Fig. 9. Summary of the main results found in the organization of telencephalic-OB ventricle wall. (A) Scheme of a dorsal view of the brain showing the level of the histological section shown in B. (B) Brain transverse section showing expression of proliferative markers (IdU, CldU and IdU/CldU) and bv evidenced by differential interference contrast microscopy (DIC). Some labeled nuclei were intimately linked. A color code was assigned for each marker used. (C) Schematic representation of the cellular composition of the three proliferative regions (1, 2, 3) shown with respective main cellular components in different colors. The box shows the color code and a summary of the distinguishing characteristics of each cell type, together with a comparison of proliferation levels and marker expression. +, few; ++, intermediate; + + +, high. bv, blood vessels; CB, cerebellum; MO, medulla oblongata; OB, olfactory bulb; Tel, telencephalon; TO, tectum opticum. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the VW at OB and Telv levels as shown by TEM and SEM analysis. This is in accordance with our previous studies at the telencephalic level (Rosillo et al., 2010; Casanova et al., 2015), but differs from that reported in zebrafish telencephalic areas that bear multiciliated cells (Lindsey

et al., 2012; Ogino et al., 2016). It is possible to think that monociliated cells are needed to favor the more proliferative and potentially neurogenic areas that can account for the challenges that *Austrolebias* are submitted to during their short lifespan. This idea is consistent with the faster

and higher rates of neurogenesis found in *Austrolebias* (Fernández et al., 2011) when compared to that reported in zebrafish.

Other remarkable and original features found in *A. charrua* telencephalic VW are the regional differences in the length and morphology of cilia. Dwarf cilia were found at the OB level and long cilia at the Telv level, respectively. It is known that primary cilium length depends on the cell cycle stage (Ko, 2012); therefore such length variations suggest differences in cell proliferation in both regions with the OB being the most proliferative. However it is hard to think that regional differences in cilium length are only attributed to different cell cycle stages since length differences were consistently found. The primary cilium is also considered essential for growth factor and morphogen reception and transduction (Ka Tong et al., 2014). Thus, the morphological differences found between the apical zones of OB and Telv cilia can possibly be attributed to differential signaling in these regions.

Radial glial cells in birds and mammals have a primary cilium containing eight or nine pairs of microtubules in the periphery and none in the center (Álvarez-Buylla et al., 1998; García-Verdugo et al., 2002; Tramontin et al., 2003). The radial glial cells in the ventricular zones at OB level in adult *Austrolebias* fish possess a single cilium with a 9 + 2 microtubule arrangement which is a feature of motile cilia in ependymal cells. This is similar to the 9 + 2 structure observed in the monociliated radial glial cells of the reptile brain and spinal cord (Font et al., 2001; Fernández et al., 2002).

Rostral migratory stream in the OB

In rodents, neuroblasts from the subventricular zone migrate as chains toward the olfactory bulb along the RMS (Lois and Álvarez-Buylla, 1994). The RMS was found in most of the brains of adult mammals, including man (Curtis et al., 2007; Sawamoto et al., 2011). Successive studies showed that generation of neuroblasts that migrate tangentially populate the OB and then integrate into the olfactory circuits (Lledo et al., 2006).

Parasagittal sections of the *A. charrua* brain together with analysis of two proliferation markers in 24-h and 30-day experiments enabled the identification of distinct migratory routes from dorsal and ventral levels of the OB-Tel transition (Figs. 5 and 7). From the dorsal portion emerges a migratory path that goes toward the OB and another that runs backward to the Tel. The first one supports OB neurogenesis and can be related to the gonadotrophin+ neuronal group that originates in the olfacto-retinalis pathway of the terminal nerve (Rosillo et al., 2013). A prominent migratory stream of proliferating cells coming from the ventral zone (3) toward the OB was found (Fig. 7). This pathway shows many neuroblasts that seem to migrate in “chain” as was described in different vertebrates (Sawada and Sawamoto, 2013). Recent time-lapse imaging studies show that bv form a migratory scaffold in zebrafish RMS (Kishimoto et al., 2011). In *Austrolebias* OB we identified important bv accompanying the zones of major migration. We also observed that many proliferative migrating cells

are intimately supported on bv suggesting bv serve as scaffolds (Figs. 5F, 9B). In addition, radial glial cells that were found in different orientations (Fig. 6) very likely support radial and tangential migration. Taking these observations together, we conclude that *A. charrua* fish has an RMS equivalent to the conserved pathway for the tangential migration of neuronal precursors in vertebrates.

Teleosts have an olfactory system that allows them to detect and discriminate between different kinds of olfactory stimuli (amino acids, nucleotides, bile salts, gonadal steroids, and prostaglandins) that are related to different behaviors, such as feeding, orientation, and reproduction (Bazães et al., 2013). The short *Austrolebias* lifespan may be adapted to generate plastic and active mechanisms to ensure successful adaptations in varying environments for reproduction. Hence, we can assume that these fish need a high cell turnover in the OB to provide new different cell types necessary for neural circuit functioning and adaptation for both reproduction needs and environmental challenges.

CONCLUSIONS

Our results strongly support the existence of three neurogenic regions with own cellular composition, proliferation rate and migration routes. In the MZ (2) we found many highly proliferative cells (transient amplifying cells, stem cells and neuroblasts). This indicates that this site could be responsible for the parenchyma growth at the OB level.

In the dorsal (1) and ventral (3) neurogenic areas, but not in the MZ, there coexist elongated radial glial cells with specific morphological and molecular characteristics (RGI and RGII). As such we hypothesize that there are at least two populations of radial glial cells that give rise to different kinds of neural cells. Neurogenic zone 1 (TrZ) showed migration dorsally toward the rostral portion of the OB, and backward to the posterior Tel via the Teld and Telv transition. Neurogenic zone 3 sustains the rostral migratory stream that runs ventrally to the OB. SEM analysis evidenced the exclusive presence of monociliated cells in the whole VW, showing the OB a neat predominance of dwarf cilia. In our study, we never found multiciliated cells. Our findings allow proposing the existence of different neurogenic niches able to originate cells that may participate in sensory activity or contribute to OB growth.

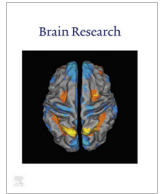
Acknowledgments—We wish to thank Patricia García, Susana González, Mario Soriano and all members of Comparative Neurobiology (University of Valencia, Spain) for their help and expertise with sample preparation and imaging for TEM experiments. A special thanks to Magela Rodao for SEM microscopy imaging and analysis. We also thank Nicolas Papa for collecting and maintaining the fish; and to Dr. Paul Gill for critical reading and correction of the manuscript. Research funding was provided by the Uruguayan Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA). All authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tanhauser B, Strahle U, Götz M, Bally-Cuif L (2006) Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev Biol* 295:278–293.
- Alunni A, Hermel JM, Heuzé A, Bourrat F, Jamen F, Joly JS (2010) Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev Neurobiol* 70:693–713.
- Álvarez-Buylla A, Kim JR (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J Neurobiol* 33:585–601.
- Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Mateo AS, Merchant-Larios H (1998) Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci* 18:1020–1037.
- Arslan-Ergul A, Erbaba B, Karoglu ET, Halim DO, Adams M (2016) Short-term dietary restriction in old zebrafish changes cell senescence mechanisms. *Neuroscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.033>, in press.
- Barnea A, Pravosudov V (2011) Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *Eur J Neurosci* 34:884–907.
- Bazáas A, Olivares J, Schmachtenberg O (2013) Properties, projections, and tuning of teleost olfactory receptor neurons. *J Chem Ecol* 39:451–464.
- Casanova G, Rosillo JC, Olivera-Bravo S, Fernández AS (2015) In annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution comparative anatomy and proliferative zones of adult *Austrolebias* brain. In: Berois N, García G, De Sá RO, editors. Florida: Taylor & Francis Group. p. 231–250.
- Chiu-Ming W, Chun-Shun W, Tzu-Chuan Ch, Shih-Ting Ch, Fan-Hua N (2010) Immunohistochemical and molecular characterization of a novel cell line derived from the brain of *Trachinotus blochii* (Teleostei, Perciformes): a fish cell line with oligodendrocyte progenitor cell and tanycyte characteristics. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 156:224–231.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wickelso C, Holtas S, Van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243–1249.
- D'Angelo L (2013) Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *Anatom Record* 296:681–691.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Doetsch F, Scharff C (2001) Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol* 58:306–322.
- Feierstein CE (2012) Linking adult olfactory neurogenesis to social behavior. *Front Neurosci* 6:1–13.
- Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O (2002) Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J Comp Neurol* 453:131–144.
- Fernández AS, Rosillo JC, Casanova G, Olivera S (2011) Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189:12–24.
- Fernández AS, Rosillo JC, Olivera S, Casanova G (2012), Characteristics of the progenitor cells in the neurogenic niches of *Austrolebias charrua* brain. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Book of Abstract: p 63 No. 159.
- Font E, Desfilis E, Pérez-Canellas MM, García-Verdugo JM (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol* 58:276–295.
- Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH (2001) Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci*. 21:8943–8955.
- García-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57:765–775.
- Goldman S (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 26:590–596.
- 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.
- Ka Tong C, Hana YG, Shaha JK, Obernier K, Guintoa CD, Álvarez-Buylla A (2014) Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *PNAS* 111:12438–12443.
- Ko HW (2012) The primary cilium as a multiple cellular signaling scaffold in development and disease. *BMB Rep* 45:427–432.
- Kishimoto N, Alfaro-Cervello C, Shimizu K, Asakawa K, Urasaki A, Nonaka S, Kawakami K, García-Verdugo JM, Sawamoto K (2011) Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 519:3549–3565.
- Lindsey BW, Darabie A, Tropepe V (2012) The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol* 520:2275–2316.
- Lindsey BW, Di Donato S, Kaslin J, Tropepe V (2014) Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain. *Eur J Neurosci* 40:3591–3607.
- Lindsey BW, Tropepe V (2014) Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Dev Neurobiol* 74:1053–1077.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179–193.
- Llorens-Martín M, Tejada GS, Trejo JL (2010) Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLoS One* 5:e12188.
- Lois C, Álvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145–1148.
- Ogino T, Sawada M, Cebrian-Silla A, Takase H, Kaneko N, Nakai Ch, García-Verdugo JM, Herranz-Pérez V, Sawamoto K (2016) Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain. *J Comp Neurol*. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.24001>.
- Olivera-Pasilio V, Peterson DA, Castelló ME (2014) Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost *Gymnotus omarorum*. *Front Neuroanat* 8:1–19.
- Passos C, Tassinio B, Reyes F, Rosenthal G (2014) Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. *PLoS One* 9: e101649.
- Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, LePage Y, Gueguen M, Marmignon M, Brion F, Pakdel F, Kah O (2007) Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol* 501:150–167.
- Peretto P, Schellino R, De Marchis S, Fasolo A (2014) The interplay between reproductive social stimuli and adult olfactory bulb neurogenesis. *Neural Plast* 497657. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/497657>.
- Pinto L, Götz M (2007) Radial glial cell heterogeneity- the source of diverse progeny in the CNS. *Progress Neurobiol* 83:2–23.
- Rocheffort CH, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult

- olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679–2689.
- Rosillo JC, Casanova G, Olivera S, Fernández A (2010) Cell heterogeneity of the telencephalic ventricular zone: a neurogenic brain region of *Austrolebias charrua*. *Acta Microsc* 19:152–159.
- Rosillo JC, Olivera-Bravo S, García-Verdugo JM, Casanova G, Fernández A (2013) Olfacto-retinal pathway in *Austrolebias charrua*. Fishes: a neuronal tracer study. *Neuroscience* 253:304–315.
- Sakurai K, Osumi N (2008) The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *J Neurosci* 28:4604–4612.
- Sawada M, Sawamoto K (2013) Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J Med* 62:13–28.
- Sawamoto K, Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Okano H (2011) Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J Comp Neurol* 519:690–713.
- Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Dev* 8:1–13.
- Strobl-Mazzulla PH, Nuñez A, Pellegrini E, Gueguen MM, Kah O, Somoza GM (2010) Progenitor radial cells and neurogenesis in Pejerrey fish forebrain brain. *Behav Evol* 76:20–31.
- Sullivan JM, Sandeman DC, Benton JL, Beltz BS (2007) Adult neurogenesis and cell cycle regulation in the crustacean olfactory pathway: from glial precursors to differentiated neurons. *J Mol Histol* 38:527–542.
- Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Álvarez-Buylla A (2003) Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580–587.
- Vega C, Peterson D (2005) Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat Methods* 2:167–170.
- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H (1996) Neuroanatomy of the Zebrafish brain: a topological atlas. Boston: Birkhauser. p. 1–144.
- Zupanc GKH, Zupanc MM (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 GKH (2001) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav Evol* 58:250–275.
- Zupanc GKH (2008) Adult neurogenesis in teleosts fish. In: Gage F, Kempermann G, Song H, editors. *Adult neurogenesis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 571–592.

(Accepted 25 August 2016)
(Available online 01 September 2016)



Research report

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



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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2017

Received in revised form 27 July 2017

Accepted 3 August 2017

Available online 8 August 2017

Keywords:

Stem cell

Fish brain

Cell proliferation

Austrolebias

ABSTRACT

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

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Results

2.1. Immunohistochemistry for CldU and IdU

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

2.2. Shape and size of labeled nuclei

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

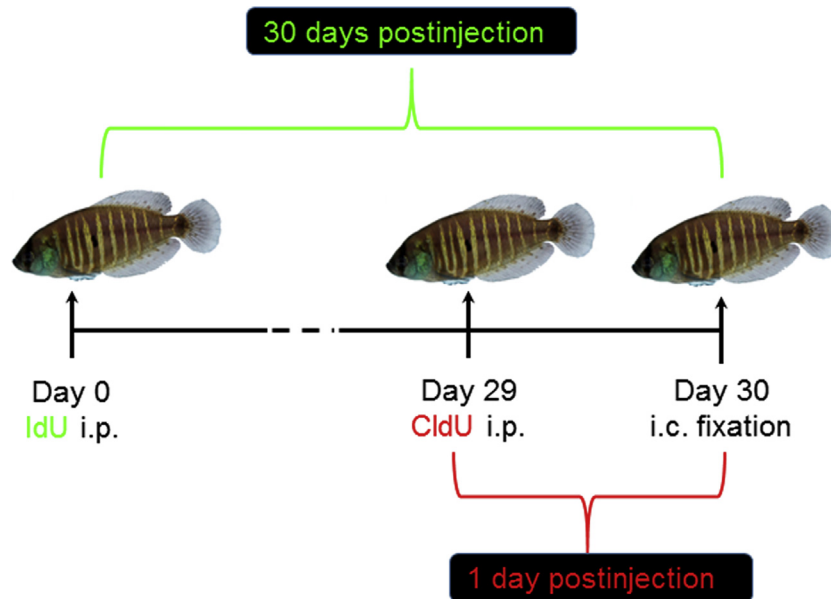


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design used for the intraperitoneal (i.p.) application of IdU (5-iodo-2'-deoxyuridine) and CldU (5-chloro-2'-deoxyuridine). Fishes were processed by intracardiac (i.c.) fixation at 30 days postinjection of IdU and 1 day postinjection of CldU, respectively.

2.3. Distribution of proliferative cells

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

2.3.1. Telencephalon

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

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

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

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

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

2.3.2. Diencephalon

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

2.3.3. Torus longitudinalis and optic tectum

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

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

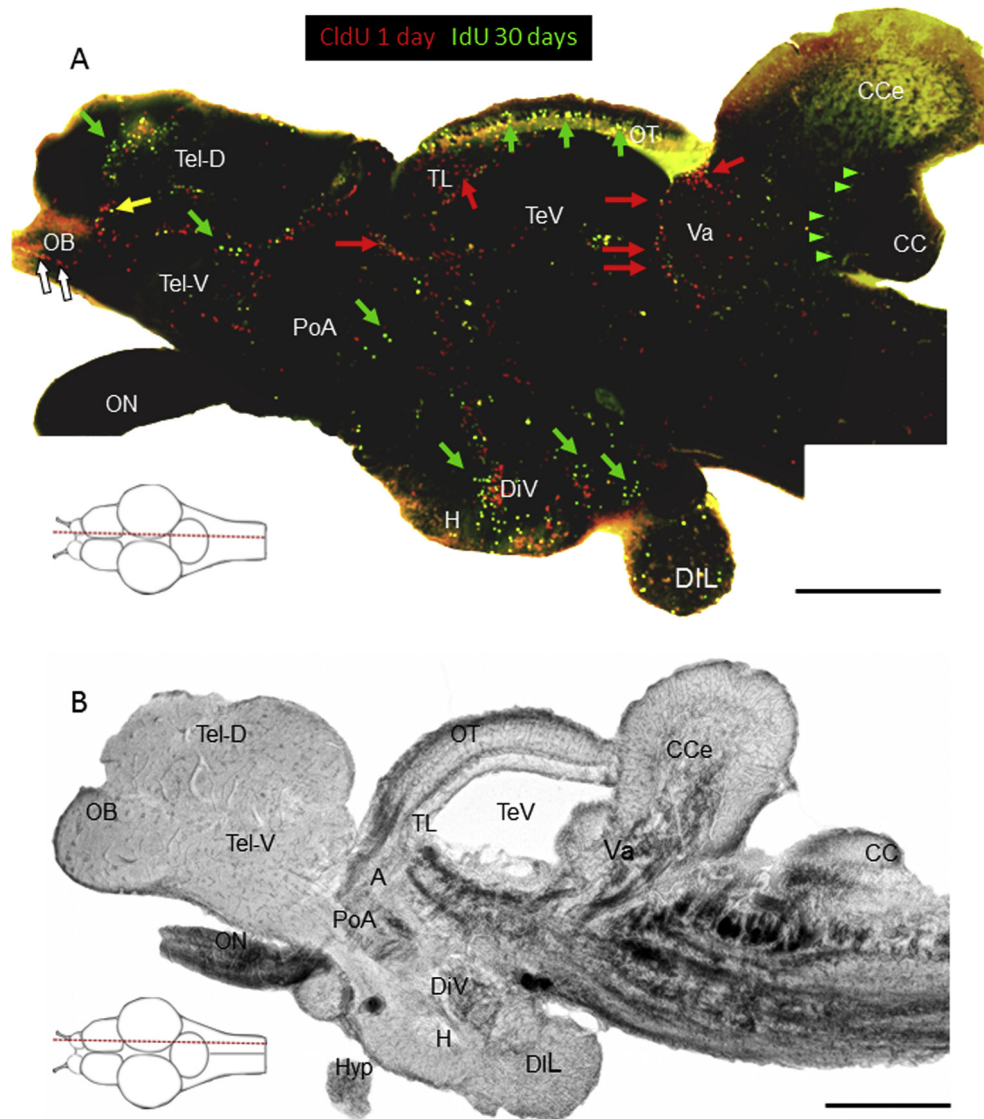


Fig. 2. A: Sagittal section of *Austrolebias charrua* brain evidencing a widespread cell proliferation. Fast proliferating cells line the ventricle walls (red arrows, CldU+) and the *valvula cerebelli* (Va). IdU+ cells are distributed deeper into the parenchyma and running in different migratory pathways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

2.3.4. Cerebellum

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

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

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

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

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

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

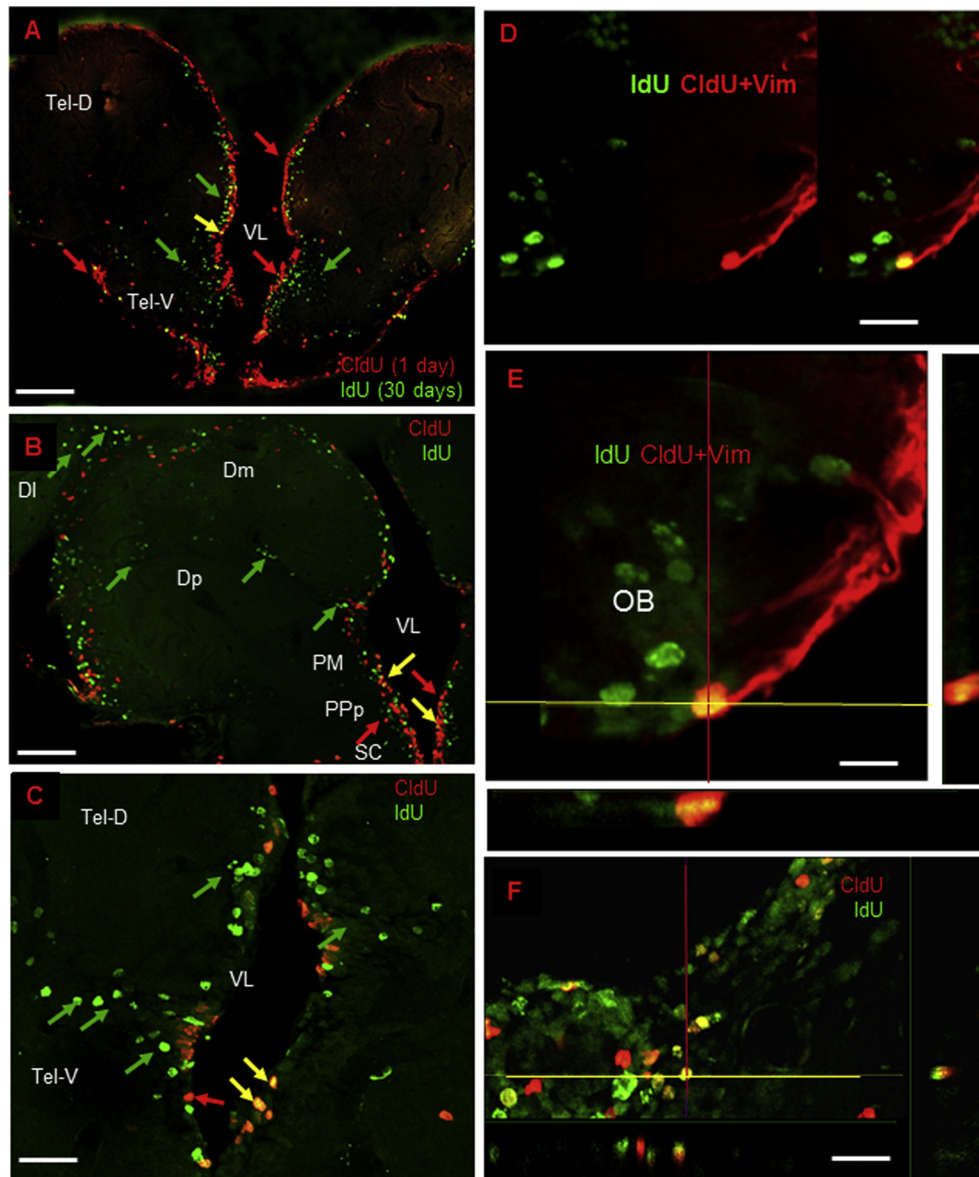


Fig. 3. CldU and IdU immunohistochemistry. **A–C:** Panoramic transverse section of the telencephalon showing the types and distribution of proliferative cells: IdU+ (green arrows); CldU+ (red arrows) and CldU/IdU+ cells (yellow arrows), respectively. Note the location of the putative stem cells and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

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

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

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

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

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

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

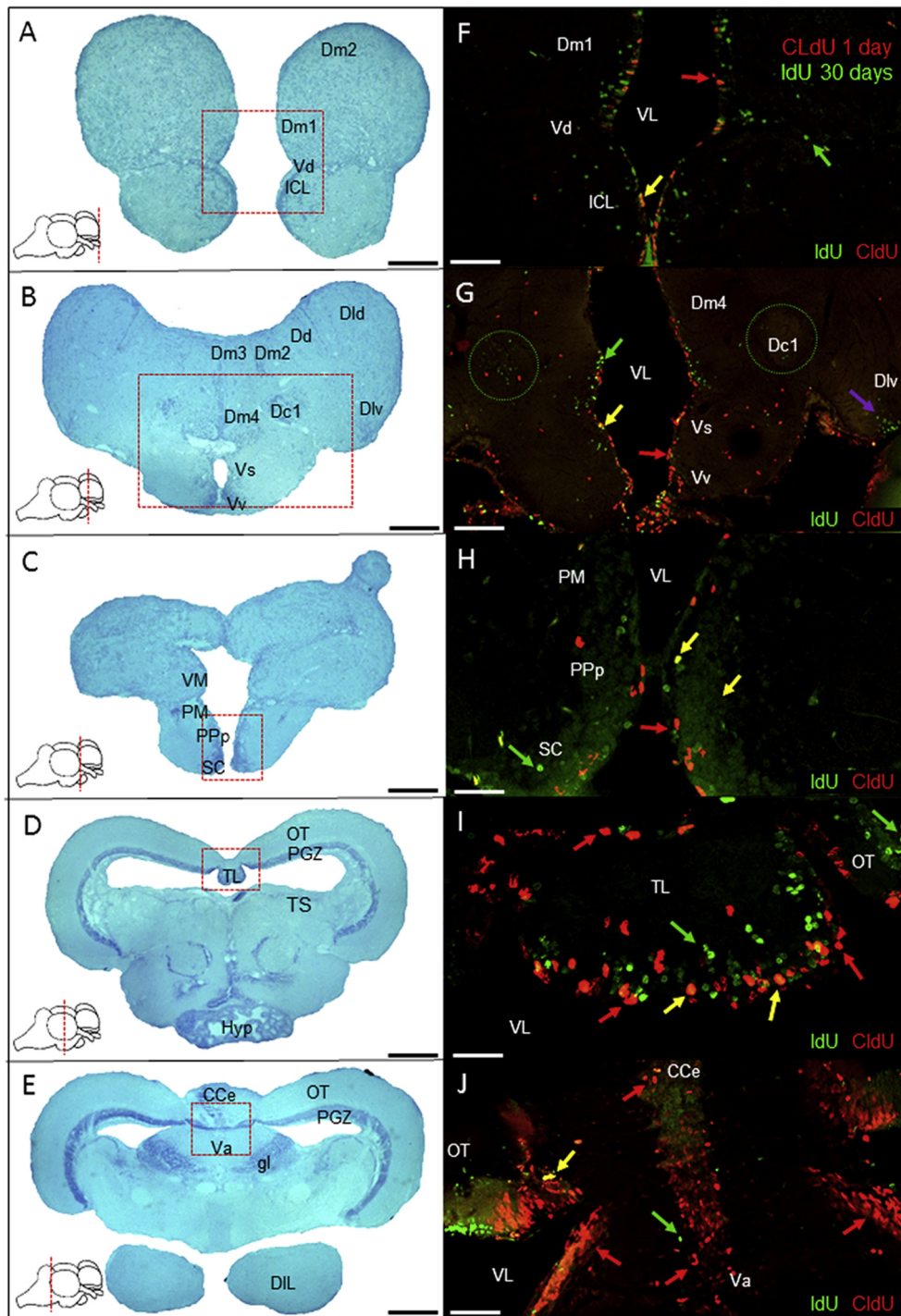


Fig. 4. Brain transverse sections at different rostro-caudal levels stained with Methylene blue (left images) and enlarged areas (red boxes) labeled with proliferation markers employed. Abundant IdU+ nuclei were found at the central zone of dorsal telencephalon (circle) and in the dorso-lateral zone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

2.5.1. IdU positive cells co-localize with neuronal markers

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

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

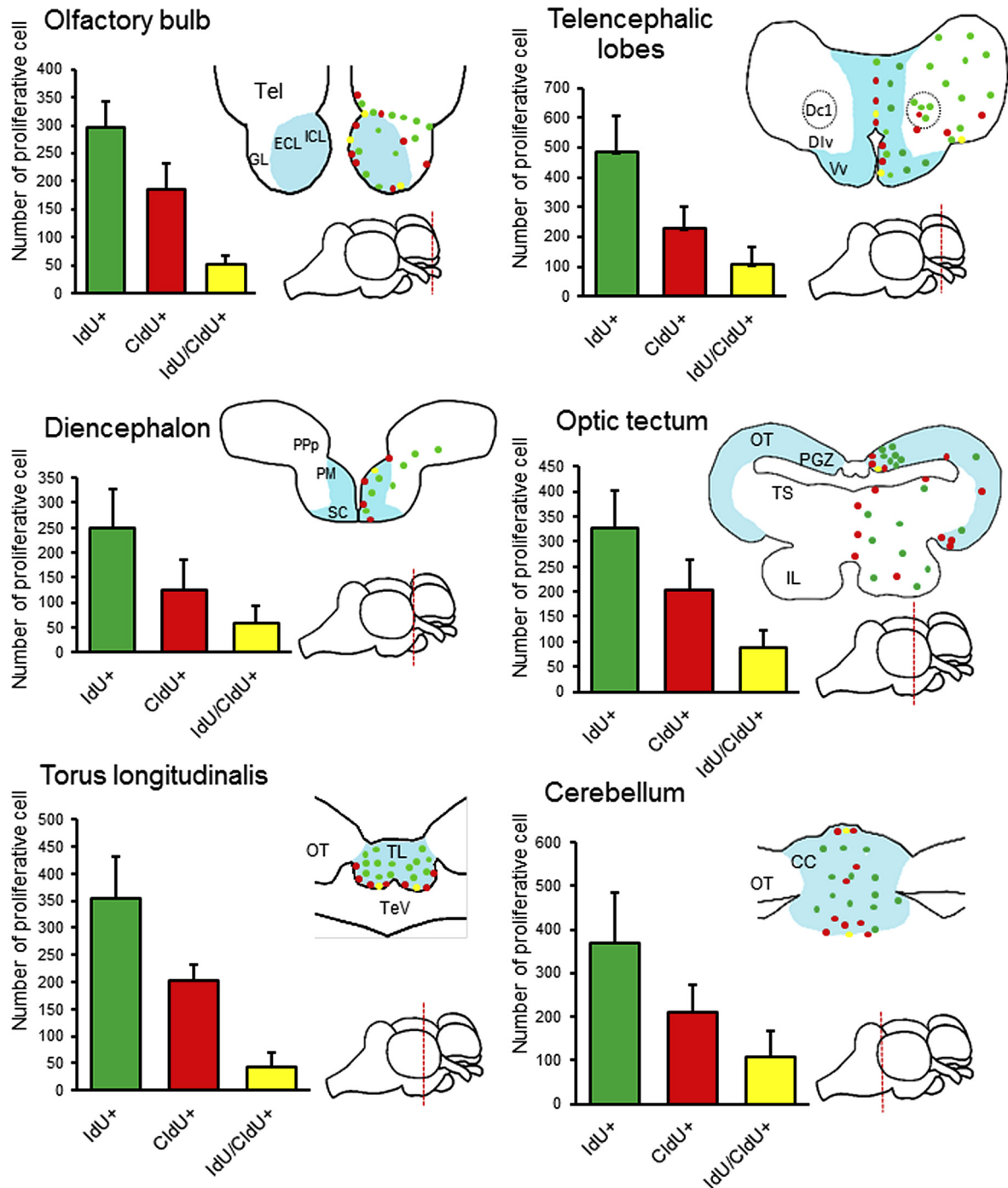


Fig. 5. Charts showing the quantitation of the three types of proliferating cells in six regions of six *Austrolebias charrua* brain. Each scheme shows the brain section at the level analyzed and the area quantitated is colored in light blue. Different color dots represent the distribution of the three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

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

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

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

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

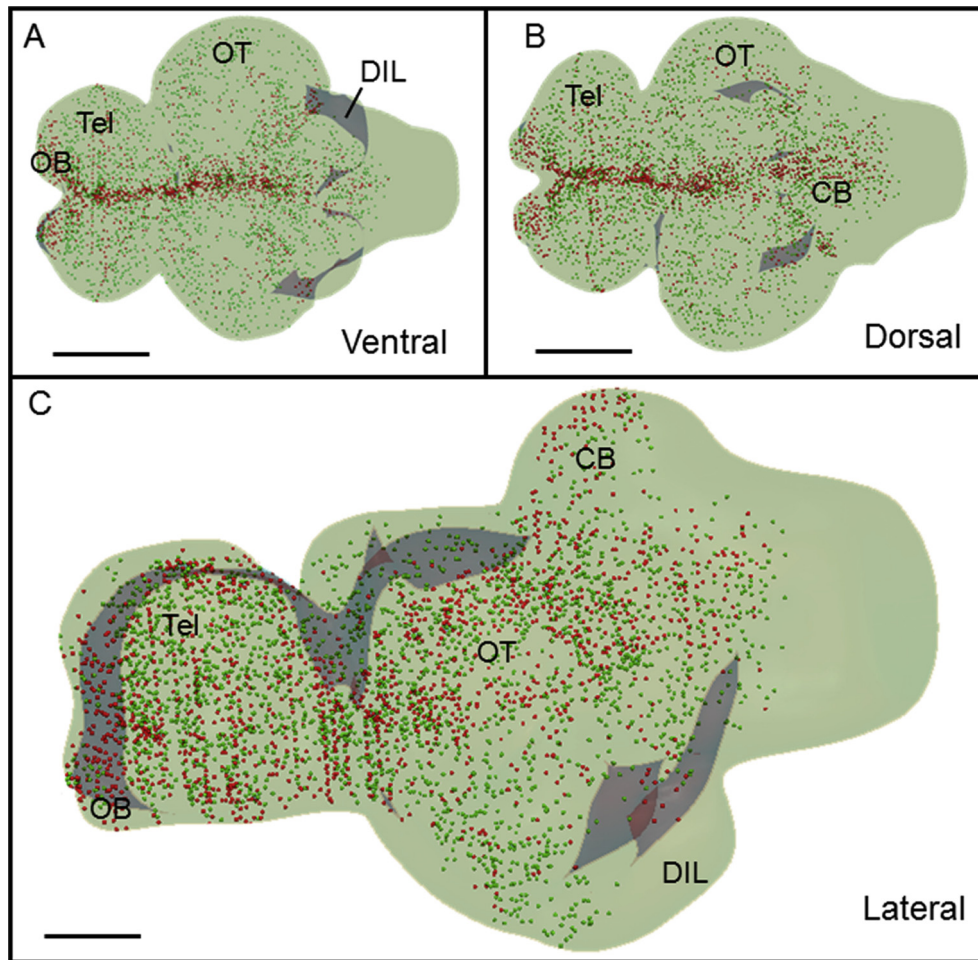


Fig. 6. Three-dimensional reconstruction of *Austrolebias charrua* brain showing the fast proliferating type I cells (red) and migratory type III cells (green) in three different views (ventral, dorsal and lateral). Note the concentration of CldU+ cells around the ventricle walls and the widespread location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

3. Discussion

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

3.1. Types of proliferating cells

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

3.2. The temporal discrimination and identity of proliferating cells

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

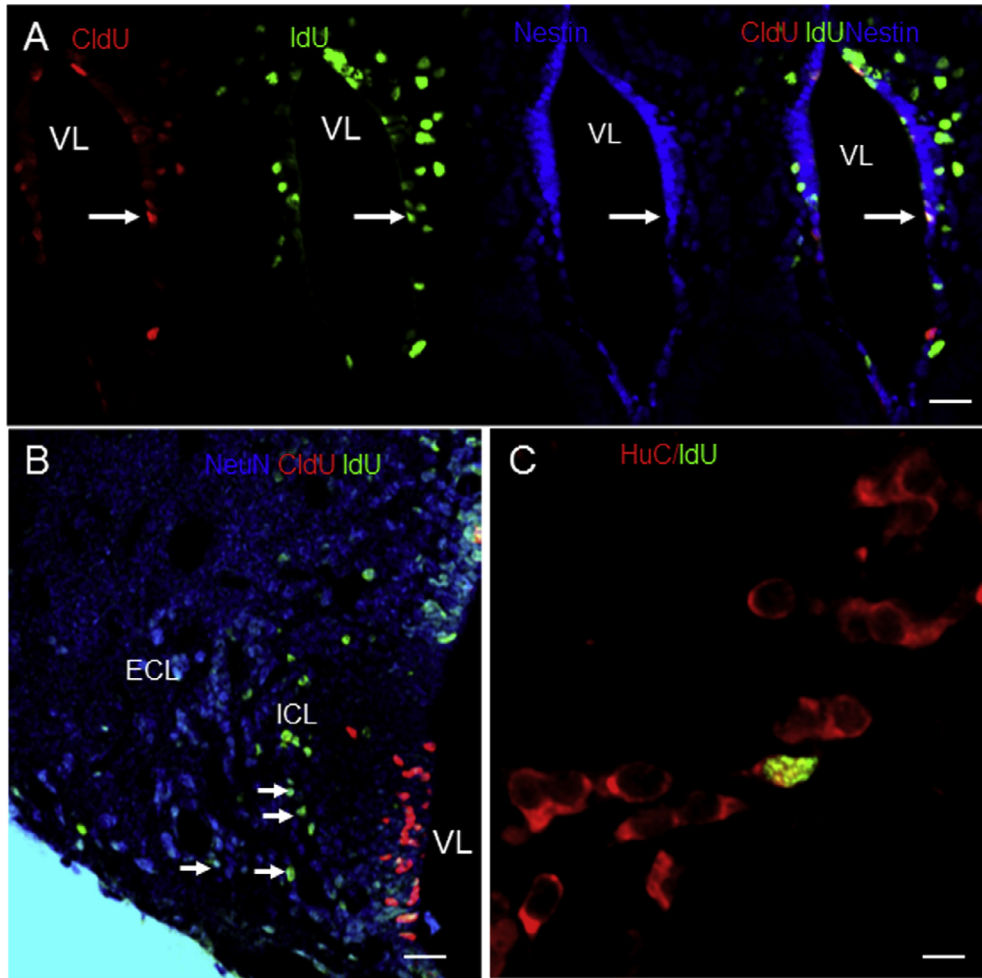


Fig. 7. A: Triple labeling of CldU/IdU/nestin (white arrow) found in the ventricular lumen. B: Co-labeling of CldU/IdU with NeuN evidencing that the neuronal marker only co-localizes with IdU (white arrows) in the ICL, farther from the OB ventricular lumen. C: Co-localization of IdU together with HuC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

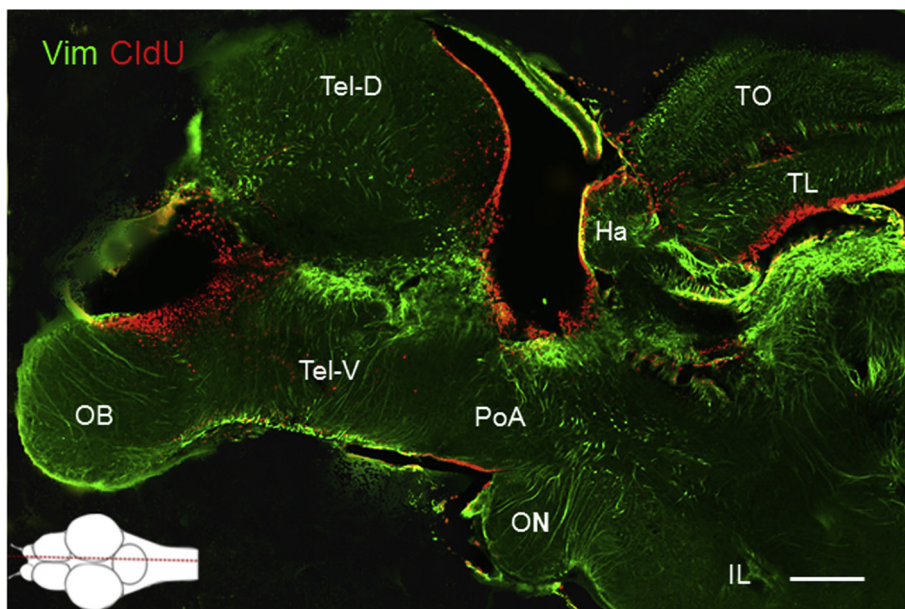


Fig. 8. Parasagittal section showing the distribution of radial glial cells, in the anterior and middle brain. Many of the vimentin+ cells co-localize with CldU in ventricular and peripheral zones. The scheme shows the level of the section. IL, inferior lobe; Ha, habenula; OB, olfactory bulb; ON, optic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

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

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

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

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

4. Conclusion

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

5. Experimental procedures

5.1. Animals

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

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

5.2. Experimental procedures to evaluate temporal discrimination of cell proliferation

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

5.2.1. CldU/ IdU-Experiments

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

5.3. Sectioning brains

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

5.4. Immunohistochemistry

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

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

5.5. Methylene blue staining

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

5.6. Quantitation of proliferating cell number in six brain regions

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

5.7. 3-D visualization of proliferative zones

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

References

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

- Ma, D.K., Ming, G.L., Song, H., 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 514–520.
- Maruska, K.P., Carpenter, R.E., Fernald, R.D., 2012. Characterization of Cell Proliferation throughout the Brain of the African Cichlid Fish *Astatotilapia burtoni* and its Regulation by Social Status.
- Ming, G.L., Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.
- Nottebohm, F., 2002. Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res. Bull.* 6, 737–749.
- Olivera-Pasilio, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E., 2014. Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Front. Neuroanat.* 8, 1–19.
- Passos, C., Tassino, B., Loureiro, B., Rosenthal, G.G., 2013. Intra and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behav. Proc.* 96, 20–26.
- Passos, C., Tassino, B., Reyes, F., Rosenthal, G., 2014. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish *Austrolebias reicherti*. *PLoS One* 9, e101649.
- Podrabsky, J.E., Riggs, C.L., Wagner, J.T., Berois, N., García, G., de Sá, R.O., 2015. Tolerance of environmental stress. In: *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, Francis and Taylor Group, pp. 159–180.
- Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., Fernández, A.S., 2010. Heterogeneidad celular en la zona ventricular telencefálica: una región neurogénica del cerebro de *Austrolebias charrua*. *Acta Microscópica* 2, 1521–2159.
- Rosillo, J.C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2016. Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall Organization in *Austrolebias charrua*: cytoarchitecture, proliferation dynamics, Neurogenesis and migration. *Neuroscience* 336, 63–80.
- Sawada, M., Sawamoto, K., 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J. Med.* 62, 13–28.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304 (5675), 1338–1340.
- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H., 2002. Astroglia induces neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39–44.
- Sorensen, C., Bohlin, L.C., Orveli, O., Nilsson, G.E., 2011. Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Behav.* 102, 518–523.
- Sorensen, C., Orveli, O., Summers, C.H., Nilsson, G.E., 2007. Social Regulation of Neurogenesis in Teleosts. *Brain Behav. Evol.* 70, 239–246.
- Sullivan, J.M., Sandeman, D.C., Benton, J.L., Beltz, B.S., 2007. Adult neurogenesis and cell cycle regulation in the crustacean olfactory pathway: from glial precursors to differentiated neurons. *J. Mol. Hist.* 38, 527–542.
- Tozzini, E.T., Baumgart, M., Battistoni, G., Cellierino, A., 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell* 11 (2), 241–251.
- Vega, C.J., Peterson, D.A., 2005. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat. Methods* 2, 167–169.
- von Krogh, K., Sorensen, C., Nilsson, G.E., Orveli, O., 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol. Behav.* 101, 32–39.
- Wourms, J.P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182 (3), 389–414.
- Wulliman, M.F., Rupp, B., Reichert, H., 1996. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. Birkhäuser Verlag, Inc, Basel. 144 p.
- Wurmser, A., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2004. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 5675, 1253–1255.
- Zikopoulos, B., Kentouri, M., Dermon, C.R., 2000. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain Behav. Evol.* 56, 310–322.
- Zikopoulos, B., Kentouri, M., Dermon, C.R., 2001. Cell genesis in the hypothalamus is associated to the sexual phase of a hermaphrodite teleost. *Dev. Neurosci.* 12, 2477–2481.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I., 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353, 213–233.
- Zupanc, G.K.H., Clint, S.C., 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia* 43 (1), 77–86.

Comparative Anatomy and Proliferative Zones of Adult *Austrolebias* Brain

Gabriela Casanova Larrosa, Juan Carlos Rosillo, Silvia Olivera-Bravo, and Anabel S. Fernández

CONTENTS

13.1	Introduction.....	232
13.2	Phenotype Differences among the Three Studied Species.....	232
13.3	Vertebrate Brain and the Environment.....	233
13.4	Comparative Brain Anatomy of the Studied Species.....	235
13.5	Cell Proliferative Zones and Neurogenesis: BrdU Results and 3D Brain Reconstructions.....	236
13.6	BrdU Method to Identify Proliferating Cells.....	236
13.7	BrdU Applied to the Study of <i>Austrolebias</i> Brain.....	237
13.8	Neurogenesis in <i>Austrolebias</i> Brain.....	237
13.9	Quantitative Analysis of Cell Proliferation.....	239
13.10	Characteristics of the Neurogenic Niches.....	241
13.11	Subcellular Morphological Analysis of the Telencephalic Ventricular Epithelium of <i>Austrolebias</i>	242
13.12	Intercellular Junctional Complexes at Neurogenic Niches.....	244
13.13	Conclusions.....	245
	References.....	246

The brain has diversified and advanced in evolution more than any other organ; the variety of nervous systems and behaviors among animal species is thus available for our exploitation. Comparative neuroscience is likely to reach insights so novel as to constitute revolutions in understanding the structure, functions, ontogeny, and evolution of nervous systems. This promise requires pursuit on a wide front, in respect to disciplines and in respect to the species, stages, and states compared. It also requires deliberate concentration on the differences among animals, in addition to the prevailing concern for the basic and common. Neglect of these challenges would be costly. Without due consideration of the neural and behavioral correlates of differences between higher taxa and between closely related families, species, sexes, and stages, we cannot expect to understand our nervous systems or ourselves.

13.1 INTRODUCTION

Teleosts are presently, by far, the most numerous group of bony fishes, encompassing about 28,000 species and thus representing the most abundant group of vertebrates (Nelson, 2006). As the earliest teleosts lived long before the earliest land vertebrates, they have had a longer time to differentiate and adapt during phylogeny and have indeed made use of this opportunity. Teleosts show a great variability in form and function, and are adapted to a variety of niches in both salt and freshwater. Consequently, in the long temporal window since their origin, the teleost central nervous system experimented greatly with variations depending on both phylogenetic and functional diversity (Meek and Nieuwenhuys, 1998).

Among vertebrates, annual fishes represent one of the most remarkable extremophiles. They share several features with other fish models; however, they exhibit unique traits related to their peculiar life cycle. They have unique adaptive strategies in reproduction and maintenance of embryos in extreme environmental situations. These attributes make them a useful model to study diverse topics in developmental biology using a comparative and evolutionary approach (Berois et al., 2012).

Herein we provide a description and comparison of the overall gross neuroanatomy among three species of annual fishes: *Austrolebias affinis*, *A. charrua*, and *A. reicherti*. Further, we focus our studies on the similarities and differences of the proliferative cell zones and their effects on neurogenic capacity in the brain of these three species. Analyses of the brain of *Austrolebias* provide new perspectives to the understanding of the variability of brain sizes and shapes exhibited by this vertebrate group. Moreover, comparative studies of areas of cell proliferation within the major cerebral divisions provide new tools for understanding the differential relative growth of the cerebral divisions and its relation to different sensorial modalities. Our research contributes to and is enriched by a multidisciplinary approach to understanding the evolutionary biology of the genus *Austrolebias* as undertaken by different research teams in Uruguay.

13.2 PHENOTYPE DIFFERENCES AMONG THE THREE STUDIED SPECIES

The phylogenetic history of the three species may be related to significant diversity in body characteristics. Molecular and morphological studies support that *A. charrua* and *A. reicherti* are sister taxa within the *A. adloffii* species group (Loureiro and García, 2008). Diversification in the *A. adloffii* species group has been triggered by events of explosive speciation that likely occurred during the Late Pleistocene (1.25 mya to 450,000 years ago; García et al., 2009, 2014). *Austrolebias charrua* and *A. reicherti* are similar in size but differ in (1) the origin and the number of rays of dorsal fins; (2) coloration patterns, for example, spots on the fins, and number, thickness, and separation of body vertical bands; and (3) the supraorbital bands, which is well-developed in *A. reicherti* but moderately developed in *A. charrua* (Loureiro and García, 2008).

Austrolebias affinis belongs to the *A. alexandri* species group (Costa, 2006; García et al., 2014); consequently, it is distantly related to the other two species included in this study. This is a smaller species, and its body coloration consists of white spots spread over the entire body with no vertical bands. Moreover, *A. reicherti* and *A. charrua* can occur in sympatry, whereas *A. affinis* is allopatric with respect to both the other species, occurring geographically distant with no possibility of geographic merging (Figure 13.1).

In spite of the three species belong to the same genus, genetic studies proposed that this group participates in current speciation events with the consequent genome expansion (García et al., 2014). The explosive speciation that the clade presents is reflected in the varied phenotype and also in the brain anatomy (Figure 13.2).

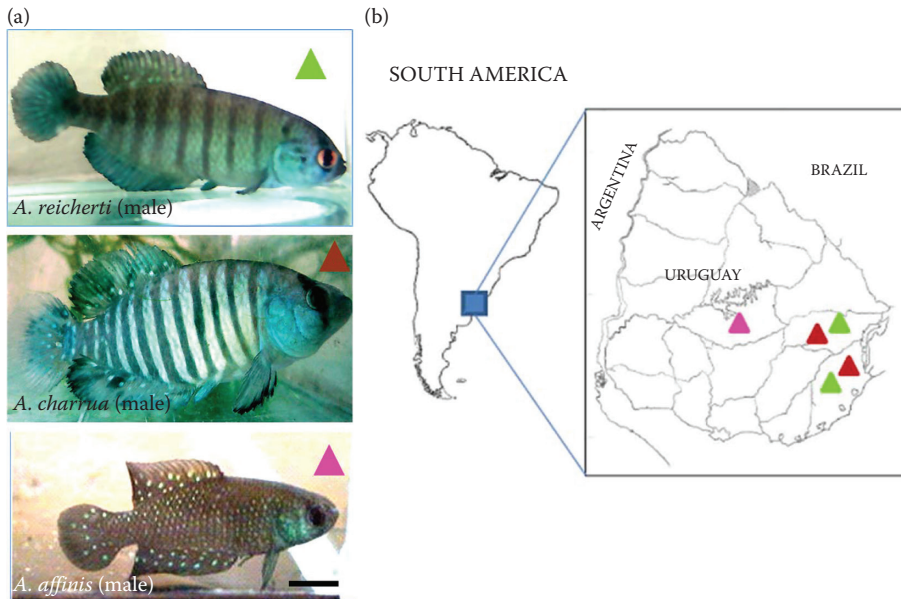


Figure 13.1 (a) Phenotype of adult males from each *Austrolebias* species studied. Note the differences in size and body shape, as well as the presence and pattern of bars or dots. (b) Geographical distribution and sites of collection of the three studied species in Uruguay. *Austrolebias affinis* (magenta) found in the department of Durazno, *A. reicherti* (green triangle) and *A. charrua* (red) cohabit the departments of Rocha and Treinta y Tres.

13.3 VERTEBRATE BRAIN AND THE ENVIRONMENT

The brains of living vertebrates are a reflection of the very diverse niches occupied by the different species that comprise each major taxon. The variation in complexity and relative brain size that exists across all living vertebrate groups and individual species is a direct function of the available niches and the adaptations of various species that successfully occupy them (Butler, 2009).

Bony fishes represent the largest radiation of vertebrates; they exhibit an enormous taxonomic and morphological diversity and occupy all available aquatic habitats. This diversity offers a great opportunity to relate ecological adaptations to morphology, including brain anatomy and sensory systems. Moreover, the anatomical variation among closely related species may represent trends favoring alternative evolutionary pressures toward functional specializations (sensory) of related structures as adaptations to environmental variation (Kotrschal et al., 1998).

Fish brains exhibit the arrangement of subdivisions typical of most vertebrates: forebrain, mid-brain, and hindbrain. However, the anatomy of fish brains has greater variation when compared to other vertebrates (Northcutt and Davis, 1983; Meek and Nieuwenhuys, 1998). This variation can be partially explained by their phylogenetic history along with functional specializations that result from their interaction with the environment (Kotrschal et al., 1998). The brain of fishes follows the overall embryological and developmental patterns of other vertebrates with few unique differences. The formation of the nervous system begins at the early stages of the embryo development. A thickening of the ectoderm forming the neural plate will be transformed during neurulation into the neural tube. Subsequently, the most anterior part of neural tube will give rise to the brain vesicles, whereas the posterior portion develops into the spinal cord. In the later development, it is possible to observe the formation of the three main vesicles: forebrain or telencephalon, midbrain or mesencephalon, and hindbrain or rhombencephalon. These primary swellings will subdivide,

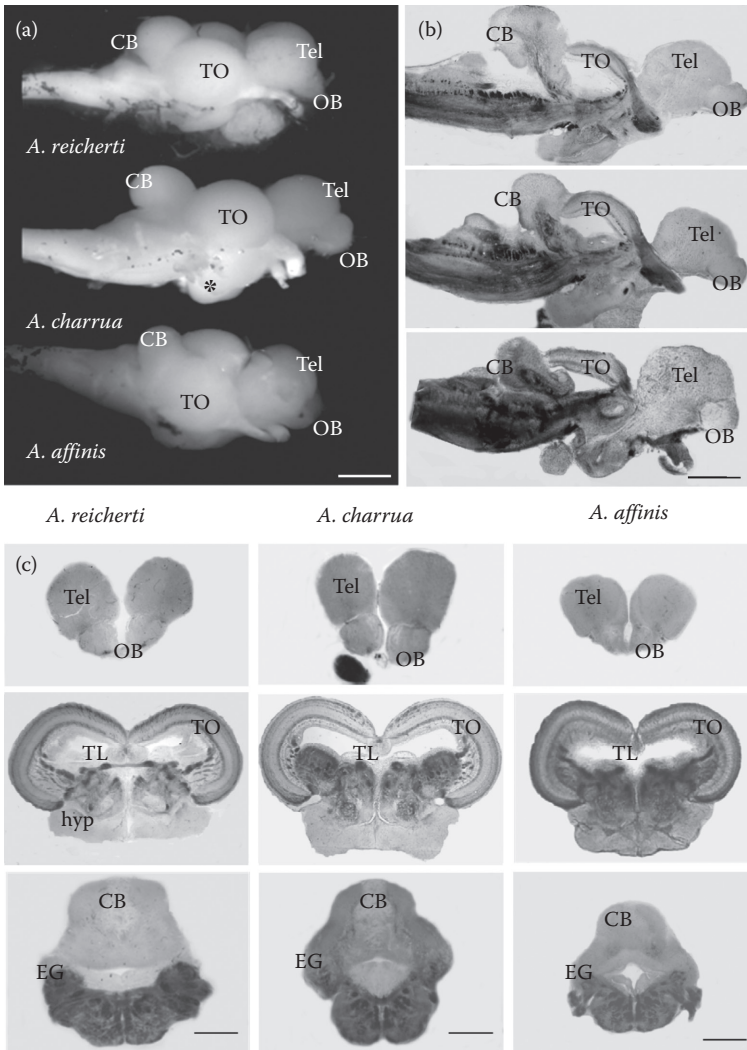


Figure 13.2 (a) Lateral views of the gross anatomy of *Austrolebias* brain showing the commonalities and differences in sizes and shapes. The differences in the cerebellum and olfactory bulbs (OB) are more pronounced when comparing *A. affinis* with the other two closely related species. The asterisk points to the hypothalamic lobes bulging from the ventral portion of *A. reicherti* brain. Prominent optic nerves are seen in all the species studied. (b) Corresponding vibratome parasagittal sections show the differences in brain with greater detail. (c) Unstained vibratome transverse sections showing the internal brain anatomy at different levels: telencephalon (upper), mesencephalon (middle), and rhombencephalon (bottom). Note the particular anatomical features of each species, such as the smaller size of the torus longitudinalis (TL) and the broader appearance of tectum opticum (TO) in *A. affinis*. *A. reicherti*, and *A. charrua* both present prominent OB and thinner TO. Different cerebellum (CB) profiles are also shown. Pictures show the myelinated fibers appearing dark, which allows the recognition of structures and regions even without any staining. Other abbreviations: Tel, telencephalon; OB, olfactory bulb; EG, eminentia granularis. Scale bar: 1 mm. (Reprinted from *Neuroscience*, 189, Fernández, A.S. et al., Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study, Figures 1 and 2, 12–24, Copyright (2011), with permission from Elsevier.)

and the forebrain gives rise to the paired telencephalic vesicles and the diencephalon, whereas the rhombencephalon will subdivide into the metencephalon and the myelencephalon. The relative development of these subdivisions is closely related to the phylogeny and adaptability of each species and has been suggested as the underlying cause of the wide variety in fish brains (Sanes et al., 2006). The development of the cerebral hemispheres of ray-finned fishes is radically different from that of all other vertebrates. The hemispheres increase in size and originally may have tended to an everted condition in which the medial hemispheres are separated by an extended sheet of choroid plexus (Aboitiz and Montiel, 2007). This process results in the eversion of the dorsal telencephalon, and the degree of eversion varies considerably among ray-finned fishes; consequently, the pallium (or dorsal telencephalon) shows significant structural diversity.

13.4 COMPARATIVE BRAIN ANATOMY OF THE STUDIED SPECIES

Among teleosts, *Austrolebias* is an annual genus belonging to the order Cyprinodontiformes (Atherinomorpha). Brain anatomy of Cyprinodontiformes has been reported for a few genera: *Fundulus heteroclitus* (Peter et al., 1975), *Xiphophorus helleri* (Anken and Rahmann, 1994), and *Nothobranchius furzeri* (D'Angelo, 2013); and also for *Oryzias latipes* (Ishikawa et al., 1999), a member of the order Beloniformes (Atherinomorpha), the closest relatives to Cyprinodontiformes (Saeed et al., 1994; Allen, 1998; Setiamarga et al., 2008). We reported the first study on the brain anatomy of *Austrolebias* (Fernández et al., 2011), and based on our results, we present here (1) an overview of its gross neuroanatomy, (2) a comparative analysis of the three species, and (3) a discussion of shared features and differences in a developmental/evolutionary context.

Overall, the brain anatomy of *Austrolebias* shares common features with various other groups of teleosts. These features do not show particular sensory or motor specialization, beyond those related to vision, which resulted in a relatively large tectum opticum (TO; Meek and Nieuwenhuys, 1998).

The adult brain of *Austrolebias* is characterized by a well-balanced development of the three major brain divisions (i.e., prosencephalon, mesencephalon, and rhombencephalon) and extends 4 mm into the rostrocaudal axis and 2 mm in the dorsoventral axis (Figure 13.2). The overall anatomy of *A. charrua* and *A. reicherti* brains is very similar. They are characterized by the following traits: (1) prominent, rounded, and sessile olfactory bulbs (OB), placed anterior and ventral to the hemispheres of the telencephalon; (2) an everted and well-developed telencephalon; (3) a diencephalon with paired and large inferior hypothalamus lobes bulging out on the ventral surface of the brain; (4) two prominent tectal halves located dorsally to the midbrain tegmentum and diencephalon; (5) a large rhombencephalon with a single and prominent cerebellum that differs in size among species (Figure 13.2); and (6) a large medulla oblongata. The cranial nerves seen in the images are representative of the general patterns found in other described teleosts. In contrast, *A. affinis* shows a compact brain with more ventral and less defined OB, large telencephalic areas relative to the TO, and a smaller cerebellum that just passes the level of the TO. Regarding the relative proportions between the size of telencephalic regions and TO among the species, *A. affinis* shows a large telencephalon, whereas in *A. reicherti* and *A. charrua* both regions are of the approximately equal size (Figure 13.2).

Regarding internal anatomy, transverse histological sections, at the same anatomical level, showed structural variations among the species (Figure 13.2). At the level of the telencephalon, *Austrolebias charrua* and *A. reicherti* have a notable increase in the size in dorsal-ventral axis, a more extended ventricular region, and broader interhemispheric distance relative to *A. affinis*. Furthermore, both species have a rounded and prominent OB, whereas *A. affinis* has triangular, smaller OB (Figure 13.2). In the mesencephalon there is the torus longitudinalis (TL), a small and unique medial structure found in ray-finned fishes that relays motor inputs to the TO. The TL is different among the three studied species. It is the largest and bilobed (appears with the shape of an

inverted heart) in *A. reicherti*, whereas in the other two species it is a single medial lobe, prominent in *A. charrua*, and small in *A. affinis*.

The TO consists of relatively expanded lobes on each side of the brain with the TL located between both halves and the third or tectal ventricle extending laterally into each tectal lobe. The TO consists of various layers of cell and fibers, with dendrites of many neurons oriented in a radial way and afferent fibers coursing through it and in parallel to the surface. The tectal wall is thickest in *A. affinis* (Figure 13.2). Transverse sections of the hindbrain revealed clear differences in the size, shape, and proportion of different cerebellar formations. *Austrolebias reicherti* has a wider corpus cerebelli, whereas *A. charrua* has the most prominent eminentia granularis and *A. affinis* has the smallest cerebellum but a larger ventricular area.

Whole brain 3D reconstructions, made by stacking serial transverse sections, showed similar overall brain volumes in the three studied species. However, a previous study has shown species-specific differences in relative volumes among brain regions. *Austrolebias reicherti* has the most prominent TO and cerebellum, *A. charrua* has the largest OB, and *A. affinis* the smallest TL (Fernández et al., 2011). The differences found in brain anatomy among the studied species could be correlated to habitat differences, since visual conditions for different teleostean species may vary dramatically, particularly depending on water turbidity and depth (Gruber et al., 1990).

13.5 CELL PROLIFERATIVE ZONES AND NEUROGENESIS: BrdU RESULTS AND 3D BRAIN RECONSTRUCTIONS

Cell proliferation zones in the brain of adult teleosts have long been recognized (Kirsche, 1967). However, little is known about location and neuroanatomical description of fish brain cell proliferation and neurogenic zones and, among the teleosts, information is limited to *Apteronotus leptorhynchus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Danio rerio*, and *Gymnotus omarorum* (Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc, 2006; Olivera-Pasilio et al., 2014). Early investigations of adult neurogenic niches in fishes, using classical histological approaches (Kirsche, 1967) and [³H]thymidine autoradiography (Rahmann, 1968; Kranz and Richter, 1970), identified major areas of mitotic activity in the brain of teleosts. Analysis of the types of newly generated cells, particularly study of cell proliferation in the TO and the continued formation of photoreceptors in the retina (Meyer, 1978; Johns, 1982), evidenced that newly born cells in the teleostean adult brain are capable of neuronal differentiation (Raymond and Easter, 1983). This finding strongly evidenced the existence of adult neurogenesis in teleost fishes. Subsequent progress and studies on adult neurogenesis in teleost fishes include (1) mapping and quantitative analysis of proliferative activity in the brain of several teleost species (Zupanc and Horschke, 1995; Zikopoulos et al., 2000; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006; Fernández et al., 2011); (2) demonstrated long-term persistence, neuronal differentiation, and integration of newly born neurons into already existing neural networks (Zupanc and Zupanc, 1992; Zupanc et al., 1996, 2005); (3) isolation and characterization of the stem cells that generate new neurons and glial cells (Hinsch and Zupanc, 2007); (4) potential of teleost fish to regenerate nervous tissue after injury by formation of new neurons (Zupanc and Zupanc, 2006); and (5) the identification of several proteins associated with neuronal regeneration (Zupanc and Zupanc, 2006). However, there are only few studies on adult neurogenesis in annual fishes: on the African *Nothobranchius* (Tozzini et al., 2012) and in *Austrolebias* among Neotropical annual fishes (Fernández et al., 2011).

13.6 BrdU METHOD TO IDENTIFY PROLIFERATING CELLS

We employed the most widely used marker to study cellular proliferation and identification of potentially neurogenic areas, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). BrdU is a synthetic nucleotide

analogue of thymidine. After injection, cells in the S phase of the cellular cycle incorporate BrdU to the DNA strand during replication. Subsequent detection, via immunohistochemistry, allows the identification of proliferating cells. Moreover, its combination with other antibodies allows determination of the lineage of newly generated cells (Rakic, 1974; Nowakowski and Hayes, 2000). Checking for location on the tissues as well as the type and number of labeled cells, it is possible to establish a chronology of cell proliferation and to evaluate its contribution to tissue composition.

13.7 BrdU APPLIED TO THE STUDY OF *AUSTROLEBIAS* BRAIN

BrdU was injected intraperitoneal to adult *Austrolebias* males that were processed 24 h later (Fernández et al., 2011). The brain of the studied species showed many proliferative zones with a concentration of BrdU-positive cells close to the ventricular walls. The pattern of cell proliferation in each region was similar in the three species. In the forebrain, the highest concentration of BrdU-positive cells was found ventrally on the rostral areas of the OB and on the transition region between the OB and the telencephalic lobes. In the latter structures, most of the BrdU-positive cells formed a narrow band contiguous to and following the overall shape of the ventricle. In the midbrain, the zones with the largest concentration of BrdU-positive nuclei were detected on the periphery of the TL and on its boundary with the medial poles of the TO. Whereas in the TO, BrdU-labeled cells were concentrated on the most superficial layer of the periventricular gray zone, equally distributed throughout the rostrocaudal axis. In the hindbrain, as in other teleosts, most of the BrdU-labeled cells were found on the granular layer of the corpus cerebelli, with few positive cells on the granular cell layer. In the caudal pole, BrdU cells were mostly concentrated on the region adjacent to the wall of the ventricle's granular layer. A peculiar distribution of BrdU nuclei that were arranged radially in the valvula cerebelli was found in *A. reicherti* (Fernández et al., 2011). This arrangement of BrdU nuclei is similar to, but more prominent than, the chains of "radial spokes" previously reported in the molecular layer up to the dorsal tip of the corpus cerebelli in zebrafish (Grandel et al., 2006).

Mapping and 3D reconstruction of proliferative zones of the *Austrolebias* showed a common pattern of distribution of BrdU-labeled cells characterized by the contiguity of the proliferation zones along the rostrocaudal axis throughout the brain. From the OB up to the medulla oblongata the concentration of BrdU-positive nuclei was located very close to the ventricular regions. Interestingly, cell proliferation in the cerebellum of *A. charrua* was concentrated on the medial portion, whereas in the other two species proliferation areas were distributed widely, forming lateral bands toward the periphery (Figure 13.3). This is in agreement with previous studies that reported cell proliferation zones located in the proximity of ventricles in a wide range of representative species of fishes, amphibians, reptiles, birds, and mammals (Kirsche, 1967; García-Verdugo et al., 2002; González-Granero et al., 2011). Furthermore, our 3D reconstruction of proliferation zones demonstrated that the contiguity of proliferative cells along the entire rostrocaudal brain axis in the three studied species is similar to that suggested in the mapping of some transverse sections of zebrafish brain (Hinsch and Zupanc, 2007).

13.8 NEUROGENESIS IN *AUSTROLEBIAS* BRAIN

Identification of proliferative cell lineages can be obtained by combining BrdU recognition with specific cell type markers. Double immunostaining for BrdU with the glial markers S-100 and glial acidic fibrillar protein (GFAP) showed that in the brain of *Austrolebias*, most of the BrdU-positive cells also coexpressed S-100. The analysis of colocalization of BrdU with the general neuronal marker HuC/D (Marusich and Weston, 1992) allowed identifying neurogenesis in *Austrolebias* as early as 24 h after BrdU injection. Newborn neurons were found in the OB, dorsal Tel, TO, TL, and CB in the three *Austrolebias* studied species. In Tel, TO, and TL, the newly born neurons were

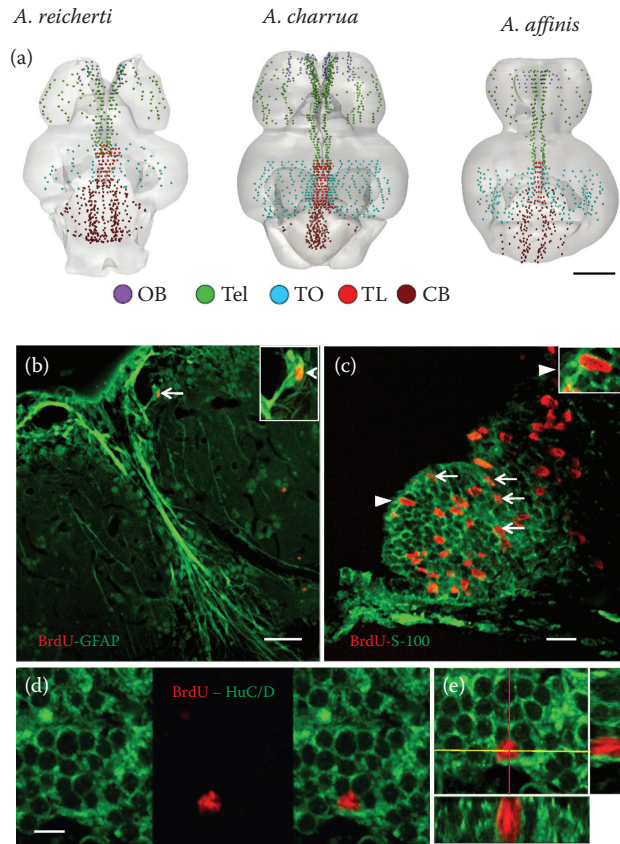


Figure 13.3 (a) Three-dimensional reconstruction and topographical representation of *Austrolebias* brain cell proliferative zones. Brains were fully and serially cut and then reconstructed with the BioVis 3D software. Dorsal views of 3D brain reconstructions in which BrdU-labeled nuclei have a contiguous distribution along the medial line throughout the rostrocaudal axis and its adjacency to the ventricle wall. The colored dots represent the places where 5–8 BrdU nuclei were found. The pattern of colors in the circles refers to the regions. OB, olfactory bulb; Tel, telencephalic ventricles; TO, tectum opticum; TL, torus longitudinalis; CB, cerebellum. Scale bar: 1 mm. (b–c) Gliogenesis in *Austrolebias* brain. (b) Immunocytochemistry for the glial marker GFAP (green) and BrdU (red) in a transverse section showing the medial line of the ventral zone of the tectal ventricle. A double-labeled cell is indicated with a white arrow in the panoramic view and in the higher-magnification inset. (c) Olfactory bulb transverse hemisection showing extensive double-labeling against the early glial marker S-100 (green) and BrdU (red). Colocalizations are indicated with white arrows. Arrowheads indicate one double-labeled cell at panoramic and higher magnification (inset), respectively. (d–e) Neurogenesis in *Austrolebias* brain. (d) Double immunostaining against the early neuronal marker HuC/D (green) and BrdU (red) in the granular zone of the cerebellum. An apparent colocalization was found in one newly born granular cell. (e) Stack from multiple confocal sections to demonstrate colocalization in the cell shown in (d). The stack of 6 μm contains 14 orthogonal planes, which analysis of the intersection point demonstrates to be the colocalization of both markers in the cell. Scales bars: (b) 40 μm , (c) 20 μm , (d, e) 15 μm . (Reprinted from *Neuroscience*, 189, Fernández, A.S. et al., Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study, Figures 8 and 9, 12–24, Copyright (2011), with permission from Elsevier.)

located close to the ventricular areas. Our results are significantly earlier than those reported for zebrafish, in which the earliest double-labeled cells (BrdU/HuC/D) were found in the telencephalon 3 days after BrdU administration and later (Adolf et al., 2006). Interestingly, zebrafish lifespan is about 3.5 years (Hinsch and Zupanc, 2007), whereas *Austrolebias* are annual fishes with a lifespan of about 9 months. Thus, the faster appearance of double-labeled proliferative cells with neuronal

markers in *Austrolebias* could reflect an overall earlier or accelerated neurogenesis program in fishes with a shorter lifespan. In zebrafish, the proportion of double BrdU/HuC/D-labeled cells increased over 2 weeks (Adolf et al., 2006). Accordingly, our preliminary results show that at 1 week after BrdU injection, the population of BrdU/HuC/D-positive cells increased notably. Unlike mammals, fish body and brain grow throughout the lifespan. This continuous brain growth includes constitutive neurogenesis and a high rate of neuron turnover largely throughout the lifespan (Zupanc, 2011). The brain of the electric fish *Gymnotus omarorum* showed many proliferative zones adjacent to the ventricular walls (Olivera-Pasilio et al., 2014). Thus, allometries may account for lifelong changes in brain morphology.

13.9 QUANTITATIVE ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION

Mitotic activity was found in all major divisions of the brain of adult *Austrolebias* with *A. reicherti* having the largest number of BrdU-positive cells. The cerebellum exhibited the highest value of cell proliferation in the three species. Quantitative analyses for other regions showed differences in OB, TO, and TL. *Austrolebias reicherti* and *A. charrua* showed similar values of cell proliferation in the OB and TO, but the TL of *A. charrua* has BrdU-positive cells that are about 50% of those found in *A. reicherti*. The brain of *A. affinis* showed the lowest proliferation value on the OBs and the highest in the TO. The TO of *Austrolebias* exhibited high mitotic activity, particularly on a specific area at the caudal pole, similar to previous reports for zebrafish (Zupanc et al., 2005). Proliferation in this region seems to have functional relevance for these macroptic fishes, given that visual input plays an important role during courtship (García et al., 2008). Among *Austrolebias* species, the TL was the region of the brain with the greatest anatomical differences, including size, shape, and proliferation rate. These differences may have functional importance, since the TL is functionally related to the TO, the eye movements, and visuotopic mapping (Butler and Hodos, 2005). As expected, the cerebellum, as the region that develops later (Hinsch and Zupanc, 2007), exhibited the largest number of mitotic cells in *Austrolebias*. This phenomenon has been reported for other teleosts and is linked to the late development of the cerebellum during postnatal life and parallel to the continuous fish brain growth throughout life (Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc, 2006). In summary, quantitative proliferation values found in *Austrolebias* are in agreement with data reported for zebrafish that exhibits abundant proliferation in the telencephalon, in the mantle zone of mesencephalon (TO and TL; Zupanc et al., 2005; Zupanc, 2006), and in other regions of the brain (Hinsch and Zupanc, 2007). The distribution of BrdU-labeled nuclei also resembles that reported for stickleback (Ekström et al., 2001). However, our results in *Austrolebias* differ from those reporting cell proliferation restricted to the ventricular zones in zebrafish (Grandel et al., 2006).

We analyzed cell proliferation in relation to the volume of each brain region, given that size of different brain regions varied. The volume of each region was calculated using 3D reconstruction by BioVis 3D software. Volume-normalized proliferation indexes were obtained by dividing the number of BrdU-positive nuclei by the volume of each brain region. These indexes were used as an initial approach to understanding the significance that cell proliferation may have in each brain zone and species. The TL shows the highest volume-normalized proliferation index of all brain regions analyzed: the TL of *A. affinis* has the highest index, almost three times that of *A. charrua*. Olfactory bulb indexes were the second largest, with *A. reicherti* having the highest value and *A. affinis* the lowest. The TO had the lowest normalized indexes among brain regions. The three species showed similar cerebellar proliferation indexes. Overall, except for the TL, other brain regions in *A. charrua* showed values intermediate to those of *A. affinis* and *A. reicherti*. It seems that the volume-normalized proliferation indexes found in OB and TO in the three species has inverse correlation. Whereas *A. reicherti* has the highest index value in the OB and the lowest in the TO, *A. affinis* has exactly the opposite (Figure 13.4). Differences in these values among species may be

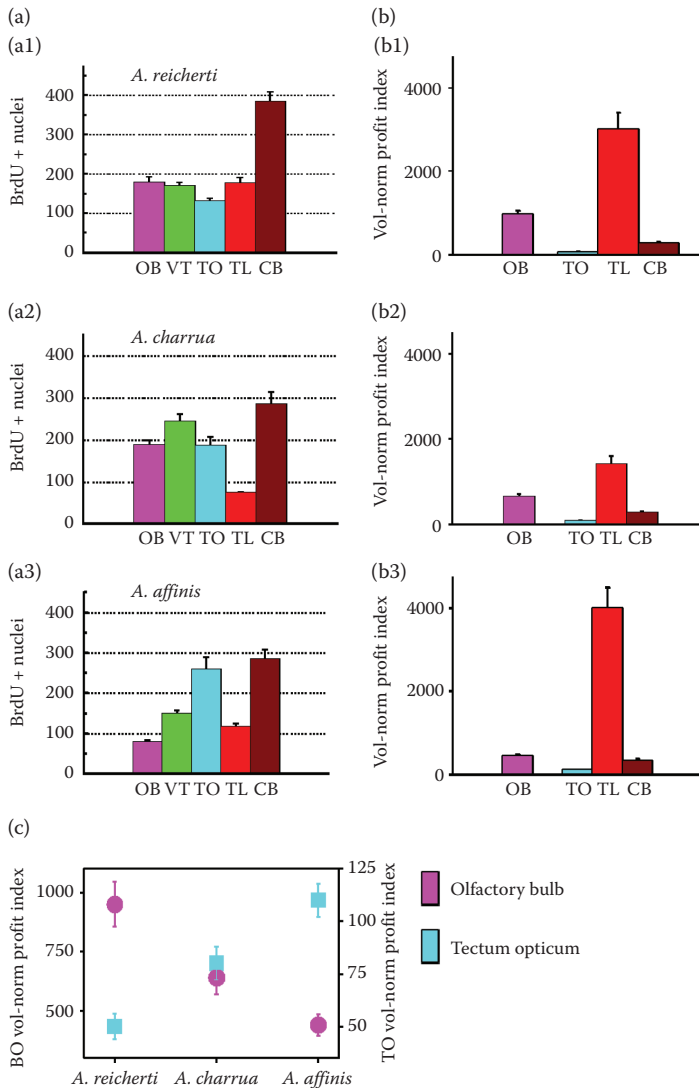


Figure 13.4 Quantitative analysis of total and volume-normalized cell proliferation in brain regions. (a) Whole BrdU-positive nuclei in olfactory bulb (OB), telencephalic ventricle zone (VT), tectum opticum (TO), torus longitudinalis (TL), and cerebellum (CB) in the three species studied. *Austrolebias reicherti* (a1) showed similar values in all regions except for the CB. *Austrolebias charrua* (a2) and *A. affinis* (a3) showed more heterogeneous patterns. TL and OB were the regions with less cell proliferation. (b) Volume-normalized proliferation indexes shown by *A. reicherti* (b1), *A. charrua* (b2), and *A. affinis* (b3) brain. The index was calculated as the ratio between the number of proliferating cells and the volume of each region determined with BioVis 3D. Values were calculated only for the regions that could be delimited in 3D brain reconstructions. The TL had the highest index value in the three species. OB was the second-most proliferative region but had different values among species. The CB showed the minor proliferation index in all species. (c) Inverse correlation of volume-normalized proliferation indexes in OB (pink) and TO (cyan). Whereas OB of *A. reicherti* had the highest index and TO the lowest, the inverse of that shown for *A. affinis*. *Austrolebias charrua* exhibited an intermediate behavior. In all cases, descriptive statistical analysis was made with Sigma Stat 2.0. Data were plotted using Origin 8.0. (Reprinted from *Neuroscience*, 189, Fernández, A.S. et al., Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study, Figure 7, 12–24, Copyright (2011), with permission from Elsevier.)

functionally important. *Austrolebias affinis* showed high volume-normalized proliferation indexes in vision-related areas (TO and TL), but lowest values in OBs. Conversely, *A. reicherti* exhibited inverse patterns; this may point to differences in the hierarchy of sense modalities between these species. Furthermore, it may suggest that proliferation capacity may be correlated to phylogenetic relationship and/or shared habitat. Volume-normalized proliferation indexes of regions involved in different sensorial modalities suggest an evolutionary trend favoring olfaction. In this context, *A. reicherti* has highest proliferation indexes in OB and lowest in the TO, whereas *A. affinis* showed the inverse pattern. Indeed, vision is important in *Austrolebias*, because males are elaborately colored, and both coloration and size play an important role in sexual courtship (García et al., 2008; Passos et al., 2014). In addition, recent behavioral studies suggest that olfaction directs *A. reicherti* females to find and select males (Passos, 2013), suggesting that olfaction seems at least equally as important as vision in this species.

Recently, we have described the centrifugal olfacto-retinal system of *Austrolebias*, a constant component of the CNS that appears to exist in all vertebrates and is part of the terminal nerve (TN) complex (Rosillo et al., 2013). TN allows the integration of different sensory modalities, and its anatomical variability may have functional and evolutionary significance. We suggest that in *Austrolebias*, the olfacto-retinal branch of the TN is an important anatomical link that allows the functional interaction between olfactory and visual systems. The olfacto-retinal TN branch of *Austrolebias* is well developed and complex, consisting of different neuronal groups. Moreover, the presence of constitutive gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-positive neurons indicates a role in sexual and reproductive behaviors (Kawai et al., 2009). Furthermore, *Austrolebias* presents a rostral group of neurons that is the main component of the link between retinal and olfactory pathways that has not been previously reported in other teleosts and may suggest a higher hierarchy of TN *Austrolebias*. The circuitual organization of the pathway changes depending on the group of vertebrate analyzed (Kawai et al., 2009). Small differences may be related to the hierarchy of each sensory modality, even among closely related species such as the three species of *Austrolebias* studied. Consequently, some of the observed differences in the olfacto-retinal pathway in *Austrolebias* may be explained by ecological differences in habitats. The ponds inhabited by *Austrolebias* differ in vegetation, with varying light conditions, particularly depending on the turbidity and depth of the water (Zucker and Dowling, 1987), which may influence the sensory modalities used. Thus, the proliferative and neurogenic activity of each brain region involved in different sensory modalities can reflect the functional activity of this area.

13.10 CHARACTERISTICS OF THE NEUROGENIC NICHES

During embryogenesis, the folding of the neural ectoderm gives rise to the CNS primordium, and its cavities will constitute the future ventricular brain regions. In adults the “ventricular zone” is formed by the layer of cells that lines the brain ventricles. Cells present in these zones maintain their proliferative and neurogenic capacity similar to what happens during embryo neurogenesis (Gross, 2000; García-Verdugo et al., 2002). Thus, these zones are called “matrix zones” or “neurogenic niches” and constitute the embryonic reservoirs from which differentiation can result in neuronal or glial cells, according to the system’s needs. The fine structure of these proliferative sites has been extensively studied in mammals (Alvarez-Buylla et al., 2001) and is less known in reptiles and birds (García-Verdugo, 2002; González-Granero et al., 2011). Neurogenic niches are formed by a variety of types of cells. In mammals, these niches contain four different cell types: multiciliated ependymal cells, (type E), astrocytes (type B), transit-amplifying cells (type C), and migrating neuroblasts (type A) (Doetsch et al., 1999). A mix of radial glial cells, ependymal multiciliated cells, and proliferative neuroblasts has also been described in the brains of adult canary birds (Alvarez-Buylla and

Temple, 1998) and reptiles (García-Verdugo et al., 2002). The ventricular zone of the telencephalon in zebrafish has three types of cells: GFAP+ radial glial cells, PCNA+ proliferative cells, and PSA-NCAM+ neuroblasts, revealing similarities to and differences from the ventricular neurogenic niches of mammal brains (Sawada and Sawamoto, 2013).

In mammals the cells proposed as the “neural stem cell” (NSC) are the type B astrocytes, whereas Pax6-positive radial glial cells (Götz and Barde, 2005) are proposed as NSCs in reptiles and birds. Both cell types preserve some features of the monociliated cells that constitute the neural tube. However, a current controversial issue regarding neurogenic niches is the determination of the structural characteristics that identify the NSCs. Neural stem cells are defined as cells that possess the ability to self-renew and generate the three major cell types in the CNS (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes in mammals; Gage, 2000; Temple, 2001; Okano, 2002). NSCs originate from the pseudostratified monociliated epithelium of the neural tube and preserve the primary cilium projecting into the ventricle lumen as a structural landmark (Mori et al., 2005; Chapouton et al., 2007; Kazanis et al., 2008; Rodríguez, 2012) that is essential for retaining pluripotent capacities (Mizraheh et al., 2011; Wang et al., 2009).

Another remarkable difference among adult vertebrates is related to the number of the NSC reservoirs. Whereas in adult mammalian brain neurogenic niches are restricted to the subventricular and subgranular sites, many of those niches are reported in different sites of brain ventricular walls in nonmammalian vertebrates (García-Verdugo et al., 2002; Sawada and Sawamoto, 2013). Similar to their avian relatives, reptiles contain only one big primary neurogenic compartment that extends through the whole periventricular zone of the lateral ventricular walls. Moreover, proliferation in the adult reptilian brain follows a pattern similar to embryonic brain development (Lindsey and Tropepe, 2006).

Studies in teleost fishes described cells with proliferative and neurogenic capacities in the neighborhood of the ventricles in many regions of the CNS, but the ultrastructure of those sites has been studied only in a few species (Zupanc, 2006; Rosillo et al., 2010; Sawada and Sawamoto, 2013). A comparative study showed that these mitotically active regions have both characteristics common to all groups and some characteristics unique to each group studied (Doetsch and Scharff, 2001). In *Austrolebias* there are numerous proliferative zones lining the ventricles of the telencephalon, the TO, and the TL (Fernández et al., 2011). Such regions exhibit different cell populations similar to those observed in other neurogenic niches (Rosillo, 2010).

13.11 SUBCELLULAR MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE TELENCEPHALIC VENTRICULAR EPITHELIUM OF *AUSTROLEBIAS*

A transmission electron microscopy (TEM) analysis of the ventricular zone of the telencephalon (TVZ) identified in at least three well-differentiated cell types: (1) Type I cells lining the ventricles that present with heterochromatic nuclei (with variable profiles) and an electron-dense cytoplasm due to the abundant free ribosomes and rough endoplasmic reticulum. Most of these cells have a single cilium oriented toward the ventricular lumen. (2) Type II cells bordering the ventricular lumen intermingled among type I cells or just a line behind it. Their cytoplasm is lighter than type I cells and has a remarkable development of the cytoskeleton with large areas occupied by bundles of filaments that suggest a glial nature. The nuclear envelope has indentations, and the chromatin is homogeneous with a moderate degree of condensation. Some type II cells show a single cilium. (3) Type III cells are arranged one or two cell lines away from the ventricular lumen. These cells have an abundant and electron-lucid cytoplasm with a large, spherical, and euchromatic nucleus with one or two prominent nucleoli, strongly suggesting that type III cells probably are newly formed neurons. The immunocytochemistry images obtained with the antineuronal HuC/D antibody confirmed the neuronal identity of these cells (Rosillo et al., 2010).

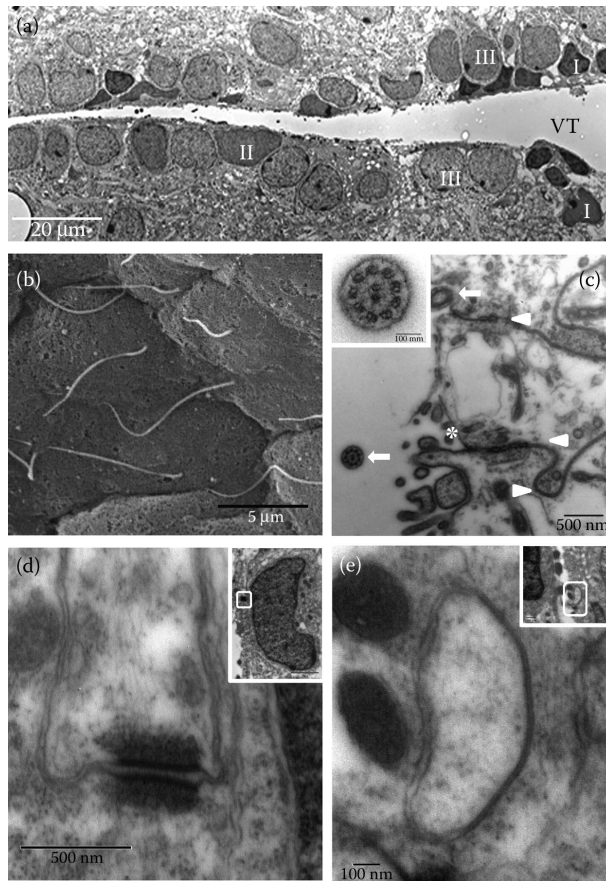


Figure 13.5 TEM and SEM ultrastructural features of *A. charrua* ventricular zone of the telencephalon (TVZ). (a) Dorsoroventral panoramic view obtained from thin-section overlapped TEM pictures, evidencing three well-differentiated cell types: type I cells characterized by the most electron-dense nucleus of variable profiles and dark cytoplasm enriched in ribosomes; type II cells that are close to the ventricle and show nuclei with intermediate electron density and size. These cells in general are bigger than I type. Type III cells are young neurons bearing electron-lucid and round nuclei with one or two nucleoli. (From Rosillo, J.C. et al. 2010. *Microscopica Acta* (Figure 2d) 19: 152–159. With permission.) (b) SEM topographic view of TVZ evidencing that all of the cells that line the wall bear a single cilium. All cilia present are similar in length and appearance and have a thinner end. (c) TEM micrograph showing different cell membrane specializations, including microvilli (*), different intercellular junctions (arrowhead), and cilium (arrow). The inset shows the typical microtubule structure of a single cilium consisting of the arrangement of 9 + 2 pairs of microtubules. (d) TEM micrograph showing the presence of a prominent desmosome interacting with long intermediate filaments of cell cytoskeleton. The white box in the inset shows the location of the desmosome. (e) TEM of gap junction connecting neighboring cell membranes. The box in the inset shows the panoramic location of the intercellular communication zone.

TEM analysis of the ciliary axoneme of type I and II cells (Figure 13.5) showed that it is composed of nine doublets of outer microtubules surrounding a central pair in the characteristic “9 + 2” pattern. The minus axonemal microtubule ends are bound to the basal body located in the cytoplasm (Figure 13.5). This basal body has a structure similar to a centriole (9 triplets + 0) and acts as an organizing center for microtubules in axoneme formation (Dawe et al., 2006). The cilium ranges in length from 8 to 10 μm . We did not find multiciliated cells in the ventricular wall of the telencephalon of *Austrolebias* (Rosillo et al., 2010). This finding was contrary to the abundance

of multiciliated cells reported for the ventricular walls of mammals and the few ones described in reptiles and zebrafish (Sawada and Sawamoto, 2013).

13.12 INTERCELLULAR JUNCTIONAL COMPLEXES AT NEUROGENIC NICHES

Most of the cell junctions have been described in different regions of vertebrate CNS, mainly in mammals (Peters et al., 1991). The development of “junction complexes” among cells of the brain proliferative zones is particularly interesting due to their potential roles in the dynamics of cell division in neurogenic niches. Moreover, apically localized cell junctions and the apicobasal polarity complexes have been implicated in the asymmetric cell division of neural proliferative cells (Farkas and Huttner, 2008; Hatakeyama, 2014).

In *Austrolebias* brain, we found that the ventricular cells form an intricate network of processes that overlap and interdigitate each other, showing a significant development of tight, gap, and adherens junctions, as well as desmosomes, that bind and connect cells to each other (Rosillo et al., 2010; Casanova et al., 2014). Tight junctions are a network of transmembrane proteins always located between adherens junctions and the ventricular lumen (Grupp et al., 2010). We observed that the membranes of neighboring cells in the ventricles of *Austrolebias* have tight junctions forming points of cell-to-cell adhesion that seal the more apical intercellular space of the ventricular wall. Similarly, junctional complexes in the glial membranes were found on the ventricular surfaces of the TO and telencephalon of zebrafish brain (Grupp et al., 2010). In this species, radial glial cells contacting the ventricle bear tight junctions and form a kind of barrier between the ventricular cerebrospinal fluid and the neuronal compartment. Close to the tight junctions, it is often possible to observe the presence of adherens junctions. In *Austrolebias*, adherens junctions were found among almost all the cells that line the ventricular lumen of the telencephalon. TEM analysis showed (Figure 13.5) that each adherens junction is a 30-nm-thick plaque of dense material placed in the cytoplasmic face of both plasma membranes (Casanova et al., 2014). In *Austrolebias*, ventricular desmosomes are well developed and variable in size and length. The number of intermediate filaments anchored to each desmosome and their distinct continuity with cytoskeleton is notable. The lateral membranes of adjacent cells often interdigitate and sometimes attach through desmosome-like junctions (Casanova et al., 2014). In addition, to have complexes that join together, the cells of the ventricular walls connect with each other via gap junctions. Gap junctions consist of transmembrane proteins (i.e., connexins, Cx in the text) that form complexes called connexons that play a role coordinating cells and the exchange of molecules and ions, enhancing the chemical and electrical coupling among cells. In neurogenic precursors, functional coupling via gap junctions has been reported as a basic and phylogenetically conserved mechanism (Nakase and Naus, 2004). This coupling appears to involve both neural precursors and radial glia (Bittman et al., 1997). In mammals, the cells of the ventricle walls express Cx43 and Cx26 (Bittman and Lo Turco, 1999), as also occurs in the central channel of the spinal cord of turtles, another neurogenic niche (Russo et al., 2006). In adult *Austrolebias*, glial cells are often connected to each other through gap junctions that express Cx43. Furthermore, these gap junctions are generally located close to desmosomes and to the ventricular surface, extending along large surfaces. Gap junctions are also present among cell interdigitations (Casanova et al., 2014).

High proliferation and the presence of undifferentiated cells bearing a single cilium that projects toward the ventricular lumen, together with cell heterogeneity found in the TVZ of *Austrolebias*, are consistent with the characteristics reported for other neurogenic niches (García-Verdugo et al., 2002; Sawada and Sawamoto, 2013). Moreover, the appearance and distribution of the three cell types described here are consistent with those reported on the wall of the third ventricle of the brain in the teleost *Eigenmannia* sp. (Zupanc, 1992). In addition, the presence of electron-dense nuclei, with marked indentations (equivalent to the *Austrolebias* type I cells), in *Eigenmannia* sp. also suggest high mitotic activity (Zupanc and Zupanc, 1992). Type II cells show ultrastructural characteristics

that are comparable with those S100+ cells described by Zupanc (1992) as “intermediate cells.” Their characteristics suggest that they could be proposed to be NSCs of the *Austrolebias* TVZ. Finally, the characteristics of type III cells coincide with those previously identified as “young and migrating neurons” (Zupanc, 2001).

13.13 CONCLUSIONS

The analysis of the comparative brain anatomy of the genus *Austrolebias* allows us to conclude that these annual fishes share common features with other teleosts that show no particular specializations beyond those related to vision. However, the *Austrolebias* species studied showed anatomical and cell proliferation differences across the main brain divisions. In addition to having comparable brain volumes, *A. reicherti* and *A. charrua* showed the greatest similarity in terms of size, shape, and arrangement of the larger cerebral divisions. These similarities are consistent with their phylogenetic relationship and/or because they inhabit similar environments. However, both species showed significant size and shape differences in the TL. *Austrolebias affinis*, a more distantly related species, has significant differences in the TL but also in the OB, TO, and cerebellum. These differences could be attributed to variations in the environments. Visual conditions for different teleost species may vary dramatically depending on water turbidity and depth and the hierarchy of sensory modalities used. Using BrdU, we identified, quantified, and mapped cell proliferation throughout the entire brain of the three analyzed species. Significant cell proliferation was found in all brain subdivisions, showing remarkable continuity along the rostrocaudal axis and proximity to ventricle walls. Patterns of proliferation areas were similar to those reported for other teleosts. However, the brain regions related to different sensory modalities exhibited different proliferation indexes depending on phylogeny or environment. The largest variations in cell proliferation indexes were found in the OB and TO. Whereas *A. reicherti* presents the highest values in the OB and the lowest in the TO, *A. affinis* exhibits the inverse pattern. Indeed, vision is important in *Austrolebias* for social communication, sexual courtship, and mating, but other studies suggest that olfaction seems at least equally important in *A. reicherti*. In summary, the different proliferation indexes may suggest a high plasticity that probably reflects plastic adaptations to diverse environmental pressures.

Coimmunolabeling of BrdU with cell lineage markers showed that adult *Austrolebias* have gliogenesis and early neurogenesis throughout all brain regions. We suggest that the rapid appearance of BrdU+ cells bearing neuronal markers in *Austrolebias* could reflect a relatively rapid neurogenesis program related to their short lifespan. Adult neurogenesis could enable the dynamic remodeling of mature neuronal circuits by adding new neurons, contributing to structural and functional plasticity in the adult brain. In this context, adult neurogenesis seems a fundamental mechanism for experience-dependent plasticity, which is the most important feature of the adult brain. Recent reports have indicated that environmental stimuli, such as exercise, exploration, enriched environments, learning, and memory, improve the rate of the generation of new neurons (Kempermann, 2011). Adult neurogenesis could also have an important role in the injured brain in regenerating lost neurons from adult NSCs.

The complex biological events that occur in neurogenesis are only possible due to the particular features of neurogenic zones. Studies performed in the proliferative zones of *Austrolebias* showed that neurogenic niches have characteristics in common with other vertebrates, including the variety of cell types. In *Austrolebias*, we recognized glial and neuronal cells in distinct differentiation stages and also undifferentiated cells that could not be classified in any lineage. The presence of a single cilium in most cells lining the ventricular lumen seems a unique feature for *Austrolebias*. In addition, the absence of multiciliated cells contacting the ventricular lumen, reported in neurogenic niches of mammals and reptiles, seems also unique in these fishes. Another particular feature found in *Austrolebias* is the existence of many types of intercellular junctions, including desmosomes and gap junctions. This degree of organization suggests a highly dynamic zone where the intercellular

junction may play a role in cell movements during mitotic activity. On the other hand, anchoring junctions could be important in the maintenance of the everted epithelia of *Austrolebias* forebrain.

REFERENCES

- Aboitiz, F. and J. Montiel. 2007. *Origin and Evolution of the Vertebrate Telencephalon, with Special Reference to the Mammalian Neocortex*. Berlin: Springer, Science & Business Media.
- Adolf, B., P. Chapouton, C.S. Lam et al. 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental Biology* 295: 278–293. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.023
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *The Cell*. 5th edition. 1131–1204. New York: Garland Science.
- Allen, G.R. 1998. *Encyclopedia of Fishes*. J.R. Paxton and W.N. Eschmeyer (eds.). 153–156. San Diego, CA: Academic Press. ISBN 0-12-54766.
- Alvarez-Buylla, A. 1992. Neurogenesis and plasticity in the CNS of adult birds. *Experimental Neurology* 115: 110–114. doi: 10.1016/0014-4886(92)90232-F
- Alvarez-Buylla, A. and J.M. García-Verdugo. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience* 22: 629–634. doi: 0270-6474/02/220629-06\$15.00/0
- Alvarez-Buylla, A., J.M. García-Verdugo, and A.D. Tramontin. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 287–293. doi: 10.1038/35067582.
- Alvarez-Buylla, A., C.Y. Ling, and N. Nottebohm. 1992. High vocal center growth and its relation to neurogenesis, neuronal replacement and song acquisition in juvenile canaries. *Journal of Neurobiology* 23: 396–406. doi: 10.1002/neu.480230406
- Alvarez-Buylla, A. and S. Temple. 1998. Stem cells in the developing and adult nervous system. *Journal of Neurobiology* 36: 105–110. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<105::AID-NEU1>3.0.CO;2-5
- Alvarez-Buylla, A., M. Theelen, and F. Nottebohm. 1990. Proliferation “Hot Spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5: 101–109. doi: 10.1016/0896-6273(90)90038-H
- Anken, R.H. and Rahmann, H. 1994. *Brain Atlas of the Adult Swordtail Fish Xiphophorus helleri and of Certain Developmental Stages*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Banerjee, S., A.D. Souza, and M.A. Bhat. 2006. Organization and function of septate junctions: An evolutionary perspective. *Cell Biochemistry and Biophysics* 46: 65–77. doi: 10.1385/CBB: 46: 1: 65
- Berois, N., M.J. Arezo, N.G. Papa, and G.A. Clivio. 2012. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *WIREs Developmental Biology* 1: 595–602. doi: 10.1002/wdev.39
- Bittman, K.S. and J.J. Lo Turco. 1999. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cerebral Cortex* 9: 188–195. doi: 10.1093/cercor/9.2.188
- Bittman, K.S., D.F. Owens, A.R. Kriegstein, and J.J. Lo Turco. 1997. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *Journal of Neuroscience* 17: 7037–7044. NII Article ID (NAID): 10016130012 0270-6474/97/177037-08\$05.00/0.
- Bullock, T.H. 1984. Comparative neuroscience holds promise for quiet revolutions. *Science* 225: 473–478.
- Butler, A.B. 2009. *Evolution of Vertebrate Brains*. Fairfax, VA, USA: George Mason University, Elsevier Ltd.
- Butler, A.B. and W. Hodos. 2005. Overview of the midbrain. In: *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. N.J. Hoboken (ed.). 57–66. Hoboken, NJ: Wiley.
- Casanova, G., J.C. Rosillo, S. Olivera, and A. Fernández. 2014. Ultrastructural features of progenitors cells in the *Austrolebias* brain. *Paper Presented at the 18th International Microscopy Congress*. Prague, Check Republic.
- Chapouton, P., R. Jagasia, and L. Bally-Cuif. 2007. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays* 29: 745–757. doi: 10.1002/bies.20615
- Costa, W.E.J.M. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): Phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213: 1–162.
- D’Angelo, L. 2013. Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *The Anatomical Record* 296: 681–691. doi: 10.1002/ar.22668
- Dawe, H.R., H. Farr, and K. Gull. 2006. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of Cell Science* 120: 7–15. doi: 10.1242/jcs.03305

- Doetsch, F. 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience* 6: 1127–1134. doi: 10.1038/nn1144
- Doetsch, F., I. Caille, D.A. Lim, J.M. García-Verdugo, and A. Álvarez-Buylla. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703–716. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80783-7
- Doetsch, F. and C. Scharff. 2001. Challenges for brain repair insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain, Behavior and Evolution* 58: 306–322. doi: 10.1159/000057572
- Ekström, P., C.M. Johnsson, and L.M. Ohlin. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *Journal of Comparative Neurology* 436: 92–110. doi: 10.1002/cne.1056
- Farkas, L.M. and W.B. Huttner. 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Current Opinion in Cell Biology* 20: 707–715. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.008
- Fernández, A.S., J.C. Rosillo, G. Casanova, and S. Olivera-Bravo. 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study. *Neuroscience* 189: 12–24. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.063
- Gage, F.H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433–1438. doi: 10.1126/science.287.5457.1433
- García, G., F.Y. Álvarez-Valfín, and N. Gómez. 2002. Mitochondrial genes: Signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 49–59. doi: 10.1111/j.1095-8312.2002.tb01713.x
- García, G., S. Claramunt, A.I. Lalanne. 2004. Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a biosphere reserve site from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes* 70: 247–256. doi: 10.1023/b:ebfi.0000033339.55585.f6
- García, G., V. Gutiérrez, N. Ríos et al. 2014. Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genética* 142: 87–98. doi: 10.1007/s10709-014-9756-7
- García, G., M. Loureiro, N. Berois et al. 2009. Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society London* 98: 620–635. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01303.x
- García, D., M. Loureiro, and B. Tassino. 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Neotropical Ichthyology* 6: 243–248. doi: 10.1590/S1679-62252008000200012
- García-Verdugo, J.M., S. Ferron, N. Flames, L. Collado, E. Desfilis, and E. Font. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Research Bulletin* 57: 765–775. doi: 10.1016/s0361-9230(01)00769-9
- García-Verdugo, J.M., S. Llahi, I. Ferrer, and C. Lopez-García. 1989. Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neuroscience Letters* 98: 247–252. doi: 10.1016/0304-3940(89)90408-4
- González-Granero, S., M. Lezameta, and J.M. García-Verdugo. 2011. Adult neurogenesis in reptiles. In: *Neurogenesis in Adult Brain I Neurobiology*. T. Seki, K. Sawamoto, J.M. Parent, and A. Alvarez-Buylla (eds.). Tokyo, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. doi: 10.1007/978-4-431-53933-9_6
- Götz, M. and Y.A. Barde. 2005. Radial glial cells: Defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46: 369–372. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.012
- Grandel, H., J. Kaslin, J. Ganz, I. Wenzel, and M. Brand. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology* 295: 263–277. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.040
- Gross, C.G. 2000. Neurogenesis in the adult brain: Death of the dogma. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 308–315. doi: 10.1038/35036235
- Gruber, S.H., E.R. Loew, and W.N. Mc Farland. 1990. Rod and cone pigments of the Atlantic guitarfish, *Rhinobatos lentiginosus* Garman. *Journal of Experimental Zoology* 5 (Suppl.): 85–87. doi: 10.1002/jez.1402560512
- Grupp, L., H. Wolburg, and A.F. Mack. 2010. Astroglial structures in the zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology* 518: 4277–4287. doi: 10.1002/cne.22481

- Hatakeyama, J., Y. Wakamatsu, A. Nagafuchi, R. Kageyama, R. Shigemoto, and K. Shimamura. 2014. Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development* 14: 1671–1682. doi: 10.1242/dev.102988
- Hinsch, K. and G.K.H. Zupanc. 2007. Generation and long-term survival in the adult zebrafish brain: A quantitative analysis. *Neuroscience* 146: 679–696. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.01.071
- Ishikawa, Y., M. Yoshimoto, and H. Ito. 1999. A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal of Medaka* 10: 1–26. doi: 10.1159/000006577
- Johns, P.R. 1982. Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *Journal of Neuroscience* 2: 178–198.
- Kawai, T., Y. Oka, and H. Eisthen. 2009. The role of the terminal nerve and GnRH in olfactory system neuro-modulation. *Zoological Science* 26: 669–680. doi: 10.2108/zsj.26.669
- Kazanis, I., J. Lathia, L. Moss, and C.F. Constant. 2008. *The Neural Stem Cell Microenvironment*. D. Scadden (ed.), StemBook, The Stem Cell Research Community.
- Kempermann, G. 2011. Regulation of adult neurogenesis by environment and learning. In *Neurogenesis in the Adult Brain I. Neurobiology*. T. Seki, K. Sawamoto, J.M. Parent, and A. Alvarez-Buylla (eds.). 271–284. Tokyo, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. doi: 10.1007/978-4-431-53933
- Kirsche, W. 1967. Über postembryonale Matrixzone im Gehirn verschiedener Vertebraten und deren Beziehung zur Hirnbauplanlehre. *Zeitschrift für Mikroskopisch-anatomische Forschung* 77: 313–406.
- Kotrschal, K., M.J. Van Staaden, and R. Huber. 1998. Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8: 373–408.
- Kranz, D. and W. Richter. 1970. Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation der Matrixzonen des Diencephalons von juvenilen und adulten *Lebistes reticulatus* (Teleostei). *Zeitschrift für Mikroskopisch-anatomische Forschung* 82: 42–66.
- Lane, N. 1984. A comparison of the construction of intercellular junctions in the CNS of vertebrate and invertebrates. *Trends in Neurosciences* 7: 95–99. doi: 10.1016/s0166-2236(84)80165-4
- Lindsey, B.W. and V. Tropepe. 2006. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology* 80: 281–307.
- Loureiro, M. and G. García. 2008. *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa* 1940: 1–15. ISSN 1175-5334 (online edition).
- Marusich, M.F. and J.A. Weston. 1992. Identification of early neurogenic cells in the neural crest lineage. *Developmental Biology* 149: 295–306. doi: 10.1016/0012-1606(92)90285-o
- Meek, J. and R. Nieuwenhuys. 1998. Holosteans and teleosts. In: *The Central Nervous System of Vertebrates*. R. Nieuwenhuys, H.J. Ten Donkelaar and C. Nicholson (eds.). 759–937. Berlin: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-18262-4_15
- Meyer, R.L. 1978. Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Experimental Neurology* 59: 99–111. doi: 10.1016/0014-4886(78)90204-2
- Mirzadeh, Z., Y.G. Han, J.M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2011. Chapter 12: Epithelial organization of adult neurogenic germinal niches. In: *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology*. T. Seki et al. (eds.). USA: Springer. doi: 10.1007/978-4-431-53933-9_12
- Mori, T., A. Buffo, and M. Gotz. 2005. The novel roles of glial cells revisited: The contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Current Topic in Developmental Biology* 69: 67–99. doi: 10.1016/s0070-2153(05) 69004-7
- Mori, M., Y. Rikitake, K. Mandai, and Y. Takai. 2014. Roles of nectins and nectin-like molecules in the nervous system. *Advances in Neurobiology* 8: 91–116. doi: 10.1007/978-1-4614-8090-7_5
- Morshead, C.M., B.A. Reynolds, C.G. Craig et al. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian fore-brain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: 1071–1082. doi: 10.1016/0896-6273(94)90046-9
- Nakase, T. and C.C.G. Naus. 2004. Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes* 1662: 149–158. The Connexins. Review. doi: 10.1016/j.bbmem.2004.01.009
- Nelson, J. 2006. *Fishes of the World*. 4th edition. New Jersey: Wiley and Sons, Inc. doi: 10.1007/s11160-006-9004-z
- Nieuwenhuys, R. and J. Meek. 1990. The telencephalon of actinopterygian fishes. In: *Comparative Structure and Evolution of Cerebral Cortex, Part I*. E.G. Jones and A. Peters (eds.). 31–73. New York: Plenum. doi: 10.1007/978-1-4757-9622-3_2

- Northcutt, R.G. 1983. Evolution of the optic tectum in ray-finished fishes. In: *Fish Neurobiology: Higher Brain Areas and Function*, Vol. 2. R.E. Davis and R.G. Northcutt (eds.). 1–42. Ann Arbor, MI: The University of Michigan Press.
- Nowakowski, R.S. and N.L. Hayes. 2000. New neurons: Extraordinary evidence or extraordinary conclusion. *Science* 5: 771. doi: 10.1126/science.288.5467.771a
- Olivera-Pasilio, V., D.A. Peterson, and M.E. Castelló. 2014. Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 88. doi: 10.3389/fnana.2014.00088
- Okano H. 2002. Stem cell biology of the central nervous system. *Journal of Neuroscienc Resesearch* 69(6): 698–707. Review.
- Passos, C. 2013. *Austrolebias*: un modelo para explorar la selección sexual. PhD thesis. Faculty of Sciences, UdelaR. Uruguay.
- Passos, C., B. Tassino, F. Reyes, and G.G. Rosenthal. 2014. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish. *Austrolebias reicherti*. *Plos One* 9: 1–5.
- Peter, R.E., M.J. Macey, and V.E. Gill. 1975. A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Comparative Neurology* 159: 103–127. doi: 10.1002/cne.901590107
- Peters, A., S.L. Palay, and H. deF. Webster. 1991. *Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*. 3rd edition. USA: Oxford University Press.
- Rahmann, H. 1968. Autoradiographische Untersuchungen zum DNS-Stoffwechsel (Mitose-Häufigkeit) im ZNS von *Brachydanio rerio* HAM. BUCH. (Cyprinidae, Pisces). *Journal für Hirnforschung* 10: 279–284.
- Rakic, P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: Systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183: 425–427. doi: 10.1126/science.183.4123.425
- Raymond, P.A., S.S. Easter, J.A. Burnham, and M.K., Powers. 1983. Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. II. Modulation of cell proliferation by retinal fiber input. *Journal of Neuroscience* 3: 1092–1099. doi: 0270~6474/83/0305-1092\$02.00/O
- Rodríguez, E.M., M.M. Guerra, K. Vío et al. 2012. A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biological Research* 45: 231–241. doi: 10.4067/S0716-97602012000300005
- Rosillo, J.C. 2010. Zonas proliferativas y neurogénicas en el cerebro de peces adultos del género *Austrolebias*. MSc thesis, Faculty of Sciences, UdelaR. Uruguay.
- Rosillo, J.C., G. Casanova, S. Olivera, and A. Fernández. 2010. Cell heterogeneity of the telencephalic ventricular zone: A neurogenic brain region of *Austrolebias charrua*. *Microscopica Acta* 19: 152–159.
- Rosillo, J.C., S. Olivera-Bravo, G. Casanova, J.M.D. García-Verdugo, and A.S. Fernández. 2013. Olfactory-retinal pathway in *Austrolebias charrua* fishes: A neuronal tracer study. *Neuroscience* 253: 304–315. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.047
- Russo, R.E., C. Realí, M. Radmilovich, A. Fernández, and O. Trujillo-Cenóz. 2008. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 28: 3298–3309. doi: 10.1523/jneurosci.5736-07.2008
- Saeed, B., W. Ivanstovff, L.E.L.M. Crowley. 1994. Systematic relationships of Atheriniform families within division I of the series Atherinomorpha (*Acanthopterygii*) with relevant historical perspectives. *Journal of Ichthyology* 34: 27–72.
- Sanes, H.D., A.R.A. Thomas, and H. William. 2006. *Development of the Nervous System*. San Diego: Academic Press, Elsevier.
- Sawada, M. and K. Sawamoto. 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio Journal of Medicine* 62: 13–28. doi: 10.2302/kjm.2012-0005-re
- Setiamarga, D.H., M. Miya, Y. Yamanoue, K. Mabuchi, T.P. Satoh, J.G. Inoue, and M. Nishida. 2008. Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(2): 598–605. doi: 10.1016/j.ympev.2008.08.008
- Temple, S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature* 414: 112–117. doi: 10.1038/35102174
- Togashi, H., T. Sakisaka, and Y. Takai. 2009. Special focus: Synapse-Glia interactions, cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion and Migration* 3: 29–35. doi: 10.4161/cam.3.1.6773

- Tozzini, E.T., M. Baumgart, G. Battistoni, and A. Cellerino. 2012. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: Localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging Cell* 11: 241–251. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00781.x
- Wang, X., J.W. Tsai, J.H. Imai, W.N. Lian, R.B. Vallee, and S.H. Shi. 2009. Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature* 461: 947–955. doi: 10.1038/nature08435
- Zikopoulos, B., M. Kentouri, and C.R. Dermon. 2000. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain Behavior and Evolution* 56: 310–322.
- Zucker, C.L. and J.E. Dowling. 1987. Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature* 330: 166–168. doi: 10.1038/330166a0
- Zupanc, G.K.H. 2001. A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. *Brain Behavior and Evolution* 58: 246–249. doi: 10.1159/000057568
- Zupanc, G.K.H. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology A* 192: 649–670. doi: 10.1007/s00359-006-0104-y
- Zupanc, G.K.H. 2011. Adult neurogenesis in teleost fish. In: *Neurogenesis in the Adult Brain I. Neurobiology*. T. Seki et al. (eds.). 137–167. Tokyo, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. doi: 10.1007/978-4-431-53933-9_1
- Zupanc, G.K.H., K. Hinsch, and F.H. Gage. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology* 488: 290–319. doi: 10.1002/cne.20571
- Zupanc, G.K.H. and I. Horschke. 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology* 353: 213–233. doi: 10.1002/cne.903530205
- Zupanc, G.K.H. and M.M. Zupanc. 1992. Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knife fish (*Eigenmannia* sp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9539–9543. doi: 10.1073/pnas.89.20.9539
- Zupanc, G.K.H. and M.M. Zupanc. 2006. New neurons for the injured brain: Mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. *Journal of Regenerative Medicine* 1: 207–216. doi: 10.2217/17460751.1.2.207
- Zupanc, M.M., I. Horschke, R. Ott, and G.B. Rascher. 1996. Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *Journal of Comparative Neurology* 370: 443–464. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19960708)370:4<443::aid-cne3>3.3.co;2-8