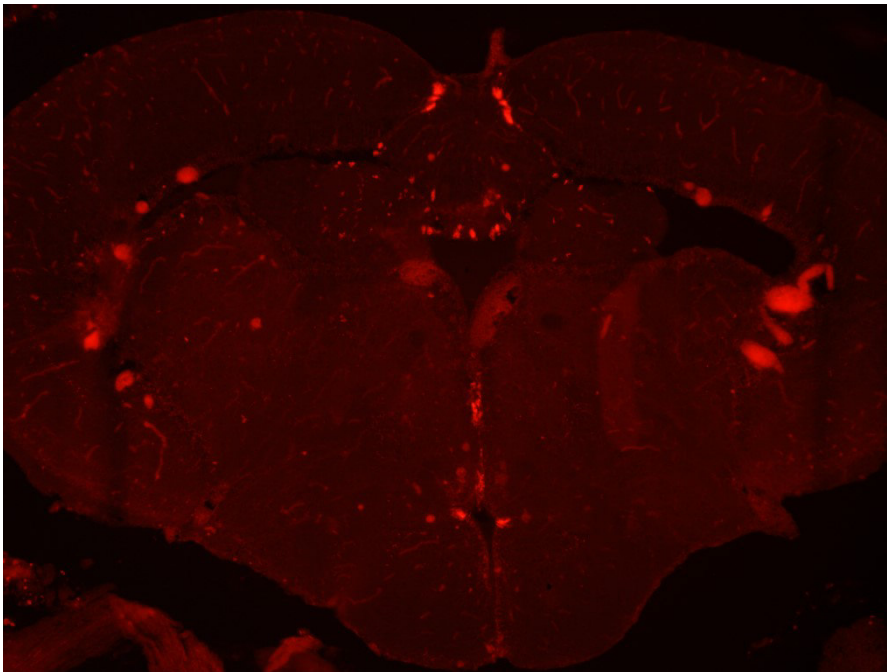


Trabajo de Fin de Grado

Neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Neuroxénese no mesencéfalo do peixe cebra adulto (*Danio rerio*)

Neurogenesis in the midbrain of the adult zebrafish (*Danio rerio*)



Nerea Pardo Cundíns

Julio, 2017

Tutores académicos | Dr. Antonio M. Castro Castro
Dra. M^a Luz Díaz Prado

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña, y Dña María Luz Díaz Prado, Profesora Contratada Interina en el anteriormente citado Departamento,

INFORMAN,

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por Nerea Pardo Cundíns y con título “Neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*)” ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su envío y presentación al tribunal calificador.

Y, para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña a 18 de julio de 2017.

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Fdo. María Luz Díaz Prado

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias en primer lugar a mis tutores Dr. Antonio Castro Castro y Dra. María Luz Díaz Prado por ayudarme y enseñarme tanto con este trabajo, pero sobre todo por su paciencia. También me gustaría agradecerle al resto del personal del laboratorio de Biología Celular por ofrecerme su ayuda. Pero en especial quiero darles las gracias a mis padres por haberme apoyado tanto todo este tiempo.

Resumen

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo muy útil para analizar los mecanismos implicados en la regeneración de tejido dañado en el sistema nervioso central de individuos adultos. En este estudio se ha empleado el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) con el fin de demostrar la existencia de proliferación celular en el mesencéfalo de individuos adultos de esta especie. Mediante técnicas de inmunofluorescencia, se observó neurogénesis en diversas áreas del mesencéfalo. Los resultados obtenidos indican que existe gran proliferación celular activa en el toro longitudinal, así como en las regiones dorsomedial y ventrocaudal del techo óptico. También se observaron células positivas para PCNA en otras áreas del mesencéfalo. La distribución de las zonas de proliferación concuerda con las observadas en otros teleósteos. Además, la neurogénesis descrita en teleósteos es mayor que la estudiada en otros vertebrados superiores.

Palabras claves: pez cebra, neurogénesis, proliferación celular, mesencéfalo, PCNA.

Resumo

O peixe cebra (*Danio rerio*) é un organismo moi útil para analizar mecanismos implicados na rexeneración de tecido danado no sistema nervioso central de individuos adultos. Neste estudio empregouse o Antixeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) a fin de demostrar a existencia de proliferación celular no mesencéfalo de individuos adultos desta especie. Mediante técnicas de inmunofluorescencia, observouse neuroxénese en diversas áreas do mesencéfalo. Os resultados obtidos indican que existe unha gran proliferación celular activa no toro lonxitudinal, así como nas rexións dorsomedial e ventrocaudal do teito óptico. Tamén se observaron células positivas para PCNA noutras áreas do mesencéfalo. A distribución das zonas de proliferación concorda coas observadas noutros telósteos. Ademais, a neuroxénese descrita en telósteos é maior que a estudada noutros vertebrados superiores.

Palabras clave: Peixe cebra, neuroxénese, proliferación celular, mesencéfalo, PCNA.

Abstract

The zebrafish (*Danio rerio*) is a very useful organism to analyze the mechanisms involved in the regeneration of damaged tissue in the central nervous system of adult individuals. In this study the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) has been used in order to demonstrate the existence of cell proliferation in the midbrain of adult individuals of this specie. By immunofluorescence techniques, neurogenesis was observed in several areas of the midbrain. The results obtained indicate that there is a great active cellular proliferation in the torus longitudinalis, as in the dorsomedial and ventrocaudal regions of the optic tectum. There also are PCNA positive cells in the rest of the midbrain. The distribution of proliferation zones agrees with those observed in other teleosts. In addition, the neurogenesis described in teleosts is greater than that studied in other higher vertebrates.

Key words: zebrafish, neurogenesis, cellular proliferation, midbrain, PCNA.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 El pez cebra.....	1
1.2 Neurogénesis.....	2
1.3 Sistema nervioso central.....	3
1.3.1 Techo óptico.....	4
1.3.2 Toro semicircular.....	4
1.3.3 Tegmento.....	4
1.4 Técnicas inmunohistoquímicas.....	5
1.5 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).....	7
2. Objetivos.....	9
3. Material y métodos.....	10
3.1 Obtención y procesamiento del material biológico.....	10
3.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	10
3.3 Prueba control.....	11
3.4 Observación y análisis de las muestras.....	11
4. Resultados.....	12
4.1 Inmunofluorescencia indirecta para PCNA.....	12
4.2 Inmunofluorescencia indirecta para TH.....	14
5. Discusión.....	15
5.1 PCNA como marcador de proliferación celular.....	15
5.2 Neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra.....	15
5.3 Comparación con otros teleósteos.....	16
5.4 Comparación con otros vertebrados.....	17
6. Conclusiones.....	19
8. Bibliografía.....	20

1. Introducción

Con el presente trabajo se pretende estudiar las zonas de proliferación celular reconocibles en el mesencéfalo de individuos adultos de pez cebra (*Danio rerio*). Se ha elegido esta especie por tratarse de un organismo modelo muy utilizado en diferentes campos de investigación.

1.1 El pez cebra

El pez cebra o *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan 1822) es un pequeño pez 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, subgrado Esteleostomi (Osteichthyes), grado Teleostomi, superclase Gnathostomata, subphyllum Craniata, phylum Chordata (Nelson 2006).

Este pez rara vez excede los 40 mm de longitud estándar (desde la punta del hocico hasta el origen de la aleta caudal). Tiene un cuerpo fusiforme y comprimido lateralmente. La boca se encuentra en posición oblicua y dirigida hacia arriba. La mandíbula inferior sobresale más allá de la parte superior. Los ojos son centrales y no se ven desde arriba. Las características más distintivas del pez cebra son una línea lateral incompleta que se alarga hasta la base de la aleta pélvica, dos pares de barbillas y 5-7 franjas longitudinales de color azul oscuro que se extienden desde detrás del opérculo hasta la aleta caudal. La aleta caudal también presenta estas rayas, mientras que la aleta dorsal tiene la parte superior azul oscuro con un borde blanco (Figura 1). Tanto los machos como las hembras presentan una coloración similar, aunque los machos tienden a tener las aletas anales más grandes con una coloración más amarillenta.



Figura 1: Anatomía externa del pez cebra (*Danio rerio*); la imagen recogida se corresponde con un macho adulto. Fuente: <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=4653&AT=zebrafish> (22/6/2017)

Su área de distribución natural se localiza alrededor de las cuencas de los ríos Ganges y Brahmaputra, en el noroeste de la India, Bangladesh y Nepal, aunque en el pasado se recogieron especímenes en las cuencas de los ríos Indus, Cauvery, Pennar, Godavari y Mahanadi (Figura 2).

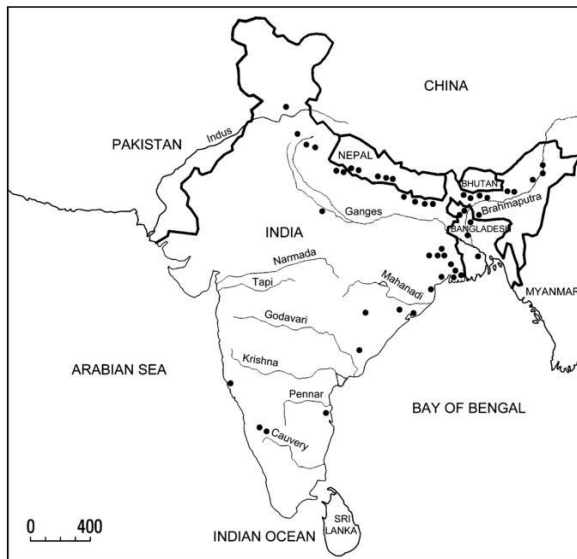


Figura 2: Distribución natural de *Danio rerio*. Los puntos negros indican los lugares donde se ha registrado su presencia. Fuente Spence *et al.* 2008.

El pez cebra es conocido por ser uno de los organismos modelo de vertebrados más usado en genética, biología del desarrollo, neurofisiología y biomedicina debido a los atributos que se citan a continuación. Al tratarse de un pez pequeño y robusto puede mantenerse fácilmente y de forma barata en el laboratorio. A esto se le añade el hecho de que se reproduce durante todo el año y que las hembras se pueden aparear cada 2-3 días produciendo puestas de varios cientos de huevos. Los huevos son grandes en relación con los de otros peces (0,7 mm de diámetro durante la fertilización) y ópticamente transparentes. Además, la fertilización es externa, por lo que los embriones vivos son accesibles para ser manipulados y

monitorizados a lo largo de todas las etapas del desarrollo. Se desarrollan rápidamente, ya que las larvas muestran conductas de búsqueda de alimento y evitación a los cinco días tras la fertilización, es decir, a los dos o tres días después de la eclosión (Spence *et al.* 2008).

Además, *Danio rerio* resulta muy útil para el estudio de los mecanismos implicados en la regeneración de tejido dañado en individuos adultos en distintos órganos como el músculo, el corazón, el hígado, la piel, las células pigmentarias, las aletas y el sistema nervioso central (Kizil *et al.* 2012).

1.2 Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso por el cual las células neurales indiferenciadas generan neuronas maduras y funcionales. Se inicia con la inducción de los precursores neuronales y una fase de división celular que aumenta el número de estos precursores. A continuación se produce la diferenciación para generar neuronas post-mitóticas. Todas estas etapas son espacial y temporalmente controladas para generar múltiples tipos de células neuronales y gliales que eventualmente poblarán el sistema nervioso central maduro (Schmidt, Strähle & Scholpp 2013).

Aunque se pensaba que el sistema nervioso central de los vertebrados adultos carecía del potencial para producir nuevas neuronas, estudios realizados en las últimas décadas han demostrado lo contrario. En vertebrados, la neurogénesis ocurre no solo durante la embriogénesis y poco después de nacer, sino también durante las etapas adultas (Zupanc, Hirsch & Gage 2005, Grandel *et al.* 2006).

A pesar de la presunción universal de la neurogénesis en vertebrados adultos, análisis comparativos han demostrado diferencias importantes entre vertebrados inferiores y superiores. Por ejemplo, en mamíferos, la generación de nuevas neuronas en adultos parece estar restringida a dos regiones del sistema nervioso central: la zona

subventricular y el giro dentado del hipocampo. Además, el número de nuevas neuronas es extremadamente pequeño en comparación con el número total de células cerebrales.

Por otro lado, investigaciones con peces teleósteos han demostrado la existencia de zonas de proliferación como fuente de nuevas neuronas en muchas regiones del cerebro (Figura 3). Así, mientras que en mamíferos es poco frecuente el reemplazo de neuronas dañadas por nuevas células neuronales, los peces muestran un enorme potencial para la regeneración neuronal después de lesiones o enfermedades neurodegenerativas (Zupanc, Hinsch & Gage 2005, Zupanc 2006).

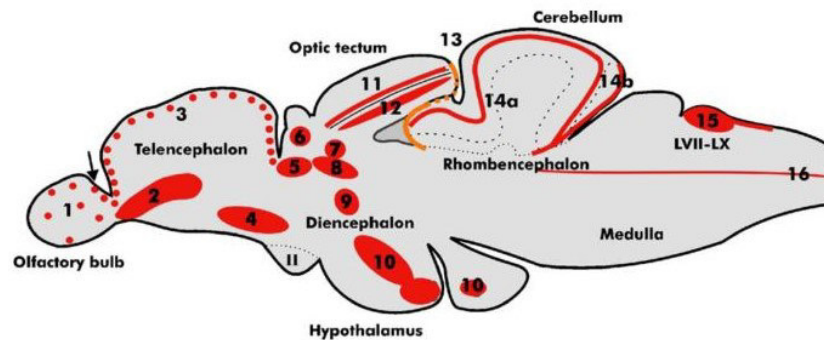


Figura 3: Dibujo esquemático en vista lateral de las zonas de proliferación en el cerebro adulto del pez cebra (áreas rojas) numeradas por números arábigos. Fuente: Grandel *et al.* 2006.

La mayoría de las nuevas células generadas en el cerebro de teleósteos adultos se originan en zonas específicas de proliferación. Muchas de estas zonas, especialmente en el telencéfalo y en el diencéfalo, se localizan en la superficie de los ventrículos o cerca. Las zonas de proliferación también se pueden situar alejadas de cualquier ventrículo como en el caso del cerebelo, y se piensa que al menos algunas de ellas provienen de áreas situadas en las superficies ventriculares durante estadios embrionarios (Zupanc & Sîrbulescu 2011).

1.3 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal, que están protegidos por el cráneo y la columna vertebral, respectivamente. El encéfalo es la principal área integradora del sistema nervioso mientras que la médula espinal desempeña varias funciones, contiene numerosas vías nerviosas que van y vienen del encéfalo, sirviendo además como área integradora para muchas actividades nerviosas subconscientes.

El encéfalo (Figura 4), a su vez, se divide en: telencéfalo y diencéfalo (que forman el encéfalo anterior), mesencéfalo (también llamado encéfalo medio), y rombencéfalo o encéfalo posterior (Guyton 1994).

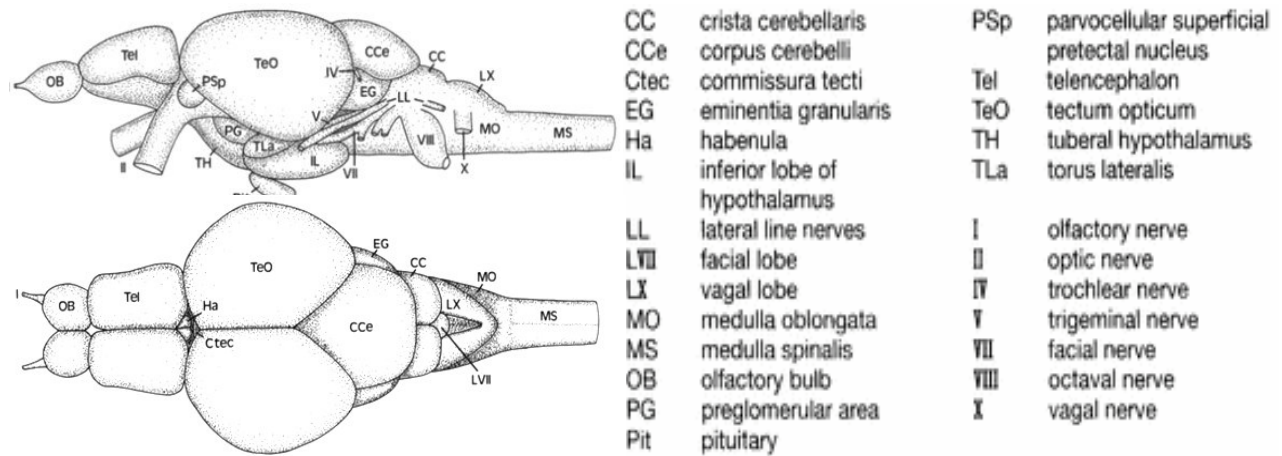


Figura 4: Vista lateral (imagen de arriba) y dorsal (imagen de abajo) del cerebro de pez cebra (*Danio rerio*) adulto. Fuente: Wullimann, Rupp & Reichert 1996.

Dado que la región estudiada en este trabajo es el mesencéfalo, a continuación se describirán sus distintas partes tomando como referencia la información publicada por Wullimann, Rupp & Reichert (1996).

El mesencéfalo del pez cebra incluye dorsalmente el techo óptico y ventralmente, el toro semicircular y el tegmento mesencefálico.

1.3.1 Techo óptico

El techo óptico (TeO) es la estructura estratificada más compleja del cerebro del pez cebra. Se divide en cuatro regiones: zona gris periventricular (PGZ), zona blanca profunda, zona central, y zona gris y blanca superficial; las cuales, a su vez, pueden subdividirse en varios estratos. A diferencia del resto de vertebrados, la capa tectal más superficial de los teleosteos no está formada por fibras retinales, sino que consiste en axones cuyo soma se encuentra en el toro longitudinal (TL). Este es una eminencia longitudinal simétrica de células granulares unidas al techo que se localiza en el ventrículo medio tectal y solo aparece en actinopterigios. La comisura tectal (Ctec) se encuentra entre los hemisferios del techo óptico.

1.3.2 Toro semicircular

El toro semicircular sensorial (TS) es la diana mesencefálica del sistema octavolateral ascendente y se encuentra en la parte superior del tegmento lateral donde protruye hacia el ventrículo tectal. En ciprínidos, el núcleo central del toro semicircular está relacionado con la audición, mientras que el núcleo ventrolateral se relaciona con la mecanorrecepción.

1.3.3 Tegmento

El término tegmento es utilizado de forma ambigua en la literatura. En mamíferos, el techo del mesencéfalo consiste en el colículo superior (techo óptico de vertebrados no mamíferos, que es parte del sistema visual) y el colículo inferior (toro semicircular del resto de vertebrados, que es parte del sistema auditivo). El mesencéfalo ventral está separado del techo del ventrículo y forma el tegmento, el cual tiene un papel dominante en las funciones motoras. Mientras que el tegmento mesencefálico surge

embriológicamente de la placa basal, el toro semicircular y el techo óptico derivan de la placa alar.

El tegmento incluye muchas estructuras motoras, como el núcleo nervioso oculomotor, el núcleo troclear, el núcleo parasimpático Edinger-Westphal, el núcleo rojo y la porción más rostral de la formación reticular superior. También contiene los núcleos tegmentales dorsal (DTN) y rostral, el núcleo perilemniscal, el núcleo del lemnisco lateral, y el núcleo interpeduncular (NIn).

Mientras que las fibras del nervio oculomotor (nervio III) abandonan el cerebro ventralmente, entre el tegmento y el lóbulo inferior, el núcleo motor troclear envía sus axones dorsalmente donde decusan en la válvula cerebelosa, para retornar caudolateralmente y salir del cerebro como el nervio troclear (nervio IV) entre el toro semicircular y el rombencéfalo.

El tegmento está limitado rostralmente por el diencefalo, el tálamo dorsal y el tubérculo posterior; ventralmente por el hipotálamo; y dorsalmente por el toro semicircular. Caudalmente, el tegmento es contiguo con la médula oblonga sin límite morfológico claro. El núcleo interpeduncular y el núcleo troclear son considerados los núcleos tegmentales más caudales. Sin embargo, el gris central rombencefálico, así como la formación reticular superior, se extienden rostralmente hasta este nivel.

1.4 Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas se basan en la afinidad entre antígenos y anticuerpos. Esta afinidad se debe a la atracción que se produce entre estas moléculas y provoca que se aproximen y se mantengan unidas (Kiernan 2008). Debido a la gran especificidad y alta afinidad de los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, se puede detectar cantidades muy pequeñas de moléculas en los tejidos. La mayoría de técnicas inmunohistoquímicas pueden aplicarse a tejidos fijados e incluidos en parafina con buenos resultados (siempre que la fijación tisular, su procesamiento e inclusión se realicen adecuadamente). Se puede diferenciar dos tipos de métodos: los métodos directos y los métodos indirectos.

En los métodos directos (o de una capa) se utiliza un anticuerpo primario marcado que se unirá al antígeno específico permitiendo su detección y localización (Figura 5).

En los métodos indirectos se emplea un anticuerpo primario no marcado. En el caso de los métodos de doble capa, este será reconocido por un anticuerpo secundario marcado (Figura 6).

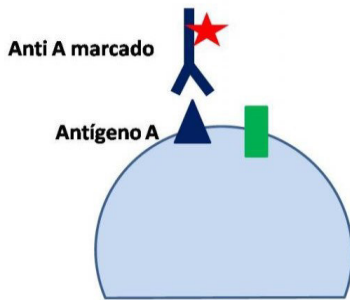


Figura 5: Método inmunohistoquímico directo.
Fuente:
<http://www.neurowikia.es/content/diagn%C3%B3stico-anatomopatol%C3%B3gico-y-t%C3%A9cnicas-de-biolog%C3%AD-molecular-en-tumores-primarios-del-sn> (22/6/2017).

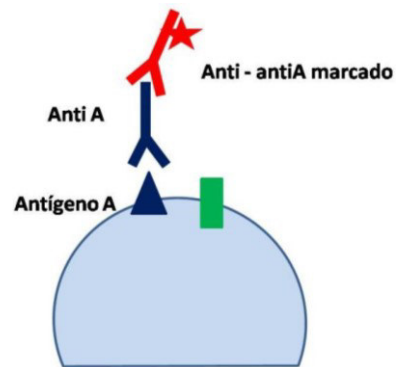


Figura 6: Método inmunohistoquímico indirecto.
Fuente:
<http://www.neurowikia.es/content/diagn%C3%B3stico-anatomopatol%C3%B3gico-y-t%C3%A9cnicas-de-biolog%C3%AD-molecular-en-tumores-primarios-del-sn> (22/6/2017).

El marcaje inmunohistoquímico se puede realizar con fluorocromos (técnicas de inmunofluorescencia), con enzimas, con oro, o con isótopos radiactivos. De estos procedimientos, uno de los más conocidos, y el empleado en este trabajo, es la técnica de inmunofluorescencia. Se basa en el uso de fluorocromos, que son moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda emitiendo a otra diferente. Para su visualización se necesita un microscopio de epifluorescencia equipado con los filtros adecuados para el fluorocromo empleado. Los fluorocromos que se han utilizado en este trabajo son:

- Isotiocianato de fluoresceína: absorbe luz azul y emite fluorescencia verde (Figura 7). Se ha utilizado para detectar la presencia de tirosina hidroxilasa (TH) en el tejido.
- Rodamina: absorbe la luz verde y emite fluorescencia roja (Figura 7). Se ha utilizado para detectar la presencia del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).

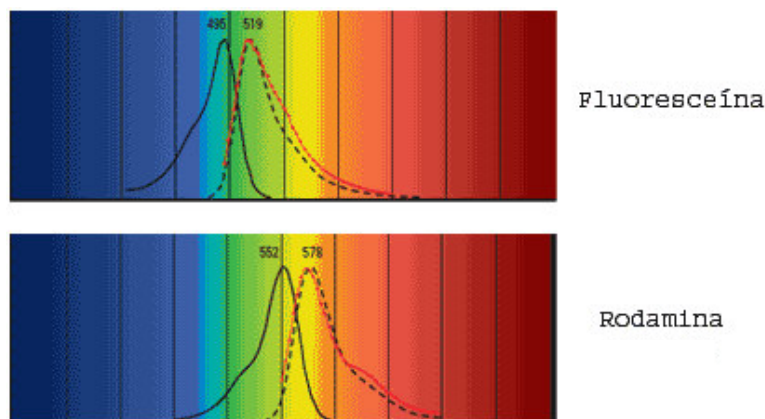


Figura 7: Espectro de excitación y de emisión de los fluorocromos usados. La línea negra continua representa el espectro de excitación y la línea negra punteada muestra el espectro de emisión. Fuente: http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_5.htm (22/6/2017).

1.5 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular también conocido comúnmente como PCNA (de las siglas en inglés Proliferation Cell Nuclear Antigen) es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución, encontrándose en todas las especies eucariotas, así como en *Archaea*. Se ha descubierto que el PCNA tiene un papel crítico en varios procesos biológicos relacionados con el metabolismo del ADN. Es un componente esencial de la maquinaria de replicación del ADN, funcionando como proteína accesoria de la polimerasa δ necesaria para la síntesis de ADN cromosómico, y de la ADN polimerasa ϵ . El PCNA también es necesario para la recombinación, la reparación, el ensamblaje y la remodelación de la cromatina. Además, interacciona con proteínas celulares implicadas en la regulación del ciclo celular por lo que actualmente se usa como marcador de la proliferación celular (Kelman 1997, Naryzhny 2008, Strzalka & Ziemienowicz 2011, Dieckman, Freudenthal & Washington 2012).

En cuanto a su estructura, el PCNA es un homotrímero en forma de anillo que rodea la doble cadena de ADN (Figura 8). Existen diferencias estructurales entre bacterias, *Archaea* y eucariotas en cuanto al número de dominios que componen cada subunidad y en el modo en que estas se unen para formar el anillo. La estructura cristalográfica del PCNA de eucariotas muestra que cada subunidad del homotrímero consiste en dos dominios independientes y plegados de forma similar. El dominio N-terminal (residuos 1-117) se denomina dominio A, mientras que el dominio C-terminal se conoce como dominio B. Ambos dominios se mantienen unidos de forma estable por una lámina β extendida, la cual está formada por la cadena β del dominio A de una subunidad y por las cadenas β del dominio B. De esta forma, las tres subunidades se unen de cabeza a cola de manera que el dominio A de una subunidad interactúa con el dominio B de la subunidad adyacente. Además, ambos dominios también están conectados a través de un conector largo y flexible (residuos 118-134) llamado IDCL (“interdomain connector loop”).

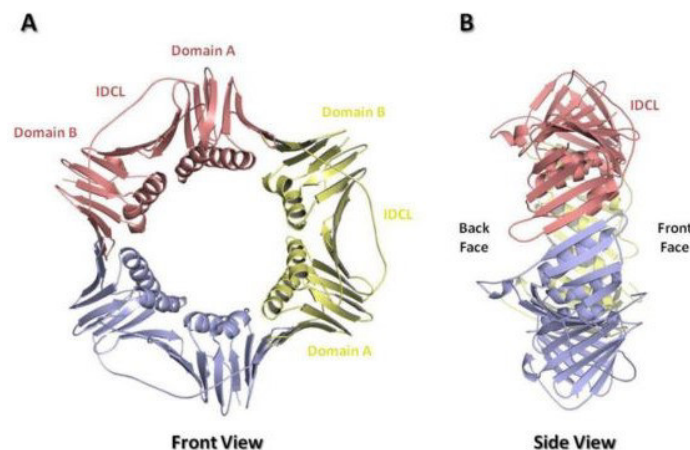


Figura 8: Estructura del PCNA. A) vista frontal; B) vista lateral. Las tres distintas subunidades se representan coloreadas de rojo, amarillo y azul. Fuente: Dieckman, Freudenthal & Washington 2012.

El anillo de PCNA tiene un diámetro de 80 Å con un orificio central de 35 Å aproximadamente. La superficie externa del anillo es un collar circular de seis láminas β .

La superficie interna del anillo está compuesta por doce hélices α , dos de cada dominio. Aunque el potencial electrostático total del PCNA es negativo, la superficie interna está cargada positivamente debido a la presencia de residuos de lisina y arginina en estas hélices α . Esto facilita el paso del ADN cargado negativamente a través del orificio central del anillo.

El IDCL se encuentra en la cara frontal del anillo y está implicado en gran cantidad de interacciones proteína-proteína. Esto es importante ya que muchas proteínas de replicación, como la ADN polimerasa y ADN ligasa, llevan a cabo sus funciones sobre el ADN en la cara frontal del anillo. Por otro lado, el papel de la cara posterior del anillo de PCNA está menos claro aunque sí se sabe que probablemente está involucrada en el reclutamiento de factores proteicos para las horquillas de replicación manteniéndolos conservados hasta que sean necesarios en la cara frontal del PCNA (Dieckman, Freudenthal & Washington 2012).

2. Objetivos

El estudio de la neurogénesis en peces teleósteos adultos como *Danio rerio* resulta de gran interés al posibilitar la identificación de los factores celulares implicados en la producción de un gran número de neuronas en distintas regiones del sistema nervioso central.

Estudios previos han demostrado la existencia de neurogénesis en las regiones más rostrales y más caudales del encéfalo de diversas especies de teleósteos. Por ello, el presente estudio se desarrolló en las regiones medias del encéfalo del pez cebra.

Teniendo en cuenta las anteriores observaciones, los objetivos planteados para este estudio son:

- Demostrar la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) en el mesencéfalo del pez cebra adulto, reconociendo su distribución particular.
- Comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con aquellos previamente publicados en la literatura.

3. Material y métodos

3.1 Obtención y procesamiento del material biológico

En el presente estudio se han empleado cuatro ejemplares adultos de pez cebra de 24-28 mm de longitud.

Los individuos fueron anestesiados con metanosulfonato de tricaina (MS-222, Sigma-Aldrich) diluido en agua de acuario (100mg/L) y posteriormente fijados con el fin de mantener la estructura y la actividad biológica del tejido lo más parecido posible a su estado *in vivo*. La fijación se realizó por inmersión usando como agente fijador el líquido de Bouin.

Previamente a su inclusión, las cabezas de los ejemplares utilizados fueron deshidratadas en etanol, aclaradas en xileno y embebidas en parafina. Las muestras se colocaron en moldes y se incluyeron en parafina fundida y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los bloques fueron cortados transversalmente con un micrótopo de rotación tipo Minot en secciones de 12 μ m, recogiendo estas sobre portaobjetos gelatinizados.

3.2 Inmunofluorescencia indirecta

Para procesar las secciones del encéfalo, previamente es necesario eliminar el medio en el cual se han incluido las muestras. Las secciones se desparafinaron mediante cuatro baños de xileno de cinco minutos de duración cada uno. A continuación, las secciones se hidrataron en varios baños de etanol de concentración decreciente: 100°, 96° y 80°, durante diez minutos en cada etanol.

Después se sometieron a tres lavados sucesivos de cinco minutos cada uno con tampón fosfato salino (TFS 0,01 M pH 7,4). Se incubaron posteriormente con borohidruro de sodio 0,1 M durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con TFS y un cuarto lavado con TFS y Triton-X100 0,01% (TFS-T), todos ellos de cinco minutos de duración.

A continuación, las secciones se incubaron con suero normal de cabra (NGS) al 10% en TFS durante una hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Tras esto se incubaron con una combinación de anticuerpos primarios diluidos en TFS: ratón anti-PCNA (1/500, Sigma-Aldrich) y conejo anti-TH (1/250, Santa Cruz) en cámara oscura y húmeda durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados de cinco minutos con TFS y uno con TFS-T también de cinco minutos de duración. Posteriormente, las secciones se incubaron con un cóctel de anticuerpos secundarios: cabra anti-IgG de ratón conjugada con rodamina-red TMX (1/100, Invitrogen) y cabra anti-IgG de conejo conjugada con fluoresceína (1/100, Invitrogen) en cámara oscura y húmeda durante una hora.

Por último se realizaron tres lavados (de cinco minutos cada uno) con TFS y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente montar las muestras con Mowiol.

3.3 Prueba control

Para verificar la especificidad de la inmunorreactividad detectada, se sustituyeron los anticuerpos primarios por NGS durante la incubación y se continuó con el desarrollo normal de la técnica inmunohistoquímica (como se ha descrito en apartados anteriores). Esta prueba control puso de manifiesto la ausencia de inmunorreactividad en las regiones del mesencéfalo del pez cebra estudiadas.

3.4 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 al microscopio. Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Adobe Photoshop CC2017.

4. Resultados

En el mesencéfalo del pez cebra adulto se han podido reconocer distintas zonas de proliferación, empleándose para ello un marcador de proliferación celular como el PCNA. En este sentido, tanto el techo óptico como el toro longitudinal contienen abundantes células en proliferación, posibilitando la renovación de las poblaciones neuronales en dichas estructuras.

4.1 Inmunofluorescencia indirecta para PCNA

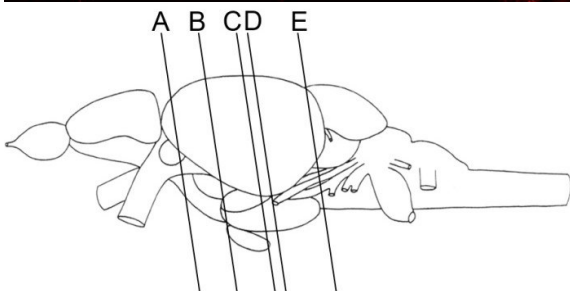
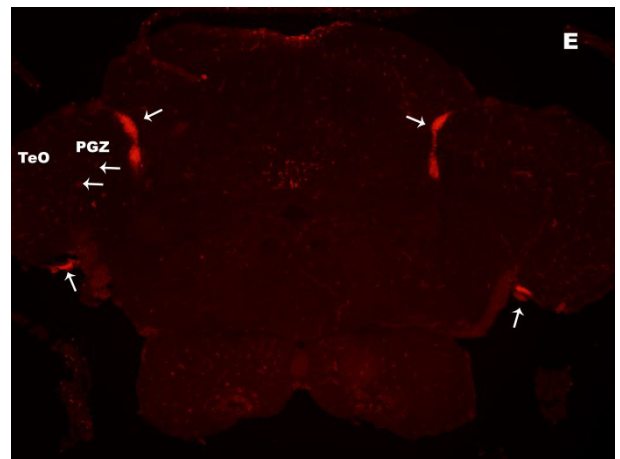
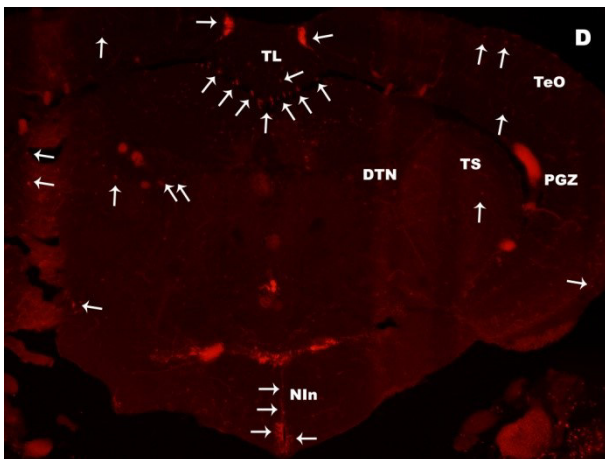
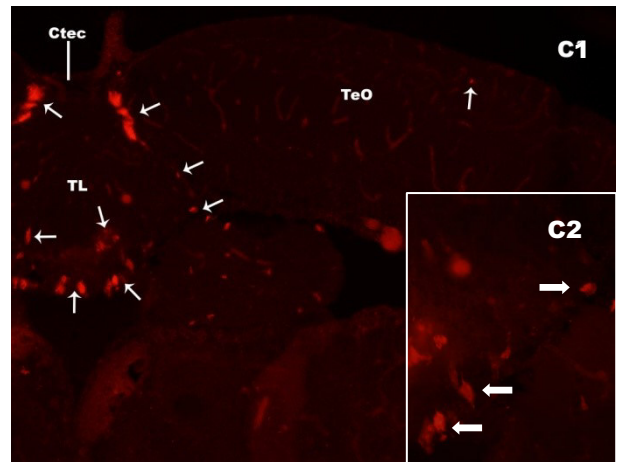
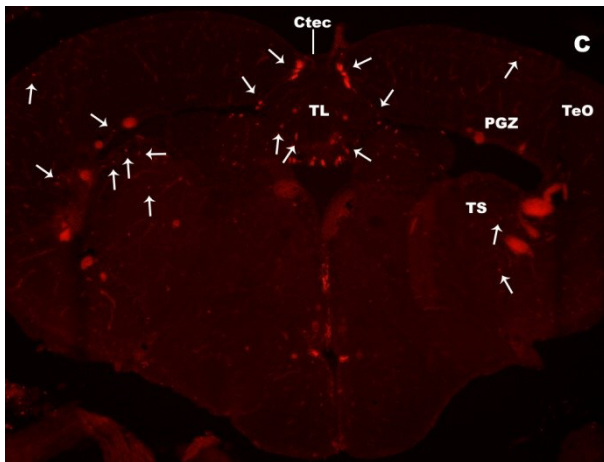
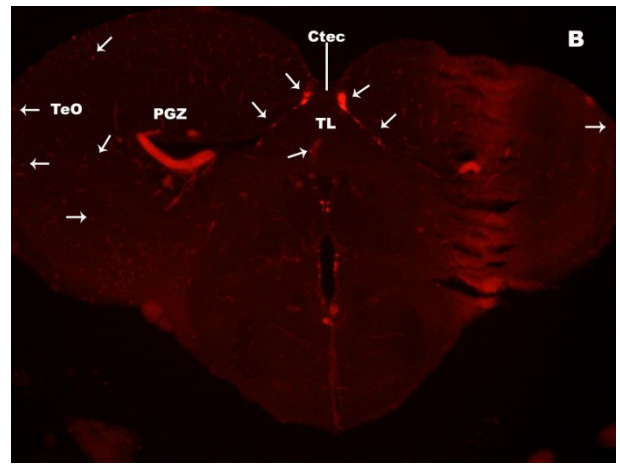
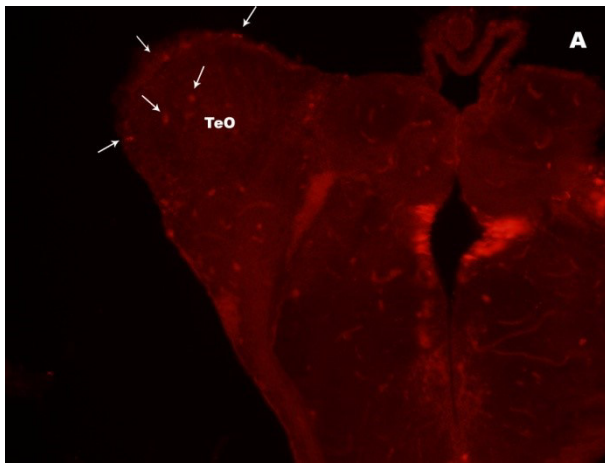
El empleo de anticuerpos contra PCNA ha permitido revelar varias zonas de proliferación en el mesencéfalo del pez cebra, observándose que tanto la morfología de las células que expresan PCNA, como la intensidad de la positividad detectada, varían en función de la posición de dichas zonas de proliferación. La inmunorreactividad al PCNA únicamente se observó en los somas neuronales o en su defecto en agrupaciones de somas, pero no se han observado fibras positivas para PCNA en ninguna de las zonas de proliferación estudiadas en el mesencéfalo.

En la parte más rostral del mesencéfalo se observan células redondeadas positivas para el PCNA próximas a la parte más superficial del techo óptico (TeO), aunque también aparece alguna célula dispersa en la zona central del mismo (Figura 9A).

En sentido rostrocaudal, se observa que continúan apareciendo algunas células positivas para PCNA en la región media del techo óptico y en la zona gris periventricular del mismo (PGZ), pero la mayoría de células se encuentran agrupadas en dos zonas de proliferación simétricas situadas en la parte dorsomedial del techo óptico, en contacto con la comisura tectal (Ctec). En la región rostral del toro longitudinal (TL) las células inmunorreactivas al PCNA (PCNA-ir) son abundantes, y se agrupan en los márgenes dorsales y laterales (Figura 9B), mientras que en la región caudal se encuentran en el margen ventral (Figura 9C). Dado que la inmunorreactividad al PCNA de estas zonas de proliferación es muy intensa, no se aprecia adecuadamente la morfología de los somas, aunque sí parece observarse que las células PCNA-ir del toro longitudinal son más alargadas que aquellas localizadas en el techo óptico (Figuras 9C1 y 9C2).

En el toro semicircular (TS), y en el núcleo tegmental dorsal (DTN) aparecen algunas células positivas redondeadas y separadas unas de otras, aunque son muy escasas. También en la parte ventral del encéfalo se pueden apreciar múltiples células redondeadas positivas que se disponen siguiendo un eje dorso-ventral que atraviesa el centro del núcleo interpeduncular (NIn) (Figura 9D).

En la parte más caudal del mesencéfalo, aumenta el número de células PCNA-ir en la zona gris del techo óptico, y aparecen dos nuevas zonas de proliferación simétricas en la región ventral de la PGZ. Estas células también presentan una intensa inmunorreactividad, de modo que no es posible determinar su morfología (Figura 9E).



Listado de abreviaturas:

- Ctec** Comisura tectal
- DTN** Núcleo tegmental dorsal
- NIn** Núcleo interpeduncular
- PGZ** Zona gris periventricular del techo óptico
- TeO** Techo óptico
- TL** Toro longitudinal
- TS** Toro semicircular

Figura 9: Expresión del PCNA (flechas) revelada mediante inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes están tomadas con el filtro Tx Red con 100x aumentos, excepto la imagen C1 y C2 (detalles de la imagen C) que están tomadas con 200x y 400x aumentos respectivamente.

4.2 Inmunofluorescencia indirecta para TH

El empleo de anticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa permite detectar la presencia y localización de células ya diferenciadas de naturaleza catecolaminérgica. Sin embargo, en el presente estudio no se han observado células inmunorreactivas a la TH, asociadas a las zonas de proliferación reconocidas en el mesencéfalo del pez cebra (Figura 10).

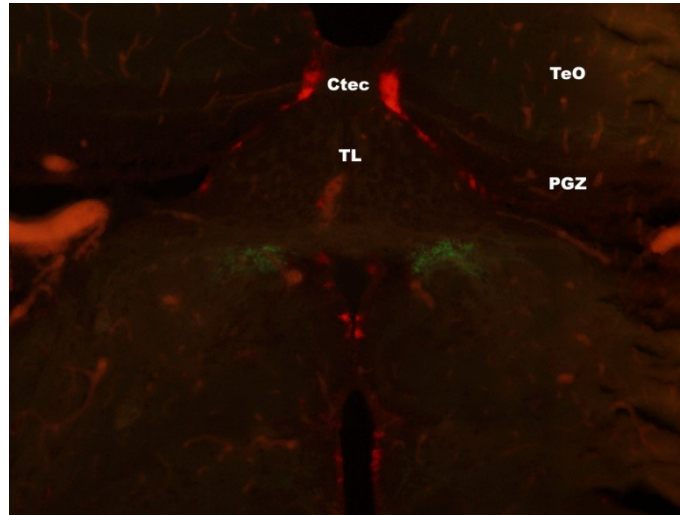


Figura 10: Expresión de PCNA (rojo) y TH (verde). Imagen tomada con el filtro F-T con 200x aumentos. El nivel al que se ha tomado la sección se corresponde con la figura 9C.

5. Discusión

5.1 PCNA como marcador de proliferación celular

El uso del PCNA como marcador de proliferación presenta algunas ventajas con respecto a otros ensayos para detectar la proliferación celular, incluyendo el recuento directo de figuras mitóticas o el uso de precursores de ADN, tales como la timidina tritiada (3H-T) o análogos de nucleótidos tales como bromodesoxiuridina (BrdU) para detectar su incorporación en el ADN.

Las figuras mitóticas representan sólo una fase corta del ciclo celular, lo que dificulta su uso para observar la proliferación de poblaciones celulares con baja producción. Del mismo modo, 3H-T y BrdU se incorporan sólo durante la fase S y, para los animales de crecimiento lento, requiere una larga exposición a estas sustancias para evaluar los resultados, lo que afecta a su viabilidad.

Por el contrario, el PCNA se detecta inmunocitoquímicamente en la mayor parte del ciclo celular, y se ha demostrado que resulta útil para detectar células en división en tejidos fijados y embebidos en parafina sin tratamientos previos en especímenes vivos.

Aunque el PCNA (a diferencia de 3H-T y BrdU) no permite estudiar la dinámica de desarrollo de las poblaciones celulares, se ha demostrado que en los cerebros de los peces teleósteos utilizando el PCNA se marcan las mismas células y regiones que se marcarían con el uso de 3H-T y BrdU (Candal *et al.* 2005a). Por ese motivo, habitualmente se emplea tanto el PCNA como el BrdU en los trabajos de neurogénesis en teleósteos (ver Candal *et al.* 2005a, Zupanc, Hinsch & Gage 2005, Grandel *et al.* 2006).

5.2 Neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra

En el presente trabajo se ha empleado inmunofluorescencia indirecta para observar células positivas para PCNA y así poder detectar la existencia de proliferación celular en el mesencéfalo del pez cebra. Se detectaron varias zonas de proliferación en el mesencéfalo del pez cebra, siendo las más destacables las encontradas en los márgenes del toro longitudinal y en las regiones dorsomedial y ventrocaudal del techo óptico.

De acuerdo con los resultados de Zupanc, Hinsch & Gage (2005), en el techo óptico de *Danio rerio*, las células positivas para el PCNA aparecen más concentradas en las capas más superficiales. Sin embargo, la morfología de las células descritas por Zupanc, Hinsch & Gage (2005) es ovoidea a diferencia de las descritas en este estudio, que son redondeadas. También en el trabajo de los mismos autores se observó que las células marcadas se distribuyen uniformemente en la mayor parte de la extensión rostrocaudal de la zona gris periventricular, excepto en el extremo más caudal de esta. En esta zona, las células se concentran en el límite de la zona gris periventricular. Además, en el presente estudio, en las secciones más caudales del mesencéfalo, se ha observado una zona de proliferación a ambos lados de la parte más ventral de la zona gris periventricular donde las agrupaciones de células presentan una inmunopositividad muy intensa, pero dichas zonas no han sido descritas en el trabajo de los anteriores autores.

Ito *et al.* (2010) observaron que la mayor parte de células proliferativas del techo óptico del pez cebra se encuentran en los márgenes caudal, dorsomedial y ventrolateral de la zona gris periventricular. También concluyen con sus resultados, que la zona proliferativa con mayor actividad es el área dorsomedial de la región caudal de la zona gris periventricular. Los resultados de este trabajo concuerdan con los de estos autores, aunque en el presente estudio se observó que la actividad proliferativa de la región ventrolateral es igual de intensa que la de la región dorsomedial.

Por otra parte, Zupanc, Hirsch & Gage (2005) demostraron la presencia de células alargadas inmunorreactivas al PCNA en el límite dorsomedial del toro longitudinal. Así, de nuevo, sus resultados coinciden con los de este trabajo.

Es importante destacar que tanto Zupanc, Hirsch & Gage (2005) como Ito *et al.* (2010) emplearon BrdU y no PCNA, obteniéndose con ambas técnicas resultados semejantes.

5.3 Comparación con otros teleósteos

Aunque en las últimas décadas se ha estudiado ampliamente la neurogénesis en adultos no se dispone de la suficiente información comparativa como para comprender la evolución de este fenómeno. En teleósteos se ha realizado un mapeo detallado de las zonas de proliferación en todo el cerebro adulto en algunas de las 25000 especies que se estiman que existen: *Apteronotus leptorhynchus* estudiada por Zupanc & Horschke (1995), *Gasterosteus aculeatus* estudiada por Ekström, Johnsson & Ohlin (2001) y *Danio rerio* estudiada por Zupanc, Hirsch & Gage (2005). Por ello, parece probable que la neurogénesis se trata de un rasgo compartido por todos los peces teleósteos. Por otra parte, en cualquiera de las especies de teleósteos examinadas hasta el momento, se observa que la neurogénesis se produce en muchas regiones del cerebro de los individuos adultos y el número de nuevas neuronas es muy elevado en relación con el número total de células cerebrales (Zupanc & Guenther 2008).

Todas las zonas de proliferación detectadas en el pez cebra concuerdan con aquellas descritas en el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) por Grandel *et al.* (2006). Por el contrario, *A. leptorhynchus* muestra diferencias específicas en la distribución de las zonas de proliferación en el cerebro adulto en comparación con *Danio rerio*. Una de estas diferencias es que en esta especie, al contrario de lo observado en el pez cebra, no se encontraron zonas de proliferación en el techo óptico. Estas diferencias específicas entre *A. leptorhynchus* por un lado, y el pez cebra y el pez espinoso por otro lado, pueden atribuirse a las adaptaciones específicas de *A. leptorhynchus* al medio.

Las especies del género *Austrolebias* presentan cerebros con características similares a las de *Danio rerio*, por lo que resultan muy interesantes a la hora de comparar la distribución de las zonas de proliferación. Fernández *et al.* (2011) estudiaron tres especies de *Austrolebias* mediante tratamiento inmunohistoquímico con BrdU para así observar las distintas zonas de proliferación en el cerebro adulto. *A. charrua* mostró una alta concentración de células proliferativas cerca de las paredes ventriculares y en la porción caudal del techo óptico, y en las otras dos especies de *Austrolebias* se encontraron patrones similares. En la zona gris periventricular hay un número relativamente alto de células redondeadas u ovoides positivas para BrdU en las tres

especies. Estas células se concentran en la capa tectal superficial de la PGZ y se distribuyen uniformemente a lo largo de la mayor parte de su extensión rostrocaudal, excepto en el extremo más caudal del techo óptico, donde las células marcadas estaban densamente agrupadas en una zona bastante estrecha. Otra región que presenta un número elevado de células marcadas con BrdU es el límite entre el techo óptico y el toro longitudinal. Estos autores también estudiaron la región del toro longitudinal y observaron que a pesar de la existencia de diferencias anatómicas importantes en el toro longitudinal de las tres especies en cuanto a tamaño y forma, la distribución y la morfología de las células marcadas es similar. Las células marcadas se disponen generalmente en dos grupos regulares. El primer grupo se encuentra en la periferia, recubriendo la pared ventricular, y el segundo forma una sola hilera de células marcadas que emergen entre el borde lateral del toro longitudinal y la línea media del cerebro.

Por otra parte, Candal *et al.* (2005a) afirman que hay que tener en cuenta que algunos aspectos de la morfogénesis cerebral podrían no ser claramente revelados en especies de crecimiento rápido con cerebros pequeños como el pez cebra y por eso es necesario realizar estudios de proliferación en especies de teleosteos con períodos de crecimiento prolongado. Por ello, estos autores estudiaron la neurogénesis en el rombencéfalo y mesencéfalo de la trucha común (*Salmo trutta*), la cual presenta un desarrollo embrionario lento y un cerebro de gran tamaño. También analizaron las mismas regiones del encéfalo del medaka común (*Oryzias latipes*) por tratarse de una especie con crecimiento rápido.

En adultos de trucha común solo se encontró un pequeño número de células positivas para PCNA en las regiones caudal, lateroventral y mediodorsal del techo óptico. También se observaron células inmunorreactivas para PCNA en la zona ventricular del toro longitudinal (Candal *et al.* 2005b). En cuanto al toro semicircular, en la etapa de juvenil de esta especie se pueden encontrar unas pocas células positivas pero estas ya no están presentes en individuos adultos (Candal *et al.* 2005a).

En medaka común el patrón de distribución es bastante parecido al de la trucha común. Las células marcadas en el techo óptico se encontraron únicamente en las zonas más periféricas del mismo (Nguyen *et al.* 1999). Además, en adultos de esta especie, se observan grupos de células positivas para PCNA en posiciones similares a las encontradas en los juveniles de trucha. Estas células se encuentran en el pliegue endimario que conecta el extremo caudal del techo óptico con el toro semicircular. Rostralmente, esta zona proliferativa se continúa con otra región de células proliferativas localizadas sobre la superficie ventricular más caudolateral del toro semicircular (Candal *et al.* 2005a).

5.4 Comparación con otros vertebrados

La neurogénesis en individuos adultos es mucho más abundante en aves, reptiles, anfibios y peces que en mamíferos. Normalmente la neurogénesis ocurre en los subdominios de la zona ventricular de varias zonas del cerebro y puede servir para múltiples funciones adaptativas. Sin embargo, las zonas cerebrales sometidas a neurogénesis adulta siguen patrones que varían entre las distintas especies y estas

zonas pueden estar relacionadas con diferentes funciones. Además, hay que tener en cuenta que normalmente las investigaciones sobre neurogénesis en adultos se realizan con individuos que viven en su medio natural, por lo que no puede considerarse un mero artefacto de laboratorio.

La neurogénesis ha sido estudiada en aves como canarios, mirlos, estorninos, pinzones cebra y gorriones. En cuanto a los reptiles, se ha observado neurogénesis en individuos adultos de varias especies de lagartos y tortugas, mientras que en anfibios se ha observado este fenómeno en ranas. Como ya se ha mencionado anteriormente, también se ha estudiado la neurogénesis en muchos teleósteos como la trucha común, el medaka común o, como en este trabajo, en el pez cebra (Chapouton, Jagasia & Bally-Cuif 2007).

En aves, la neurogénesis se localiza de modo disperso a lo largo del ventrículo lateral del telencéfalo, produciendo neuronas neonatales en el núcleo telencefálico dorsal, en el neocórtex, en el hipocampo y en otras estructuras relacionadas con el núcleo estriado del prosencéfalo (Chapouton, Jagasia & Bally-Cuif 2007, Kaslin, Ganz & Brand 2008). En reptiles se ha encontrado neurogénesis en varias zonas del cerebro como el bulbo olfatorio, la cresta dorsoventricular, la corteza y el cerebelo. En anfibios, la proliferación en adultos ha sido detectada en el telencéfalo, en la región preóptica, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en el cerebelo (Kaslin, Ganz & Brand 2008). En lo referente a los peces, concretamente los teleósteos, se caracterizan porque la neurogénesis en individuos adultos es abundante en todas las subdivisiones encefálicas, pero al igual que en otros vertebrados se concentra en “puntos calientes”. Esto sugiere que existen eventos reguladores locales y específicos que favorece el proceso de neurogénesis (Chapouton, Jagasia & Bally-Cuif 2007).

Como ya se ha mencionado, la neurogénesis es poco abundante en mamíferos adultos, y sólo se ha encontrado en la zona subependimal/subventricular del ventrículo telencefálico lateral y en la zona del giro dentado en el hipocampo (Kaslin, Ganz & Brand 2008).

Parece que durante la evolución, el número de zonas de proliferación activas se ha ido reduciendo entre anamniotas y amniotas, y más en mamíferos en comparación con otros vertebrados no mamíferos. Todavía se desconoce si esta reducción filogenética en la proliferación del cerebro de adultos es causada por una pérdida selectiva durante la adaptación o si la proliferación activa en mamíferos es suprimida por factores intrínsecos o extrínsecos. Sin embargo, se ha propuesto que la disminución de la neurogénesis en mamíferos adultos, que culmina en primates, puede ser el resultado de una adaptación para mantener a las poblaciones neuronales que acumulan experiencia durante toda la vida de los individuos (Kaslin, Ganz & Brand 2008).

Por otra parte, comprender la proliferación y neurogénesis en adultos sería de gran importancia para la investigación biomédica. Por ese motivo es necesario seguir realizando estudios que nos ayuden a entender mejor cómo y dónde ocurre la neurogénesis en individuos adultos.

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo y de acuerdo a los objetivos planteados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) se ha observado en todo el mesencéfalo del pez cebra adulto, siendo esta más abundante en los márgenes del toro longitudinal y los márgenes dorsomedial y ventrocaudal del techo óptico.
- La neurogénesis en el mesencéfalo del pez cebra adulto concuerda con la presentada por individuos adultos de otras especies de teleósteos, existiendo sin embargo diferencias interespecíficas al respecto.

Conclusión

Tendo en conta os resultados obtidos no presente traballo, e de acordo cos obxectivos plantexados, poden establecerse as seguintes conclusións:

- A expresión do Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) observouse en todo o mesencéfalo do peixe cebra adulto, sendo esta máis abundante nas marxes do toro lonxitudinal e nas marxes dorsomedial e ventrocaudal do teito óptico.
- A neuroxénese no mesencéfalo do peixe cebra adulto concorda coa presentada por individuos adultos doutras especies de teleósteos, existindo con todo diferenzas intraspecíficas ao respecto.

Conclusions

Based on the results obtained in the present study and in accordance with the proposed objectives, the following conclusions can be established:

- Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) expression has been observed throughout the midbrain of the adult zebrafish, being this more abundant in the margins of torus longitudinalis and in the dorsomedial and ventrocaudal margins of the optic tectum.
- Neurogenesis in the midbrain of adult zebrafish agrees with that observed in adult individuals from other species of teleosts, although there are interspecific differences.

8. Bibliografía

- Candal, E, Anadón, R, Bourrat, F, & Rodríguez-Moldes, I 2005a, 'Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): A segmental approach', *Developmental Brain Research*, vol. 160, no. 2, pp. 157-175.
- Candal, E, Anadón, R, DeGrip, WJ & Rodríguez-Moldes, I 2005b, 'Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout', *Developmental Brain Research*, vol. 154, no. 1, pp.101-119.
- Chapouton, P, Jagasia, R & Bally-Cuif, L 2007, 'Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates', *Bioessays*, vol. 29, no. 8, pp. 745-757.
- Dieckman, LM, Freudenthal, BD & Washington, MT 2012, 'PCNA structure and function: insights from structure of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA', *Subcell Biochem*, vol. 62, pp. 281-299.
- Ekström, P, Johnsson, CM & Ohlin, LM 2001, 'Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres migration (secondary matrix) zones', *Journal of Comparative Neurology*, vol. 436, no. 1, pp. 99-110.
- Fernández, AS, Rosillo, JC, Casanova, G & Olivera-Bravo, S 2011, 'Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study', *Neuroscience*, vol. 189, pp. 12-24.
- 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*, vol. 295, no. 1, pp. 263-277.
- Guyton, AC 1994, *Anatomía y fisiología del sistema nervioso: neurociencia básica*, 2nd edn, Médica Panamericana, Madrid.
- Ito, Y, Tanaka, H, Okamoto, H & Ohshima, T 2010, 'Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum', *Developmental Biology*, vol. 342, no. 1, pp. 26-38.
- Kaslin, J, Ganz, J & Brand, M 2008, 'Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain', *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, vol. 363, no. 1489, pp. 101-122.
- Kelman, Z 1997, 'PCNA: structure, functions and interactions', *Oncogene*, vol. 14, no. 6, pp. 629-640.
- Kiernan, JA 2008, *Histological and histochemical methods: theory and practice*, 4th edn, Scion, Oxfordshire.
- Kizil, CK., Kaslin, J, Kroehne, V & Brand, M 2012, 'Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish', *Developmental Neurobiology*, vol. 72, no. 3, pp. 429-461.
- Naryzhny, SN 2008, 'Proliferation cell nuclear antigen: a proteomics view', *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 23, pp. 3789-3808.
- Nelson, J 2006, *Fishes of the world*, 4th edn, John Wiley & Sons, New Jersey.
- Nguyen, V, Deschet, K, Henrich, T, Godet, E, Joly, JS, Wittbrodt, J, Chourrout, D & Bourrat, F 1999, 'Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): A morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation', *Journal of Comparative Neurology*, vol. 413, no. 3, pp. 385-404.
- Schmidt, R, Strähle, U & Scholpp, S 2013, 'Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult', *Neural Development*, vol. 8, no. 1, pp.3.

- Spence, R, Gerlach, G, Lawrence, C, & Smith, C 2008, 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*', *Biological Reviews*, vol. 83, no. 1, pp. 13-34.
- Strzalka, W & Ziemienowicz, A 2011, 'Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation', *Annals of Botany*, vol. 107, no. 7, pp. 1127-1140.
- Wullimann, MF, Rupp, B & Reichert, H 1996, *Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas*, Birkhäuser, Basel.
- Zupanc, GKH 2006, 'Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain', *Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, vol. 192, no. 6, pp. 649-670.
- Zupanc, GKH & Guenther, KH 2008, 'Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish', *Journal of Physiology*, vol. 102, no. 4-6, pp. 357-373.
- Zupanc, GKH, Hinsch, K & Gage, FH 2005, 'Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain', *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 488, no.3, pp. 290-319.
- Zupanc, GKH, Horschke, I 1995, 'Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study', *Journal of Comparative Neurology*, vol. 353, no. 2, pp. 213-233.
- Zupanc, GKH & Sîrbulescu, RF 2011, 'Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish', *European Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 6, pp. 917-929.