



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto (*Danio rerio*)



Olalla Paz Coira

Directora: M^a Luz Díaz Prado

Julio 2015



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Estudo da proliferación celular no rombencéfalo e na médula espiñal do peixe cebra adulto (*Danio rerio*)

Study of cell proliferation in the hindbrain and spinal cord of adult zebrafish (*Danio rerio*)

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna de Biología Olalla Paz Coira bajo la dirección de Dña. M^a Luz Díaz Prado.

A Coruña, 22 de Julio de 2015.

Fdo. M^a Luz Díaz Prado

Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Resumen

Los peces teleósteos son reconocidos por la capacidad de generar nuevas neuronas en el sistema nervioso central, aun cuando son adultos. En el presente estudio se ha utilizado el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) con el fin de demostrar la existencia de dicha proliferación en el rombencéfalo y en la médula espinal de individuos adultos de pez cebra. Mediante técnicas inmunohistoquímicas indirectas e inmunofluorescencia, se detectó y localizó proliferación celular en diversas áreas de la zona caudal del encéfalo y de la médula espinal. Los resultados obtenidos señalan que existe abundante actividad neurogénica en las tres subdivisiones del cerebelo, así como en las zonas que rodean al ventrículo rombencefálico. Por otro lado, en el asta dorsal de la médula espinal se detecta un gran número de células inmunorreactivas al PCNA. Todas estas células positivas para el PCNA apoyan la premisa de que en el pez cebra adulto se originan nuevas neuronas de forma continua. Estudios previos señalan que la proliferación celular en peces teleósteos es mucho más abundante que en otros grupos de vertebrados, como los mamíferos.

Palabras clave: pez cebra, *Danio rerio*, neurogénesis, rombencéfalo, médula espinal, PCNA, inmunohistoquímica.

Study of cell proliferation in the hindbrain and spinal cord of adult zebrafish (*Danio rerio*)

Abstract

Teleost fish are known for their ability to generate new neurons in the central nervous system, even as adults. In the current study the Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) was used in order to prove the existence of such proliferation in the hindbrain and spinal cord of adult zebrafish. By indirect immunohistochemistry and immunofluorescence it was detected and located cell proliferation in several areas of the hindbrain and spinal cord. The results indicate the existence of abundant neurogenic activity in the three subdivisions of the cerebellum and in the areas surrounding the rombencephalic ventricle. Furthermore, in the dorsal plate of the spinal cord many immunoreactive cells are detected. These PCNA positive cells support the premise that new neurons are continuously originated in the adult zebrafish. Previous studies indicate that cell proliferation in teleost fish is more abundant than in other groups like mammals.

Keywords: zebrafish, *Danio rerio*, neurogenesis, rombencephalon, spinal cord, PCNA, immunohistochemistry.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Biología del pez cebra	1
1.2. Neurogénesis	2
1.3. Sistema nervioso central	3
1.3.1. Región del istmo	4
1.3.2. Cerebelo (cerebellum)	4
1.3.3. Médula oblongata	5
1.3.4. Médula espinal	6
1.4. Técnicas inmunohistoquímicas	6
1.5. Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)	7
2. Objetivos	10
3. Material y métodos	11
3.1. Obtención y procesamiento del material biológico	11
3.2. Inmunofluorescencia indirecta	11
3.3. Inmunohistoquímica indirecta (dos capas): técnica de la inmunoperoxidasa	12
3.4. Inmunohistoquímica indirecta (tres capas): técnica de la extravidina-peroxidasa	13
3.5. Pruebas control	13
3.6. Observación y análisis de las muestras	13
4. Resultados	14
4.1. Inmunofluorescencia indirecta	16
4.2. Técnica de la inmunoperoxidasa	18
4.3. Técnica de la extravidina-peroxidasa	18
5. Discusión	21
5.1. PCNA como marcador de proliferación celular	21

5.2. Neurogénesis en el encéfalo y médula espinal del pez cebra.....	21
5.3. Comparación con otros teleósteos.....	22
5.4. Comparación con otros vertebrados.....	23
6. Conclusiones	26
7. Anexo	27
8. Agradecimientos.....	28
9. Bibliografía y referencias.....	29

1 Introducción

En el presente trabajo, se ha escogido como objeto de estudio el pez cebra (*Danio rerio*) debido a las ventajas que presenta como organismo modelo para estudios de investigación, y se ha diseñado un experimento con el fin de observar las posibles áreas de proliferación celular presentes en el rombencéfalo y en la médula espinal de individuos adultos de la mencionada especie.

1.1 Biología del pez cebra

El pez cebra o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan 1822) es un pequeño pez (de una longitud máxima de 5 cm) originario de los ríos del norte de la India, norte de Pakistán, Nepal y Bangladesh que pertenece al género *Danio*, subfamilia Rasborinae o Danioninae, familia Cyprinidae, superfamilia Cyprinoidea, orden Cypriniformes, serie Otophysi, superorden Ostariophysi, subdivisión Otocephala (Ostarioclupeomorpha), división Teleostei, subclase Neopterygii, clase Actinopterygii, subgrado Euteleostomi (Osteichthyes), grado Teleostomi, superclase Gnathostomata, subphyllum Craniata, phylum Chordata (Nelson 2006).



Figura 1. Pez cebra. Tomado de: <http://www.aquaterraria.com/portal/289-nanio-rerio-ayuda-en-la-lucha-contra-el-cancer.html> 2/6/15

Se reconocen fácilmente por su aspecto fusiforme y por un marcado patrón de bandas horizontales de color azul, motivo por el cual se conocen popularmente como peces cebra. Presenta una aleta dorsal y dos pares de finos barbillones en la boca, la cual se dispone hacia arriba (Figura 1). Muestran un claro dimorfismo sexual (aunque no se ha tenido en cuenta en este estudio) ya que las hembras presentan un fondo plateado y un vientre redondeado, mientras que los machos son más pequeños y oscuros.

La reproducción, que tiene lugar en cualquier momento del año, es ovípara y la fecundación, externa. Las puestas pueden superar los 200 huevos, teniendo estos 1 mm de diámetro. Tanto los huevos como los embriones son transparentes, aunque

incrementan su pigmentación a medida que se acerca el momento de la eclosión, proceso que ocurre a las 48 horas post-fertilización. El estadio larvario abarca desde los tres hasta los veintinueve días post-fertilización, (alcanzando un tamaño aproximado de 3,5 mm (Gayoso Babío 2011)). A los tres meses post-fecundación, alcanzan la madurez sexual y comienzan a observarse las diferencias morfológicas entre macho y hembra (dimorfismo sexual).

El pez cebra ha sido utilizado en numerosos estudios genéticos y de desarrollo, especialmente aquellos relacionados con el sistema nervioso central (Kimmel 1993, Westerfield 1993). Ello se debe, en parte, a su corto ciclo vital y a su rápida embriogénesis, similar a la de vertebrados superiores. Dado que su sistema nervioso central es accesible para la manipulación experimental y sus características se encuentran filogenéticamente conservadas ha sido ampliamente empleado en trabajos sobre neurogénesis (Schmidt *et al.* 2013).

1.2 Neurogénesis

Se define la neurogénesis como el proceso mediante el cual células madre neurales indiferenciadas generan neuronas maduras y funcionales (Schmidt *et al.* 2013).

Hasta hace unas pocas décadas, se creía que en el cerebro de los vertebrados cesaba la producción de nuevas neuronas en el momento del nacimiento o poco después del mismo. A partir de 1960, se ha demostrado repetidamente la formación de nuevas neuronas en el encéfalo de un gran número de especies de vertebrados. (Grandel *et al.* 2006, Zupanc 2006, Chapouton *et al.* 2007, Kaslin *et al.* 2008)

A pesar de la presunción universal de que existe neurogénesis en los vertebrados, el análisis comparado ha mostrado diferencias pronunciadas entre vertebrados superiores e inferiores (Zupanc 2009, Fernández *et al.* 2011). Así, en mamíferos, la generación de nuevas neuronas se restringe a dos áreas cerebrales (bulbo olfatorio y telencéfalo dorsal) y el número de nuevas neuronas es extremadamente pequeño en comparación al número total de células cerebrales. Sin embargo, en peces, hay una elevada y continua producción en diversas áreas del cerebro (Figura 2). A diferencia de los mamíferos, los peces exhiben un elevado potencial de regeneración neuronal post-lesión o tras una enfermedad neurodegenerativa (Zupanc 2006, Zupanc & Sîrbulescu 2011).

Se han detectado más de 16 regiones de proliferación diferentes en el encéfalo del pez cebra adulto. Muchas de ellas, particularmente las del telencéfalo y el diencéfalo, se localizan en, o cerca de, la superficie de los ventrículos. En el cerebelo, en cambio, se localizan alejadas del ventrículo, aunque embriológicamente derivan de áreas situadas en las superficies ventriculares (Zupanc & Sîrbulescu 2011).

En la médula espinal de los teleósteos, las células nuevas se generan tanto en la capa endodermal como en el parénquima (Zupanc & Sîrbulescu 2011).

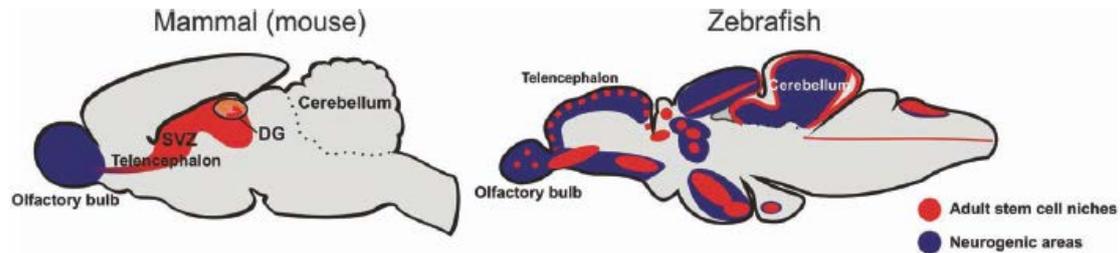


Figura 2. Comparación entre las regiones neurogénicas del cerebro de *Danio rerio* y las de mamíferos. En el SNC de mamíferos adultos, las poblaciones de células madre se restringen a la zona subventricular (SVZ) y al giro dentado (DG) en el telencéfalo. En el pez cebra, estas poblaciones son más abundantes y se encuentran distribuidas a lo largo de todo el eje rostrocaudal del encéfalo. Tomado de Kizil *et al.* 2012

En mamíferos adultos las nuevas neuronas surgen a partir de células gliales radiales. En teleosteos, además de las células mencionadas (capaces de autorrenovarse y generar distintos tipos celulares), aparece otra subpoblación de aspecto neuroepitelial que cumple la misma función (Zupanc & Sîrbulescu 2011).

La gran actividad neurogénica, ha hecho del pez cebra un modelo atractivo para el estudio de la proliferación en el encéfalo de individuos adultos, con la finalidad de proporcionar una vía de entendimiento para explicar los factores que limitan este fenómeno de proliferación y restauración en los mamíferos, además de posibilitar nuevas estrategias en la curación de enfermedades neurodegenerativas (Grandel *et al.* 2006, Zupanc 2006, Schmidt *et al.* 2013).

1.3 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal. En sentido rostrocaudal, el encéfalo de los vertebrados se divide en: el telencéfalo y el diencefalo (que representan el encéfalo anterior), el mesencéfalo o encéfalo medio y el rombencéfalo o encéfalo posterior, que está constituido por el metencéfalo (cerebelo y protuberancia anular) y el mielencéfalo (Figura 3). Al conjunto formado por el rombencéfalo y el mesencéfalo también se le denomina tronco encefálico (Nieuwenhuys 2009).

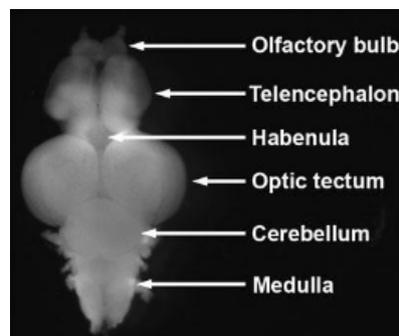


Figura 3. Encéfalo de pez cebra adulto. Se distingue el bulbo olfatorio, el telencéfalo, la habénula, el techo óptico, el cerebelo y la médula espinal. Fuente desconocida.

El rombencéfalo se considera la parte más caudal del encéfalo, estando su límite rostral marcado por la región del istmo y su límite caudal por la región del óbex (transición rombencéfalo-médula espinal). El techo del rombencéfalo está ocupado

rostralmente por el cerebelo y caudalmente por el velo medular posterior. De forma clásica se divide en tres zonas: la región del istmo, el cerebelo y la médula oblongata.

1.3.1 Región del istmo

Es la zona de transición entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. A través de ella discurren diversos tractos de fibras tanto ascendentes como descendentes, incluyendo: el lemnisco lateral ascendente, el tracto gustatorio secundario, el fascículo longitudinal medial descendente y el tracto tectobulbar. En esta zona están presentes el núcleo interpeduncular, el locus coeruleus y varios núcleos sensoriales secundarios como el núcleo gustatorio secundario, el núcleo pre-eminencial y el núcleo del istmo.

1.3.2 Cerebelo (cerebellum)

El cerebelo o metencéfalo deriva de la parte más rostradorsal del rombencéfalo (placa alar). Funcionalmente se relaciona con la propiocepción y el procesamiento de información asociada a órdenes motoras, para conseguir un control motor preciso y funciones cognitivo-emocionales elevadas. Estas tareas complejas dependen de la organización del cerebelo y de los circuitos neurales.

El cerebelo de los teleósteos (Figura 4) se compone fundamentalmente de tres partes que, en sentido rostro-caudal, son: la *valvula cerebelli* o válvula cerebelar (Va), el *corpus cerebelli* o cuerpo cerebelar (CCe) y el lóbulo vestibulolateral, el cual está formado por la eminencia granular (*eminencia granularis*, EG) y el lóbulo caudal cerebelar (*lobus caudalis cerebelli*, LCa) (Bae *et al.* 2009).

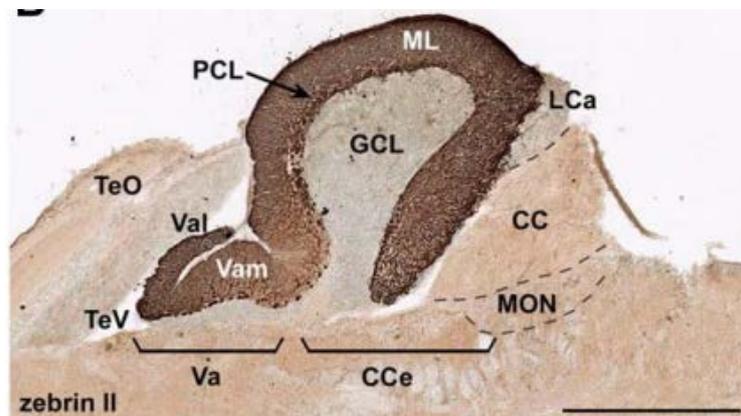


Figura 4. Sección sagital del cerebelo de pez cebra con inmunohistoquímica revelada con diaminobencidina. Parte anterior del cerebelo hacia la izquierda de la imagen. CC, cresta cerebelar; CCe, cuerpo cerebelar; GCL, capa de células granulares; LCa, lóbulo cerebelar caudal; ML, capa molecular; MON, núcleo medio octavolateral; PCL, capa de células de Purkinje; TeO, techo óptico; TeV, ventrículo tectal; Va, válvula cerebelar; Vam, división media de la válvula cerebelar; Val, división lateral de la válvula cerebelar. Barra de escala: 500µm.

Tomado de Bae *et al.* 2009.

La válvula cerebelar muestra una estructura en tres capas que, del exterior al interior, son: capa granular (formada por células granulares), capa ganglionar (constituida por células de Purkinje) y capa molecular (contiene células estrelladas dispersas). En el cuerpo cerebelar se mantiene esta disposición en capas, pero en sentido inverso, siendo la capa molecular la más superficial. El lóbulo vestibulolateral solo contiene la capa granular (GCL).

Además, la cresta cerebelar (*crista cerebellaris*, CC) y el núcleo medio octavolateral (MON) situados en la parte anterodorsal del encéfalo de teleósteos se consideran parte funcional del cerebelo. Se ha demostrado que fibras que parten de las células granulares y discurren por la cresta cerebelar, contactan con neuronas del núcleo medio octavolateral (Bae *et al.* 2009).

1.3.3 Médula oblongata

La médula oblongata, también conocida como bulbo raquídeo o mielencéfalo se localiza entre el mesencéfalo y la médula espinal, acogiendo en su interior al cuarto ventrículo. Puede subdividirse en dos placas, alar y basal, que se encuentran separadas por el surco limitante de His. La placa alar constituye las paredes dorsales del bulbo y a ella llegan las principales aferencias sensoriales. La placa basal o zona motora contiene los núcleos motores o eferentes, y constituye las paredes ventrales del bulbo. A su vez, ambas placas pueden ser subdivididas en zonas viscerales y somáticas, según el tipo de información que procesen, por lo que aparecerán un área somatosensorial (dorsomedial), un área viscerosensorial (dorsolateral), un área somatomotora (ventromedial) y un área visceromotora (ventrolateral).

La zona somatosensorial procesa información relacionada con la propiocepción, nocicepción y los receptores acústico-vestibulares. Se relaciona con fibras nerviosas de los nervios octaval (VIII), trigémino (V) y de la línea lateral (anterior y posterior). El grado de desarrollo de esta región varía en los distintos peces teleósteos.

La zona viscerosensorial recibe dos tipos de fibras: viscerales especiales y viscerales generales. Las especiales portan información sobre la percepción del gusto y las generales información de los receptores de los vasos sanguíneos y de los órganos viscerales. En esta zona se encuentran aferencias de los nervios facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X).

La zona somatomotora es la continuación rostral del asta anterior de la médula espinal, y contiene el núcleo de los nervios espino-occipitales y los núcleos motores de los nervios oculomotor común (III), troclear (IV) y abducente (VI) que inervan los músculos oculares externos.

La zona visceromotora o branquiomotora contiene los núcleos de los nervios trigémino (V), facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X). Estas neuronas inervan la musculatura branquial y la de las vísceras abdominales (músculo liso de órganos internos, músculo cardíaco y glándulas), estando implicadas en acciones vitales tales como la captura de presas, la alimentación y la respiración (Díaz Prado 2004)

Según Wulliman (1998) el rombencéfalo se desarrolló tempranamente y no sufrió modificaciones importantes a lo largo de la evolución, lo que puede deberse a su importante papel en la respiración, en el ritmo cardíaco y en el mantenimiento de la presión sanguínea. Esto permite comparar a especies filogenéticamente tan separadas como peces y mamíferos. El rombencéfalo es, además, una estación intermediaria de información originada en zonas más rostrales del encéfalo y dirigida hacia la médula espinal o a ciertos músculos.

1.3.4 Médula espinal

La médula espinal es un tubo cilíndrico o ligeramente aplanado que se extiende longitudinalmente desde el rombencéfalo hasta la aleta caudal. En su centro se localiza una pequeña cavidad denominada canal medular o canal central. Este canal se encuentra rodeado por la sustancia gris, constituida por cuerpos neuronales, y externamente a ésta se sitúa la sustancia blanca, que se compone de fibras nerviosas.

Las neuronas de la sustancia gris adoptan una posición ventrolateral y dorsolateral al canal medular, constituyendo, respectivamente, las astas dorsal (posterior) y ventral (anterior) de la médula espinal. De estas parten dos series de raíces, que se fusionan dando lugar a los nervios espinales mixtos, y que junto con los nervios craneales constituyen el sistema nervioso periférico.

En el asta ventral se encuentran las motoneuronas que, en teleósteos, se diferencian en primarias y secundarias. Las primarias son de mayor tamaño y se localizan dorsalmente inervando la musculatura más rápida del tronco. Las secundarias son más pequeñas y se encuentran ventralmente inervando la musculatura lenta del tronco y de las aletas.

La sustancia blanca se encuentra dividida en funículos o cordones que, según su posición, son: el funículo ventral (o anterior), el funículo lateral y el funículo dorsal (o posterior). En el funículo ventral se sitúa el fascículo longitudinal medial. La médula espinal actúa de estación intermediaria o de relevo entre los centros superiores del sistema nervioso y distintos órganos del cuerpo, transmitiendo impulsos en ambas direcciones. Asimismo es el centro donde se originan los actos reflejos de la natación y de reacción ante situaciones de peligro (Díaz Prado 2004).

1.4 Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección y la localización de un determinado antígeno *in situ* en secciones de tejidos, en extensiones celulares, en órganos *in toto*, etc., mediante el uso de anticuerpos que se unen de forma específica a ese antígeno (Montuenga *et al.* 2014). Generalmente estas técnicas pueden dividirse en dos tipos: los métodos directos (Figura 5) y los métodos indirectos (Figura 6). En los primeros, también llamadas técnicas de una capa, el anticuerpo primario (anticuerpo específico frente al antígeno que se quiere detectar y localizar) está marcado; mientras que en los segundos (técnicas de doble capa y de tres capas), el anticuerpo primario no lleva acoplada una molécula marcadora y es detectado de forma posterior mediante un anticuerpo secundario que sí está marcado.

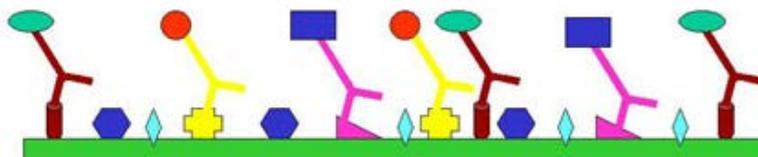


Figura 5. Método inmunohistoquímico directo. Fuente desconocida.

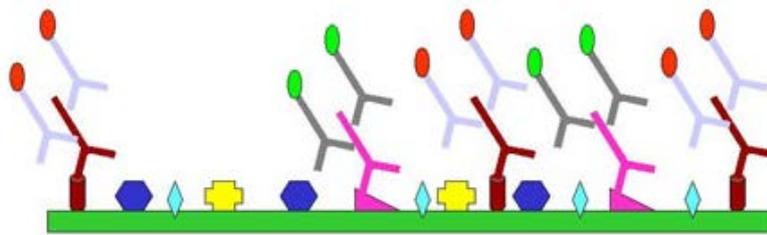


Figura 6. Método inmunohistoquímico indirecto. Fuente desconocida.

Las técnicas de inmunodetección pueden clasificarse en función del marcador utilizado (acoplado al anticuerpo) para poder visualizar al microscopio si la reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar. En general, las moléculas más empleadas como marcadores (y utilizadas en el presente trabajo) son:

- **Enzimas:** se denominan técnicas inmunoenzimáticas y suelen ser métodos indirectos. Las enzimas más usadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. En el presente estudio esta técnica se empleó, como se describe de forma más detallada en el apartado de "Material y métodos", con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) combinada con el método de revelado del peróxido de hidrógeno-diaminobencidina (DAB). Así, dicha enzima se incubó con su sustrato (peróxido de hidrógeno) en presencia de un donador de electrones, que en este caso es la diaminobencidina, de forma que la peroxidasa provoca la reducción del peróxido de hidrógeno y la oxidación de la DAB, dando lugar a un precipitado de color parduzco visible al microscopio óptico y al microscopio electrónico.
- **Moléculas fluorescentes o fluorocromos:** que se conjugan con los anticuerpos primarios (método directo) o secundarios (método indirecto) y constituyen las llamadas técnicas de inmunofluorescencia. Su visualización requiere de un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros adecuados para el fluorocromo utilizado. En este estudio, se empleó un fluorocromo clásico como es la fluoresceína (FITC), que es excitada por luz ultravioleta (320 nm) o azul (390 nm) y emite una luz verde-amarillenta observable con el microscopio de fluorescencia.

1.5 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular o PCNA (de las siglas en inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), usado en el presente estudio, es una proteína de estructura toroidal que juega un papel esencial en el metabolismo de los ácidos nucleicos, siendo uno de los componentes de la replicación y de la maquinaria de reparación. Esta proteína envuelve al DNA y puede deslizarse bidireccionalmente a lo largo del dúplex. Una de las funciones mejor conocidas del PCNA es su papel como factor procesador en la DNA polimerasa delta y épsilon. El PCNA une a la unidad catalítica de la polimerasa, el DNA molde para una rápida síntesis de DNA. Además de la replicación de DNA, las funciones del PCNA están asociadas con otros procesos vitales para la célula como la remodelación de la cromatina, la reparación de DNA, la cohesión de cromátidas hermanas y el control del ciclo celular (Naryzhny 2008, Dieckman *et al.* 2012).

Estructuralmente el PCNA es un homotrímero con forma anillada. Su estructura cristalográfica en eucariotas muestra que cada subunidad consiste en dos dominios independientes y plegados de forma similar (Figura 7). El dominio N-terminal (residuos 1-117) es denominado dominio A y el dominio C-terminal (residuos 135-258), el dominio B.

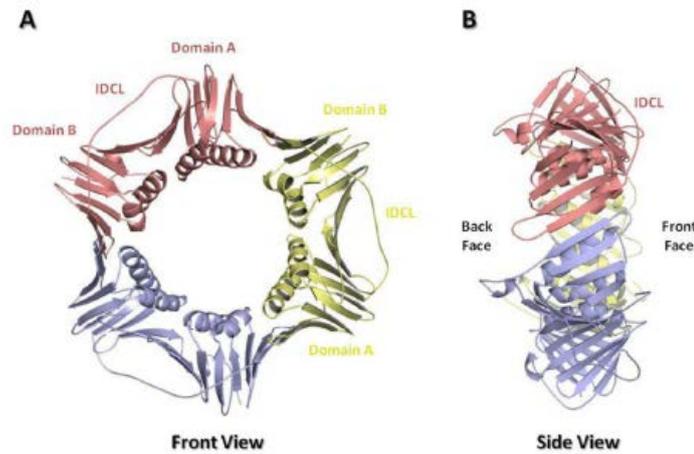


Figura 7. Estructura del PCNA, mostrada desde un punto de vista frontal (A) y lateral (B). Cada subunidad se representa con un color diferente. Tomado de Dieckman *et al.* 2012.

Las tres subunidades se unen de cabeza a cola de forma que el dominio A de una subunidad interactúa con la subunidad adyacente del dominio B.

Una lámina β extendida estabiliza la unión entre ambos dominios de la misma subunidad. Dicha lámina está compuesta por cadenas β de una subunidad del dominio A y cadenas β de la subunidad adyacente del dominio B. Asimismo, ambos dominios están conectados mediante uniones flexibles (118-134) llamadas IDCL (del inglés, *InterDomain Connector Loop*).

El anillo de PCNA presenta un diámetro de aproximadamente 80 Å, mostrando el agujero central del anillo un diámetro aproximado de 35 Å. La superficie externa del anillo de PCNA es un collar circular de las ya mencionadas seis láminas β (tres interdominios de láminas β y tres intersubunidades de lámina β). La cara interna del anillo de PCNA es un conjunto de 12 hélices α , dos de cada dominio. Mientras que el potencial electrostático general del PCNA es negativo, la cara interna está positivamente cargada debido a la presencia de residuos de lisina y arginina en estas hélices α . Estas cargas positivas facilitan el paso del DNA cargado negativamente a través del agujero central.

El anillo central del PCNA tiene una amplitud aproximada de 35 Å y contiene una cara frontal y otra trasera. La cara frontal del PCNA contiene el IDCL y está implicada en gran cantidad de interacciones proteína-proteína. Esto se observa en múltiples proteínas de replicación, como las DNA polimerasas y las DNA ligasas, cuyas acciones sobre el DNA tienen lugar en dicha cara del anillo. El papel de la cara trasera del PCNA está menos claro. Esta cara emerge como una modificación post-translacional del PCNA y parece estar implicada en el reclutamiento de factores proteicos para las horquillas de replicación y los conserva hasta que se necesitan en la

cara frontal del PCNA. El PCNA proporciona una plataforma estructural para múltiples procesos incluyendo la replicación y la reparación de DNA. Para esto, el PCNA debe interactuar con múltiples enzimas involucradas en estos procesos (Dieckman *et al.* 2012).

La secuencia génica y las funciones del PCNA están altamente conservadas entre los eucariotas, además de aparecer en arqueas (Strzalka & Ziemienowicz 2011).

2 Objetivos

Estudios preliminares han demostrado la existencia de neurogénesis y/o proliferación celular en el encéfalo de individuos adultos del pez cebra, con especial mención a aquellas regiones telencefálicas y diencefálicas, localizándose principalmente próxima a los ventrículos encefálicos.

Teniendo en cuenta estas observaciones, los objetivos planteados en este estudio son:

- Demostrar la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) en regiones caudales del encéfalo del pez cebra.
- Estudiar la localización y la distribución del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto.

3 Material y métodos

3.1 Obtención y procesamiento del material biológico

Para llevar a cabo este estudio se han empleado un total de 15 ejemplares adultos de pez cebra proporcionados por un suministrador comercial.

Todos los individuos fueron anestesiados por inmersión en metanosulfonato de tricaína (MS-222, Sigma-Aldrich) diluido en agua de acuario (100 mg/l). Posteriormente se procedió a la fijación del material biológico con el objetivo de mantener la estructura y la actividad biológica del tejido lo más parecido posible a su estado *in vivo*.

Parte de los ejemplares se procesaron para poder ser seccionados con un criostato. Así, fueron fijados por perfusión transcardial con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (TF, anexo) y postfijados por inmersión en el mismo agente fijador durante 20 horas. Pasado este tiempo, se realizaron varios lavados con TF, se extrajeron los cerebros y se dejaron en TF hasta el día siguiente. A continuación, se procedió a su crioprotección en soluciones crecientes de sacarosa en TF al 10% (durante 1 hora), al 20% (durante 2 horas) y al 30% (20 horas) a 4°C. Posteriormente, los encéfalos se embebieron en un medio de inclusión específico para criostato (OCT Compound Tissue-Tek; Sakura) contenido en moldes y se congeló en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en nitrógeno líquido. Las secciones transversales y de 12 µm de grosor, se realizaron en un criostato HM500-M (Microm) y se recogieron en portaobjetos previamente gelatinizados (anexo).

Sin embargo, la mayor parte de los individuos fueron procesados para poder ser seccionados en un microtomo de rotación. Para ello se fijaron, por perfusión transcardial y por inmersión, en líquido de Bouin (anexo), se decapitaron y las cabezas enteras se mantuvieron en el mismo líquido fijador durante aproximadamente 20 horas y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se mantuvieron en alcohol de 70°. Posteriormente, se deshidrataron en varios baños de etanol de concentración creciente (80°, 96° y 100°) manteniéndolas durante 40 minutos en cada uno de ellos y se aclararon en dos baños de xileno de 40 minutos de duración cada uno. Seguidamente se sumergieron las cabezas en tres baños, de parafina líquida a 58°C, de 2, 20 y 1 hora de duración, respectivamente. A continuación, se incluyeron las muestras en parafina fundida contenida en moldes y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los bloques así obtenidos se cortaron, transversalmente y a 12 µm, en un microtomo de rotación tipo Minot (LKB Bromma) y las secciones se recogieron sobre portaobjetos gelatinizados (anexo).

3.2 Inmunofluorescencia indirecta

Un paso previo al desarrollo de cualquier técnica inmunohistoquímica es la eliminación del medio en el cual se han incluido las muestras. Para ello, las secciones incluidas en OCT Compound Tissue-Tek se sometieron a dos lavados con tampón fosfato salino 0,01 M pH 7,4 (TFS; anexo) de 10 minutos de duración cada uno. Por otro lado, las secciones incluidas en parafina fueron desparafinadas en 4 baños de xileno (de 5 minutos cada uno) e hidratadas en baños de concentraciones decrecientes de etanol (100°, 96° y 80°) y agua destilada durante 5 minutos cada uno. A continuación se realizó recuperación antigénica tratando el tejido con tampón ácido cítrico- citrato sódico pH 6 en baño termostático a 95°C durante media hora. Tras tres lavados en

TFS de 5 minutos cada uno, se mantuvieron los cortes durante media hora (a temperatura ambiente) en una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4) 0,1 M preparado en TFS. Esta incubación se realizó para eliminar la posible autofluorescencia del tejido o la fluorescencia de fondo. De nuevo se realizaron 4 lavados (de 5 minutos de duración cada uno), tres de ellos en TFS y el cuarto en TFS-T (TFS con Tritón-X 100 al 0,1%). Posteriormente se incubaron las secciones con suero normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich) diluido 1:10 en TFS durante una hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Este paso se efectuó para evitar la formación de uniones no específicas que se pudieran formar entre el antisuero primario y otros antígenos susceptibles de reconocimiento por parte de éste.

A continuación, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-antígeno nuclear de proliferación celular (anti-PCNA, Sigma-Aldrich) preparado en TFS a una dilución 1:500, durante 20 horas, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con TFS y uno con TFS-T (de 5 minutos de duración cada lavado). Posteriormente, se incubó el tejido con el anticuerpo secundario inmunoglobulina de cabra anti-IgG de ratón conjugada con fluoresceína, GAM-FITC, Sigma-Aldrich (1:100 en TFS) durante una hora, en cámara húmeda y oscuridad. Tras ello se realizaron otros tres lavados con TFS (de 5 minutos cada uno) y, finalmente, las secciones se dejaron secar a temperatura ambiente (mantenidas en oscuridad) para poder ser montadas con mowiol. Después de montadas las muestras, y para maximizar la vida de la fluorescencia, las muestras se mantuvieron protegidas de la luz y refrigeradas a baja temperatura.

3.3 Inmunohistoquímica indirecta (dos capas): técnica de la inmunoperoxidasa

Para el desarrollo de esta técnica únicamente se emplearon cabezas enteras que habían sido previamente incluidas en parafina, por ello las secciones se desparafinaron e hidrataron (ver inmunofluorescencia indirecta). Tras esto se realizaron tres lavados de cinco minutos de duración cada uno en TFS (0,01 M pH 7,4). Para bloquear la actividad peroxidasa endógena propia de los tejidos, y evitar así la aparición de “falsos positivos” durante la etapa de revelado, las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% en TFS a temperatura ambiente durante media hora. De nuevo se ejecutaron otros dos lavados en TFS y un tercer lavado en TFS-T (TFS con Tritón-X 100 al 0,2%), de 5 minutos de duración cada uno. Posteriormente, se incubaron los cortes en suero normal de cabra, NGS, (1:10 en PBS-T al 0,2%), durante 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-antígeno nuclear de proliferación celular (anti-PCNA, Sigma-Aldrich) preparado en TFS a una dilución 1:1000, durante 20 horas, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Al día siguiente, y tras efectuar tres lavados de 5 minutos cada uno en TFS, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa (GAM-HRP, Sigma-Aldrich) a dilución 1:100 en TFS durante 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Después de dos lavados de diez minutos en TFS, la actividad peroxidasa fue revelada usando una solución de 3-3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina, DAB, (Sigma-Aldrich) al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en TFS durante

aproximadamente 4-5 minutos. De nuevo se realizaron tres lavados en TFS de 5 minutos cada uno.

Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en una batería de etanoles de gradación creciente (80°, 96° y 100°), aclaradas en dos baños de xileno de cinco minutos cada uno y montadas con Eukitt (resina sintética). Antes de su observación al microscopio se dejaron secar en estufa a 40°C.

3.4 Inmunohistoquímica indirecta (tres capas): técnica de la extravidina-peroxidasa

El protocolo seguido es igual al descrito en el apartado anterior (ver técnica de la inmunoperoxidasa) hasta la etapa de incubación con el anticuerpo secundario ya que, en este caso, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-ratón biotinilado (GAM-Biotinilado, Sigma-Aldrich) preparado en TFS a una dilución 1:200, durante 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, y tras dos lavados de 10 minutos cada uno en TFS, se incubaron las secciones con extravidina unida a peroxidasa de rábano (ExtrAvidina-Peroxidasa, Sigma-Aldrich) diluido 1:100 en TFS, durante 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Posteriormente, las secciones se lavaron con TFS (2 baños de 10 minutos cada uno) y se trataron con una solución de 3-3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en TFS durante aproximadamente 5 minutos. Se realizaron dos lavados más en TFS y se finalizó con la deshidratación en etanol (80°-96°-100°), el aclarado en xileno y el montaje con la resina Eukitt. Las muestras así obtenidas se dejaron secar en estufa hasta su visualización.

3.5 Pruebas control

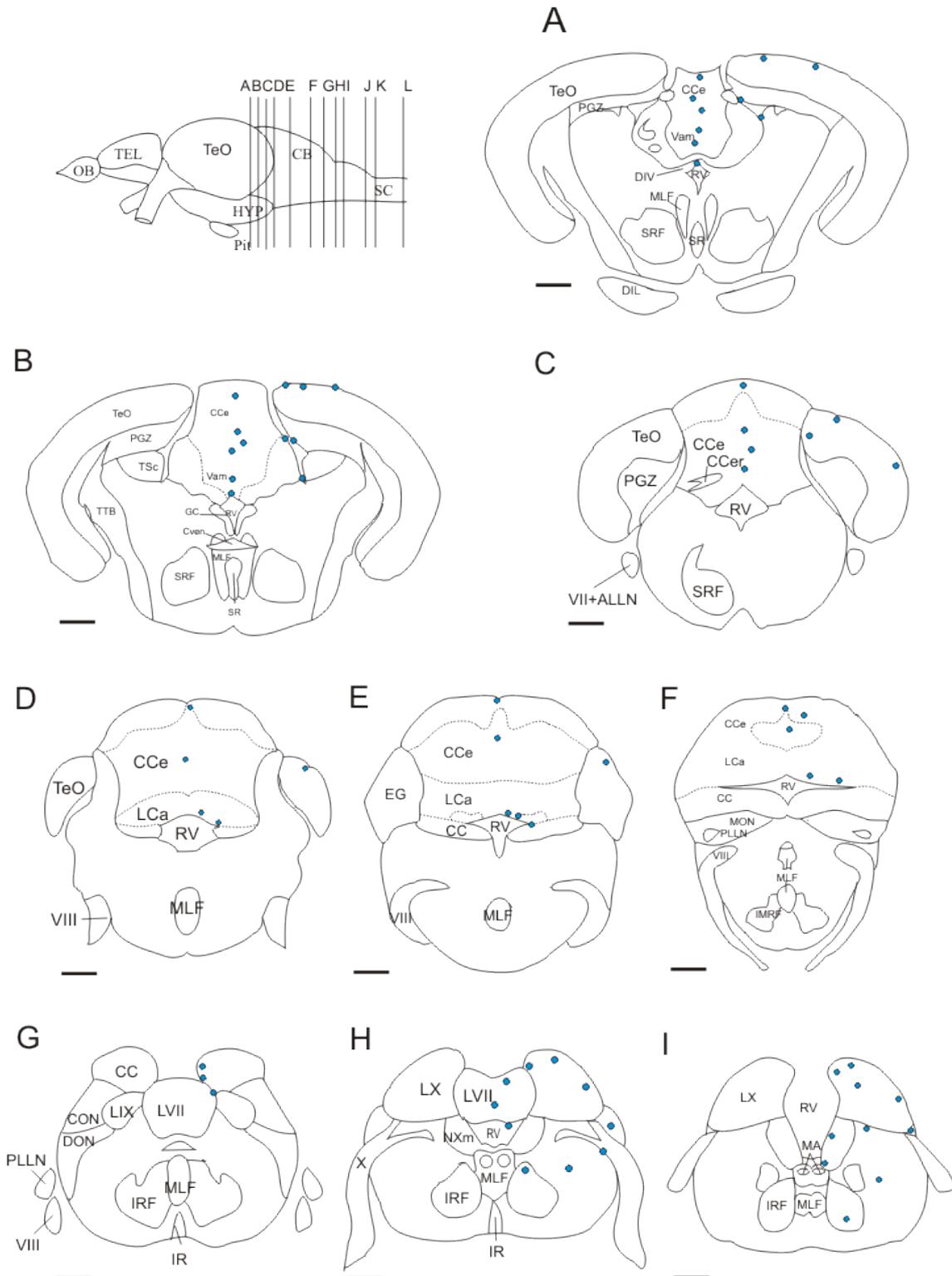
Para verificar la especificidad de la inmunorreactividad detectada, se procedió a la sustitución de la incubación del anticuerpo primario por incubación con suero normal de cabra (NGS) y desarrollo normal de la técnica inmunohistoquímica (como se ha descrito en los apartados anteriores). En todos los casos, las pruebas control pusieron de manifiesto la ausencia de inmunorreactividad en las regiones del encéfalo y de la médula espinal del pez cebra estudiadas.

3.6 Observación y análisis de las muestras

Las muestras se visualizaron a través de un microscopio óptico (Nikon, Eclipse, E1000) y se fotografiaron mediante una cámara digital (Nikon, Camera Dmx 1200, Tokio, Japón) acoplada a dicho microscopio. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa CorelDraw X7.

4 Resultados

Debido a que la mayor parte de los estudios de proliferación en el pez cebra se describen en zonas cerebrales rostrales, en este estudio se examina el área más caudal del encéfalo y la médula espinal, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los métodos empleados revelan la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular en neuronas localizadas en las regiones posteriores del cerebro. Los resultados obtenidos se recogen de forma esquemática en la Figura 8.



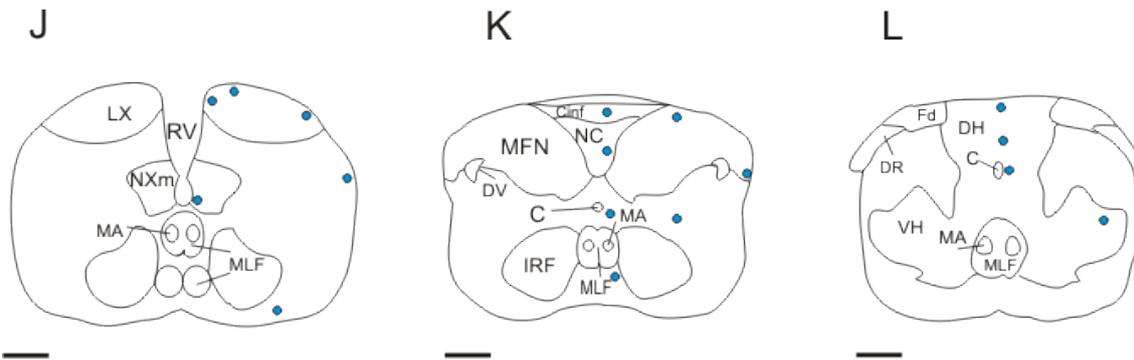


Figura 8. Representación esquemática de las secciones transversales de la división caudal del encéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*), mostrando el patrón de distribución de neuronas (puntos azules) que expresan positividad para el PCNA. Los gráficos corresponden a los niveles 204 (A), 208 (B), 219 (C), 230 (D), 237 (E), 251 (F), 272 (G), 283 (H), 290(I), 303 (J), 319 (K) Y 363(L) de Wullmann *et al.* 1996. Barra de escala: 150 μ m

LISTADO DE ABREVIATURAS

ALLN Nervios de la línea lateral anterior	Fd Funículo dorsal	NXm Núcleo motor del vago
C Canal central	GC Gris central	OB Bulbo olfatorio
CB Cerebelo	HYP Hipotálamo	Pit Pituitaria
CC Cresta cerebelar	IMRF Formación reticular intermedia	PGZ Zona gris periventricular del techo óptico
CCe Cuerpo cerebelar	IO Oliva inferior	PLLN Nervio de la línea lateral posterior
CCer Comisura cerebelar	IR Rafe inferior	RV Ventrículo rombencefálico
Cinf Comisura ínfima de Haller	IRF Formación reticular inferior	SC Médula espinal
CON Núcleo octavolateral caudal	LCa Lóbulo caudal cerebelar	SR Rafe superior
Cven Comisura ventral rombencefálica	LVII Lóbulo facial	SRF Formación reticular superior
DIL Núcleo difuso del lóbulo inferior	LIX Lóbulo glossofaríngeo	TeO Techo óptico
DIV Decusación troclear	LX Lóbulo vagal	TEL Telencéfalo
DON Núcleo octaval descendente	MA Axón Mauthner	TSc Núcleo central del toro semicircular
DH Asta dorsal	MFN Núcleo funicular medio	TTB Tracto tectobulbar
DR Raíz dorsal	MLF Fascículo longitudinal medial	Vam División media de la válvula cerebelar
DV Nervio trigémino descendente	MON Núcleo octavolateral medio	VH Asta ventral
EG Eminencia granular	NC Núcleo comisural de Cajal	

El protocolo inmunohistoquímico realizado sobre las secciones transversales ha revelado múltiples zonas de proliferación en el cerebro y en la médula espinal del pez cebra (*Danio rerio*). El análisis a microscopio de las mismas permitió observar que tanto la forma de las células, como la intensidad de la positividad, varían en base a la posición de dicho área de proliferación.

La expresión neuronal de PCNA disminuye progresivamente hacia la parte más caudal del rombencéfalo; en estas regiones, la neurogénesis es menos abundante, pero no por ello inexistente. Es decir, se observa proliferación en toda el área estudiada que, como ya se ha mencionado, incluye el rombencéfalo y la médula espinal.

En los resultados descritos a continuación, la inmunorreactividad al PCNA se refiere siempre a somas neuronales (y agrupaciones de los mismos); en ninguna de las secciones estudiadas se han observado fibras positivas para PCNA, lo que concuerda con estudios previos sobre proliferación celular tanto en el pez cebra como en otras especies de teleósteos.

4.1 Inmunofluorescencia indirecta

En la parte más rostral del rombencéfalo, las zonas con mayor proliferación se localizan en la parte dorsal, abarcando el cuerpo cerebelar (CCe), la válvula cerebelar media (Vam) y alcanzando la decusación troclear (DIV). También se detecta proliferación en la parte más superficial del techo óptico (TeO); así, la positividad dorsal es abundante e intensa mientras que la ventral es dispersa y suave (Figura 8A).

Las células que aparecen como inmunorreactivas al PCNA (PCNA-ir) en el cuerpo cerebelar (CCe) y en la válvula cerebelar media (Vam) presentan una morfología alargada y se agrupan en la zona central, formando una línea que va desde la superficie pial hasta el ventrículo rombencefálico (Figuras 8A, 8B, 8C y 9B). Fijándonos de forma más precisa, en el cuerpo cerebelar se aprecia que las células positivas son mucho más abundantes en la capa molecular y son escasas en la capa granular (Figuras 8B y 9B).

Al igual que lo percibido en CCe, en la Vam las neuronas PCNA-ir son alargadas y cuantiosas en la capa molecular (Figuras 8A, 8B y 9B). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el CCe, en Vam se observa un mayor número de células positivas en la zona de la capa granular que limita con el ventrículo rombencefálico (RV) (Figura 9B).

En la superficie dorsal del techo óptico (TeO) se observan varias células PCNA-ir que se hallan más separadas unas de otras y con una morfología más redondeada u ovoide que las detectadas en el cuerpo cerebelar y en la válvula cerebelar media (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 9B y 9C). Estas células ovoides también se localizaron en la zona gris periventricular del techo óptico (PGZ) y en el núcleo central del toro semicircular (TSc) (Figuras 8A, 8B, 9B y 9C).

Hacia las zonas más caudales del encéfalo, la localización de las neuronas que expresan PCNA va cambiando. Así, las células alargadas PCNA-ir que se localizaban en el cuerpo cerebelar se van restringiendo cada vez más a la capa molecular, casi desapareciendo de la capa granular; mientras que en la válvula cerebelar media ocurre lo contrario, disminuyen su presencia en la capa granular y aumentan en la capa molecular (Figuras 8C y 9C). En esta región se siguen observando células PCNA-ir en la zona del techo óptico y en la zona gris periventricular del mismo.

El área que rodea al ventrículo rombencefálico muestra células PCNA-ir ovoides de forma constante (Figuras 8A, 8B, 8D, 8E, 8G 9B, 9C, 9D, 9E y 9G). Esto se percibe especialmente en el lóbulo caudal cerebelar (Lc) donde se observan células PCNA-ir concentradas en la zona ventral que se encuentra adyacente al ventrículo rombencefálico (Figuras 8D, 8E, 8F, 9D y 9E).

En la parte rostral del lóbulo facial (LVII) las células ovoides PCNA-ir aparecen tímidamente en el límite con la cresta cerebelar (CC) y aumentan su presencia en la zona caudal encontrándose entonces en la zona media de dicho lóbulo (Figuras 8G, 8H, 9G y 9H).

En las áreas dorsal y medial del lóbulo vagal (LX) también se manifiestan estas células redondeadas u ovoides, principalmente en las zonas más cercanas a la superficie pial (Figuras 8H, 8I, 8J, 9H, 9I₁ y 9I₂).

En las zonas rombencefálicas más cercanas a la médula espinal surgen células PCNA-ir de estructura ovoide en el núcleo motor del vago (NXm) (Figura 8I, 8J y 9I₂).

Aunque las células se localizan más claramente en las zonas previamente descritas, también se hallaron células PCNA-ir aisladas, distribuidas en áreas de parénquima cerebral sin exhibir asociaciones claras con ningún grupo nuclear concreto.

Alcanzada la médula espinal la inmureactividad no desaparece, multitud de células PCNA-ir fueron detectadas en diversas áreas. En la comisura ínfima de Haller (Cinf) se observan células de morfología redondeada en la zona medial, mientras que en el núcleo comisural de Cajal (NC), las células que expresan PCNA son más alargadas y se distribuyen de forma más dispersas (Figuras 8K y 9K). Alrededor del canal central las células PCNA-ir examinadas son redondeadas pero de mayor tamaño que las detectadas en la Cinf (Figura 8K, 8L y 9K).

En la zona medular más caudal se revela proliferación en la zona medial del asta dorsal (DH) y en la zona adyacente al canal central. También aparecen células redondeadas aisladas dispersas por toda el asta ventral (Figura 8L).

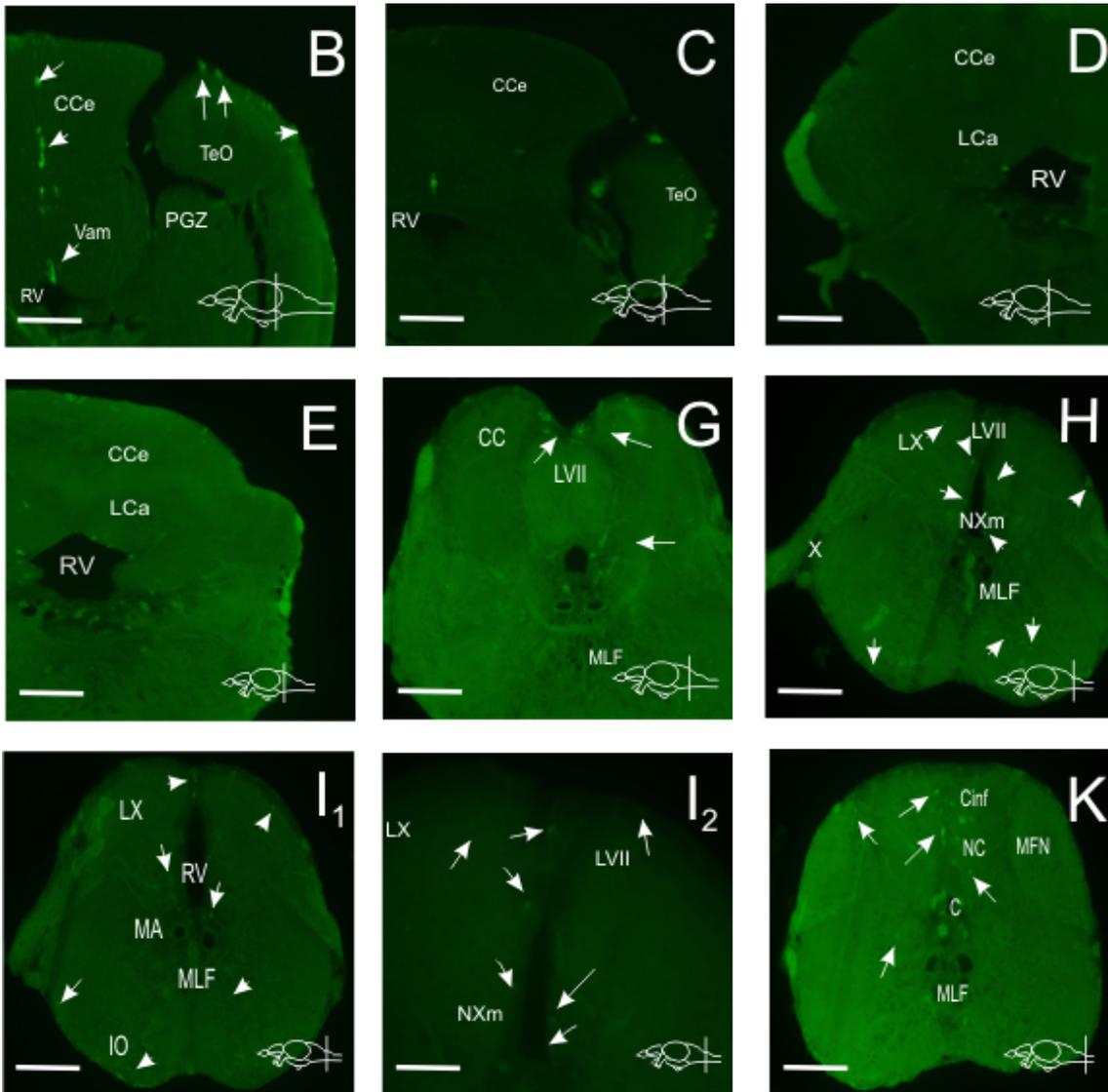


Figura 9. Estudio de la expresión de PCNA (flechas) revelada mediante inmunofluorescencia indirecta. Barra de escala: 90 μ m (B, C y H); 45 μ m (D, E, G, I₁ y K); 22'5 μ m (I₂).

4.2 Técnica de la inmunoperoxidasa

En el rombencéfalo del pez cebra adulto no se obtienen resultados concluyentes en la detección de proliferación celular, ni en somas neuronales ni en fibras, mediante el uso de la técnica de la inmunoperoxidasa.

En la médula espinal tampoco se detectaron muestras de positividad para el PCNA en las estructuras celulares antes mencionadas mediante el empleo de esta técnica.

4.3 Técnica de la extravidina-peroxidasa

Las células inmunorreactivas al PCNA (PCNA-ir) presentes en la válvula cerebelar lateral muestran una morfología alargada y se encuentran mayoritariamente en la capa molecular.

En la válvula cerebelar media (Vam) las células presenta una forma similar a las encontradas en la parte lateral de la válvula. En esta zona la mayoría de células se observan en la capa molecular dispuestas en una línea media con dirección dorsoventral (Figuras 8A, 8B, 10A y 10B).

En el cuerpo cerebelar (CCe) aparecen abundantes células PCNA-ir con forma alargada en la capa molecular y se concentran en una banda que se sitúa inmediatamente ventral a la superficie pial. Además de éstas, se observan otras células aisladas distribuidas por toda la capa molecular del CCe (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F, 10A, 10B, 10C y 10F).

Dentro también del cerebelo, en el área denominada lóbulo cerebelar caudal (LCa) las células inmunorreactivas al PCNA se concentran predominantemente en la región ventral inmediatamente adyacente a la pared del ventrículo rombencefálico (Figuras 8D, 8E y 8F). En la capa molecular del LCa, las células PCNA-ir son evidentes en la zona limítrofe con la capa granular. La morfología celular presente en esta zona es ovoide y dichas células no parecen seguir un patrón de orientación definido (Figura 10F).

Más caudalmente en el rombencéfalo se observan células PCNA-ir, de morfología ovoide, que aparecen de forma casi exclusiva en las áreas dorsal y dorsomedial del núcleo del lóbulo vagal (LX), muy cerca de la superficie pial (Figuras 8H, 8I, 10H₁, 10H₂, 10I₁ y 10I₂).

Otras células marcadas, similares a las del lóbulo vagal, aparecen en el parénquima cercano al ventrículo rombencefálico (RV), y dispuestas a lo largo de la zona dorsoventral externa de dicho ventrículo (Figuras 10H₁, 10H₂, 10I₁ y 10I₂). En regiones más laterales se observan las mismas células que las del parénquima que rodea al ventrículo rombencefálico, situadas, concretamente, entre la línea media y el núcleo motor del vago (Figuras 8I, 8J, 10I₂ y 10J). Estas células redondeadas u ovoides, se distribuyen por gran parte del parénquima cerebral sin exhibir una asociación clara con ningún grupo nuclear concreto. Esta distribución aparece también en las células PCNA-ir del resto de la médula oblongata, aunque se encuentran predominantemente en áreas ventrolaterales y medioventrales.

En la médula espinal se detectan multitud de células PCNA-ir en áreas como la comisura ínfima de Haller (Cinf) (Figuras 8K, 10K₁ y 10K₂), en el núcleo funicular medio (MFN) (Figuras 8K, 10J, 10K₁ y 10K₂) y en el núcleo comisural de Cajal (NC). En la Cinf se observan células redondeadas en la zona medial mientras que en el núcleo comisural de Cajal (NC) (Figuras 8K y 10K₁) éstas son más alargadas y más dispersas.

Las células reactivas que aparecen rodeando al canal central (C) (Figuras 8K, 8L, 10K₁ y 10L) son redondeadas pero de mayor tamaño que las detectadas en la Cinf (Figura 10K₁ y 10K₂).

Al igual que lo descrito para la técnica de inmunofluorescencia indirecta, en la región más caudal de la médula espinal destaca la existencia de proliferación celular en el asta dorsal (DH) y en la zona adyacente al canal central, aunque también se observan células redondeadas distribuidas por el asta ventral (Figuras 8L y 10 L).

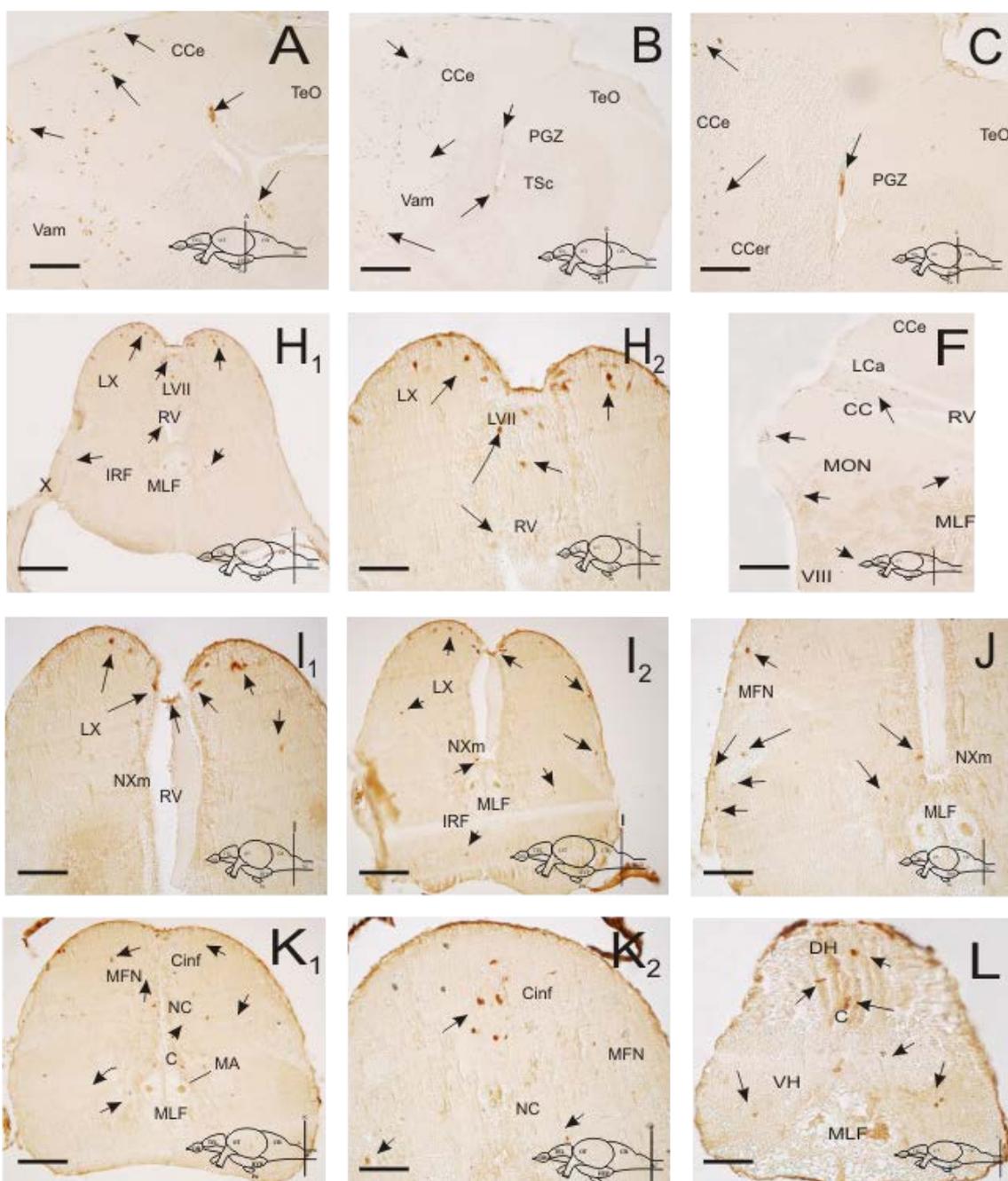


Figura 10. Estudio de la expresión de PCNA (flechas) revelada mediante el método extravitina-peroxidasa. Barra de escala: 175 μ m (F); 70 μ m (A, B y H₁); 35 μ m (C, I₂ y K₁); 17.5 μ m (H₂, I₁, J, K₂ y L)

5 Discusión

5.1 PCNA como marcador de proliferación celular

El uso de PCNA como marcador de proliferación presenta ciertas ventajas con respecto a otros ensayos para la detección de proliferación celular, como son el conteo directo de figuras mitóticas o el uso de precursores de DNA, tales como la timidina tritiada (H-T) o análogos de nucleótidos como la bromodeoxiuridina (BrdU) usada por Zupanc *et al.* (2005), Grandel *et al.* (2006) y Fernández *et al.* (2011), para detectar su incorporación al DNA.

Las figuras mitóticas representan solo una corta fase del ciclo celular, lo que dificulta su uso en estudios de proliferación en poblaciones celulares con baja producción. De forma similar H-T y BrdU se incorporan sólo durante la fase S y, para animales de crecimiento lento, requiere de una larga exposición a estas sustancias para que se puedan evaluar los resultados, lo que afecta a su viabilidad.

Por el contrario el PCNA es detectado inmunohistoquímicamente durante la mayor parte del ciclo celular y se ha demostrado útil para localizar células en división en tejidos fijados y embebidos en parafina, sin tratamientos previos en especímenes vivos. Aunque el PCNA, a diferencia de la H-T y la BrdU, no permite estudiar la dinámica de desarrollo en las poblaciones celulares (Candal *et al.* 2005).

Se ha demostrado que en otros teleósteos se marcan de la misma forma las células y regiones con el uso de PCNA, H-T (Adolf *et al.* 2006) y BrdU (Candal *et al.* 2005, Zupanc *et al.* 2005, Adolf *et al.* 2006).

5.2 Neurogénesis en el encéfalo y médula espinal del pez cebra

La inmunohistoquímica contra el PCNA llevada a cabo con el fin de detectar proliferación celular en el cerebro posterior del pez cebra se realizó mediante tres técnicas. Se obtuvieron resultados significativos en dos de las técnicas empleadas (la inmunofluorescencia indirecta y la inmunohistoquímica indirecta mediante el método de la extravidina-peroxidasa) y no se obtuvieron datos concluyentes en la tercera (la inmunohistoquímica indirecta por el método de la inmunoperoxidasa). Las dos técnicas que resultaron efectivas dieron lugar a los mismos resultados, siendo éstos similares a los descritos por otros autores (especificados posteriormente), lo que podría validarlos.

Mediante ambas técnicas inmunohistoquímicas se detectaron múltiples áreas de proliferación en el rombencéfalo de *Danio rerio* siendo destacables las tres subdivisiones del cerebelo (la válvula cerebelar, el cuerpo cerebelar y el lóbulo vestibulolateral) así como las regiones circundantes al ventrículo rombencefálico. La válvula cerebelar, tanto media como lateral, presentó abundante inmunorreactividad, siendo esta más importante en sus capas moleculares, de acuerdo con los resultados obtenidos por Zupanc *et al.* (2005). Y a diferencia de lo reportado por este mismo autor, sí se encontró proliferación destacable en todo el cuerpo cerebelar y no sólo en la capa molecular, aunque de nuevo se coincide en una mayor positividad en la zona cercana a la superficie pial.

Otra zona donde se apreció proliferación celular es en el techo óptico situado en la parte más rostral del rombencéfalo. Zupanc *et al.* (2005) e Ito *et al.* (2010) también describen neurogénesis en esta área.

Dorsocaudalmente, en el rombencéfalo, también se detectó inmunorreactividad destacable en el lóbulo caudal cerebelar y en el lóbulo vagal.

De acuerdo con los datos previos presentados por Zupanc *et al.* (2005) y, contrariamente a los obtenidos por Grandel *et al.* (2006), la inmunorreactividad en las zonas ventrales del rombencéfalo fue bastante escasa y apareciendo siempre de forma aislada y nunca en agrupaciones neuronales.

En la médula espinal se detectan células PCNA-ir en la zona medial del asta dorsal, en el núcleo comisural de Cajal (NC) y alrededor del canal central, coincidiendo de nuevo con los resultados obtenidos por Grandel *et al.* (2006).

Así mismo es importante destacar que la técnica empleada, tanto por Zupanc *et al.* (2005) como por Grandel *et al.* (2006) implicaba el uso del BrdU y no de PCNA, ya que sus estudios abarcan varios estadios de desarrollo del pez cebra además de seguir la migración de estas nuevas células. Como se menciona en el apartado anterior, los resultados aquí presentados son semejantes a aquellos obtenidos por los autores mencionados; es decir, se detectan las mismas neuronas en las mismas regiones cerebrales, aun cuando las técnicas inmunohistoquímicas empleadas y los anticuerpos utilizados son diferentes.

5.3 Comparación con otros teleósteos

El cerebro de los teleósteos continúa desarrollándose a lo largo de toda la vida y el número de células cerebrales aumenta con la edad y con el tamaño corporal y, como se ha venido explicando a lo largo del presente estudio, la gran mayoría de nuevas células generadas en el cerebro de adultos se originan en zonas específicas de proliferación. Muchas de estas zonas se localizan en/o cerca de las superficies ventriculares que suelen ser remanentes de las zonas de proliferación presentes en alevines y juveniles (Candal *et al.* 2005). Aunque otras zonas de proliferación, particularmente en el cerebelo, se localizan en regiones distantes de cualquier ventrículo y, al menos algunas de ellas, se cree que derivan de áreas localizadas en superficies ventriculares durante estadios embrionarios de desarrollo (Zupanc & Sîrbulescu 2011).

Se han hallado múltiples áreas de proliferación en el cerebro de todos los peces teleósteos adultos examinados, incluyendo *Poecilia reticulata* (Kranz & Richter 1970 (citado por Zupanc & Sîrbulescu 2011)), *Sparus aurata* (Zikopoulos *et al.* 2000), *Salmo trutta fario* (Candal *et al.* 2005), *Oryzias latipes* (Candal *et al.* 2005), *A. leptorhynchus* (Grandel *et al.* 2006), *Gasterosteus aculeatus*. (Grandel *et al.* 2006), *Danio rerio* (Zupanc *et al.* 2005, Grandel *et al.* 2006) y *Austrolebias sp.* (Fernández *et al.* 2011).

En *Apteronotus leptorhynchus* y *Gasterosteus aculeatus* las zonas de proliferación detectadas en el rombencéfalo por Grandel *et al.* (2006), mediante PCNA y BrdU, son las mismas que las observadas en el pez cebra y descritas en el apartado de Resultados. En el cerebelo destacan de nuevo las capas moleculares de la válvula y el cuerpo cerebelar y del lóbulo caudal cerebelar. Al igual que ocurre en *Danio rerio*, las células proliferativas se orientan a lo largo de la línea media en la capa molecular del cuerpo cerebelar. También hay coincidencia en la presencia de neurogénesis alrededor del ventrículo rombencefálico. En la médula oblongata y en la médula

espinal de *Apteronotus leptorhynchus* y *Gasterosteus aculeatus*, de forma caudal al cerebelo, los dominios de proliferación ventricular se encuentran en el lóbulo facial medio y en el lóbulo vagal. Además, proliferación dispersa aparece en la zona ventricular del ventrículo rombencefálico que puede seguirse caudalmente hasta la médula espinal. Caudalmente al lóbulo vagal, la zona de proliferación ventricular se hace un poco más intensa a nivel del núcleo comisural de Cajal, donde las células PCNA positivas se ven muy cercanas a la línea media ventricular de dicho núcleo.

Salmo trutta fario y *Oryzias latipes* tienen un crecimiento más lento del que presenta el pez cebra, motivo por el cual fueron escogidos por Candal *et al.* (2005) para estudiar la proliferación celular mediante el uso de PCNA a lo largo del desarrollo, desde el estadio de embrión hasta el adulto, de forma que observaron que la proliferación se reduce progresivamente (a lo largo del desarrollo) quedando limitada a zonas específicas del neuroepitelio ventricular y endimario en los individuos adultos.

En *Salmo trutta fario*, la cantidad de células PCNA-ir presentes en el rombencéfalo disminuye durante el proceso de desarrollo. En la trucha común adulta, las células PCNA-ir permanecen en la capa endimial del óbex; mientras que, en el cerebelo, las células PCNA-ir se encuentran en la zona ventricular del lóbulo cerebelar vestibulolateral y en la zona ventricular medial del cuerpo y de la válvula cerebelar. Fuera de la zona ventricular, se encuentran pocas células PCNA-ir (Candal *et al.* 2005).

En individuos adultos de *Oryzias latipes*, Candal *et al.* (2005) hallaron inmunorreactividad en el lóbulo cerebelar vestibulolateral, especialmente a niveles rostrales, y también en zonas mediales de la zona ventricular del cuerpo cerebelar y de la válvula cerebelar. Estos autores demostraron la presencia de células PCNA-ir migradas fuera de la zona ventricular, localizándose principalmente en la capa molecular del cuerpo cerebelar y de la válvula cerebelar, así como en la parte más caudal de las eminencias granulares.

Los cerebros de *Austrolebias* son anatómicamente muy similares a los del pez cebra y, según Fernández *et al.* (2011), muestran proliferación cercana a los ventrículos y una amplia actividad mitótica en otras áreas telencefálicas, de acuerdo a los datos reportados por Zupanc *et al.* (2005) y Zupanc (2006). La mayor parte de células proliferativas en el cerebelo de *Austrolebias* fueron halladas en el cuerpo cerebelar, al igual que en el presente estudio y en otros previos realizados en el pez cebra como los de Zupanc *et al.* (2005) y Grandel *et al.* (2006).

5.4 Comparación con otros vertebrados

Como se ha demostrado en numerosos estudios, la neurogénesis que se produce en individuos adultos es mucho más abundante en especies de aves, reptiles, anfibios y peces, que en mamíferos. Además, suele localizarse en subdominios de zonas ventriculares de múltiples áreas cerebrales con diversas funciones adaptativas. Sin embargo, las zonas cerebrales sometidas a neurogénesis adulta siguen patrones de distribución que varían entre las diferentes especies, lo cual podría relacionarse con el desarrollo de diferentes funciones (Chapouton *et al.* 2007).

Los estudios sobre proliferación celular realizados en aves cantoras, como canarios, mirlos, estorninos, pinzones cebra, gorriones, etc. (Chapouton *et al.* 2007), muchos de los cuales se llevaron a cabo con animales criados en su medio natural, sugieren que la neurogénesis adulta no es un mero artefacto de laboratorio, es decir, no es consecuencia del mantenimiento de los individuos estudiados en condiciones artificiales de laboratorio.

En reptiles adultos, la neurogénesis ha sido observada en algunas especies de lagartos y de tortugas; mientras que en anfibios, ha sido documentada en ranas (Kaslin *et al.* 2008). Y, como se ha comentado en el apartado anterior, también ha sido descrita en gran variedad de especies de teleósteos. Sin excepción, la producción neuronal en estas especies tiene lugar a lo largo de toda la vida.

En las aves estudiadas hasta la fecha, las zonas de proliferación se encuentran en su mayoría a lo largo de las paredes del ventrículo lateral del telencéfalo, produciendo nuevas neuronas en el núcleo telencefálico dorsal, en el neocórtex (contiene el centro vocal superior, HVC), en el hipocampo y en otras estructuras relacionadas con el núcleo estriado del prosencéfalo (Chapouton *et al.* 2007, Kaslin *et al.* 2008). En reptiles, la neurogénesis se produce en todas las subdivisiones mayores del telencéfalo adulto y, en menor grado, en el cerebelo. En ranas y ajolotes, la proliferación celular cerebral, aparece en el telencéfalo, en el núcleo preóptico, en el tálamo, en el hipotálamo y en el cerebelo (Kaslin *et al.* 2008). En los peces teleósteos, se observa una diferencia fundamental con respecto a las demás especies estudiadas; en éstos, la neurogénesis en individuos adultos es abundante en todas las subdivisiones cerebrales examinadas (Zupanc *et al.* 2005, Candal *et al.* 2005, Grandel *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2001, Zupanc & Sîrbulescu 2011). Al igual que en otros vertebrados, la proliferación celular se limita a centros de proliferación focales, o *hotspots*, sugiriendo la existencia de mecanismos celulares específicos que favorecen o impiden el proceso de neurogénesis (Chapouton *et al.* 2007).

A lo largo de la evolución se observa, por tanto, que el número de zonas de proliferación activa en los adultos se reduce, o suprime, a medida que ocurre la transición entre anamniotas y amniotas o incluso más si comparamos entre mamíferos y otros vertebrados no mamíferos. Se desconoce si esta reducción filogenética en la proliferación del cerebro de adultos se debe a la pérdida selectiva de zonas de proliferación a través de la adaptación (Kaslin *et al.* 2008).

Aunque no está claro la causa y/o el mecanismo por los que la selección natural deriva en la pérdida de zonas de proliferación activa en los vertebrados, se ha propuesto que podría ser el resultado de una adaptación evolutiva con el fin de mantener aquellas poblaciones neuronales que acumulan experiencia a lo largo de toda la vida de los individuos. Parece poco probable que el no poder almacenar información a largo plazo, sea evolutivamente beneficioso para los no-primates. Por ejemplo, las aves, que tienen una vida larga y unas habilidades cognitivas similares a las de los primates, disponen de una memoria a largo plazo bien desarrollada además de una “memoria episódica”. Este fenómeno también ocurre en muchas especies de peces y reptiles que viven durante décadas. (Kaslin *et al.* 2008)

La mayor parte de la neurogénesis post-embionaria en los vertebrados no mamíferos, podría estar relacionada con el crecimiento del cerebro en respuesta al crecimiento de los sistemas sensitivos, ya que las nuevas neuronas son más plásticas y adaptables a nuevas experiencias que las neuronas viejas. En los mamíferos esto no ocurre, ya que los receptores asociados a los sistemas sensitivos están desarrollados por completo en el momento del nacimiento o poco después. Por ejemplo, en el hipocampo de los mamíferos, las poblaciones neuronales viejas se mantienen estables y preservan inalterable la información de los ambientes conocidos, mientras que las nuevas neuronas se adaptan a las características de nuevos ambientes (Kaslin *et al.* 2008).

Se ha sugerido que la escasa capacidad de añadir o reemplazar neuronas en el cerebro de los mamíferos está causada por la resistencia a integrar células nuevas en la red neural madura, ya que se cree que la adición de estas nuevas neuronas a un circuito ya existente podría causar daños en toda la estructura neuronal de la red. En los vertebrados no mamíferos, el hecho de que exista crecimiento cerebral a lo largo de toda la vida, podría hacer más fácil la incorporación de nuevas células al circuito neuronal preexistente sin que se causen los mencionados daños.

Por lo tanto, parece que hay un delicado equilibrio entre los beneficios de la adición de nuevos componentes y experiencias a una red preexistente (capacidad de adaptación) y, por otro lado, la estabilidad de no comprometer la estructura de dicha red neuronal con la adición de nuevos elementos (Kaslin *et al.* 2008).

6 Conclusiones

Del estudio realizado en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular es abundante en las regiones más caudales del encéfalo y en la médula espinal del pez cebra, lo que estaría de acuerdo con las premisas de que existe proliferación celular o neurogénesis en el cerebro y la médula espinal de los ejemplares adultos de peces teleósteos.
- Esta proliferación celular está ampliamente distribuida en el rombencéfalo de *Danio rerio*, siendo especialmente abundante en las tres subdivisiones del cerebelo (la válvula cerebelar, el cuerpo cerebelar y el lóbulo vestibulolateral) y en la periferia del ventrículo rombencefálico. En la médula espinal, el mayor número de neuronas inmunorreactivas al Antígeno Nuclear de Proliferación Celular, se localiza en el asta dorsal y en la zona adyacente al canal central.

Conclusions

The study in the hindbrain and spinal cord of adult zebrafish leads to the following conclusions:

- PCNA expression is abundant in the caudal regions of the brain and spinal cord of zebrafish, which would agree with the premise that there is cell proliferation or neurogenesis in the brain and spinal cord of adult teleost specimens.
- This cell proliferation is widely distributed in the hindbrain of *Danio rerio*, being especially abundant in the three subdivisions of the cerebellum (the valvula cerebelli, the corpus cerebelli and the vestibule lateralis lobe) and in the rombencephalic ventricle periphery. In the spinal cord, the greater number of PCNA immunoreactive neurons is located in the dorsal plate and in the adjacent area to the central canal.

7 Anexo

Preparación de líquido Bouin (100mL)

En la campana de extracción de gases se mezclan 75mL de una solución acuosa de ácido pícrico saturado y filtrado con 20 mL de formaldehído al 40%. Justo antes de su utilización, se añaden 5 ml de ácido acético glacial.

Preparación de 1 L de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (1L)

En la campana de extracción de gases, se calientan 500 mL de agua destilada hasta una temperatura de 75-80°C y se le añaden 40 gramos de paraformaldehído y varias gotas de NaOH 1N hasta que la solución se torna transparente. Se mantiene en la campana hasta que alcanza la temperatura ambiente, tras lo cual se agregan 500 mL de tampón fosfato (0,2M; pH 7,4), se mezcla y se filtra.

Preparación de tampón fosfato salino, TFS, 0,01M pH 7,4 (1L)

A 950 ml de agua destilada se le añaden 9,5ml de fosfato monosódico 0,2M y 40,5ml de fosfato disódico 0,2 M. A esta mezcla se le echan 8,76g de NaCl y 0,2g de KCl y se mantiene en agitación hasta que todos los reactivos se hayan disuelto por completo. Posteriormente, se mide el pH y se ajusta a 7,4.

Gelatinización de portaobjetos

En un vaso de precipitados, se calienta 1 L de agua destilada hasta 60°C, sin que llegue a hervir. Se le añaden 5 gramos de gelatina y se disuelve manteniendo la mezcla en agitación. Una vez disuelta la gelatina, se agregan 0,5 gramos de sulfato de Cr y K y, de nuevo, se deja en agitación. A continuación, se filtra la mezcla y se deja atemperar. Se colocan los portaobjetos en las cestillas y se sumergen, durante media hora y a temperatura ambiente, en cubetas que contienen la mezcla anterior. Pasado este tiempo, se retiran las gradillas de las cubetas, se escurren bien y se dejan secar en estufa a 37°C. Este proceso se repite cuatro veces.

8 Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a mi tutora la Dra. María Luz Díaz Prado por su paciencia y dedicación a la hora de guiarme y enseñarme a lo largo de estos meses de trabajo. También quisiera agradecerle al resto del personal de laboratorio de Biología Celular, por su apoyo y ayuda; en especial a Miriam Fernández Vega con cuya presencia, este trabajo, se ha hecho mucho más llevadero.

9 Bibliografía y referencias

Adolf, B.; Chapouton, P.; Lam, C.S.; Topp, S.; Tanhäusser, B.; Strhäle, U.; Götz, M. & Bally-Cuif, L. (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

Bae, Y.; Kani, S.; Shimizu, T.; Tanabe, K.; Nojima, H.; Kimura, Y. Higashijima, S. & Hibi, M. (2009) Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology*. 330, 406–426. Doi:10.1016/j.ydbio.2009.04.013

Candal, E.; Anadón, R.; Bourrat, F. & Rodríguez-Moldes, I. (2005) Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental approach. *Developmental Brain Research* 160, 157-175. Doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.08.009

Chapouton, P.; Jagasia, R. & Bally-Cuif, L. (2007) Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays* 29, 745–757. Doi: 10.1002/bies.20615

Díaz Prado, M.L. (2004) Estudio inmunohistoquímico de los sistemas mediados por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el sistema nervioso central y retina de anamniotas. Dirigida por María Jesús Manso Revilla & Antonio Manuel Castro Castro. Tesis doctoral. Universidade de A Coruña

Dieckman, L.M.; Freudenthal, B.D. & Washington, M.T. (2012) PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Subcell Biochem* 62: 281–299. Doi:10.1007/978-94-007-4572-8_15

Fernández, A.S.; Bolsillo, 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. Doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.063

Gayoso Babío, J. (2011) Estudio neuroanatómico del sistema olfativo del pez cebra (*Danio rerio*), con especial atención a sus proyecciones primarias y secundarias. Dirigida por: María Jesús Manso Revilla & Antonio Manuel Castro Castro. Tesis doctoral. Universidade de A Coruña

Grandel, H.; Kaslin, J.; Ganz, J.; Wenzel, I. & Brand, M. (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology* 295, 263-277. Doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.040

Ito, J.; Tanaka, H.; Okamoto, H.; Ohshima, T. (2010) Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Developmental Biology* 342, 26–38. Doi:10.1016/j.ydbio.2010.03.008

Kaslin, J.; Ganz, J. & Brand, M. (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society* 363, 101-122. Doi:10.1098/rstb.2006.2015

Kimmel, CB. (1993) Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annual Reviews Neuroscience* 16, 707-732. Doi: 10.1146/annurev.ne.16.030193.003423

- Kizil, C.; Kaslin, J.; Kroehne, V. & Brand, M. (2012) Adult Neurogenesis and Brain Regeneration in Zebrafish. *Developmental Neurobiology* 72, 429-461. Doi: 10.1002/dneu.20918
- Montuenga Badía, L.; Esteban Ruiz, F.J. & Calvo González, A. (2014) *Técnicas en histología y biología celular*. Elsevier Masson, 2ª Ed. Barcelona
- Naryzhny, S. N. (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3789-3808. Doi: 10.1007/s00018-008-8305-x
- Nelson J. (2006) *Fishes of the world*. John Wiley and Sons. 4th Ed. Hoboken
- Nieuwenhuys, R. (2009). *El sistema nervioso central humano*. Panamericana. 4ªEd. Buenos Aires
- Schmidt, R.; Strähle, U. & Scholpp, S. (2013) Neurogenesis in zebrafish– from embryo to adult. *Neural Development*, 8:3. <http://www.neuraldevelopment.com/content/8/1/3> (25/5/15)
- Strzalka, W. & Ziemienowicz, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107, 1127–1140. Doi:10.1093/aob/mcq243
- Westerfield M. (1993) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of the zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon Press. Eugene
- Wullimann, M.F.; Rupp, B. & Reichert, H. (1996) *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain. A topological atlas*. Birkhäuser Verlag. Basel
- Wullimann, M.F. (1998). *The Central Nervous System. The Physiology of Fishes*. CRC Press, 2nd Ed. New York (USA)
- 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
- Zupanc, G.K.H.; Hinsch, K. & Gage, A.H. (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology* 488, 290–319. Doi: 10.1002/cne.20571
- Zupanc, G. K. H. (2006) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J Comp Physiol A* 192, 649–670. Doi: 10.1007/s00359-006-0104-y
- Zupanc, G.K.H. (2009) Towards brain repair: Insights from teleost fish. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 683-690. Doi: 10.1016/j.semcdb.2008.12.001
- Zupanc, G.K.H. & Sîrbulescu, R.F. (2011) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience* 34, 917-929. Doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07854.x