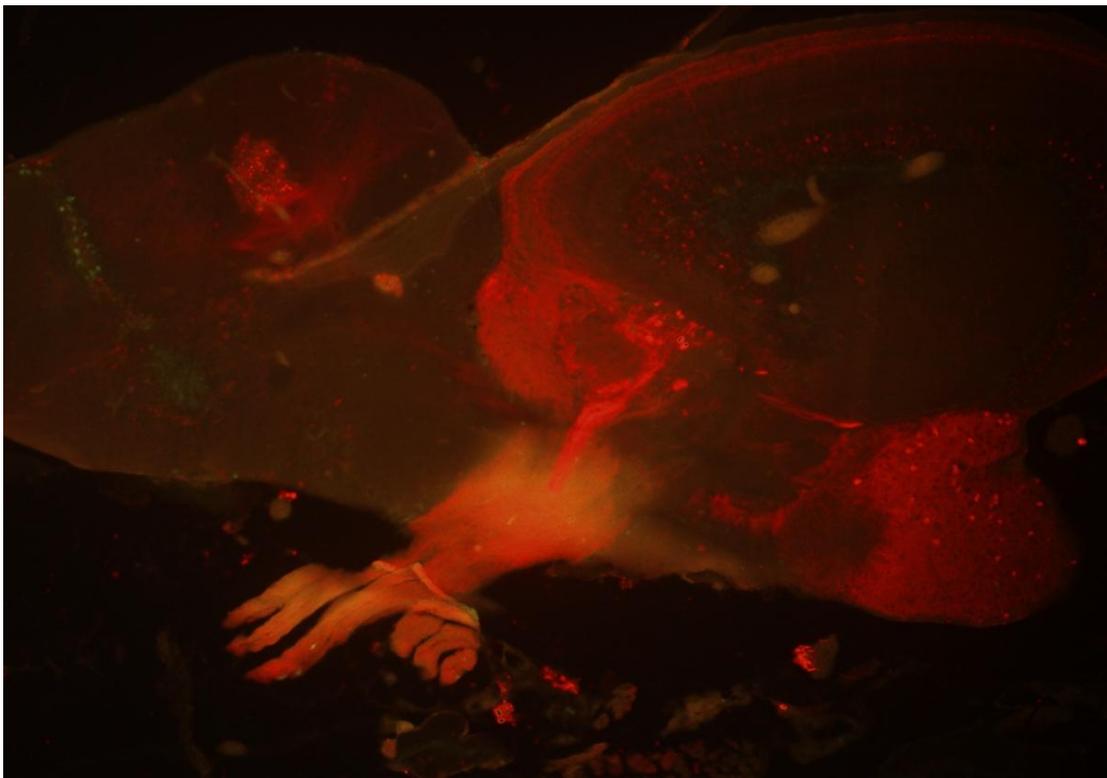


Neuroxénese no diencéfalo do peixe cebra adulto: un estudo
imunohistoquímico empregando como marcador o antíxeno
nuclear de proliferación celular (PCNA)

Neurogenesis in the diencephalon of the adult zebrafish: an
immunohistochemical study employing as marker the nuclear
antigen of cell proliferation (PCNA)

Neurogenesis in the diencephalon of the adult zebrafish: an
immunohistochemical study using the proliferating cell nuclear
antigen (PCNA) as marker



Samuel Casás Casal
Trabajo de Fin de Grado
19 de Junio de 2015

Dirigido por el Dr. Antonio Manuel Castro Castro



Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular
Área de Bioloxía Celular

Neuroxénese no diencéfalo do peixe cebra adulto: un estudo
imunohistoquímico empregando como marcador o antíxeno
nuclear de proliferación celular (PCNA)

Neurogénesis en el diencéfalo del pez cebra adulto: un estudio
imunohistoquímico empleando como marcador el antígeno nuclear
de proliferación celular (PCNA)

Neurogenesis in the diencephalon of the adult zebrafish: an
immunohistochemical study using the proliferating cell nuclear
antigen (PCNA) as marker

Trabaja de fin de Grado que presenta el alumno de Biología Samuel Casás
Casal bajo la dirección de D. Antonio Manuel Castro Castro.

A Coruña, 19 de Junio de 2015

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Índice

Resumen

Summary

1. Introducción	1
1.1. Características del pez cebra	1
1.2. Anatomía del Sistema Nervioso Central (SNC) de peces	2
1.3. Proliferación en el encéfalo de vertebrados	5
1.4. Marcadores de proliferación	7
1.5. PCNA	7
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	9
3.1. Material biológico: obtención y procesamiento	9
3.2. Técnicas inmunohistoquímicas	10
3.2.1. Doble inmunofluorescencia	10
3.2.2. Inmunohistoquímica con revelado enzimático	10
3.2.3. Pruebas de especificidad	11
3.3. Obtención y procesamiento de las imágenes	11
4. Resultados	11
5. Discusión	16
6. Conclusiones	18
7. Bibliografía	19

Resumen

La proliferación celular a lo largo de la vida de los vertebrados recae en células progenitoras que se agrupan en regiones conocidas como zonas de proliferación. Si bien en el encéfalo adulto de mamíferos la proliferación está bastante restringida, en peces teleósteos las zonas proliferativas están ampliamente distribuidas a lo largo del eje antero-posterior del encéfalo. En este trabajo se estudiará la proliferación celular en el diencefalo del pez cebra adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas empleando como marcador el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los resultados obtenidos evidencian células en proliferación en zonas del área preóptica, tálamo, sinencéfalo, epitálamo e hipotálamo del diencefalo del pez cebra. Asimismo se evaluará el papel de la PCNA como marcador y se discutirán los resultados obtenidos con otras especies de teleósteos y vertebrados.

Palabras clave: Pez cebra (*Danio rerio*), Neurogénesis adulta, Zonas de proliferación, PCNA, Inmunohistoquímica, Diencefalo.

Summary

Lifelong proliferation in vertebrates relies on progenitor cells that are clustered in regions known as proliferative zones. Although in the adult brain of mammals this proliferation is greatly restricted, in teleost these proliferative zones are widespread through the anteroposterior axis of the encephalon. In this work is studied the cellular proliferation in the diencephalon of the adult zebrafish by means immunohistochemical techniques using the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as marker. The results show proliferation cells in regions of the preoptic area, thalamus, synencephalon, epithalamus and hypothalamus of the zebrafish diencephalon. Furthermore the role of the PCNA as marker and the results are assessed.

Keywords: Zebrafish (*Danio rerio*), Adult neurogenesis, Proliferation zones, PCNA, Immunohistochemistry, Diencephalon.

1. Introducción

1.1. Características del pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822) es una especie que pertenece al filo Chordata, subfilo Craniata, superclase Gnathostomata, clase Actinopterygii, subclase Neopterygii, división Teleostei, superorden Ostariophysi, orden Cypriniformes, superfamilia Cyprinoidea, familia Cyprinidae, subfamilia Danioninae y género *Danio*; comprendiendo la familia en la que se incluye 220 géneros y 2420 especies (Nelson, 2006). Su distribución comprende el sur y este de Asia (Pakistán, Birmania, India y Nepal), constituyendo su hábitat ríos de aguas tranquilas (Perry *et al.*, 2010). Los individuos adultos suelen medir entre 2 y 5 cm. Presentan una forma fusiforme y el cuerpo está comprimido lateralmente. Poseen dos pares de barbos sensoriales y de 5 a 7 franjas longitudinales de color azul oscuro (Fig. 1) que se extienden por detrás del opérculo hacia la aleta caudal. La aleta anal también muestra unas franjas similares, mientras que la aleta dorsal tiene un borde superior de color azul oscuro, bordeado de blanco. Los machos y las hembras presentan una coloración similar, sin embargo, los machos suelen poseer aletas caudales más grandes con una coloración amarilla más intensa (Spencer *et al.*, 2008).



Fig. 1. Pareja de peces cebra (*Danio rerio*). Imagen sacada de www.dugdug.com (10/03/2015), (Benner M, 2013).

Esta especie se ha convertido en un modelo útil para la investigación biomédica gracias a George Streisinger y sus colaboradores de la Universidad de Colorado (Gerhard, 2003). Charles B. Kimmel, por su parte, publicó descripciones detalladas de la diferenciación celular y de la organización del sistema nervioso. También fue el modelo de los primeros *screenings* de mutaciones a gran escala que se llevaron a cabo en un vertebrado. Estos *screenings* dieron lugar a la aparición de 4000 mutaciones y a la identificación de unos 400 genes que controlan el desarrollo de los vertebrados (Spencer *et al.*, 2008).

Dentro de las características que lo convierten en un organismo ideal para la investigación están su pequeño tamaño, lo que facilita el poder manipular un gran número de individuos en el laboratorio. Las hembras pueden poner huevos cada 2-3 días y una sola puesta puede contener hasta varios cientos de ellos. La fecundación es externa, por lo que los embriones vivos son accesibles a la hora de manipularlos y poder monitorizar todas sus etapas del desarrollo. Además, los embriones son transparentes, lo que permite examinar visualmente los procesos de embriogénesis y organogénesis sin provocar su interrupción (Bilotta *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2008). Alcanza la madurez sexual en 3-4 meses y se necesitan pocos recursos para mantener un elevado número de individuos.

También resulta muy útil en campos como el de la medicina regenerativa, ya que esta especie es capaz de regenerar distintas estructuras como aletas, corazón, células fotorreceptoras, neuronas retinales e incluso la espina dorsal (Gemberling *et al.*, 2013).

Asimismo, se han llevado a cabo numerosos estudios en el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso del pez cebra para describir las conexiones cerebrales, lo cual puede facilitar el estudio de enfermedades humanas neurológicas (Tavares y Santos, 2013). Otro de los puntos fuertes en los que se apoya para ser un modelo de tal consideración radica en el hecho de que, como vertebrado, es más comparable a los humanos que los modelos invertebrados, mientras que al mismo tiempo es más manejable respecto a la manipulación genética o embriológica que las especies de vertebrados modelos, como los ratones, en los cuales los procedimientos son más complejos y caros (Spencer *et al.*, 2008).

1.2. Anatomía del Sistema Nervioso Central (SNC) de peces

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal, los cuales surgen a partir de la diferenciación del tubo neural. Una vez ha concluido su cierre, en la parte más anterior, comienzan a diferenciarse las tres vesículas encefálicas primarias (prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo), las cuales originan el encéfalo y las regiones en las que se divide (Fig. 2). En la parte más anterior se sitúa el prosencefalo o cerebro anterior, el cual contiene dos divisiones que se corresponden con el telencefalo y el diencefalo. El telencefalo constituye la región más rostral del encéfalo e incluye la corteza cerebral (dividido en dos hemisferios cerebrales). El diencefalo se sitúa entre el telencefalo y el mesencefalo o cerebro medio, en este último se encuentra el techo óptico. El rombencefalo o cerebro posterior es la región más caudal del encéfalo y contiene el bulbo raquídeo, el cerebelo y el puente troncoencefálico, este último conecta el bulbo raquídeo y la médula con estructuras superiores del encéfalo (Butler y Hodos, 2005).

A continuación se describirá la región diencefálica, objeto de estudio en el presente trabajo.

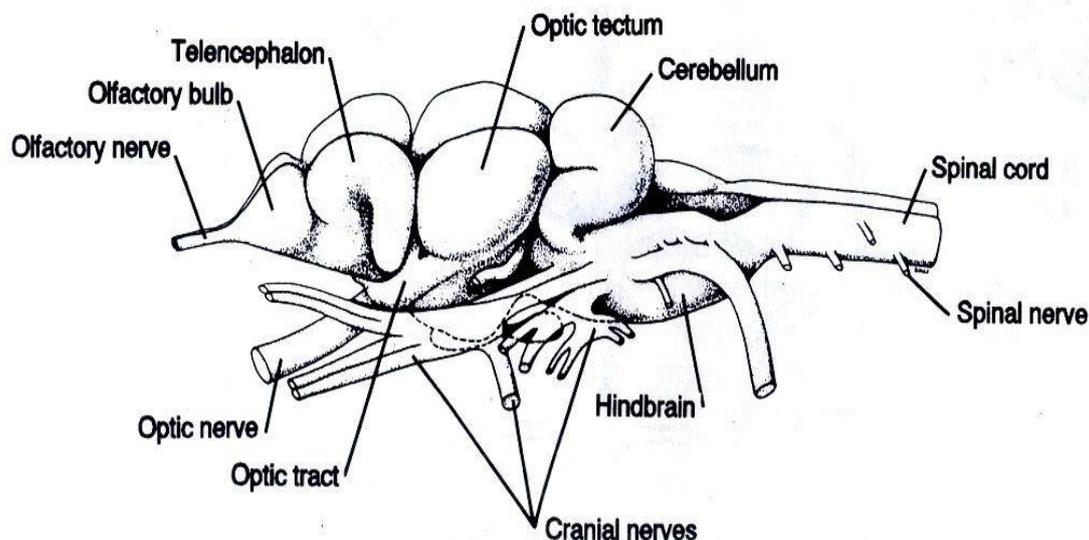


Fig. 2. Esquema en visión lateral del encéfalo de actinopterigios. Imagen tomada de *Comparative Vertebrate Neuroanatomy-Evolution and Adaptation* (2005).

El diencefalo constituye una compleja región del encéfalo situada entre el telencéfalo (rostralmente) y el mesencéfalo (caudalmente); no obstante, los límites rostrales y caudales del diencefalo no son fáciles de determinar. Según Braford y Northcutt (1983) el diencefalo se subdivide en área preóptica, hipotálamo, tálamo, epitálamo, sinencéfalo, incluyendo dentro de éste una parte del pretecho, y resto del pretecho (Tabla 1).

El área preóptica está situada entre el quiasma óptico y la comisura anterior, rodeando el receso preóptico del tercer ventrículo. Se encuentra dividida en los siguientes núcleos: núcleo preóptico magnocelular (contiene células neuroendocrinas que vierten hormonas a la sangre y tienen como destino la neurohipófisis), núcleo preóptico parvocelular (localizado anterior y caudoventralmente respecto al núcleo preóptico magnocelular; consta de una parte anterior, compuesta por células pequeñas que concentran esteroides sexuales, y otra posterior, formada también por células de pequeño tamaño), y núcleo supraquiasmático (localizado caudoventralmente respecto al núcleo preóptico parvocelular) (Braford y Northcutt (1983).

El hipotálamo está localizado debajo del tálamo y representa la parte más ventral de la región diencefálica. Está conectado con la hipófisis (glándula pituitaria) por medio del infundíbulo, el cual contiene fibras nerviosas hipotalámicas y preópticas que intervienen en funciones de regulación neuroendocrina. A su vez, el hipotálamo de los teleosteos se encuentra dividido en tres zonas: la zona periventricular, la cual está formada por neuronas pequeñas densamente empaquetadas, la región tuberal medial y los lóbulos inferiores, localizados lateralmente. La región tuberal abarca a su vez dos regiones principales, una región tuberal anterior y una región tuberal posterior. Los lóbulos hipotalámicos inferiores son visibles claramente en la superficie ventral del cerebro, que abarca un núcleo central más bien compacto, y una gran región periférica de células de distribución difusa, el núcleo difuso de los lóbulos inferiores hipotalámicos (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Braford and Northcutt (this chapter)	Bergquist (1932, 1954a)	Herrick (1948)
Preoptic area	Area optica	Preoptic nucleus of hypothalamus
Hypothalamus	Hypothalamus* and pars frontalis thalami (in part)	Hypothalamus (in part)
Thalamus	Thalamus (in part)	Thalamus and peduncle (in part)
Posterior tuberculum of the thalamus	Pars tuberculum posterioris	Posterior part of pars ventralis thalami, nucleus tuberculi posterioris, and hypothalamus (in part)
Ventral thalamus	Pars frontalis thalami (in part) and pars medialis thalami (in part)	Anterior part of pars ventralis thalami and nucleus of Bellonci
Dorsal thalamus	Pars caudalis thalami except epithalamus	Pars dorsalis thalami except nucleus of Bellonci
Epithalamus Habenula	Epithalamus Habenula	Rostral part of epithalamus Habenula
Synencephalon Nucleus of MLF Periventricular preteetum	Pars synencephali Area nucleus MLF Regio commissurae posterioris	Mesencephalon in part) Nucleus of MLF Pars intercalaris diencephali (caudal part of epithalamus)
Remainder of preteetum	Regio praeteetalis	Pretectal nucleus

Tabla 1. Representación de las distintas divisiones que componen el diencefalo. En la tabla se recogen las divisiones propuestas por Braford y Northcutt (1983) y las divisiones de otros autores en los que ellos se basaron para desarrollar las suyas.

El tálamo consta de una subdivisión dorsal, una ventral, y el tubérculo posterior. Tanto el tálamo dorsal como el ventral se encargan de la transmisión de información sensorial al telencefalo. El tálamo dorsal incluye un núcleo dorsal posterior, anterior y central posterior. El tálamo ventral consta de un núcleo ventromedial, uno ventrolateral y uno intermedio talámico, además de la eminencia talámica, que representa la porción más rostral del tálamo ventral y está formada por un pequeño grupo de células situadas adyacentes al epéndimo. El tubérculo posterior es una compleja región del diencefalo de los actinopterigios que no puede ser comparada de forma clara con ninguna otra región en el diencefalo de los otros vertebrados. Está compuesto por los núcleos periventriculares, dentro de los que destacan los siguientes grupos de células: el núcleo periventricular del tubérculo posterior, el órgano paraventricular, el núcleo del órgano paraventricular, el núcleo tuberal posterior, y por una serie de núcleos migrados los cuales forman una columna de células que se extiende a lo largo del

diencéfalo basal y en la cual se diferencian las siguientes poblaciones neuronales: núcleo glomeruloso, complejo preglomeruloso, núcleos caudomediales y núcleos aislados (Braford y Northcutt, 1983).

El epitálamo es la parte rostródorsal del diencéfalo, localizado de manera dorsal respecto al tálamo ventral, y rostral respecto al tálamo dorsal. En los teleósteos, comprende el núcleo habenular, la epífisis y el saco dorsal. El núcleo habenular, a su vez, está dividido en un subnúcleo ventral y otro dorsal. El ventral consistiría en células pequeñas densamente empaquetadas, mientras que el dorsal estaría compuesto por neuronas más grandes y no tan empaquetadas dispuestas en cordones. La epífisis o glándula pineal es un órgano fotorreceptor que interviene en la sincronización de los ritmos de actividad con el ciclo luz-oscuridad. Está conectada con la región habenular del epitálamo por medio del tallo de la epífisis (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

El sinencéfalo se sitúa entre el diencéfalo y el mesencéfalo. Está formado por el núcleo del fascículo longitudinal medial, el cual está compuesto por neuronas multipolares, grandes y ampliamente separadas, y por el pretecho periventricular, que se encuentra dividido en un núcleo pretectal periventricular ventral, que se compone de células muy pequeñas densamente empaquetadas, y otro núcleo pretectal periventricular dorsal, formado por un grupo de células ligeramente dispersas (Braford y Northcutt, 1983).

En relación al pretecho, a mayores del citado pretecho periventricular, Braford y Northcutt (1983) han identificado otras dos grandes regiones del pretecho, las cuales podrían tener un origen mesencefálico y que serían la zona pretectal central y la zona pretectal superficial. El núcleo pretectal central consiste en una masa de células que se sitúa lateralmente al pretecho periventricular, mientras que el pretecho superficial está situado cerca del núcleo pretectal central, y consiste en una esfera de pequeñas células.

1.3. Proliferación en encéfalo de vertebrados

A pesar de la tradicional creencia de que el SNC de vertebrados carece del potencial necesario para producir nuevas neuronas, la producción continuada de éstas más allá de los estados de desarrollo embrionarios y postembrionarios, fenómeno conocido comúnmente como *neurogénesis adulta*, ha sido demostrada en todas las especies de vertebrados examinadas hasta la fecha, entre las que encontramos peces óseos, reptiles, aves y mamíferos (Tabla 2) (Zupanc *et al.*, 2005). A pesar de la existencia de la neurogénesis adulta, análisis comparativos han revelado diferencias pronunciadas entre los vertebrados inferiores y superiores. En mamíferos, por ejemplo, la generación de nuevas neuronas durante la etapa de adulto parece estar restringida a dos regiones del sistema nervioso central, la zona subventricular del ventrículo lateral y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Por el contrario, en los peces teleósteos se han descubierto zonas de proliferación como fuente de nuevas neuronas en docenas de regiones cerebrales (Olivera-Pasilio *et al.*, 2014).

	mammals	birds	reptiles	amphibians	teleost fish
olfactory bulb	(+)	-	+	-	+
<i>telencephalon</i>					
ventral telencephalon/subpallium/SVZ	+	+	+	+	+
dorsal telencephalon/medial pallium/hippocampus	+	+	+	+	+
<i>diencephalons</i>					
preoptic region	-	-	-	+	+
epithalamus, habenula	-	-	-	-	+
thalamus	-	-	-	+	+
hypothalamus	-	(+)	-	+	+
pretectum	-	-	-	-	+
<i>mesencephalon and rhombencephalon and spinal cord</i>					
tectum	-	-	-	+	+
cerebellum	(+)	-	+	+	+
midbrain	(+)	-	-	+	+
vagal complex	(+)	-	-	-	+
spinal cord	(+)	-	-	-	+

Tabla 2. Comparación de las distintas regiones del cerebro de vertebrados donde tiene lugar la neurogénesis adulta de forma constitutiva (+, regiones bien documentadas donde hay neurogénesis; (+), regiones donde la neurogénesis ha sido observada de forma ocasional o bien ha sido inducida experimentalmente; -, regiones en donde no se ha documentado neurogénesis) (Kaslin *et al.*, 2008).

Por otro lado, mientras que el reemplazo de neuronas dañadas, ya sea por lesiones o enfermedades neurodegenerativas, por otras nuevas suele ser imposible en el SNC de mamíferos, los peces exhiben un enorme potencial para la regeneración neuronal después de una lesión (Zupanc, 2006). En los peces teleósteos, la retina crece constantemente por medio de la adición de células desde un borde periférico de células proliferantes. A su vez, estudios morfométricos han demostrado que el cerebro continúa creciendo a lo largo de la vida del pez. Experimentos de conteo de células en teleósteos juveniles y adultos han demostrado que el número de células en el cerebro aumenta con la edad, peso y longitud corporal. Regiones específicas de división celular activa han sido descubiertas en todas las grandes regiones del cerebro de los peces teleósteos adultos y, su presencia, indica que el crecimiento depende, al menos en parte, de la adición de nuevas células del cerebro (Ekström *et al.*, 2001).

Ekström *et al.* (2001) se refieren a estas zonas que contienen células en división activa como zonas de proliferación, las cuales están asociadas con los límites entre las regiones del cerebro adulto, así como con subdivisiones definidas morfofuncionalmente. Existen zonas de proliferación en el límite entre el telencéfalo y el diencefalo, y en el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. En el cerebro anterior, las zonas de proliferación están asociadas con las zonas ventriculares de los bulbos olfatorios, zona telencefálica ventral ("subpallio"), área telencefálica dorsal ("pallio"), región preóptica, tálamo dorsal y ventral, epitálamo, pretecho, tubérculo posterior e hipotálamo. En el cerebro medio, encontramos una zona de proliferación de gran extensión en la que se pueden diferenciar dos partes. Una de ellas constituye la zona periférica de crecimiento del techo óptico. La otra parte consiste en células dispersas sobre la superficie ventricular del toro semicircular y el núcleo lateral de la válvula. En el cerebro posterior, el cerebelo contiene una gran y compleja zona de proliferación que abarca la válvula cerebelosa, el cuerpo cerebeloso, la cresta cerebelar y el lóbulo vestibulo-lateral cerebelar.

1.4. Marcadores de proliferación

Los antígenos asociados al ciclo celular han sido empleados exitosamente como marcadores de proliferación y entre ellos destacan: PCNA, p53, Ki67, AgNORs y BrdU. Por ejemplo, el antígeno Ki67 consiste en una proteína nuclear no histónica ubicua, presente en todas las fases del ciclo, excepto en G₀, y es por lo tanto una medida de la fracción en crecimiento. Las Regiones Organizadoras Nucleolares (NOR) son segmentos de DNA que codifican el RNA ribosómico, el cual está directamente relacionado con la síntesis proteica y la proliferación celular. Mediante técnicas de impregnación argéntica se pueden detectar las proteínas asociadas a los NORs (AgNORs), siendo su cantidad proporcional a la actividad proliferativa (Palomo-González *et al.*, 2002). Finalmente, uno de los marcadores empleados más exitosamente es el análogo de la timidina, 5'-bromodeoxiuridina (BrdU), el cual es inyectado intraperitonealmente para incorporarse dentro del núcleo celular durante la fase S del ciclo celular, donde puede ser detectado mediante anticuerpos anti-BrdU (Muskhelishvili *et al.*, 2003).

1.5. PCNA

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es empleado como un marcador molecular para la proliferación celular dado que una de sus funciones principales es intervenir en la replicación del DNA (Wang, 2014). La PCNA fue identificada como el antígeno de un anticuerpo autoinmune producido en el suero de un grupo de pacientes con *lupus eritematosus* sistémico (Tsurimoto, 1998). Este antígeno era expresado preferentemente en células humanas cancerosas activamente proliferativas y células normales transformadas, además resultó ser idéntica a una proteína ciclina identificada en un estudio anterior cuyos niveles oscilaban con la proliferación celular, con picos de expresión durante la fase G1 tardía y la fase S (Wang, 2014).

Se han realizado numerosos estudios sobre la PCNA y sus funciones en los últimos años, y se ha visto que ésta juega un papel crítico en diversos procesos biológicos aparentemente dispares, pero que tienen un papel común en el metabolismo del DNA.

La PCNA es una proteína de 36-kDa (Wulliman y Puelles, 1999) que pertenece a una familia de pinzas deslizantes ("sliding clamps"), las cuales están conservadas estructural y funcionalmente. Presentan una estructura tridimensional, y se agrupan en complejos con forma de anillo (homotrimeros en eucariotas) con una simetría pseudohexamérica (Fig. 3). Este anillo circunda la doble hélice de DNA siendo capaz de deslizarse en ambas direcciones. La superficie interna del anillo está cargada positivamente y está formada por 12 hélices α , las cuales presentan un conjunto de residuos básicos. Además, estas hélices α están situadas un poco perpendiculares respecto a la columna de fosfatos del DNA impidiendo una unión estrecha con el DNA, para que la PCNA pueda deslizarse libremente sobre el DNA. La superficie externa se compone de 9 láminas β dispuestas de forma antiparalela; presenta una estructura estable globular rica en residuos ácidos, además, contiene el lazo de conexión interdominio (IDCL), a través del cual se unen a la PCNA distintas proteínas como el factor de replicación C (RFC) y la Polimerasa δ (Pol δ) (Tsurimoto, 1998). La PCNA es colocada alrededor del DNA por medio del RFC, lo que hace que sujete la polimerasa de forma firme al DNA, convirtiéndose de ese modo la PCNA en un cofactor esencial de la síntesis de DNA (Moldovan, 2007). La Pol δ por sí misma tiene una baja capacidad de síntesis, pero ésta se ve incrementada de forma considerable en

presencia del complejo PCNA-RFC, los cuales junto con la Pol δ , sustituyen a la Pol α en la síntesis de la cadena líder y retrasada (Kelman, 1997).

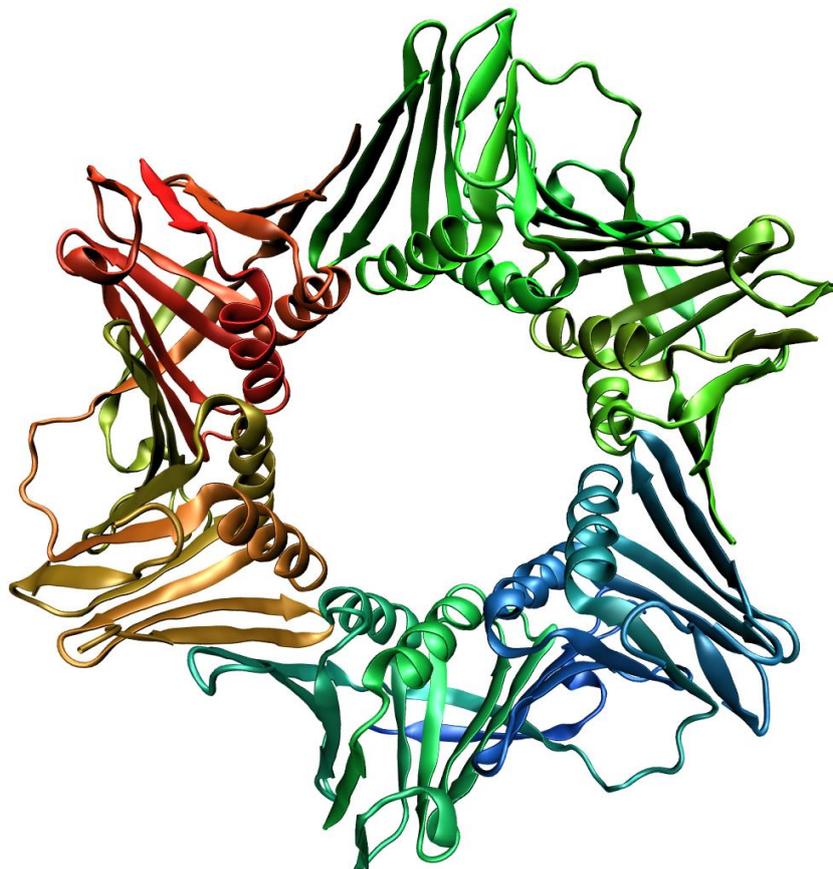


Fig. 3. Representación 3D de la estructura de la PCNA. Dentro de la molécula se muestran las hélices α y por fuera se muestran las láminas β y el IDCL. Imagen sacada del RCSB PDB (Protein Data Bank). (10/03/2015), (Burley SK y Berman HM, 2012).

La PCNA es un componente esencial de la maquinaria de replicación del DNA, funcionando como una proteína accesoria para la Pol δ , la cual es requerida para la síntesis de DNA, y para la polimerasa ϵ (Pol ϵ). A mayores, la PCNA es requerida en la recombinación y reparación del DNA, y ha demostrado que interacciona con proteínas celulares que intervienen en la regulación del ciclo celular (Kelman, 1997). Entre éstas destacan topoisomerasas, ligasas y proteínas controladoras del inicio de la replicación, transcripción de genes, reguladoras del ciclo celular, regulación cromatínica y epigenética, y metabolismo. A través de estas interacciones, la PCNA cumple un papel directo en la síntesis de DNA, y también actúa como un coordinador molecular en múltiples y distintas funciones (reparación de daños en el DNA, transcripción de genes, etc) (Wang, 2014).

2. Objetivos

La continúa producción de nuevas neuronas más allá de las etapas embrionarias y postembrionarias tempranas del desarrollo ha sido demostrada en las diferentes clases de vertebrados examinados hasta ahora. Esta producción de nuevas neuronas tiene lugar en las llamadas zonas de proliferación, las cuales han sido detectadas en los estudios que se han llevado a cabo mediante el uso de marcadores de proliferación, entre los que destacan BrdU, [³H]-timidina y PCNA.

Como objetivo general de este trabajo se estudió la proliferación habida en el diencefalo del pez cebra adulto por medio de técnicas inmunohistoquímicas y empleando como marcador la PCNA, la cual se combinó con otros dos marcadores, la Gqg y la calretinina. De este modo, los objetivos principales planteados son:

1. Determinar si existe proliferación en el diencefalo del pez cebra e identificar qué áreas la presentan.
2. Evaluar la utilidad de la PCNA como marcador de proliferación en base a su utilización por otros autores.
3. Comparar los resultados obtenidos con los publicados previamente por otros autores en peces teleosteos y otros grupos de vertebrados.

3. Material y métodos

3.1. Material biológico: obtención y procesamiento

Para llevar a cabo este estudio se emplearon 12 ejemplares adultos de pez cebra tipo salvaje, los cuales fueron anestesiados con metanosulfonato de tricaina (0,1% en agua dulce de acuario). De los 12 ejemplares, 6 presentaban medidas entre 30-40mm y fueron fijados por perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (TF) 0,1M pH 7,4; otros 4 que medían entre 24-27mm fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en TF; y los otros 2, que medían 27mm, fueron fijados por inmersión en Bouin. Las cabezas de los diferentes ejemplares fueron postfijadas durante 20 horas a 4°C.

Tras la postfijación las cabezas se lavaron con TF. A continuación se extrajo el encéfalo de los 6 ejemplares fijados transcardíacamente bajo un estereomicroscopio. Posteriormente se crioprotegieron en soluciones de sacarosa de concentración creciente (10%, 20% y 30%) en TF a 4°C (1 hora en sacarosa 10%, 2 horas en sacarosa 20% y 18-20 horas en sacarosa 30%). Los cabezas (de los ejemplares fijados por inmersión) se trataron con EDTA al 20% (para descalcificar) y sacarosa al 10% en TF durante una noche, para a continuación aumentar la concentración de sacarosa hasta el 20% y dejar pasar otra noche más.

Los seis cerebros y dos cabezas fijadas en paraformaldehído al 4% se incluyeron en medio *OCT Compound Tissue-Tek* (Sakura), y se congelaron en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en nitrógeno líquido. Los bloques se cortaron transversal o sagitalmente (14 µm de grosor) con un criostato HM500-M (Microm) y las secciones obtenidas fueron recogidas en portaobjetos gelatinizados.

Las otras cuatro cabezas se incluyeron en parafina. Para ello se realizaron baños en etanol de concentración creciente (80°, 96° I, 96° II, 100° I y 100° II) durante 30 minutos cada baño. A continuación se pasaron a Xileno I y Xileno II durante 15 min

cada uno, seguido de un baño de parafina I (50% parafina, 50% xileno) durante 1 hora, tras el cual se realizó un segundo baño en parafina II durante 20 horas y finalmente un último baño en parafina III durante 2 horas, todos los baños se realizaron en la estufa a 58°C. Las cabezas fueron seccionadas transversal o sagitalmente (12 µm) con un micrótopo Rotary-One modelo LKB BROMMA, los cortes fueron recogidos en portaobjetos gelatinizados y mantenidos en la estufa a 37°C.

3.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas, también denominadas “inmunocitoquímicas”, consisten en la detección y localización de antígenos (Ag) utilizando anticuerpos (Ac) que reconocen específicamente ese Ag. Para detectar la PCNA se emplearon 2 procedimientos inmunohistoquímicos indirectos diferentes, una técnica de inmunofluorescencia y otra técnica de revelado enzimático (Montuenga *et al.*, 2014).

3.2.1. Doble inmunofluorescencia

Previamente al desarrollo de dicha técnica, las secciones fueron desparafinadas (en varios baños de xileno, hasta eliminar parafina) e hidratadas (en etanol de concentración decreciente: 100°, 96°, 80°, durante 10 min en cada baño). A continuación se lavaron durante 5 minutos en tampón fosfato salino (TFS) 0,01 M pH 7,4. Seguidamente las secciones se incubaron con tampón ácido cítrico-citrato 0,01 M pH 6 a 95°C durante 30 minutos para recuperar los antígenos enmascarados durante el proceso de fijación. Una vez finalizado se dejaron atemperar (15 minutos aproximadamente), se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos) y se incubaron con borohidruro de sodio 0,37% durante 30 minutos para eliminar la posible autofluorescencia de los tejidos o la fluorescencia de fondo. Posteriormente se bañaron con TFS (3 baños de 5 minutos) seguido de otro baño en TFS con Triton-X100 al 0,01% (5 minutos). A continuación se incubaron las secciones con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich, G6767, Lote 11H280) al 10% en TFS durante una hora para bloquear las uniones inespecíficas del antígeno al anticuerpo. Posteriormente se incubaron con una combinación de anticuerpos primarios: uno monoclonal desarrollado en ratón contra la PCNA 1:500 (Sigma-Aldrich, P8825, Lote 082M4844) y otro policlonal desarrollado en conejo contra la Gαq (E-17) (Santa Cruz Biotechnology, sc-393, Lote A1813) o Calretinina (Swant, 7699/3H, Lote 18299) 1:250 en TFS durante 20 horas a temperatura ambiente. Las secciones fueron entonces lavadas con TFS (3 baños de 5 minutos) y TFS con Triton-X100 al 0,01% (5 minutos). A continuación se incubaron con una combinación de anticuerpos secundarios: inmunoglobulinas de cabra anti ratón marcadas con fluoresceína (F-2761, Lote 938854) 1:100 e inmunoglobulinas de cabra anti conejo marcadas con rodamina Red™-X (R-6394, Lote 1081936) 1:100 en TFS durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos) y se dejaron secar a temperatura ambiente para finalmente montarlas con Mowiol.

3.2.2. Inmunohistoquímica con revelado enzimático

Una vez lavadas en TFS, las secciones libres del medio de inclusión se trataron con peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en TFS durante 30 minutos. A continuación fueron lavadas con TFS (3 baños de 5 minutos) y otro baño de TFS con Triton-X100 0,01% (5 minutos). Posteriormente, los cortes fueron incubados con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich) al 10% en TFS durante 1 hora para bloquear las uniones inespecíficas, tras lo cual se incubaron con un anticuerpo monoclonal desarrollado en

ratón frente a la PCNA 1:3000 en TFS (Sigma-Aldrich) durante 20 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos) y se realizó otro baño en TFS con Triton-X100 al 0,01%. Acto seguido, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario cabra anti-ratón unido a la peroxidasa de rábano 1:100 en TFS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos). La reacción histoquímica (actividad peroxidasa) fue revelada usando 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, Sigma) al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en TFS, durante 5-10 minutos. Posteriormente, las secciones se lavaron de nuevo con TFS (3 baños de 5 minutos) y fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (80°, 96°, 100°, 5 minutos en cada baño), aclaradas en xileno (3 baños de 5 minutos cada uno) y montadas con Eukitt.

3.2.3. Pruebas de especificidad

Para verificar si la inmunorreactividad detectada era específica se realizaron dos series paralelas de cortes sagitales (12 µm de espesor) del encéfalo de un ejemplar adulto de pez cebra fijado en Líquido de Bouin. El protocolo a seguir fue similar al descrito en el apartado 3.2.1, si bien a los cortes de una de las series realizadas (serie control) no se les añadió el anticuerpo primario, apreciándose entonces en dicha serie una ausencia total de inmunorreactividad.

3. 3. Obtención y procesamiento de las imágenes

Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90 i) equipado con una cámara digital (Olympus DP71). Para el procesamiento de las imágenes y realización de las planchas se empleó el Corel 12.0.

4. Resultados

Para la detección y estudio de las células en proliferación existentes en el diencefalo del pez cebra adulto se ha empleado un anticuerpo comercial que reconoce el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Éste ha sido utilizado previamente en distintas especies de vertebrados, incluidos peces (Villar-Cheda *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008). Asimismo, la incubación de secciones del encéfalo del pez cebra sin dicho anticuerpo primario no reveló inmunorreactividad alguna, indicando que la inmunorreacción observada es específica para PCNA (Fig. 4).

La proliferación celular permite una constante renovación neuronal en el encéfalo de peces adultos. Las distintas zonas de proliferación se extienden por las diferentes regiones distinguibles en el encéfalo del pez cebra adulto, centrándose este estudio en aquéllas ubicadas en la región diencefálica (y estructuras asociadas). La nomenclatura de los diferentes núcleos usada en este trabajo está basada en la recogida en el atlas del cerebro del pez cebra de Wullimann *et al.* (1996).

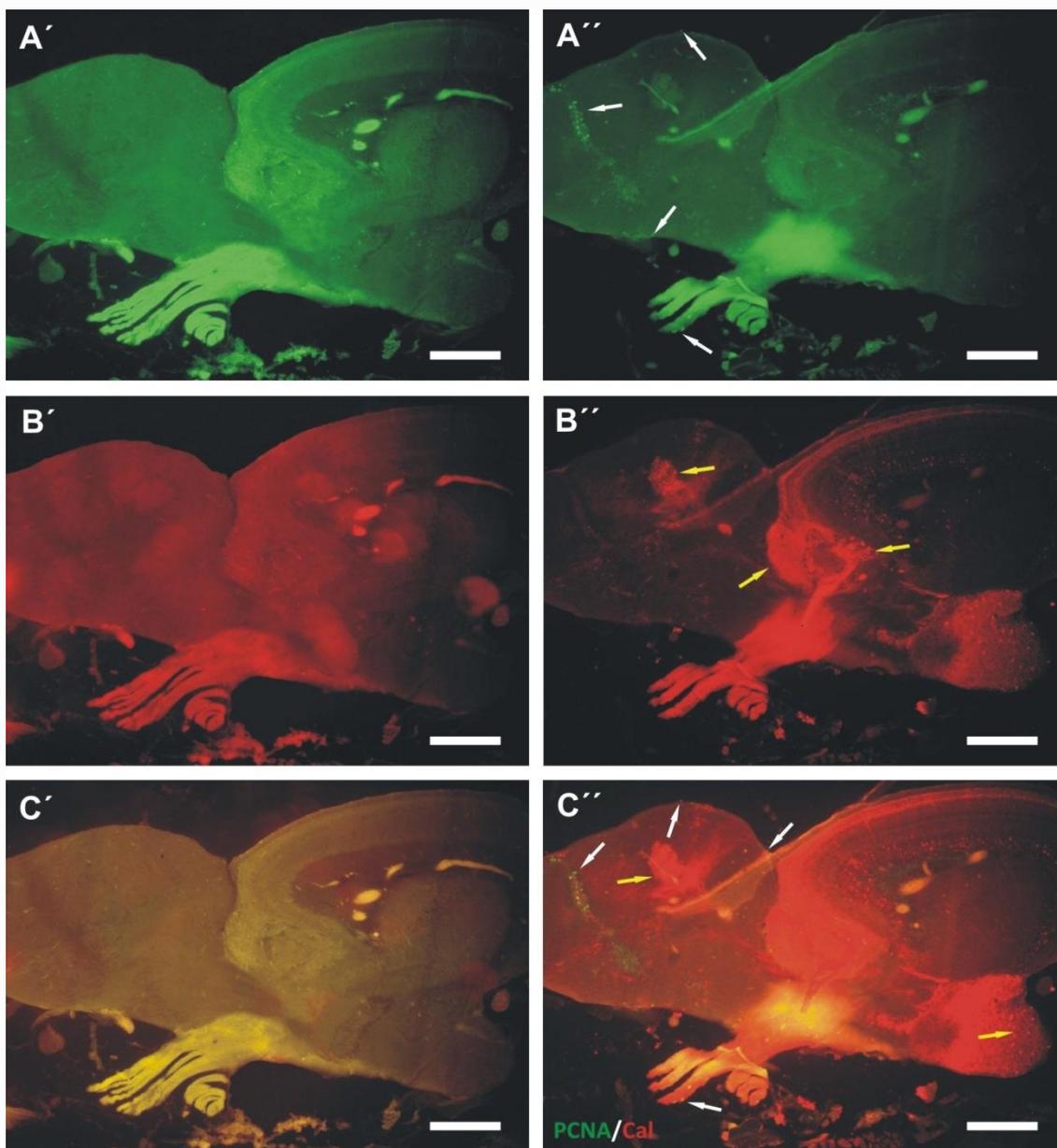


Fig. 4. Fotomicrografías de secciones sagitales de la parte antero-medial del encéfalo del pez cebra adulto. Las flechas blancas señalan células PCNA positivas y las flechas amarillas señalan células que expresan calretinina (Cal). Secciones A', B' y C' representan los controles no incubados con el anticuerpo primario, por lo que se muestran carentes de células positivas. Sección A'' muestra células positivas a la PCNA. Sección B'' muestra células positivas a la calretinina. Sección C'' muestra células PCNA positivas en proliferación y células diferenciadas que expresan calretinina. Barras de escala: 80 μ m.

En el diencefalo del pez cebra adulto se pueden llegar a advertir hasta 11 zonas de proliferación celular, de las cuales 2 están localizadas en estructuras asociadas al diencefalo. Éstas se localizan periventricularmente en el área preóptica, epitálamo, tálamo, sinencéfalo e hipotálamo. La intensidad de las células marcadas de las diferentes zonas de proliferación varía entre la región rostral (área preóptica; más intensa), intermedia (epitálamo-tálamo; menos intensa) y caudal (tálamo-hipotálamo; más intensa) del diencefalo.

El área preóptica constituye la región diencefálica más rostral, situándose entre la comisura anterior y el quiasma óptico. En la misma, se aprecia una zona de proliferación bien definida a nivel de la parte ventral del núcleo preóptico parvocelular anterior. Esta zona de proliferación, adyacente al receso preóptico del ventrículo diencefálico (DiV), se encuentra constituida por núcleos intensamente marcados y muy agrupados (Fig. 5A). Dentro del epitálamo se pueden observar dos zonas con una clara proliferación que se corresponden con el núcleo ventral de la habénula (Hav; Fig. 5B) y con el saco dorsal (SD; Fig. 5C). En la división ventral del tálamo, concretamente el núcleo talámico ventromedial (VM) se localiza una zona clara de proliferación (Fig. 5D), la cual está encuentra ventralmente a las zonas de proliferación del epitálamo y más separada de éstas.

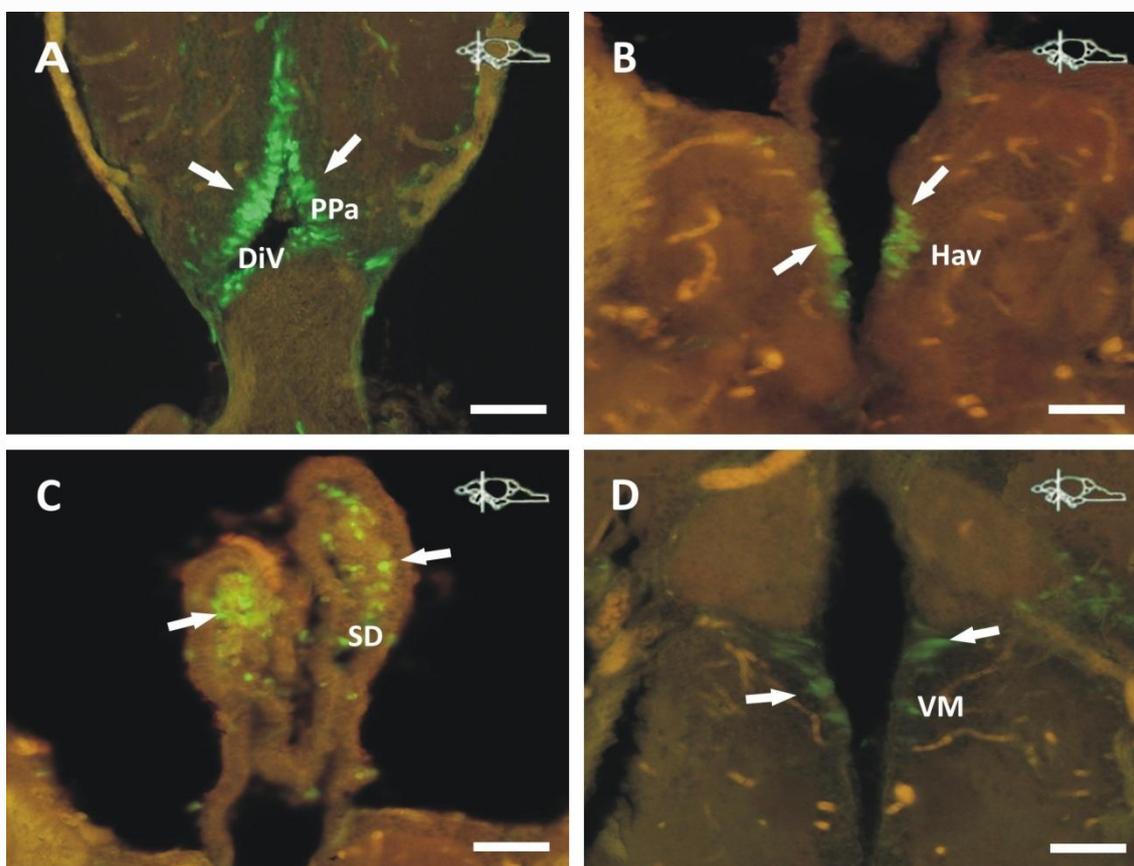


Fig. 5. Fotomicrografías de secciones transversales del diencefalo del pez cebra adulto en sentido antero-posterior mostrando las zonas proliferativas marcadas por la PCNA (canal verde). A: Células PCNA inmunorreactivas (PCNA-ir) (flechas blancas) a nivel del núcleo preóptico parvocelular anterior (PPa), limitando el receso preóptico del ventrículo diencefálico (DiV). B: Zona proliferativa (flechas blancas) en el núcleo habenular ventral (Hav) del epitálamo. C: Células PCNA-ir en el saco dorsal (SD, flechas blancas) del epitálamo. D: Células PCNA tenuemente marcadas (flechas blancas) en el tálamo ventral a la altura del núcleo talámico ventromedial (VM). Barras de escala: 40 μm (A), 50 μm (B), 83 μm (C), 33 μm (D). El nivel de dichas secciones transversales se indica en el esquema del encéfalo del pez cebra adulto adjunto en la parte superior derecha.

Situados más caudalmente al tálamo ventral se encuentran el tálamo dorsal (DT) y el núcleo pretectal periventricular (PP), los cuales a su vez aparecen ventralmente a la habénula (Figs. 6A, B). Las células PCNA-ir del PP constituyen una pequeña zona de proliferación formada por células densamente empaquetadas. Por otra parte, las células inmunorreactivas presentes en el DT se encuentran dispuestas de un modo más disperso, cubriendo una mayor área. Por debajo del PP y el DT se extiende una zona de proliferación separada y localizada a lo largo de la superficie ventricular del núcleo periventricular del tubérculo posterior (TPp; Figs. 6A, D). En la zona intermedia del diencéfalo, la proliferación está más aislada y es menos frecuente con las células distribuidas de forma más irregular. Asimismo, en esta zona se pueden observar neuronas diferenciadas que expresan el marcador Gq, situándose éstas de forma adyacente a la zona ventricular.

El hipotálamo periventricular (Figs. 6A, C y E) se encuentra dividido a su vez en tres regiones, una dorsal, una ventral y una caudal. La parte más rostral del hipotálamo periventricular ventral (Hv) (Figs. 6 A, C) presenta una proliferación poco intensa en la zona adyacente al DiV, en comparación con la de su parte más caudal, donde está más marcada (Fig. 6E). Además de las células en división también se distingue la presencia de neuronas diferenciadas que expresan el marcador Gq. En este trabajo no se ha realizado un seguimiento de la migración de las neuronas en diferenciación, por lo que sólo podemos suponer su origen en la zona de proliferación antes citada. Estas neuronas Gq inmunorreactivas se encuentran en la zona más periférica, a nivel del núcleo lateral del túber. En el hipotálamo periventricular dorsal (Hd; Fig. 6E), se observa una zona de proliferación, distribuyéndose ésta entre el núcleo tuberal posterior (PTN) y el núcleo tuberal anterior (ATN). Esta zona proliferativa se encuentra constituida por células intensamente inmunorreactivas a la PCNA, extendiéndose éstas desde el ventrículo hacia el receso lateral. Del mismo modo, la parte adyacente del PTN al ventrículo también muestra células en proliferación. El hipotálamo en su totalidad se caracteriza por la intensidad de las células PCNA-ir de las distintas regiones en proliferación, las cuales se disponen próximas entre ellas cubriendo la mayor parte de la superficie ventricular.

Además de las principales divisiones del hipotálamo que muestran células en proliferación, la glándula pituitaria (Fig. 6F), unida al hipotálamo por medio del infundíbulo, también muestra células en división, las cuales se encuentran dispuestas de modo esparcido. Asimismo, muestra células diferenciadas, positivas al marcador Gq.

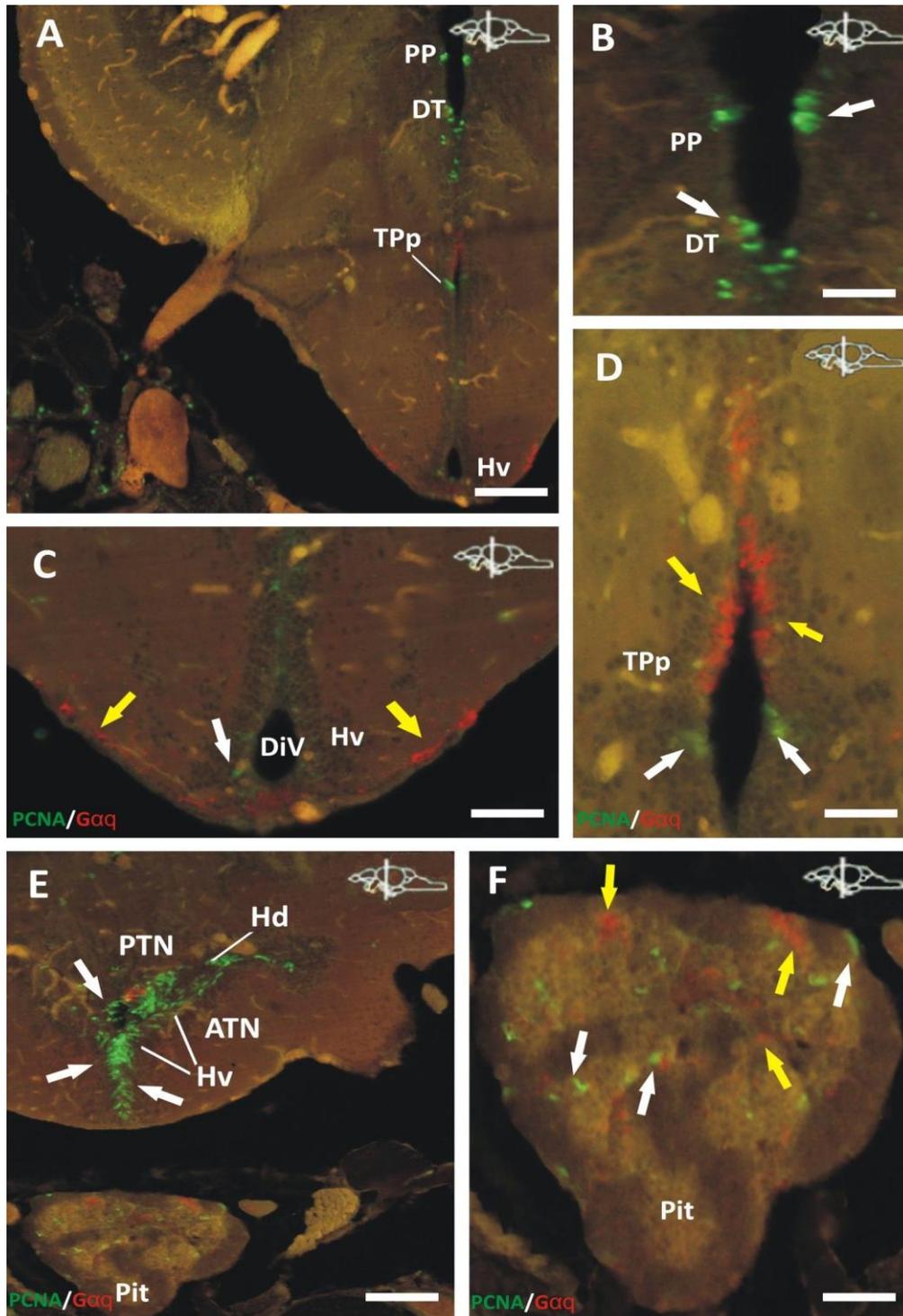


Fig. 6. Fotomicrografías fluorescentes de secciones transversales, en sentido rostro-caudal, del diencefalo del pez cebra adulto. Las flechas blancas indican células PCNA positivas y las flechas amarillas indican células Gαq positivas. A: Vista general de diferentes regiones del diencefalo. B: Células PCNA-ir en el núcleo pretecal periventricular (PP) y del tálamo dorsal (DT). C: Tenue proliferación en el hipotálamo periventricular ventral (Hv) adyacente al ventrículo diencefálico (Div), y células que expresan la Gαq. D: Células PCNA-ir del tubérculo posterior (Tpp) y células Gαq positivas. E: Zonas proliferativas en el hipotálamo periventricular ventral (Hv), hipotálamo periventricular dorsal (Hd) y el núcleo tuberal posterior (PTN), también se muestra el núcleo tuberal anterior (ATN), y la pituitaria (Pit). F: Positividad de las células de la pituitaria (Pit) a la PCNA y Gαq. Barras de escala: 83 μm (A, C, E y F), 42 μm (B y D). El nivel de dichas secciones transversales se indica en el esquema del encéfalo del pez cebra adulto adjunto en la parte superior derecha.

5. Discusión

Los resultados de este estudio se han obtenido por medio del uso de la PCNA como marcador de proliferación. Esta proteína se caracteriza por presentar una secuencia con un alto grado de conservación entre las diversas especies de vertebrados, siendo caracterizados numerosos epítomos definidos inmunológicamente con anticuerpos monoclonales (Wulliman y Puelles, 1999). El anticuerpo empleado en este estudio es el PC10, el cual tiene una afinidad particularmente alta por la PCNA, y además es especialmente útil para demostrar células en proliferación que están presentes en secciones de tejido fijadas con paraformaldehído y que están incluidas en parafina, si bien su eficacia también ha sido demostrada en tejidos fijados con Líquido de Bouin (resultados presentes). Este anticuerpo permite diferenciar las células con potencial proliferativo, es decir, las que están creciendo y dividiéndose, de aquellas que están en un estado quiescente (Wulliman y Puelles, 1999). Por otra parte, la prueba control realizada demostró total ausencia de positividad en las muestras que no fueron incubadas con el anticuerpo primario. A mayores, la presencia de células positivas a los marcadores Gq y calretinina indican que hay neuronas diferenciadas que se originan en estas zonas ventriculares y que migran tangencial o radialmente hacia sus destinos finales, sin embargo no se tienen datos para distinguir qué neuronas migran y cuáles permanecen en la zona ventricular.

Las distintas zonas proliferativas descritas en este estudio concuerdan con las identificadas en el pez cebra por Grandel *et al.* (2006) así como con otras dos especies de teleósteos, la morena (*Gymnotus omarorum*) y pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*). A mayores, para completar la discusión, se compararán resultados obtenidos con aquellos publicados para los ciclóstomos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos.

De las 11 zonas de proliferación identificadas en el pez cebra, la única no descrita por Grandel *et al.* (2006) es la que está presente en el saco dorsal del epitálamo. Por otro lado, la proliferación del núcleo preóptico parvocelular anterior únicamente se encuentra en su parte ventral, y la región de células en división de la parte ventral del hipotálamo periventricular es continua con la de la pituitaria por medio del infundíbulo.

Las regiones con proliferación en el diencefalo aquí descritas también coinciden en gran medida con las identificadas en el pez espinoso por Ekström *et al.* (2001). La principal diferencia radica en que en esta especie la proliferación en el tálamo ventral está dividida entre su parte rostral y caudal, además de no haber detectado células en división en el saco dorsal del epitálamo, en el cual solo fueron detectadas células en división a lo largo del surco subhabenular y el núcleo ventral habenular. En el estudio llevado a cabo por Olivera-Pasilio *et al.* (2014) sobre la proliferación en el encéfalo de la morena, fueron identificadas un mayor número de zonas positivas. Así, en el área preóptica, además del PPa, también observaron proliferación en las subdivisiones posteriores del núcleo preóptico periventricular y el núcleo supraquiasmático.

El modo en el que se distribuyen las distintas zonas de proliferación en el encéfalo de teleósteos muestra un elevado grado de similitud entre *Gymnotus omarorum*, *Gasterosteus aculeatus* y *Danio rerio*. En ellas se han identificado más de 10 regiones de proliferación, localizándose la mayor parte en el diencefalo.

En ciclóstomos se han observado diversas zonas de proliferación en diferentes regiones neuroanatómicas tanto del cerebro anterior, medio y posterior durante la embriogénesis y el desarrollo larvario, siendo la actividad proliferativa prácticamente

inexistente en el cerebro adulto. En el estadio larvario, Villar-Cheda *et al.* (2006) identificaron en el diencefalo zonas de proliferación en la habénula y el complejo pineal, una zona en el tálamo dorsal y otra en el tálamo ventral, en el pretecho y en el hipotálamo. En la etapa de larva temprana la zona ventricular se compone de un mosaico de regiones proliferativas que se distinguen de las regiones vecinas por la apariencia y espesor homogéneo de las células PCNA positivas, estando la neurogénesis ampliamente expandida a través de la superficie ventricular. Tras la metamorfosis, las lampreas adultas apenas exhiben zonas de proliferación, quedando en el diencefalo escasas células localizadas en la habénula. Otras regiones no tratadas en este estudio, pero que en la lamprea adulta sí presentan proliferación, son el rombencéfalo y el cerebelo (Vidal Pizarro *et al.*, 2004). Los peces cebras alcanzan el estadio larvario en 72 horas tras la fecundación y a los 5 días ya están diferenciadas las principales regiones del encéfalo. En las larvas las áreas de proliferación se caracterizan por aparecer en bandas estrechas en las que la neurogénesis está concentrada y separada por zonas de epéndimo no proliferativo, lo que da pie a pensar que la proliferación desde una etapa temprana queda concentrada en áreas especializadas (Wulliman y Puelles, 1999; Wulliman y Knipp, 2000). Estas diferencias entre los teleosteos y las lampreas en el modo en el que tiene lugar la proliferación postembrionaria puede ser debida a los ciclos de vida tan distintos de estos dos grupos, además de la compleja organización del cerebro de los teleosteos, el cual exhibe numerosos núcleos de migración y por lo tanto una compleja morfogénesis (Vidal Pizarro *et al.*, 2004).

El análisis de la proliferación en los estados larvarios premetamórficos, metamórficos y adulto de anfibios ha sido detallada por Raucci *et al.* (2006). Al igual que en la lamprea, los anfibios en el estado larvario muestran en el cerebro en desarrollo la mayor parte de los núcleos celulares marcados por la PCNA, estando todas las células de la zona ventricular y la mayoría de la zona subventricular inmunomarcadas. Esta situación cambia totalmente durante la metamorfosis, en la cual las regiones del encéfalo ya están diferenciadas y el número de células marcadas se reduce de forma notable, siendo el diencefalo, al igual que en el pez cebrado, la región con la proliferación más notable. En el área preóptica destaca el núcleo preóptico magnocelular con numerosas células PCNA positivas. Tanto el hipotálamo como la habénula son regiones que, al contrario que en teleosteos, carecen de proliferación en el cerebro adulto. El núcleo ventromedial del tálamo es una de las zonas del diencefalo de adultos que muestra la proliferación más marcada (Raucci *et al.*, 2006).

Los reptiles son otra de las clases de vertebrados que muestran neurogénesis adulta en el encéfalo. Los principales estudios se han llevado a cabo en especies de lagartos, como por ejemplo *Podarcis hispanica*, *Podarcis sicula*, *Tarentola mauritanica*, y en la tortuga *Trachemys scripta*, siendo la principal región del encéfalo con proliferación el telencéfalo. También se ha observado proliferación en el cerebelo de *Podarcis hispanica*. La mayoría de las células nuevas que surgen se diferencian en neuronas y se incorporan a los circuitos neuronales preexistentes. Estas neuronas nuevas nacen en la zona ventricular a partir de la que migran a través del parénquima hacia su destino final (Font *et al.*, 2001; García-Verdugo *et al.*, 2002; Kaslin *et al.*, 2008).

En las aves, la proliferación y la neurogénesis se encuentran dispersas a lo largo del ventrículo telencefálico lateral, situándose los centros de proliferación con una densidad mayor de células en proliferación en su parte dorsal y ventral. Las zonas donde no se ha verificado proliferación se corresponden con el hipotálamo, tálamo, techo óptico y cerebelo, al contrario que en el pez cebrado. De estas nuevas neuronas generadas, se ha visto que una gran mayoría mueren, sufriendo dos tercios de ellas un proceso de degeneración que les impide diferenciarse e integrarse en los circuitos neuronales preexistentes (García-Verdugo *et al.*, 2002).

En el cerebro adulto de mamíferos han sido identificadas únicamente dos zonas con actividad neurogénica: zona subependimal/subventricular (SVZ) del ventrículo lateral del telencéfalo y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo, las cuales se encuentran localizadas en el telencéfalo. El giro dentado en teleósteos tiene su homólogo funcional, embriológico y neuroanatómico en la porción lateral del área telencefálica dorsal del pez cebra. La región donde tiene lugar en mayor medida la neurogénesis adulta se encuentra en el SVZ. En estas dos zonas del cerebro adulto existen células con actividad mitótica que pueden ser clasificadas en dos grupos: células troncales (que a su vez generan nuevas células troncales) y células progenitoras neuronales (que generan neuronas en etapas tempranas, y astrocitos y oligodendrocitos, en etapas tardías). Desde el SVZ las neuronas migran a través de la corriente de migración rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (Arias-Carrión *et al.*, 2007).

6. Conclusiones

1. En el diencefalo del pez cebra adulto se pueden distinguir 11 zonas que presentan actividad mitótica, constituyendo la región encefálica con mayor número de zonas de proliferación. Asimismo, todas las regiones proliferativas del diencefalo estaban asociadas a la superficie ventricular, cambiando la disposición e intensidad de los núcleos de proliferación de forma rostro-caudal.
2. En peces teleósteos como el pez cebra, la PCNA puede emplearse como un marcador fiable de proliferación, presentando el anticuerpo utilizado gran afinidad y especificidad por la PCNA. Asimismo, el haber llevado a cabo el proceso de recuperación antigénica para así “descubrir” el epítipo del antígeno que ha podido quedar enmascarado tras la fijación parece haber favorecido la unión antígeno-anticuerpo.
3. Tras comparar las zonas y grado de proliferación en el diencefalo entre distintas especies de teleósteos con las de otras clases de vertebrados, se aprecia como éstas van desapareciendo y quedando totalmente restringidas a unas áreas específicas a medida que ascendemos en el subfilo Vertebrata, hasta llegar a los mamíferos, donde únicamente se observa proliferación en dos regiones muy localizadas del telencéfalo. Parece que en la transición de los anamniotas a los amniotas, y especialmente si comparamos los vertebrados no mamíferos con los mamíferos, las zonas proliferativas del cerebro adulto se van reduciendo o bien suprimiendo.

Conclusions

1. In the diencephalon of adult zebrafish can be distinguished 11 zones that have mitotic activity, becoming in the brain region with most number of proliferative zones. Further all these proliferative regions of the diencephalon are associated to ventricular surface, changing the disposition and intensity of the proliferation nuclei in a rostrocaudal way.

2. It seems that the PCNA can be used as a reliable proliferation marker and the antibody employed shows affinity for the PCNA. In the same way, the fact to perform an antigen recovering to discover the antigen's epitope which could be masked by the fixation process had favoured the antigen-antibody union.
3. After comparing the areas and extent of growth in the diencephalon between different teleostean species with other classes of vertebrates, we see how these areas disappear and keep totally restricted to specific areas as we ascend in the subphylum Vertebrata, reaching the mammals, where proliferation was observed only in two localized regions of the forebrain. It seems that in the transition from anamniotes to amniotes, especially if we compare non-mammalian vertebrates to mammals, proliferative areas of the adult brain are reduced or phased out.

7. Bibliografía

- Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Collín R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol.* 2007; 44(9):541-550.
- Benner M. Imagen *Danio rerio*, 20/09/2013. Citado 10/03/2015. Disponible en: <http://www.dugdug.com/dr-benner-discusses-zebrafish-selenite-response>.
- Bilotta J, Saszik S. The zebrafish as a model visual system. *Int J Devl Neuroscience.* 2001; 19(7):621-629.
- Braford MR, Northcutt RG. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In: Davis RE and Northcutt RG (eds): "Fish Neurobiology", vol. 2, Univ. Michingan Press, Ann Harbor; 1983; p. 117-133.
- Burley SK, Berman HM. Human PCNA, 3/11/2012. Citado 10/03/2015. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AXC>.
- Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation* 2ª ed. New York: Wiley-Liss, 2005; p. 39-47.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. Distribution of calretinin during development of the olfactory system in the brown trout, *Salmo trutta fario*: Comparison with other immunohistochemical markers. *J Chem Neuroanat.* 2008; 35(4):306-316.
- Ekström P, Johnsson CM, Ohlin LM. Ventricular Proliferation Zones in the Brain of an Adult Teleost Fish and Their Relation to Neuromeres and Migration (Secondary Matrix) Zones. *J Comp Neurol.* 2001; 436(2):92-110.
- Font E, Desfilis E, Pérez-Canellas MM, García-Verdugo JM. Neurogenesis and neural regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol.* 2001; 58(5):276-295.
- García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull.* 2002; 57(6):765-775.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 2013; 29(11):611-620.
- Gerhard GS. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Experimental Gerontology.* 2003; 38(11-12):1333-1341.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol.* 2006; 295(1):263-277.

- Kaslin J, Ganz J, Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; 363(1489):101-122.
- Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997; 14(6):629-640.
- Meek J, Nieuwenhuys R. Holostean and Teleosts. En Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. *The central nervous system of vertebrates. Volume 2.* Springer; 1998; p. 882-884.
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007; 129(4):665-679.
- Montuenga L, Esteban FJ, Calvo A. *Técnicas en histología y biología celular 2ª ed.* Elsevier Masson; 2014. Capítulo 6, Técnicas Inmunohistoquímicas; p. 109-116.
- Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL. Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67 (MIB-5) Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization for Histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(12):1681-1688.
- Nelson JS. *Fishes of the world 4ªed.* Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.
- Olivera-Pasilio V, Peterson DA, Castelló ME. Spatial distribution and celular composition of adult brain proliferative zones in the teleost. *Gymnotus omarorum.* *Neuroanat.* 2014; 8(8):1-19.
- Palomo-González MJ, Pérez-Requeña J, Rego-González M, López-Nieto M, Cañizares Benítez C. Evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNORs) en neoplasia foliculares tiroideas. *Rev Esp Patol.* 2002, 35(1):95-100.
- Perry S, Ekker M, Farrel A, Brauner C. *Fish Physiology Vol. 29: Zebrafish.* Amsterdam: Elsevier, 2010. Chapter 2. Nervous system development and general organization; p.28-29.
- Raucci F, Di Fiore MM, Pinelli C, D'Aniello B, Luongo L, Polese G, Rastogi RK. Proliferative activity in the frog brain: A PCNA-immunohistochemistry analysis. *J Chem Neuroanat.* 2006; 32 (2-4):127-142.
- Spencer R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The Behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio Rerio.* *Biological Reviews.* 2008; 83(1):13-34.
- Tavares B, Santos Lopes S. The importance of Zebrafish in biomedical research. *Acta Med Port.* 2013; 26(5):583-592.
- Tsurimoto T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochem Biophys Acta.* 1998; 1443(1-2):23-39.
- Vidal Pizarro I, Swain GP, Selzer ME. Cell proliferation in the lamprey nervous system. *J Comp Neurol.* 2004; 469(2):298-310.
- Villar-Cheda B, Pérez-Costas E, Meléndez-Ferro M, Abalo XM, Rodríguez-Muñoz, R, Anadón R, Rodicio MC. Cell Proliferation in the Forebrain and Midbrain of the Sea Lamprey. *J Comp Neurol.* 2006; 494(6):986-1006.
- Wang SC. PCNA: a silent housekeeper or a potencial therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35(4):178-186.
- Wulliman MF, Rupp B, Reichert Heinrich. *Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas.* Basel : Birkhäuser Verlag, 1996.
- Wulliman MF, Puellas L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anat Embryol.* 1999; 199(4):329-348.
- Wulliman MF, Knipp S. Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anat Embryol.* 2000; 202(5):385-400.
- Zupanc GKH, Hinsch K, Gage FH. Proliferation, Migration, Neuronal Differentiation and Long-Term Survival of New Cells in the Adult Zebrafish Brain. *J Comp Neurol.* 2005; 488(3):290-319.
- Zupanc GKJ. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J Comp Physiol.* 2006; 192:649-670.