

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA Biología
Subárea Biología Celular y Molecular

**Distribución espacial, composición celular y capacidad
neurogénica de las zonas proliferativas del cerebro de
Gymnotus omarorum en la vida posnatal**

Lic. Valentina Olivera Pasilio

Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Dra. María E. Castelló
Co-orientador: Dr. Daniel Peterson

Tribunal: Dr. Omar Trujillo-Cenóz, Dr. Flavio Zolessi, Dra. Antonia Marin-Burguin

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me acompañaron en el transcurso de mi carrera, desde que comencé la Licenciatura hasta estos últimos años de Maestría. Es por esto que estando rodeada de tantos seres queridos me siento una persona afortunada.

Gracias a mis padres, eternos promotores de que cumpla mis sueños y objetivos, no hubiera sido lo mismo sin su apoyo incondicional. Les dedico mis logros alcanzados hasta ahora y los que vendrán.

A mi abuela, por rezar y pensar que soy “muy inteligente”.

A mis amigos: las chicas que me acompañan desde la infancia, que me complementan y me dan fuerza para seguir y los que, como yo, son apasionados de la ciencia y vamos creciendo juntos compartiendo logros y esfuerzos.

A algunas personas especiales que conocí en el Clemente Estable que me estimulan, apoyan y me dan cariño: María Inés y Moira.

A los miembros del Tribunal, con sus puntos de vista diversos, dejaron en mi mente preguntas que podrían ser clave para continuar con mi trabajo.

A Daniel Peterson, por su gentileza, tanto en su participación en el curso en el cual nos conocimos como cuando visité su laboratorio. Gracias por la oportunidad de conocer otro mundo y aprender de él.

A Marita, con un papel de tutora, que a veces se transformó en amiga y otras casi de madre. Me gustaría heredar esa pasión por el trabajo científico y la docencia. Gracias por hacerme pensar y estimularme para asistir a cursos, congresos, pasantías, instancias en las cuales crecí profesionalmente y como persona. Me es muy grato pensar que contribuí de alguna manera en una nueva línea de investigación. Supongo que esto es sólo el comienzo...

Valentina

ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	4
2. Resumen.....	7
3. Introducción.....	8
3.1. Zonas proliferativas en el cerebro adulto peces teleósteos.....	10
3.1a. <i>Distribución</i>	10
3.1b. <i>Composición celular</i>	11
3.1c. <i>Zonas proliferativas en el cerebro de <i>Gymnotus omarorum</i></i>	14
3.1d. <i>Consideraciones metodológicas: doble marcación con análogos halogenados de la timidina</i>	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos generales.....	17
6. Objetivos específicos.....	17
7. Materiales y métodos.....	18
8. Resultados.....	24
8.1. Consideraciones generales sobre la marcación de núcleos de las células proliferantes en el cerebro adulto de <i>G. omarorum</i>	24
8.2. Capítulo 1: Distribución espacial de las zonas proliferativas en el cerebro de <i>G. omarorum</i>	26
8.3. Capítulo 2: Composición celular de las zonas proliferativas.....	34
8.4. Capítulo 3: Cuantificación de los tipos celulares en el corpus cerebelli mediante estereología confocal.....	50
8.5. Destino de las células proliferantes.....	54
9. Discusión.....	68
10. Conclusiones generales.....	83
11. Perspectivas.....	84
12. Referencias.....	85

ABREVIATURAS

A: Núcleo pretectal

AC: Comisura anterior

BF: Buffer fosfato

BFT: Buffer fosfato con Triton X-100

C: Cisterna

Cb: Cerebelo

CCb: Corpus cerebelli

CC: Crista cerebellaris;

CCb-gra: Corpus cerebelli, capa granular

CCb-mol: Corpus cerebelli, capa molecular

CldU: 5'clorodeoxiuridina

CP: Núcleo diencefálico central-posterior

cT: Comisura tectal

DABCO: 1,4- diazabicyclo [2.2.2] octano

DC: División central del telencéfalo dorsal

DD: División dorsal del telencéfalo dorsal

DFL: Capa de fibras profunda

DL: División lateral del telencéfalo dorsal

dLL: Decusación del lemnisco lateral

DM: División dorso-medial del telencéfalo

DNL: Capa neuropílica profunda

EGa: Eminencia granular anterior

EGm: Eminencia granular medial

EGm-gra: Eminencia granular medial, capa granular

Egp: Eminencia granular lateral-posterior

EGp-gra: Eminencia granular lateral-posterior, capa granular

EGp-mol: Eminencia granular lateral-posterior, capa molecular

ELL: Lóbulo electrosensorial de la línea lateral

GCL: Capa de células granulares

H: Habénula epitalámica

Ha: Hipotálamo anterior

Hc: Hipotálamo caudal

HCl: Ácido clorhídrico

Hd: Hipotálamo dorsal

Hl: Hipotálamo lateral

Hv: Hipotálamo ventral

IdU: 5'iododeoxiuridina

IL: Lóbulo inferior

LL: Lemnisco lateral

MgN: Núcleo magnocelular mesencefálico

MLF: Fascículo longitudinal medial

mol: Capa molecular

MS-222: Ácido aminobenzoico 3- metil éster

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NEB: Núcleo electromotor bulbar

OB: Bulbo olfatorio

PAF: Paraformaldheído

PPa: Núcleo preóptico periventricular, subdivisión anterior

PCL: Capa de células principales

Pd: Núcleo pre-eminencial medial

PLL: Capa plexiforme

PPN: Núcleo pre-marcapaso

PVA: Alcohol de polivinilo

Sc: Núcleo supraquiasmático

TA: Núcleo tuberis anterior

TeO: Tectum opticum

TH: Tirosina hidroxilasa

TL: Torus longitudinalis

TPP: Núcleo periventricular del tuberculum posterior

TS: Torus semicircularis

V: Ventrículo

Vc: Telencéfalo ventral, subdivisión central

VCb-gra: Valvula cerebelli, capa granular

VCb-mol: Valvula cerebelli, capa molecular

Vd: Telencéfalo ventral, subdivisión dorsal

Vp: Telencéfalo ventral, subdivisión posterior

Vv: Telencéfalo ventral, subdivisión ventral

ZP: Zona proliferativa

ZPs: Zonas proliferativas

ZPEV: Zona proliferativa extra-ventricular

ZPV: Zona proliferativa ventricular

RESUMEN

En mamíferos adultos ocurre neurogénesis en sólo dos regiones del cerebro localizadas en el telencéfalo. En cambio, el sistema nervioso central de los peces teleósteos, presenta en la vida adulta una amplia distribución de zonas proliferativas con una alta capacidad neurogénica. En este grupo de peces, no solamente ocurre neurogénesis en regiones homólogas a las de los mamíferos -lo que sugiere que este fenómeno es un mecanismo conservado entre los vertebrados- sino también en otras regiones de todas las divisiones cerebrales, indicando que la neurogénesis adulta es un rasgo ancestral sujeto a una modulación negativa a lo largo de la evolución.

En este trabajo se analiza la distribución espacial y composición celular de las zonas proliferativas del cerebro del pez eléctrico *Gymnotus omarorum* en la vida adulta, mediante doble marcación de células proliferantes con análogos de la timidina 5'clorodeoxiuridina (CldU) y 5'iododeoxiuridina (IdU), revelados mediante doble inmunohistoquímica. También se evalúa la capacidad neurogénica mediante demostración de la expresión de marcadores de estirpe neuronal o transporte intracelular *in vivo* de trazadores neuronales en células que presentan retención de larga duración de CldU.

La distribución espacial de las zonas proliferativas de *G. omarorum* es similar a la descrita en otros teleósteos, aunque presenta diferencias que podrían vincularse a su especialización funcional, al igual que en el pez eléctrico de onda *Apteronotus leptorhynchus*. Además, se pone en evidencia una zona proliferativa aún no descrita en la vida adulta, localizada en el lóbulo electrosensorial de la línea lateral (ELL), estructura característica de los peces eléctricos.

En todas las regiones cerebrales estudiadas se identifican distintos tipos celulares que componen las zonas proliferativas, entre las que se encuentran células de ciclado rápido y células con ciclo celular prolongado. Dentro de éstas últimas se encuentran posibles células en migración y células madre. Además, se hallan posibles células quiescentes.

La co-localización del marcador de estirpe neuronal HuC/HuD en células derivadas de las zonas proliferativas que retienen CldU por períodos prolongados indica que ocurre neurogénesis en el cerebro de *G. omarorum*, incluyendo el telencéfalo (subpallium), mesencéfalo (TeO y TS), diencefalo (hipotálamo y PPa) y rombencéfalo (Cb y ELL). Además, la co-localización de trazadores neuronales en células grano del corpus cerebelli cuyos núcleos retienen CldU, permite afirmar la capacidad neurogénica de la zona proliferativa cerebelar y aporta evidencias a favor de la inserción de las nuevas neuronas en el circuito cerebeloso.

INTRODUCCIÓN

Los peces son el grupo de vertebrados con formas corporales y comportamientos más diversos que han evolucionado en relación a la adaptación a una gran variedad de nichos ecológicos. Cada especie cuenta con un “arreglo” de sistemas sensoriales que proveen información al sistema nervioso central (SNC) sobre cambios que el entorno impone a determinadas formas de energía (producidas por el propio individuo o de origen externo) portadoras de señales sensoriales. Esto se refleja en la morfología externa y la organización histoarquitectural del cerebro de especímenes adultos, particularmente en el grado de desarrollo de las estructuras neurales dorsales vinculadas con el procesamiento de la información sensorial (Bennett, 1967; Hodos y Buttler, 1997; Kotrschal et al., 1998; Meek y Nieuwenhuys, 1998; Ito et al., 2007; Shumway, 2008). Las especies electrorreceptivas constituyen un claro ejemplo en el que han evolucionado estructuras periféricas (sensoriales y motoras) y centros neurales vinculados al procesamiento sensorial y la coordinación sensorio-motora (Bullock et al., 1982; Wilczynski, 1984; Ito et al., 2007; Lisney et al., 2007).

Debido a que genes que controlan la morfogénesis cerebral están acoplados a los que controlan la proliferación celular, Ito et al. (2007) proponen que la neo-funcionalización de algunos genes con funciones clave en la morfogénesis cerebral provocó un aumento en la proliferación y supervivencia celular en regiones específicas y permitió la gran diversidad de formas cerebrales de los teleósteos a lo largo de la evolución. De acuerdo con la hipótesis de Garstang, la filogenia deriva de cambios en la ontogenia a lo largo de la evolución (Garstang, 1922). Asimismo, varios autores han mostrado que la organización anatómica del cerebro adulto surge, a lo largo del desarrollo, por el crecimiento diferencial de las regiones cerebrales sensoriales que en algunos casos se ha vinculado a cambios en los receptores y los nichos ecológicos ocupados a lo largo de la ontogenia (Lisney et al., 2007; Kaslin et al., 2008). Finlay et al. (1998) proponen que el tamaño final alcanzado por distintas regiones cerebrales en mamíferos depende fundamentalmente de la secuencia temporal de inicio y finalización de la neurogénesis. Estos autores proponen que aquellas estructuras en las cuales la generación de nuevas neuronas comienza más tardíamente y presenta una mayor duración, alcanzan dimensiones relativamente más grandes al resto de las estructuras cerebrales (*“late makes large”*). Si esto también ocurriese en especies anamniotas podría constituir un mecanismo de control del tamaño cerebral que se ha conservado.

Al igual que otros anamniotas e invertebrados, y a diferencia de lo que ocurre en amniotas, el sistema nervioso de los teleósteos adultos presenta una amplia distribución de zonas

proliferativas (ZPs) con una alta capacidad neurogénica *in vivo* (Alunni et al., 2001; Lindsey y Tropepe, 2006; Chapouton et al., 2007; Sullivan et al., 2007; Kaslin et al., 2008). Entre ellos, los peces eléctricos constituyen uno de los modelos mejor caracterizados (Zupanc y Zupanc, 1992; Zupanc y Horschke, 1995; Zupanc et al., 1996; Hinsch y Zupanc, 2006; Zupanc, 2001, 2006, 2008). Por el contrario, en el sistema nervioso de mamíferos adultos ocurre neurogénesis *in vivo* en dos regiones del telencéfalo: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Altman y Das 1965; Altman 1969, 2011). Existen en los peces al menos cuatro regiones que presentan particular interés, desde un punto de vista comparativo: el bulbo olfatorio (OB) y las subdivisiones dorsal, ventral y posterior de la zona dorso-lateral del telencéfalo dorsal (considerada homóloga al hipocampo de amniotas), el tectum opticum (TeO) y el cerebelo (Cb) (Zupanc, 2006).

El análisis comparativo de la proliferación celular y neurogénesis posnatal entre distintos órdenes de teleósteos (con nichos ecológicos y comportamientos diferentes) permitiría una mayor comprensión del papel funcional de la neurogénesis adulta. Si bien el patrón de distribución espacial de las ZPs es muy similar entre distintas especies de teleósteos, se han encontrado diferencias atribuidas a la especialización funcional de cada especie, particularmente en *Apteronotus leptorhynchus*, pez eléctrico de onda (Zupanc y Horschke, 1995; Grandel et al., 2006; Grandel y Brand, 2012).

Se ha propuesto que la continua generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto de los teleósteos estaría relacionada con la capacidad de reemplazar neuronas perdidas por injurias, lo que confiere al SNC una alta potencialidad de regeneración (Zupanc, 2008). Además, el crecimiento continuo de los peces mediante el agregado de nuevas células musculares y sensoriales periféricas, necesita la generación en el SNC de las correspondientes células nerviosas para acompañar la necesidad de un procesamiento aumentado ("*numerical matching hypothesis*", Zupanc, 2006, 2008, 2011).

Por estas razones, los teleósteos constituyen un modelo apropiado para profundizar el conocimiento de la proliferación celular y neurogénesis en la vida posnatal.

El estudio de los mecanismos involucrados en la proliferación celular y neurogénesis en teleósteos permitiría comparar lo ocurrido en mamíferos, aportando evidencias para elucidar los cambios evolutivos que han llevado a la reducción de la capacidad neurogénica a lo largo de la filogenia. El hallazgo de neurogénesis en parte del telencéfalo

dorsal y el OB de los teleósteos aporta evidencias de que la neurogénesis adulta en dichas regiones constituye un fenómeno conservado en los vertebrados (Zupanc, 2011).

Zonas proliferativas en el cerebro adulto de teleósteos

En el cerebro adulto de vertebrados, las células proliferantes se sitúan en regiones bien definidas donde ocurre intensa actividad mitótica (Ekström et al., 2001) denominadas zonas proliferativas (ZPs). Previamente éstas fueron llamadas zonas de la matriz (Kirsche, 1967) o zonas germinativas (Raymond y Easter, 1983) debido a que las ZPs del cerebro adulto son similares o derivan de las de la matriz del tubo neural encontradas durante el desarrollo embrionario.

Distribución

Una característica distintiva del cerebro adulto de peces teleósteos (así como del de otros anamniotas) es la gran cantidad de células nerviosas generadas. Esto ocurre no sólo en estructuras neurogénicas homólogas a las encontradas en mamíferos sino también en otras zonas ubicadas en todas las divisiones cerebrales. Este fenómeno está asociado a la presencia de múltiples ZPs en todo el SNC (Zupanc y Horschke, 1995; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2008, 2009; Zupanc, 2011; Grandel y Brand, 2012) con una tasa de proliferación celular al menos un orden de magnitud mayor a la encontrada en mamíferos (Zupanc y Horschke, 1995; Hirsch y Zupanc, 2007; Zupanc, 2008, 2011).

Algunas de estas zonas se localizan cercanas al sistema ventricular-cisternal mientras que otras se encuentran lejanas del mismo. Las primeras se conocen como zonas proliferativas ventriculares (ZPV) localizadas en todas las divisiones del cerebro; las segundas se conocen como zonas proliferativas extra-ventriculares (ZPEV; Zupanc y Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc, 2006, 2011) halladas a nivel de las tres divisiones del Cb (corpus cerebelli-CCb-, valvula cerebelli-VCb- y lóbulo caudal). Otras ZPs como la del TeO, aparentemente lejanas a los ventrículos, podrían derivar de áreas localizadas originalmente adyacentes a los mismos que durante la embriogénesis (debido a la eversión que sufre el cerebro y la obliteración de los ventrículos) se translocan (Zupanc, 2006).

La distribución de las ZPs ha sido estudiada en varias especies de teleósteos (*A. leptorhynchus*: Zupanc y Horschke, 1995; *Astatotilapia burtoni*: Maruska et al., 2012; *Austrolebias*: Fernández et al., 2011; *Curassius auratus*: Raymond y Easter, 1983; Delgado y Schmachtenberg, 2011; *Danio rerio*: Maeyama y Nakayasu, 2000; Zupanc et al., 2005; Adolf

et al., 2006; Grandel et al., 2006; Ampatzis y Dermon, 2007; Kaslin et al., 2009; Ito et al., 2010; Marz et al., 2010; *Gasterosteus aculeatus*: Ekström et al., 2001; *Nothobranchius furzeri*: Terzibasi et al., 2012; *Odontesthes bonariensis*: Strobl-Mazzulla et al., 2010; *Oreochromis mossambicus*: Teles et al., 2012; *Oryzias latipes*: Van Nguyen et al., 1999; Candal et al., 2005a; Alunni et al., 2010; Kuroyanagi et al., 2010; Isoe et al., 2012; *Salmo trutta fario*: Candal et al., 2005a y *Sparus aurata*: Zokopoulos et al., 2000). Las especies más estudiadas hasta el momento han sido el Gymnotiforme *A. leptorhynchus* y el Cypriniforme *D. rerio*. Se han encontrado gran cantidad de ZPs en todas las regiones del cerebro de teleosteos adultos: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Zupanc y Horschke, 1995; Ekström et al., 2001). Entre ellas, se destaca la zona proliferativa (ZP) del Cb tanto por su extensión y alta tasa de proliferación, como por su alta capacidad neurogénica que se ha vinculado a la notoria capacidad de regeneración frente a lesiones en estos vertebrados (allí se origina aproximadamente el 75% de las nuevas células del cerebro en la vida adulta; Zupanc y Horschke, 1995; Hinsch y Zupanc, 2007; Zupanc y Sirbulescu, 2011). Además, se han estudiado en más detalle la región del telencéfalo ventral (subpallium) desde donde se originarían nuevas neuronas que migran al OB de manera similar a la corriente migratoria rostral (Adolf et al., 2006; Kishimoto et al., 2011; Lasserre, 2014), y el TeO (Raymond y Easter, 1983; Candal et al., 2005b; Alunni et al., 2010; Ito et al., 2010).

Composición celular

Al igual que en las ZPs del cerebro de mamíferos (Fig. 1) se ha demostrado en teleosteos adultos que las mismas presentan células con características de células madre (“*stem cells*”), las cuales dan origen a neuronas y glía *in vivo* e *in vitro*, células amplificadoras transitorias, células quiescentes y neuroblastos inmersas en un ambiente particular (nicho) en donde están estrechamente vinculadas a células endoteliales y endoteliales (Alvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch, 2003; Vega y Peterson, 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Hinsch y Zupanc, 2006; Tavazoie et al., 2008; Kaslin et al., 2009; Alunni et al., 2010; Llorens-Martín y Trejo, 2011; Zupanc, 2011).

El nicho neurogénico, al igual que en otros tejidos, es una estructura microanatómica bien definida que rodea tanto a las células madre como a su progenie y controla su desarrollo funcional *in vivo*. Está compuesto por una serie de elementos conservados en distintas especies: células de soporte y guía que incluyen moléculas de adhesión celular; proteínas de la matriz extracelular que constituyen un soporte mecánico por el cual se transmiten las señales; vasos sanguíneos que aportan nutrientes, y posiblemente células inmunitarias.

Es dentro del nicho donde las células madre reciben señales extrínsecas que interactúan y se integran para influenciar su comportamiento (Álvarez-Buylla y Lim, 2004; Sullivan et al., 2007; Ma et al., 2008; Morrison y Spradling, 2008; Ferraro et al., 2010; Kempermann, 2013).

Las células madre se caracterizan principalmente por presentar ciclos celulares de larga duración, ser auto-regenerantes y multipotentes. Las células amplificadoras transitorias se caracterizan por su mayor abundancia, la corta duración de los ciclos celulares y una mayor limitación en su capacidad de diferenciación. Las células que salen del ciclo celular, migran y se diferencian hacia la estirpe neuronal, se localizan a distintas distancias entre las ZPs y sus destinos finales, adquiriendo progresivamente su fenotipo estructural morfológico-bioquímico y funcional (Riquelme et al., 2008; Sawada et al., 2011; Kempermann, 2013).

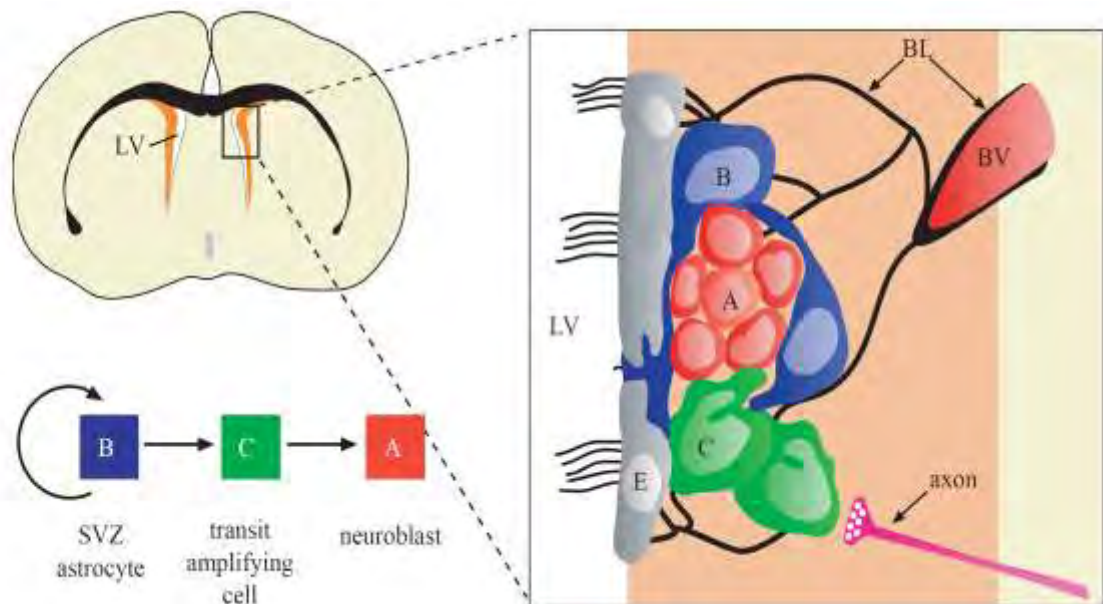


Figura 1. Representación esquemática de los tipos celulares presentes en la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral (LV) del telencéfalo en mamíferos.

En el panel izquierdo se muestra el esquema de una sección frontal del cerebro de ratón adulto señalando la ZSV (anaranjada) adyacente al LV. Abajo se esquematiza la relación entre los tipos celulares de la ZSV: los astrocitos que ofician de células madre (B, azul) generarán células amplificadoras transitorias (C, verde) algunas de las cuales originarán neuroblastos (A, rojo) que se diferenciarán en células del bulbo olfatorio. En el panel derecho se muestra además algunos componentes del nicho neurogénico: células endodermiales ciliadas (E), la lámina basal (BL, línea negra), células endoteliales y vasos sanguíneos (BV). Las señales provenientes de axones (línea rosa) regulan la proliferación y supervivencia en esta región. Modificado de Riquelme et al., 2008.

Al igual que en mamíferos, los neuroblastos pueden permanecer cercanos a las ZPs o migrar cierta distancia hacia su localización definitiva dependiendo de la región de que se

trate. Este fenómeno es particularmente notorio en el Cb donde las células en migración se dirigen desde la ZP hacia su destino final guiadas aparentemente por las fibras de glía radial en animales intactos o luego de sufrir una lesión (*A. leptorhynchus*: Clint y Zupanc 2001; Zupanc y Clint, 2003; Zupanc, 2006, 2011; *Carassius auratus*: Delgado et al., 2011; *D. rerio*: Zupanc et al., 2005; Kaslin et al., 2009, 2013). Aquellos neuroblastos que logran sobrevivir comienzan su diferenciación hacia la estirpe neuronal aún durante el proceso de migración. Esto ha sido demostrado mediante la co-localización de marcadores de la fase de síntesis del ciclo celular (análogos de la timidina) y marcadores de estirpe neuronal (Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kempermann, 2006; Hinsch y Zupanc, 2007; Pellegrini et al., 2007; Kaslin et al., 2009) o por transporte retrógrado de trazadores neuronales (Zupanc et al., 1996, 2005).

A esta potencialidad de generar nuevas neuronas se la conoce como neurogénesis, proceso que permite la recuperación estructural y funcional del sistema nervioso (Lindsey y Tropepe, 2006).

En suma, la neurogénesis es un proceso que incluye la proliferación celular, la salida del ciclo celular, la elección entre sobrevivir y muerte, la decisión del destino celular, migración, diferenciación y la ulterior incorporación en circuitos pre-existentes (Nowakowski y Hayes, 2008).

Las nuevas células generadas en la vida adulta, de las cuales aproximadamente el 50% resultan ser neuronas, persisten por tiempos prolongados abarcando incluso la mayor parte de la vida del organismo (440 días en *A. leptorhynchus*: Ott et al., 1996; 292 a 656 días en *D. rerio*: Zupanc et al., 2005; Hinsch y Zupanc, 2007). El agregado y persistencia de larga duración de estas nuevas neuronas subyacen al crecimiento continuo del cerebro de los peces hasta alcanzar una meseta en especímenes de edad muy avanzada.

Además del papel relacionado a la especialización funcional, se han propuesto dos papeles principales de la neurogénesis posnatal en peces teleósteos: por un lado, acompañar el aumento de las demandas de procesamiento e integración debido a su crecimiento continuo y por otro, permitir la reparación frente al daño (Zupanc, 2006, 2008, 2011),

El estudio de las ZPs en peces eléctricos con estrategias electrosensoriales distintas (peces eléctricos de pulso) permitiría aportar evidencias en este sentido.

Zonas proliferativas en el cerebro de *Gymnotus omarorum*

En estudios previos en *Gymnotus omarorum*, pez eléctrico de descarga débil de pulso, se encontró una amplia distribución de ZPs en larvas tardías en todas las divisiones cerebrales que persisten a lo largo de la vida posnatal (Castelló e Iribarne, 2010), con una notoria abundancia de células proliferantes en estructuras vinculadas al procesamiento de la información electrosensorial y visual, ubicadas en el telencéfalo, mesencéfalo (torus semicircularis –TS- y TeO) y rombencéfalo (Cb y lóbulo electrosensorial de la línea lateral –ELL-). Algunas de esas ZPs se encontraron adyacentes al sistema ventricular (ZPV) y otras distantes al mismo (ZPEV; Cb, ELL; Fig. 2). En el período del desarrollo estudiado (larvario tardío y juvenil), dichas estructuras difirieron en su patrón de crecimiento relativo (Fig. 3; Iribarne y Castelló, 2014) lo cual sugiere diferencias en la composición, dinámica y/o capacidad neurogénica de las ZPs de las mencionadas divisiones del sistema nervioso de estos peces, como se ha evidenciado en mamíferos (Hermann et al., 2009).

El análisis de la distribución, composición y capacidad neurogénica de las ZPs en la vida adulta de *G. omarorum* permitiría evidenciar su evolución a lo largo del desarrollo al igual que realizar un análisis comparativo con otros peces teleósteos.

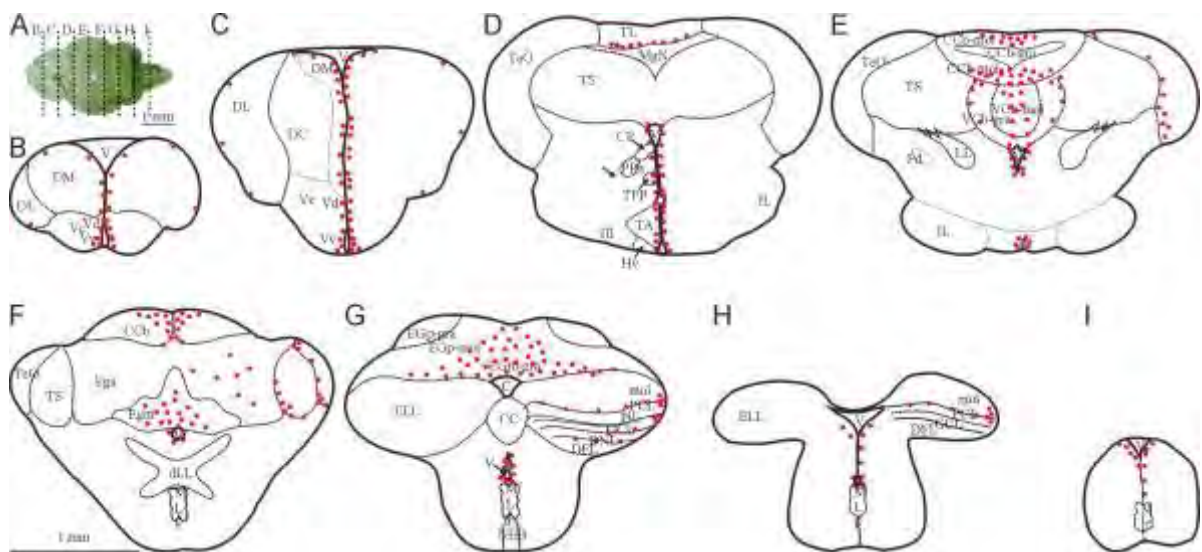


Figura 2. Distribución espacial de las zonas proliferativas de *Gymnotus omarorum* en estadio larvario.

(A) Vista dorsal del cerebro de una larva de 35 mm de largo. Las líneas punteadas indican el nivel mostrado en los esquemas de las secciones frontales del cerebro en C-I. La localización de las zonas proliferativas se representa mediante puntos rojos en base a la distribución de células marcadas con BrdU luego de un tiempo de sobrevivencia de 24 hs. Modificado de Iribarne y Castelló, 2014.

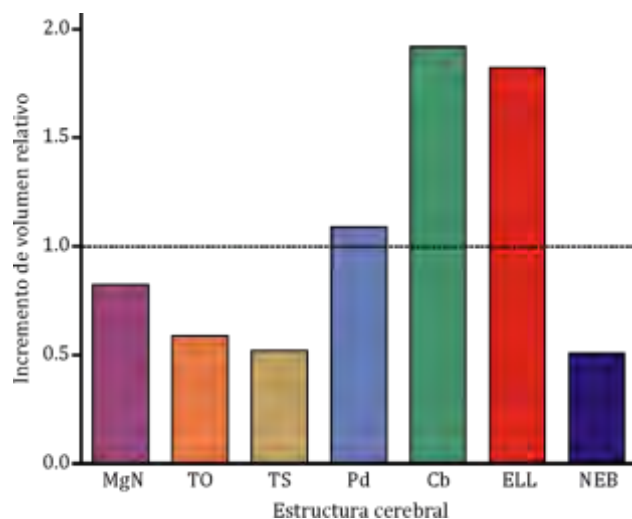


Figura 3. Aumento del volumen relativo de distintas regiones del cerebro de *Gymnotus omarorum* durante estadio larvario al juvenil.

Las estructuras rombencefálicas (Cb y ELL) presentaron un aumento relativo mayor al resto de las estructuras analizadas. Cb: Cerebelo, ELL: Lóbulo electrosensorial, MgN: Núcleo magnocelular mesencefálico NEB: Núcleo electromotor bulbar, PAE: Núcleo praeminentialis, TO: Tectum óptico, TS: Torus semicircularis. Modificado de Iribarne y Castelló, 2014.

Consideraciones metodológicas: doble marcación con análogos halogenados de la timidina

El uso de análogos de la timidina ha sido la herramienta más utilizada para estudiar la proliferación celular, particularmente en el sistema nervioso, desde que fue posible la producción de anticuerpos específicos para su reconocimiento mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo (Gratzner, 1982; Taupin, 2007; Altman, 2011). Más recientemente se han desarrollado protocolos de doble marcación con análogos que pueden ser evidenciados al mismo tiempo por doble inmunohistoquímica, mediante la utilización de anticuerpos primarios específicos para cada uno. Así, variando la ventana temporal entre la administración de ambos análogos se han logrado discriminar subpoblaciones entre las células proliferantes en el cerebro de amniotas (Vega y Peterson, 2005; Llorens-Martín et al., 2010), anamniotas (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) e invertebrados (Sullivan et al., 2007).

Utilizando distintas ventanas temporales entre la administración de dos análogos, es posible evidenciar a las células que se encuentran en fase de síntesis del ciclo celular (fase S) al momento de la administración de cada uno. Así, las células marcadas con ambos

análogos re-entrarían en el ciclo celular al momento de la administración del segundo (Vega y Peterson, 2005; Alunni et al., 2010).

La marcación de células proliferantes seguida de un tiempo de sobrevida corto (hasta 24 hs) es usualmente denominada marcación de pulso ("*pulse labeling*") y permite obtener información sobre la localización y extensión de las ZPs. Por otra parte, la marcación de células proliferantes seguida de un tiempo de sobrevida largo es usualmente denominada marcación de nacimiento ("*birth marking*") o de datado de nacimiento ("*birth dating*") y permite evidenciar el destino de las células derivadas de las ZPs (Mueller y Wullimann, 2002; Kempermann, 2006; Llorens-Martín y Trejo, 2011). La administración secuencial de dos análogos de la timidina, utilizando tiempos de administración entre ellos de distinta duración, permite marcar dos o más poblaciones de células proliferantes. Este procedimiento, denominado doble marcación de nacimiento ("*dual birthdate labeling*"), revela la composición celular de las ZPs, y es particularmente apropiado para evidenciar las células que re-entran en el ciclo celular, al mismo tiempo que el destino de las células derivadas (Vega y Peterson, 2005; Llorens-Martín y Trejo, 2011).

HIPÓTESIS

Las zonas proliferativas del cerebro de *Gymnotus omarorum*, halladas en etapas tempranas de la vida posnatal, persisten en la vida adulta y constituyen nichos neurogénicos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Describir la distribución espacial de las zonas proliferativas en el cerebro de *G. omarorum* en la vida adulta.
2. Estudiar la composición celular de las zonas proliferativas en la vida adulta en *G. omarorum*.
3. Evaluar la capacidad neurogénica de dichas zonas proliferativas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evidenciar la localización de células proliferantes a través de su marcación con un pulso de un análogo de la timidina seguido de un tiempo de sobrevida corto ("*pulse labeling*")
- b) Evidenciar los principales tipos celulares que componen las zonas proliferativas mediante la utilización de doble marcación con análogos de la timidina.
- c) Evidenciar la diferenciación de células derivadas de las zonas proliferativas hacia la estirpe neuronal mediante: 1- demostración de expresión de marcadores de estirpe neuronal en células que poseen retención de larga duración del análogo de la timidina (protocolo de datación de nacimiento "*birth-dating*"), y 2- demostración de marcación retrógrada con trazadores neuronales en células que poseen una retención de larga duración del análogo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y procedimientos generales

En este trabajo se utilizaron 17 especímenes (largo: 13,54±4.31 cm; peso: 9,77±9,57 grs) del pez eléctrico de pulso *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009). Los animales fueron colectados en la Laguna del Cisne, departamento de Maldonado, Uruguay (latitud 35°50 S, longitud 55°08 W). Una vez trasladados al Bioterio de Poiquilothermos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), se mantuvieron en peceras individuales con un ciclo 12 hs luz y 12 hs oscuridad y se alimentaron diariamente con *Tubifex tubifex*. La conductividad del agua se mantuvo a 200 µS y la temperatura ambiente a 24 °C.

Para la administración intraperitoneal de los análogos halogenados de la timidina, los animales fueron previamente anestesiados mediante inmersión en una solución de ácido aminobenzoico 3- metil éster (MS-222; 120 mg/L). Durante la aplicación de neurobiotina en el CCB, los animales se mantuvieron anestesiados durante todo el procedimiento mediante perfusión oral de la misma solución anestésica. Previo a la perfusión intracardíaca, los especímenes se anestesiaron profundamente mediante inmersión en MS-222 (500 mg/L) hasta el cese de la respiración, manteniéndose la anestesia durante todo el procedimiento.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo el previo consentimiento de la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, número de ordenanza: 4332-99, Universidad de la República). Los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE (número de protocolo: 010/09/2011).

Protocolos experimentales

Para evidenciar y caracterizar las zonas proliferativas del cerebro de *G. omarorum* durante la etapa adulta, dos análogos halogenados de la timidina, 5'clorodeoxiuridina (CldU) y 5'iododeoxiuridina (IdU), fueron administrados de modo secuencial variando el tiempo de administración entre ambos y el tiempo de sobrevida luego del segundo análogo, y combinando o no esta técnica con marcación mediante aplicación de trazadores neuronales. Por lo tanto, se realizaron cinco grupos experimentales (Protocolos 1-5; Tabla 1). En un grupo experimental los animales fueron tratados con IdU primero, CldU 30 d después, y se fijaron a las 24 hs de administrado el CldU (Protocolo 2). En los demás grupos experimentales se administró el CldU primero, el IdU 24 hs (Protocolo 1), 30 d

(Protocolo 3), 90 d (Protocolo 4) o 180 d (Protocolo 5) después, y se fijaron 4 hs luego de la administración de IdU (Tabla 1; Vega y Peterson, 2005; Alunni et al., 2010).

En todos los protocolos experimentales se realizó una única inyección de los análogos a excepción de los animales tratados según los Protocolos 4 y 5 que recibieron 4 inyecciones diarias del primero en días consecutivos, con el fin de aumentar la probabilidad de marcación de células proliferantes para posteriormente evidenciar la retención de larga duración del análogo. Estos animales tratados con dichos protocolos fueron además operados, 4 a 5 días antes de la fecha de fijación, para la aplicación de cristales de neurobiotina en la superficie del CCb.

Los animales fueron mantenidos en sus acuarios en los períodos entre la administración de ambos análogos, y entre el segundo análogo de la timidina y la fijación.

Tabla 1. Protocolos experimentales llevados a cabo para cumplir con los objetivos propuestos. Se muestra la cantidad de animales utilizados en cada grupo (N=17), el primer análogo y número de inyecciones administradas, el intervalo entre administración de análogos, la aplicación del trazador neuronal y el tiempo de sobrevida luego del segundo análogo.

Nº Protocolo	N	Primer análogo administrado (Nº inyecciones)	Intervalo entre administración de análogos	Aplicación de trazador neuronal	Tiempo luego del segundo análogo
1	4	CIdU (1)	24 hs		4 hs
2	3	IdU (1)	30 d		24 hs
3	5	CIdU (1)	30 d		4 hs
4	3	CIdU (4)	90 d	X	4 hs
5	2	CIdU (4)	180 d	X	4 hs

Preparación y administración de los análogos halogenados de la timidina

En todos los casos se prepararon soluciones equimolares de CIdU (2.3 mg/ml) e IdU (1.7 mg/ml). El CIdU se disolvió en NaCl (0.7%) y el IdU en NaCl (0.7%) conteniendo NaOH (0,04N) previamente filtrados (0.45 µm). Ambos análogos fueron administrados de modo intraperitoneal a una dosis de 25 µl/g mediante una jeringa hipodérmica (1 ml) con una

aguja 27G. A excepción de los animales tratados con los Protocolo 4 y 5, los análogos fueron administrados en una única inyección.

Marcación por incorporación y transporte intracelular del trazador neuronal neurobiotina

Para evidenciar la diferenciación de células recientemente generadas en neuronas del Cb de *G. omarorum*, se combinó la técnica de trazadores neuronales *in vivo* con la marcación de tipo datado de nacimiento en peces tratados según Protocolos 4 y 5 (tiempo de sobrevida 90 y 180 d, respectivamente). Este procedimiento fue llevado a cabo 3 a 4 días antes de la fijación de los animales para permitir la marcación retrógrada de neuronas del CCb, mayoritariamente las células grano.

Luego de la anestesia, se removió cuidadosamente el tejido que cubre la parte más rostral de la sutura sagital del cráneo con la ayuda de la punta de una pinza. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión superficial para abrir la parte más rostral de la sutura sagital y exponer la superficie dorsal de la porción rostral del CCb. Finalmente, se realizó cuidadosamente un corte superficial en la superficie dorsal del CCb para así aplicar cristales de neurobiotina (Vector, #SP-1120) con la ayuda de la punta de una aguja en la capa molecular del CCb. La herida fue luego cerrada con Histoacryl. De esta manera, se marcaron mayoritariamente de manera retrógrada las células granulares del CCb.

Perfusión intracardíaca

Una vez anestesiados profundamente, los animales fueron fijados mediante perfusión intracardíaca por medio de una bomba peristáltica de flujo bajo (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA). Para ello se insertó una cánula de perfusión en el ventrículo hasta canular el seno aórtico. Luego se lavó el lecho vascular por perfusión de una solución salina fisiológica (NaCl, 0.7%). Por último se perfundieron 50 ml de una solución fijadora (10% paraformaldehído -PAF-, disuelto en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4 -BF-). Los cerebros se disecaron y posfijaron en PAF durante 24 hs a 4 °C. Posteriormente fueron embebidos en una solución de gelatina/albúmina desnaturalizada con glutaraldehído. Los bloques obtenidos se seccionaron en cortes frontales seriados de 60 µm de espesor con un vibrátomo (Leica VT1000S, Wetzlar, Alemania).

Inmunohistoquímica para la demostración de CldU e IdU

Para exponer a los marcadores de células proliferantes, las secciones obtenidas fueron pre-tratadas de modo de separar las dobles cadenas de ADN, mediante la incubación durante cincuenta minutos en ácido clorhídrico (HCl) 2N en BF conteniendo Tritón X-100 al 0.3% (BFT). Luego de realizar lavados en BF (tres lavados de diez minutos cada uno), las secciones fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente en los anticuerpos primarios anti BrdU-CldU producido en rata (Accurate #OBT- 0030; clone BU1/75) y anti BrdU-IdU producido en ratón (Becton Dickinson #347580; clone B44); ambos a una dilución final de 1:500 (en BFT). A continuación, se realizaron lavados en BF (tres lavados de diez minutos cada uno) y se incubaron durante 1 hr en el anticuerpo secundario anti IgG de rata biotilado producido en burro (Jackson Immuno Research, # 712-065-153; dilución final 1:500 en BFT). Luego de los lavados correspondientes en BF, se incubaron durante 90 min en una mezcla de estreptavidina acoplada a Cy3 (Jackson, #016-160-084; dilución final 1:500) y anti IgG de ratón producido en burro acoplado a Alexa 488 (Molecular Probes #A11001; dilución final 1:500 en BFT). Luego de lavadas, se montaron las secciones en medio de montaje conteniendo alcohol de polivinilo (PVA) como agente endurecedor y 1, 4 - diazabiciclo [2.2.2] octano (DABCO,) como agente protector de la fluorescencia.

Los controles negativos consistieron en la omisión de la administración de alguno de los análogos o la omisión de la incubación de las secciones en los anticuerpos primarios, mientras que el resto de los pasos de la inmunohistoquímica se realizaron de igual manera a lo descrito previamente. Estos controles no resultaron en la visualización de señal (datos no mostrados).

Doble inmunohistoquímica para la demostración de CldU y marcadores neuronales

Para evidenciar la co-localización de CldU y el marcador neuronal HuC/HuD, las secciones fueron pre-tratadas con HCl 2N y lavadas en BF como se describió previamente. Luego, se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en una mezcla de soluciones de anticuerpo primarios anti BrdU-CldU producido en rata (dilución 1:500, en BFT) y anti HuC/HuD (Molecular Probes #A21271) producido en ratón (dilución 1:200, en BFT). Luego de lavados en BF, se incubaron durante 90 minutos en una mezcla de anticuerpos secundarios: anti IgG de rata ligado a Cy5 producido en burro (dilución 1:1000, en BFT) y anti IgG de ratón acoplado a Alexa 488 producido en cabra (Jackson Immuno Research #109-486-129), ambos a una dilución final de 1:1000. Posteriormente se realizaron los lavados en BF y el montado de las secciones como se describió anteriormente.

Para evidenciar la co-localización de CldU y el marcador de tirosina hiroxilasa (TH), las secciones fueron pre-tratadas como se mencionó anteriormente. Luego se incubaron en una mezcla de anticuerpos primarios anti BrdU-CldU producido en rata (dilución 1:500, en BFT) y anti TH producido en conejo (Thermo scientific #OPA1-04050, dilución 1:800, en BFT). Luego de lavados en BF, se incubaron durante 90 min en una mezcla de anticuerpos secundarios: anti IgG de rata ligado a Cy5 producido en burro y anti IgG de conejo acoplado a Alexa 488 producido en cabra, ambos en una dilución final de 1:1000. Posteriormente se realizaron los lavados en BF y el montaje de las secciones como se describió anteriormente.

Doble inmunohistoquímica para la demostración de CldU y la marcación retrógrada con neurobiotina

Para evidenciar la co-localización de CldU y neurobiotina, las secciones fueron tratadas con HCl 2N e incubadas en anticuerpo primarios anti BrdU-CldU producido en rata como se describió anteriormente. Luego de los lavados en BF, se incubaron durante 90 min en una mezcla de anti IgG de rata acoplado a Cy5, producido en burro y estreptavidina acoplada a Cy3 (dilución de ambos 1:500 en BFT). Luego de los lavados en BF, las secciones se montaron en medio de montaje conteniendo PVA-DABCO como fue previamente descrito.

Adquisición de imágenes y procesamiento

Las secciones fueron observadas bajo microscopía confocal. La mayor parte de los preparados fueron observados con el sistema confocal del IIBCE (Microscopio Olympus BX61 equipado con un módulo confocal FV300 y cuatro líneas de excitación: 405 nm, 488 nm, 543 nm y 633 nm). Algunos preparados fueron observados con el sistema confocal del Institut Pasteur Montevideo (Leica DMI6000, TCS-SP5, equipado con 4 láseres con sus respectivas líneas de excitación: 405nm, argón multilínea -458/476/488/496/514-, 543nm, 594nm, 633nm) o el sistema confocal de la Facultad de Medicina (Microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 II, equipado con 4 láseres y sus respectivas líneas de excitación : 405 nm, argón multilínea -458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm-, 543 nm y 633 nm).

La configuración para la adquisición de imágenes fue ajustada para asegurar el uso de todo el rango dinámico de detección. Las imágenes corresponden a 14, 20, 25 o 30 planos focales que fueron secuencialmente escaneados cada 0,5 o 1 μm y proyectados a un plano. En casos necesarios se realizaron modificaciones luego de la adquisición en el

histograma de distribución para lograr el completo uso del rango dinámico. La co-expresión de los marcadores fue confirmada mediante proyecciones ortogonales en los planos XZ e YZ de los stacks obtenidos en los sitios de interés, o mediante la visualización de cada canal en un plano escaneado por separado junto a su superposición.

Estereología confocal y análisis estadístico

Se utilizó estereología confocal para cuantificar en la ZP del CCb rostral de *G. omarorum*, los principales tipos celulares que fueron evidenciados mediante la doble marcación con CldU e IdU, variando el tiempo de administración entre ambos (Protocolo 1: N=4; largo: 12,47±0,74 cm, peso: 5,65±1,44 grs; Protocolo 3: N=5; largo: 19,46±1,96 cm, peso: 23,10±6,56 grs). La cuantificación de núcleos CldU, IdU y doble marcados se realizó en las capas molecular dorsal, molecular ventral y granular. Para esto se diseñó un fraccionador óptico específico para estereología (West, 1993; Peterson, 1999). Los límites del CCb fueron determinados mediante imágenes obtenidas utilizando un objetivo 10X con un microscopio Olympus BX51. El muestreo de las zonas de interés del CCb fue realizado aleatoriamente con el uso del software Stereo Investigator (MicroBrightField, Inc. Williston VT). Se cuantificaron núcleos dispuestos en secciones muestreadas a intervalos de 1:2 o 1:3 equidistantes a 7±2 µm en toda la extensión del CCb de cada animal (N=9). La cuantificación de núcleos se realizó a intervalos predeterminados mediante un marco de conteo (de 30 µm X 30 µm) superpuesto en la imagen adquirida de la sección. Para identificar con núcleos marcados con CldU, IdU o ambos dentro del marco de conteo se observaron las secciones con un objetivo 60X (de inmersión en aceite con una AN=1.4).

Para encontrar diferencias significativas entre la cantidad de tipos celulares hallados en cada capa del CCb se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (estadístico U; $p < 0,05$) utilizando el software libre PAST versión 2.17c (Hammer et al., 2001).

RESULTADOS

Consideraciones generales sobre la marcación de núcleos de las células proliferantes en el cerebro adulto de *G. omarorum*

Se encontraron principalmente dos tipos de marcaciones nucleares en las células proliferantes: núcleos que incorporaron uno de los análogos de la timidina (CldU: flechas rojas o IdU: flechas verdes) o ambos (flechas amarillas) (Fig. 4). Algunos mostraron una marcación nuclear homogénea (flechas rellenas) mientras que otros presentaron marcación granular (flechas vacías). Esto se observó independientemente de la duración del intervalo de tiempo entre la administración de ambos análogos o del tiempo de sobrevivida luego de la administración de los mismos (24 hs: Fig. 4A; 30 d: Fig. 4B). En ambos casos, la intensidad de la marcación pareció disminuir en función del tiempo de sobrevivida post administración del análogo, siendo usualmente más débil o tenue en tiempos de sobrevivida prolongados (Figs. 4B, D). Por el contrario, escasas células mostraron una marcación intensa de larga duración. En la mayoría de los casos, ambos análogos presentaron una marcación con intensidad similar en los núcleos dobles marcados, tanto en aquella homogénea como granular (Fig. 4C). En cambio algunos núcleos doble marcados resultaron tener una homogénea del primer análogo y una granular del segundo (Fig. 4C).

Los núcleos de las células proliferantes también se diferenciaron en su forma, siendo en secciones frontales, de contorno circular, ovoide o alargado (Figs. 4C, D). Aunque muchos presentaron una forma circular en las secciones frontales, su forma tridimensional fue elipsoidal o en bastón en algunos casos (Fig. 4C) y esférica en otros (Fig. 4D), como lo evidencian las proyecciones ortogonales en los planos *XY* y *XZ*.

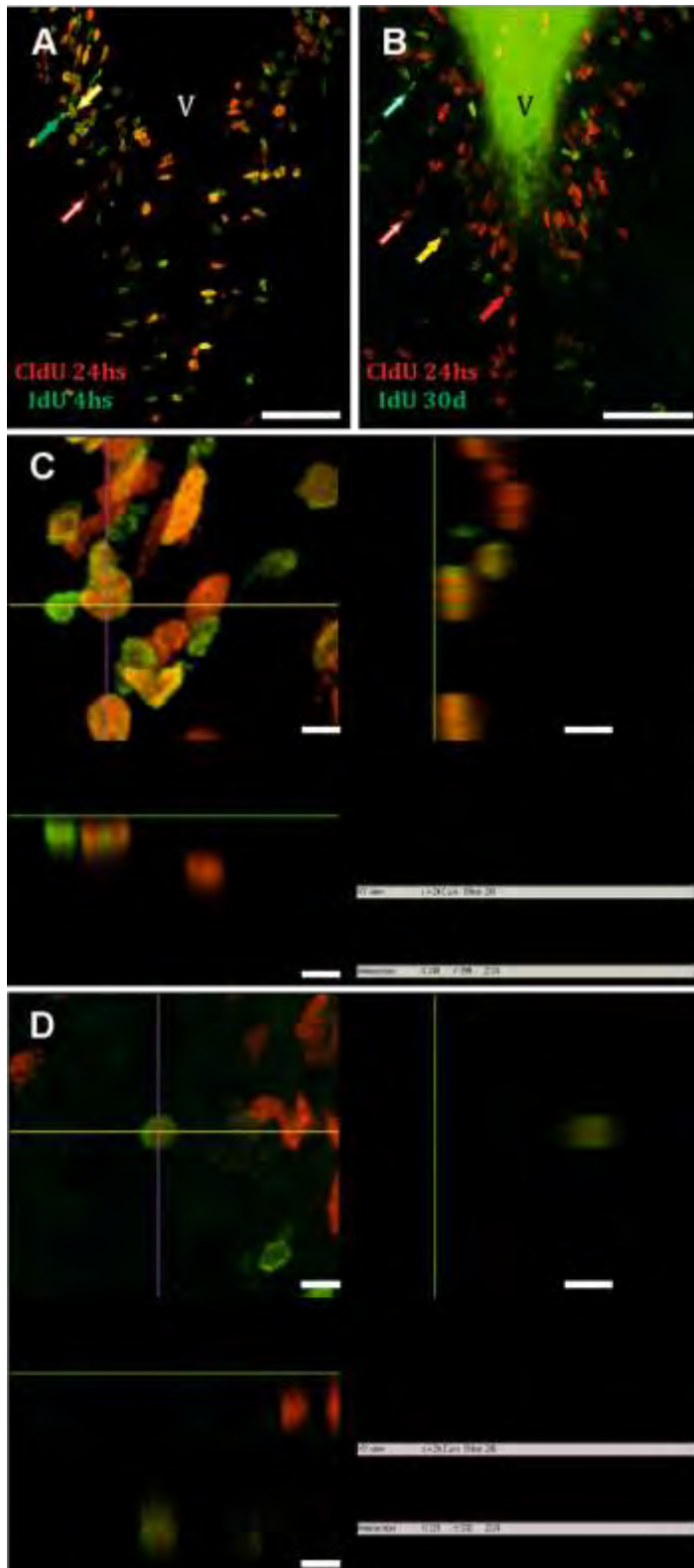


Figura 4. Tipos de marcación de los núcleos de células proliferantes a nivel de la zona proliferativa adyacente al ventrículo rombencefálico (V). Se utilizó una doble marcación con los análogos de la timidina CldU (flechas rojas) e IdU (flechas verdes) administrados de acuerdo a dos protocolos con intervalo corto (Protocolo 1: **(A)**, **(C)**) y largo (Protocolo 2: **(B)**, **(D)**) entre ambos. **(A)** y **(B)** son microfotografías correspondientes a la proyección en un plano de 25 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. La doble marcación de los núcleos que se muestran en las microfotografías en **(C)** y **(D)** fue confirmada mediante la obtención de la proyección de los planos ortogonales en los ejes *XY* y *XZ* que se cruzan en el núcleo de interés. Con ambos protocolos se obtuvo una marcación que fue tanto homogénea (flechas rellenas) como granular (flechas vacías), intensa en algunos casos y tenue en otros. Nótese que la región homogéneamente fluorescente en **(B)** se debe a la unión inespecífica de los anticuerpos a la mezcla de proteínas en la que se encastraron lo cerebros para la obtención de los cortes. Escalas: A, B: 50 μm ; C, D: 5 μm .

Capítulo 1: Distribución espacial de las zonas proliferativas en el cerebro de *G. omarorum*

Con el objetivo de describir la distribución espacial de las ZPs del cerebro de *G. omarorum* se analizó la localización de las células proliferantes marcadas con sólo un análogo de la timidina y una sobrevida de 4 o 24 hs. Esto permitió contemplar dos aspectos de esta metodología previamente utilizada en otras especies de peces teleósteos. Por un lado, abarcar el intervalo de tiempo que los análogos están metabólicamente disponibles (Zupanc y Horschke, 1995) y por otro, no superar el tiempo en el que comienza la migración de células derivadas (Ekström et al. 2001).

Cuatro horas luego de la administración de IdU se evidenció una amplia distribución de células proliferantes en todas las divisiones del cerebro adulto de *G. omarorum*: telencéfalo, diencefalo, mesencefalo y rombencefalo, al igual que en otras especies de peces teleósteos (Zupanc y Horschke, 1995; Zupanc, 2011; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2008). La distribución de células ciclantes 24 hs luego de administrado el CldU se superpuso casi completamente con la distribución de células proliferantes 4 hs luego de administrado el IdU (Figs. 4A, B).

En base a estos resultados, se asume que, si bien a las 24 hs de administrados los análogos se observaron núcleos marcados alineados (indicando que las células derivadas ya habrían comenzado el proceso de migración), dicho tiempo no fue suficiente para que estas células hayan abandonado los límites de las ZPs. Por lo tanto, los resultados de ambos tiempos de sobrevida se utilizaron para describir la distribución de las ZPs en el presente estudio.

En algunas zonas del cerebro las células proliferantes presentaron una distribución dispersa de baja densidad, con células ubicadas adyacentes a las paredes de los vasos sanguíneos o en medio del tejido nervioso (tanto en la sustancia gris como en la blanca), mientras que en otras zonas se dispusieron densamente empaquetadas, constituyendo ZPs claramente reconocibles (Ekström et al., 2001).

Se encontraron dos tipos principales de ZPs en el cerebro de *G. omarorum*, ventriculares (ZPV) y extra-ventriculares (ZPEV) (Fig. 5).

Las primeras corresponden a aquellas zonas cuyas células proliferantes se encuentran ubicadas adyacentes al epitelio que reviste el sistema ventrículo-cisternal del cerebro, mientras que las segundas corresponden a zonas alejadas de los ventrículos, como se ejemplifica en la Figs. 5A y 5B, respectivamente (Zupanc y Horschke, 1995; Ekström et al., 2001). Además, se encontró un posible tercer tipo de ZP, que aparentando ser ZPEV, una

inspección detallada de los preparados permitió revelar que en realidad corresponden a ZPV (ver descripción de la ZP del TeO más adelante).

A continuación se describe la distribución de las ZPs en todas las divisiones cerebrales de *G. omarorum* (Fig. 6), para lo cual se utilizará principalmente la nomenclatura de Meek y Nieuwenhuys (1998) complementada con la de Maler et al. (1991) y Zupanc et al. (1996).

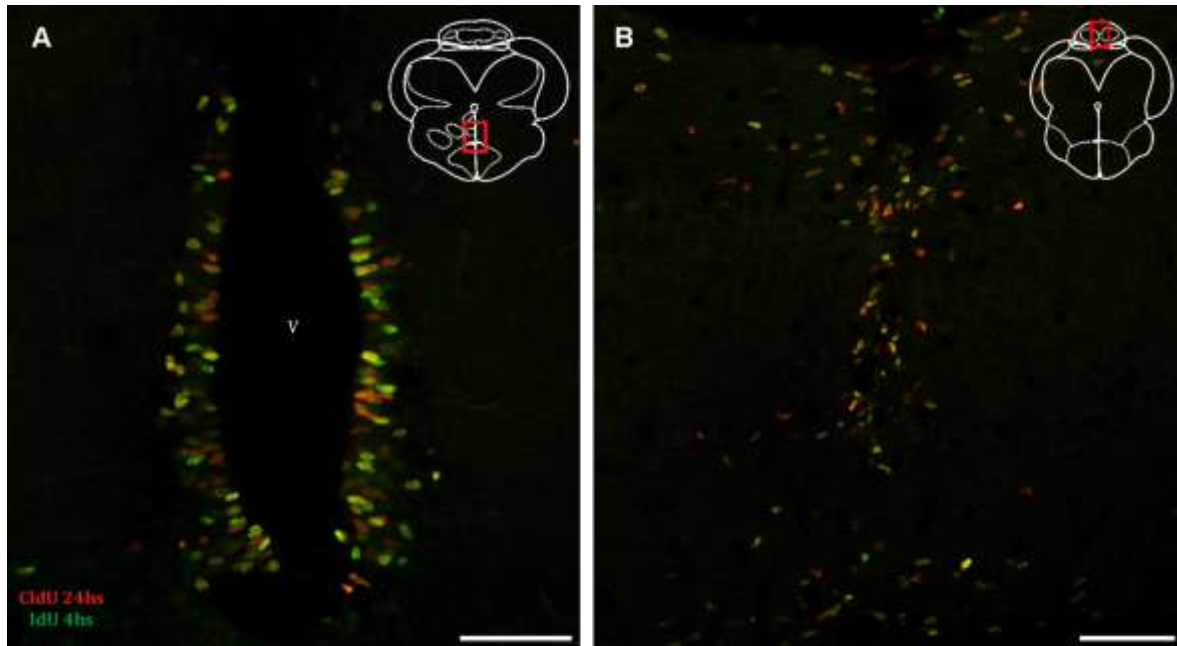


Figura 5. Tipos de zonas proliferativas según su localización. Se encontraron dos tipos principales de zonas proliferativas en el cerebro de *G. omarorum*, ventriculares y extra-ventriculares, evidenciadas mediante el Protocolo 1. En **(A)** se muestra la zona proliferativa cercana a nivel del ventrículo mesencefálico (V) mientras que en **(B)** se muestra la zona proliferativa extra-ventricular ubicada en la región rostral del corpus cerebelli. Las microfotografías corresponden a un plano confocal adquirido de modo secuencial de las regiones delimitadas por el rectángulo rojo en los esquemas de la sección frontal. Escalas: 50 μ m.

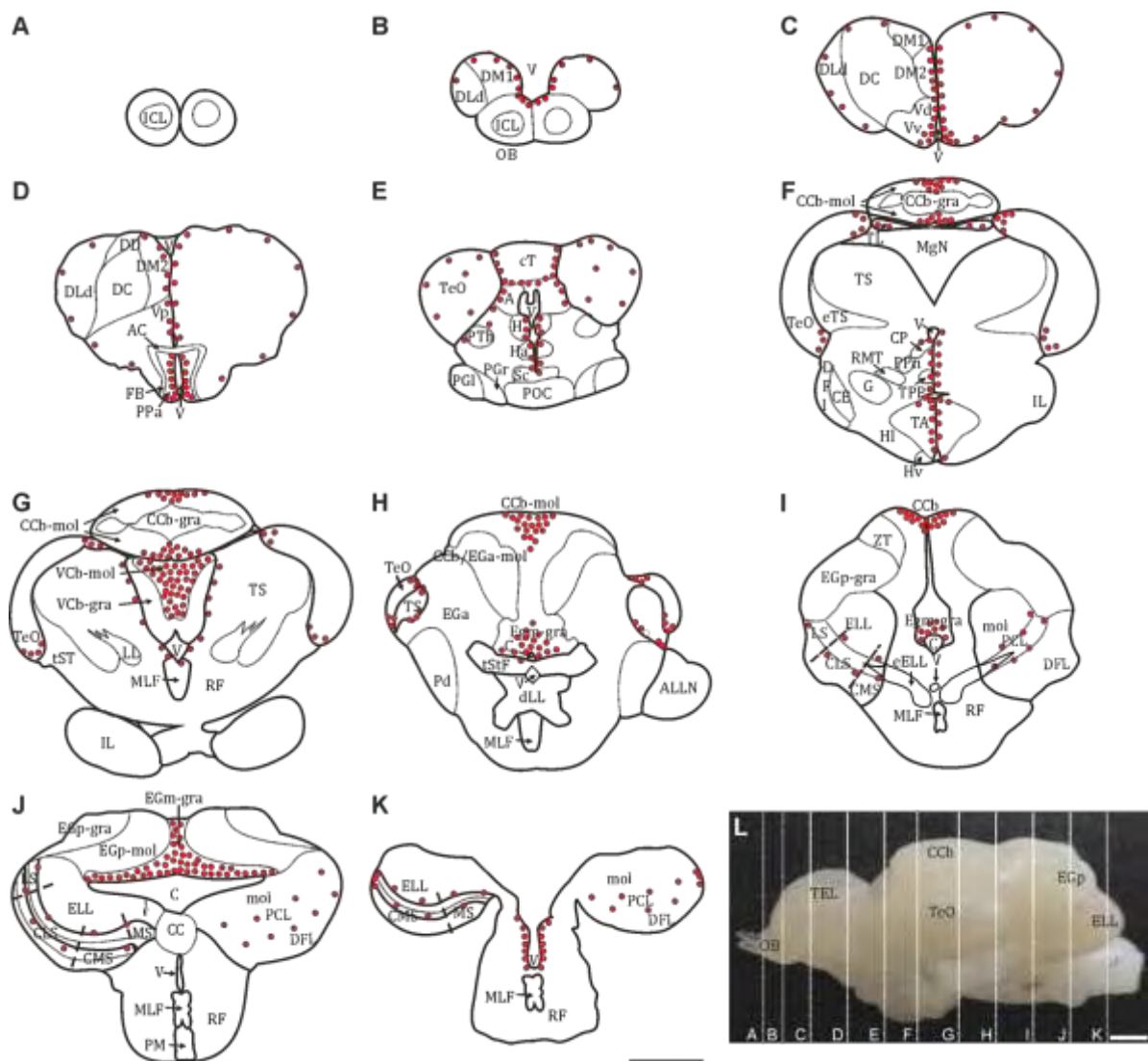


Figura 6. Distribución espacial de las zonas proliferativas del cerebro de *G. omarorum* en la vida adulta. Las zonas proliferativas (ZPs) se identificaron en base a la distribución de células proliferantes evidenciadas 4 y 24 hs luego de la administración de IdU y CldU, respectivamente. Lo puntos rojos representan la localización de las ZPs en los esquemas de secciones frontales (A-K) correspondientes a los niveles indicados en la vista lateral del cerebro (L). Las ZPs ventriculares se hallaron en la región caudal del bulbo olfatorio (B), telencéfalo (B-D), diencéfalo (D-F), mesencéfalo (E-H) y rombencéfalo (I-K). Se encontraron ZPs extraventriculares (ZPEV) en las tres divisiones del cerebelo, a nivel de la capa molecular del corpus cerebelli (CCh-mol; F-I) y de la valvula cerebelli (VCb-mol; G), y a nivel de la capa granular de la eminencia granularis pars medialis (EGm-gra; H-J). Una ZPEV aún no reportada se encontró en el borde latero-caudal del lóbulo electrosensorial de la línea lateral (ELL; K). Escalas: 1 mm.

Telencéfalo

Al igual que en otros vertebrados y teleósteos, el telencéfalo de *G. omarorum* comprende los bulbos olfatorios (OB), los hemisferios cerebrales y la región del telencéfalo caudal (Figs. 6A-D; Nieuwenhuys, 2009). El OB de *G. omarorum* es sésil y se encuentra adyacente a la parte ventral del extremo rostral de los hemisferios cerebrales. Presenta una región anterior libre, y otra posterior, parcialmente cubierta por los hemisferios cerebrales (Figs. 6A, B, L).

Se encontraron muy escasas células proliferantes en el OB que se dispusieron mayoritariamente en la capa glomerular (a nivel de la región rostral; Fig. 6A) y en la superficie dorso-medial a nivel del OB caudal (que corresponde a la región más rostral del ventrículo telencefálico; Fig. 6B). La cantidad y disposición de las células proliferantes en la región rostral del OB no es consistente con la existencia de una ZP. Por el contrario, en su región caudal, las células proliferantes constituyeron una ZP fácilmente reconocible, adyacente a la porción más rostral de la parte ventral de ventrículo telencefálico.

Los hemisferios telencefálicos comprenden dos subdivisiones, el pallium o telencéfalo dorsal (formado por cinco regiones: medial -DM-, dorsal -DD-, central -DC-, lateral -DL- y posterior) y el subpallium o telencéfalo ventral (formado por cuatro regiones: dorsal -Vd-, nother, posterior -Vp- y ventral -Vv). El DL está dividido a su vez en regiones dorsal (DLd; Figs. 6B-D), posterior y ventral. Las células proliferantes se encontraron en dos ZPVs, una extensa, adyacente a toda la extensión de la superficie medial y dorso-lateral del telencéfalo, enfrentando DM, DD y DL (Figs. 6B-D) y otra más acotada adyacente a la superficie de la región ventral del ventrículo telencefálico, enfrentando al subpallium (Figs. 6C, 7). No se observaron límites claramente netos entre las ZPVs del OB y del telencéfalo ventral, ni entre las ZPVs del telencéfalo ventral y dorsal.

Diencefalo

El diencefalo, ubicado entre el telencéfalo y mesencéfalo, incluye el epitálamo, el tálamo dorsal y ventral y el hipotálamo. De acuerdo a Meek y Nieuwenhuys (1998) también comprende la región preóptica y la región sinencefálica-pretectal, a pesar de su posible origen extra-diencefálico.

La ZP diencefálica más rostral en *G. omarorum* se encontró a nivel de la región preóptica. Esta ZP se extendió por el receso preóptico del ventrículo diencefálico desde la comisura anterior (AC) al quiasma óptico (Figs. 6D-E) y por tanto constituye una ZPV adyacente a las subdivisiones anterior (PPa, Figs. 6D; 8A, B) y posterior del núcleo preóptico periventricularis y el núcleo supraquiasmático (Sc, Figs. 6E; 8C, D). Otras ZPVs se encontraron adyacentes al núcleo pretectal (A, Fig. 6E) y la habénula epitalámica (H, Figs. 6E; 8C, D), el tálamo dorso-medial y el núcleo diencefálico central-posterior (CP, Figs. 6F; 8E, G) ubicado medial al núcleo pre-marcapaso (PPN; Figs. 6F; 8E, G). En la parte ventral a estas regiones, se hallaron varias ZPVs dispuestas, en sentido rostro-caudal, adyacentes al tálamo, núcleo posterioris periventricularis y el núcleo periventricular del tuberculum posterior (TPP, Figs. 6F; 8E, G). Además, se encontró una amplia ZPV a lo largo de las paredes del ventrículo hipotalámico y sus recesos, y por ende adyacente al hipotálamo anterior (Ha, Figs. 6E; 8C, D), dorsal (Hd, Figs. 8E, G), ventral (Hv, Figs. 6F; 8G), lateral (Hl, Fig 6F) y caudal (Hc).

Mesencéfalo

El mesencéfalo comprende la superficie dorsal del cerebro medio, incluyendo el tectum opticum (TeO), el torus longitudinalis (TL), el torus semicircularis (TS) y el tegmentum ventro-medial (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Todas estas regiones presentaron ZPs particulares en *G. omarorum*.

Tectum Opticum

El TeO es una estructura cortical pareada que cubre la mayor parte del mesencéfalo dorsal y lateral (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Ambos TeO convergen en el polo rostral donde se interconectan a través de la comisura tectal (cT). La parte rostral de la cT se dispone perpendicular al eje principal del cerebro, paralela al plano frontal, entre los polos rostrales de ambos TeO. A nivel caudal, la cT manifiesta una rotación de casi noventa grados volviéndose plana en dirección dorso-ventral. Esta porción de cT se extiende entre los extremos dorso-mediales de ambos TeO, transcurriendo entre el extremo rostral del Cb por arriba y ambos TL por abajo.

Una ZP bien definida fue encontrada a ambos lados de la parte rostral de cT, contigua al límite medial del polo rostral del TeO (Figs. 6E; 9A, B). Además, en cada TeO fueron evidentes tres ZPs, aparentemente independientes: una en el borde dorso-medial, otra en el borde ventro-lateral y otra en el polo caudal (Figs. 6F-H; 9; 10). Las porciones dorso-medial y ventro-lateral de la ZP del TeO se extendieron en sentido rostral-caudal desde

aproximadamente el límite entre el tercio rostral y los dos tercios caudales del TeO, hasta su polo caudal (Figs. 6F-H; 9; 10). En la zona rostral de dicha estructura, ambas ZPs se hallaron distantes entre sí, en la medida que el TeO es más extenso en sentido dorsal-ventral. En dirección caudal se aproximaron para coalescer entre sí y con la ZP del polo caudal. Por esta razón, se puso en evidencia que el TeO posee una única ZP con forma de herradura.

En todas las porciones de la ZP tectal, las células proliferantes se encontraron en prácticamente todas las capas, extendiéndose por todo el espesor de esta región mesencefálica.

Torus longitudinalis

El TL es también una estructura pareada dispuesta a cada lado de la línea media, por debajo de la parte horizontal de la cT. El TL está conformado por células granulares densamente empaquetadas que proyectan a la superficie ipsilateral del estrato marginal del TeO constituyendo así un circuito tipo cerebeloso (Meek y Nieuwenhuys, 1998; Bell, 2002).

La ZP del TL de *G. omarorum* aparentó estar conformada por una única capa de células proliferantes cubriendo toda la extensión rostro-caudal de su superficie ventral, adyacente al ventrículo mesencefálico usualmente obliterado en esta especie (Fig. 6F).

Torus semicircularis

El TS es una estructura laminar prominente del tegmentum ventro-lateral cuyo importante crecimiento oblitera al ventrículo mesencefálico en *G. omarorum* al igual que en otros peces eléctricos.

Se encontraron acúmulos de células proliferantes en los bordes ventro-medial y dorso-lateral de la parte caudal de TS, que convergen hacia el polo caudal del mismo (Fig. 6H).

Las ZPs del TS y TeO parecen ser continuas a nivel del polo caudal de ambas estructuras. Ambas ZPs parecen hallarse lejos del sistema ventricular. Sin embargo, en muchos cortes (Fig. 9C, D), se hizo artefactualmente evidente la existencia de una cavidad entre el TeO y el TS, correspondiente al ventrículo mesencefálico, usualmente obliterado debido al importante desarrollo del TS. Por ello, estas ZPs aparentemente ZPEV en realidad corresponden a ZPV.

Rombencéfalo

El rombencéfalo comprende tres zonas: una ventral derivada de la placa basal, una intermedia visceral y una dorsal derivada de la placa alar. Esta última incluye, en su parte rostral al Cb, y en la parte caudal a la zona somatosensorial. Ésta consiste en un núcleo trigeminal somatosensorial y un núcleo especializado. En *G. omarorum*, al igual que en otros gimnótidos de descarga débil, en el rombencéfalo predomina la región de la línea lateral, particularmente el núcleo medial octavolateral mecanosensorial y el lóbulo electrosensorial de la línea lateral (ELL; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Una amplia ZPV fue encontrada en toda la extensión de la superficie ventricular del cuarto ventrículo y el sistema cisternal cerebelo-medular. Además, se encontraron dos ZPEV que se describen a continuación.

Cerebelo

El Cb de *G. omarorum* así como el de otros teleósteos, es una estructura ubicada en la superficie del cerebro en la región más rostral del rombencéfalo. Está formado por una capa granular cuyas células grano proyectan a la capa molecular dando lugar a fibras paralelas las cuales contactan con las dendritas de células de Purkinje. El Cb de los teleósteos consiste en tres regiones principales, el corpus cerebelli (CCb), ubicado dorsalmente a la parte media de la porción anterior del mesencéfalo; la valvula cerebelli (VCb) la cual es una extensión anterior ubicada ventral al CCb y que protruye en el ventrículo mesencefálico; y la región cerebelar caudal o lóbulo vestibulo-lateral, ubicado caudal al CCb. El lóbulo vestibulo-lateral del Cb está formado por un lóbulo caudal y dos eminencias granulares, una anterior (EGa) y otra posterior que a su vez se divide en una eminencia granular medial (EGm) y una eminencia granular lateral-posterior (EGp; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

La ZP del Cb fue la más extensa y densamente poblada de células proliferantes del cerebro de *G. omarorum*. Cada división del Cb presentó su propia ZP.

En el CCb, la ZP se limitó a la parte medial de la capa molecular (CCb-mol) cuya densidad celular disminuyó en dirección medio-lateral (Figs. 6F, G; 11A, C). La región medial del CCb fue la más estudiada en este trabajo. A este nivel, la capa granular (CCb-gra) subdivide a la capa molecular en dos regiones, una región dorsal (CCb-mol dorsal) y otra ventral (CCb-mol ventral).

Otra prominente ZP fue encontrada en la capa molecular de la VCb (VCb-mol) donde se evidenció una distribución densa y homogénea de las células proliferantes (Figs. 6G; 12A, B). Cabe destacar que algunas células proliferantes fueron encontradas tapizando a modo de monocapa la superficie del extremo ventral de la capa granular de la VCb (VCb-gra) (Figs. 12B, F-H).

Por su parte, el lóbulo vestibulo-lateral del Cb presentó una destacada ZP a nivel de la capa granular de la EGM (Egm-gra; Figs. 6J; 13A, B, D, E) donde, al igual que la VCb-mol, las células proliferantes se dispusieron de manera densamente homogénea, incluyendo la zona adyacente a la cisterna (C) subyacente (Figs. 13A, B). De modo que en la EGM se pueden distinguir una delgada ZPV y otra amplia ZPEV.

Lóbulo electrosensorial de la línea lateral

El ELL es una estructura laminar de tipo cerebeloso (Bell, 2002) que protruye a nivel de la superficie dorsal del bulbo raquídeo hacia cada uno de los lados, ventral al lóbulo caudal del Cb, del que está separado por una cisterna (C). Las aferentes primarias que inervan a los electrorreceptores cutáneos proyectan somatotópicamente hacia las capas más profundas del ELL donde contactan neuronas secundarias. Las células principales del ELL proyectan al núcleo magnocelular mesencefálico (MgN) o al TS, el cual vuelve a proyectar hacia el ELL de forma directa o a través del Cb (Bell y Maler, 2005).

Las células proliferantes se distribuyeron de manera dispersa en el ELL, aunque se encontraron usualmente alineadas con los límites entre sus capas y agrupadas en el borde de sus segmentos (líneas punteadas en Figs. 6I-K; flecha blanca en Fig. 14). A nivel del polo caudal, la ZP del ELL presentó un ensanchamiento adyacente al borde lateral del límite entre la capa de células principales (PCL) y la capa molecular (mol; Figs. 6K; 14D, E), conformando una ZPEV a modo de cuña que se extiende por el borde lateral del polo caudal del ELL. También se encontraron células proliferantes alineadas dorsalmente a la capa granular (GCL).

Capítulo 2: Composición celular de las zonas proliferativas

Tipos de células proliferantes encontradas en las zonas proliferativas en el cerebro de *G. omarorum*

La administración secuencial de dos análogos de la timidina permitió evidenciar dos tipos de células proliferantes: aquellas que se encontraban en fase de síntesis (fase S) del ciclo celular al momento de la administración de uno u otro de los análogos (núcleos marcados con CldU o IdU, correspondientes a *células activamente proliferantes*) y las que re-entran al ciclo celular, es decir que ciclaron durante la administración del primer análogo y volvieron a proliferar cuando se administró el segundo (células doble marcadas; flechas amarillas en Figs. 4, 5) (Nowakowski et al., 2002; Vega y Peterson, 2005; Kempermann, 2006; Llorens-Martín y Trejo, 2011).

Al variar la duración del intervalo entre la administración de CldU e IdU (ver Tabla 1), se logró discriminar más tipos celulares que componen las ZPs: las células doble marcadas cuando se utilizó un intervalo corto entre ambos análogos (24 hs, Protocolo 1), tendrían ciclos celulares cortos y corresponderían a *células de ciclado rápido* (flechas amarillas, Figs. 4A, C; 5), mientras que las células doble marcadas cuando se utilizó un intervalo largo (30 d, Protocolo 2) tendrían ciclos celulares largos y corresponderían a posibles *células madre* (“stem cells”; Fig. 4B,D) (Nowakowski et al., 2002; Vega y Peterson, 2005; Kempermann, 2006; Llorens-Martín and Trejo, 2011).

La utilización de un intervalo de larga duración entre análogos (Protocolo 2) también permitió evidenciar escasas células cuyos núcleos se marcaron con el primer análogo solamente, presentaron una marcación intensa (aún luego de sobrevidas prolongadas, indicando que no se han dividido luego de haber sido marcadas con el primer análogo) y que permanecieron dentro de los límites de las ZPs. Por estas características podrían corresponder a *células quiescentes*, es decir, aquellas que ciclaron al momento de la administración del primer análogo y no re-entraron en el ciclo celular, o a *células madre* cuya duración del ciclo difiere de la del intervalo de administración de los análogos (razón por la cual no se marcaron con el segundo administrado).

Finalmente, utilizando un intervalo entre análogos de larga duración (30 d: Protocolos 2 y 3; 90 d: Protocolo 4; o 180 d: Protocolo 5), se evidenciaron células que se marcaron sólo con el primer análogo, presentaron una marcación tenue (indicando que se habrían dividido varias veces) y se encontraron fuera de los límites de las ZPs (es decir que ya han iniciado el proceso de migración hacia su localización definitiva). Por todas estas

características dichas células podrían corresponder a células en proceso de migración ya sea *neuroblastos* o *glioblastos* (Alvarez-Buylla et al., 2001; Vega y Peterson, 2005; Adolf et al., 2006; Kuhn y Peterson, 2008; Alunni et al., 2010; Llorens-Martín y Trejo, 2011).

Telencéfalo

La mayoría de los núcleos de las ZPV del telencéfalo ventral, en los dos niveles rostro-caudales estudiados, presentaron forma alargada en cortes frontales. Los núcleos se dispusieron en cadenas, alineadas de forma oblicua o perpendicular respecto a la superficie ventricular (Figs. 7A, B, F). Esta disposición aparenta aquella presentada por células en migración.

En la ZPV del telencéfalo dorsal, los núcleos de las células proliferantes presentaron una forma circular a ovoide en cortes frontales que corresponden a estructuras esféricas o discoidales, como se confirmó a través de las proyecciones en los ejes *XY* y *XZ* (datos no mostrados).

Ambas ZPs telencefálicas presentaron una composición celular heterogénea. El tiempo corto entre la administración de los análogos reveló la presencia de abundantes células de ciclado rápido (flechas amarillas, Figs. 7A, B; 7C) y activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, Figs. 7A, B; 7C). El tiempo largo entre la administración de los análogos permitió revelar la presencia de posibles células madre (flechas amarillas, Figs. 7F; G), células quiescentes (flechas verdes llenas, Fig. 7D) y células en migración (flechas verdes vacías, Fig. 7D). Cabe destacar la aparente baja proporción de posibles células madre y quiescentes en comparación con la alta proporción de células de ciclado rápido y en migración.

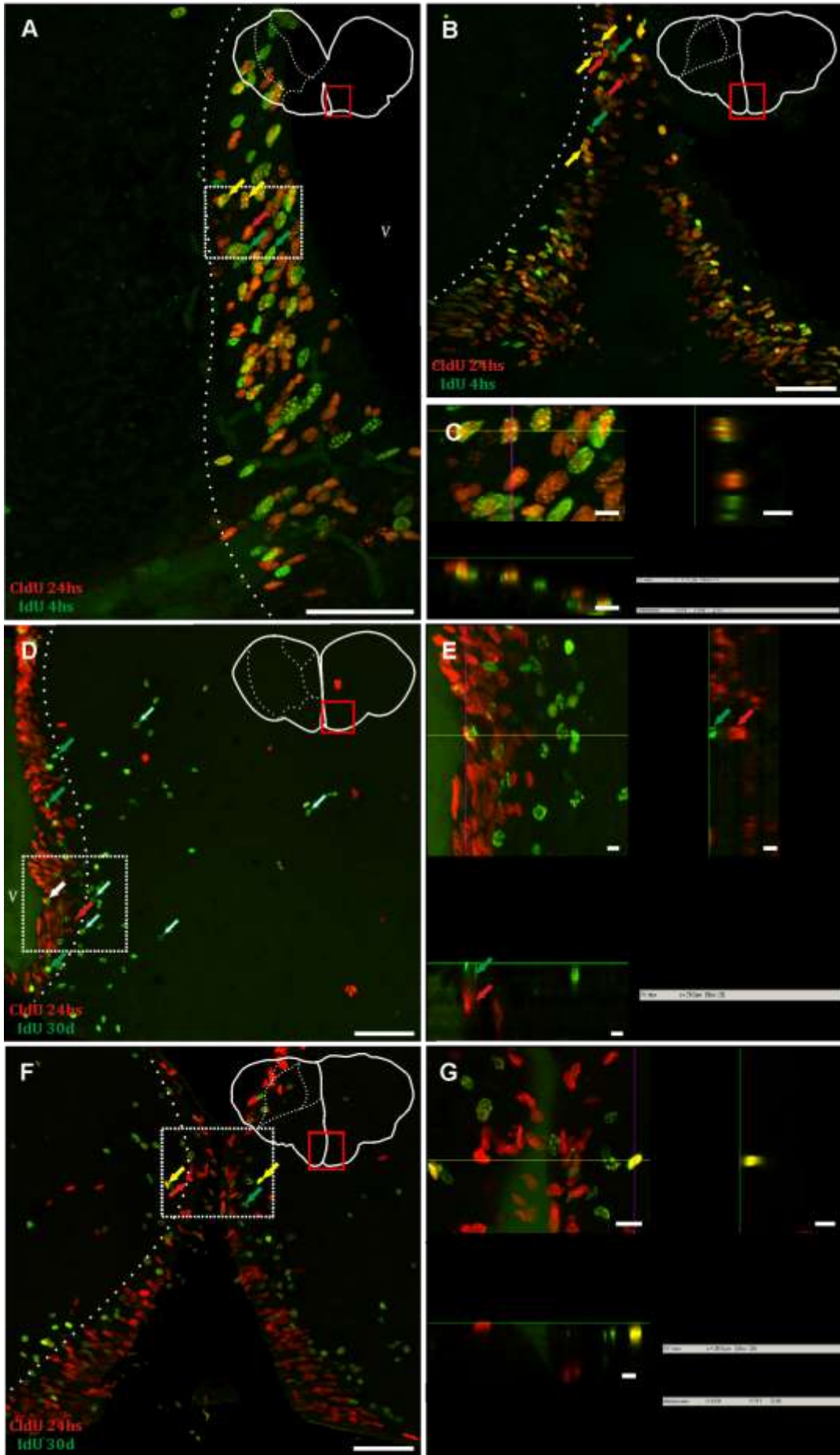


Figura 7. Composición celular de la zona proliferativa ventricular del telencéfalo evidenciada mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (24 hs; A-C) y largo (30 d; D-G). Las microfotografías corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por el cuadrado rojo en los esquemas correspondientes. **(A)** corresponde a la proyección en un plano de 20 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. **(B)**, **(D)**, **(F)** corresponden a la proyección en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. Se evidencia la composición celular de la ZP del telencéfalo ventral a nivel rostral en **(A)** y **(D)**, y a nivel caudal en **(B)** y **(F)**. En ambos niveles, la distribución de las abundantes células activamente proliferantes - flechas rojas y verdes en **(A)** y **(B)**- coinciden, e indican la extensión de la ZP subpallial (líneas punteadas). En ambos casos, muchas de las células doble marcadas -flechas amarillas en **(A)** y **(B)**-, confirmadas por la proyección en los planos ortogonales *XY* y *XZ* **(C)**, se hallaron alineadas. Sin embargo, aún a las 24 hs se encontraron dentro de los límites de las ZPs. Un intervalo largo entre la administración de CldU e IdU reveló muy escasas células madre -flecha amarilla en **(F)**, confirmada por proyección en los planos ortogonales *XY* y *XZ* **(G)**. Nótese la presencia de una aparente célula doble marcada (flecha blanca, **D**), descartada por la proyección en los planos ortogonales *XY* y *XZ* **(E)**. Algunas células con intensa marcación del primer análogo administrado permanecieron dentro de los límites de la ZP (flecha verde llena, **D**) mientras que otras, con retención más tenue y granular, se hallaron fuera de los límites de la misma (flechas verdes vacías, **D**). Las primeras corresponderían a posibles células quiescentes o células madre, y las segundas a posibles células en migración. Escalas: **A, B, D, F**: 50 μm ; **C, E, G**: 5 μm .

Diencefalo

El tipo de marcación nuclear y la organización espacial de las células proliferantes variaron entre las regiones rostral (preóptica), intermedia (epitalámica-talámica) y caudal (talámica-hipotalámica) de las ZPV diencefálicas.

En la región preóptica se encontraron núcleos de forma redondeada a ovoide, dispuestos densamente empaquetados a lo largo de toda la superficie ventricular, como se muestra en la PPa (Figs. 8A, B). Las células proliferantes se encontraron a distintas distancias desde la superficie del receso preóptico del ventrículo diencefálico (V). Esta organización le otorga a la ZP una apariencia pseudoestratificada. El tiempo corto entre los análogos de la timidina reveló la abundancia relativa de células de ciclo rápido (flechas amarillas), homogéneamente distribuidas entre las células activamente proliferantes (flechas verdes y rojas Fig. 8A). El tiempo largo entre la administración de los análogos evidenció escasas posibles células madre (flecha amarilla; Fig. 8B).

En la región intermedia del diencefalo (Fig. 8C, D), los núcleos de las células proliferantes presentaron en general una morfología circular o elongada en secciones frontales. Se evidenciaron escasas células proliferantes que se distribuyeron de manera dispersa formando una monocapa de células cuboidales, excepto en la región del receso lateral que separa H de Ha. Allí, se evidenció un claro engrosamiento de la pared ventricular, ocupado

por un pequeño grupo de células proliferantes con núcleos elongados. La composición celular de esta ZP aparentó ser distinta al resto de las ZPV dado que se encontraron escasas posibles células madre y de ciclado rápido (Figs. 8C, D).

En la extensa ZP del hipotálamo, las células proliferantes, densamente empaquetadas, ocuparon la mayor parte de la pared del ventrículo hipotalámico, incluyendo todos sus recesos. Presentaron núcleos pleiomórficos, siendo en algunos casos redondeados, y en otros ovoides o elongados como se ejemplifica en la zona adyacente a Hd, Hv y al núcleo tuberis anterior (TA) (Figs. 8E, G). Esta ZP también presentó abundantes células de ciclado rápido ubicadas entre las activamente proliferantes (flechas amarillas, rojas y verdes, respectivamente; Fig. 8E) y no se encontraron posibles células madre (Fig. 8G).

Por otra parte, se observó una clara segregación de las células activamente proliferantes (flechas rojas) por un lado, y las posibles células quiescentes (flechas verdes llenas) y células en migración (flechas verdes vacías) por otro, dispuestas en los labios, dorsal y ventral del ventrículo hipotalámico, respectivamente (Fig. 8G).

Una clara ZP a nivel del tálamo dorsal fue evidenciada en la pared ventricular adyacente a los núcleos central posterior y pre-marcapaso (complejo CP/PPn), y al TPP (Figs. 8E, G). Las células proliferantes presentaron en su mayoría núcleos elongados, cuyo eje principal se dispuso perpendicular a la superficie ventricular. En esta ZP fue habitual encontrar varios grupos de dos a cuatro células proliferantes alineadas entre sí a lo largo de trayectos perpendiculares a la superficie ventricular, dando el aspecto de corresponder a sucesivas generaciones de células derivadas. Abundantes células de ciclado rápido (flechas amarillas, Figs. 8E, F) y escasas posibles células madre (flechas amarillas, Fig. 8G, H) se encontraron entremezcladas con las activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, Fig. 8E-H). En comparación con otras ZP, ésta presenta una población de posibles células quiescentes relativamente abundante (flechas verdes llenas, Fig. 8G, H). También se observaron células migrantes a distintas distancias desde el límite de la ZP (flechas verdes vacías, Fig. 8G, H).

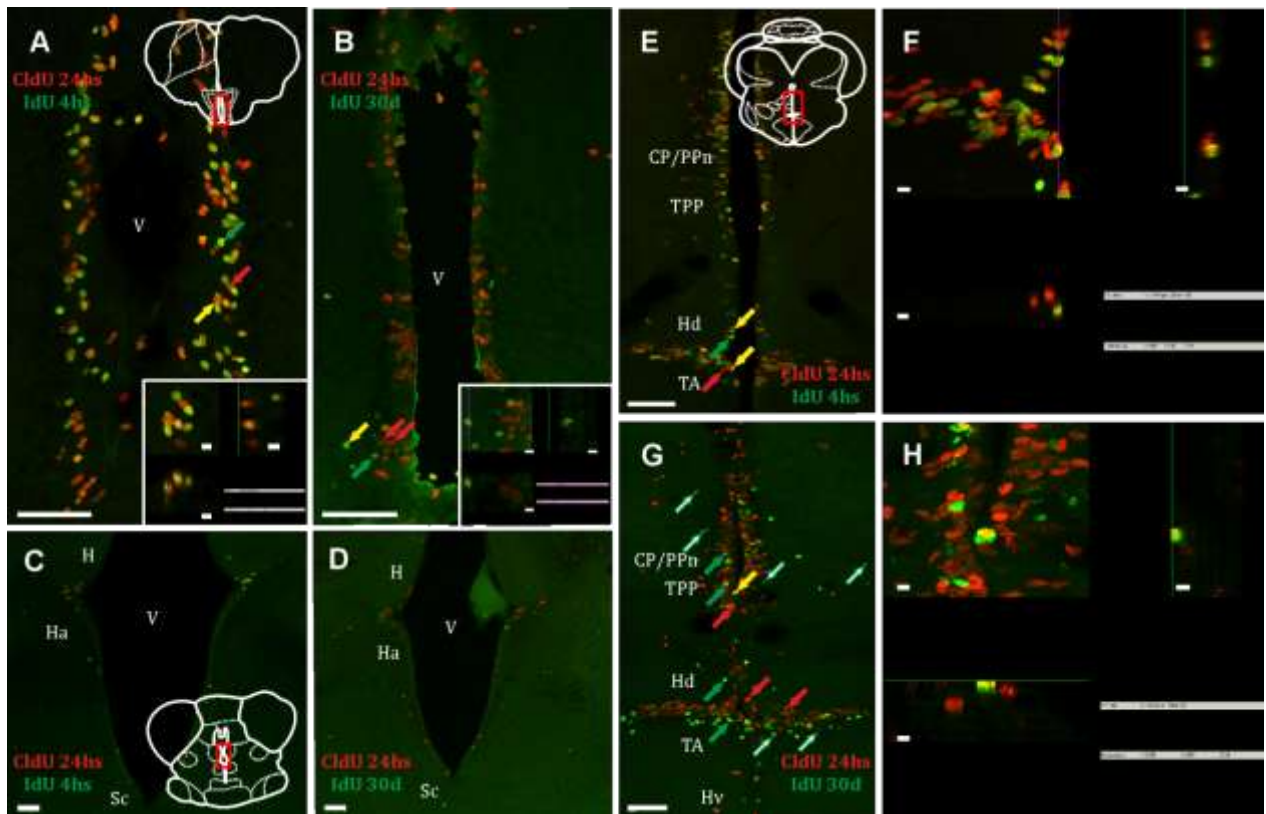


Figura 8. Composición celular de las zonas proliferativas ventriculares del diencefalo evidenciadas mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (24 hs; A,C,E) y largo (30 d; B,D,G). Las microfotografías corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por el cuadrado rojo en los esquemas correspondientes. **(A)-(E), (G)** corresponden a la proyección en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. Se evidencia la composición celular de la ZP de la regiones preóptica, adyacente a la subdivisión anterior del núcleo preóptico periventricular (PPa) **(A), (B)**, la región diencefálica intermedia adyacente a la habénula (H) e hipotálamo anterior (Ha) **(C), (D)**, la región del tálamo dorso-medial, el complejo núcleo diencefálico central-posterior/ núcleo premarcapaso (CP/PPn) y las divisiones dorsal (Hd) y ventral (Hv) del hipotálamo **(E)-(H)**. Tanto en la ZP de la PPa y el CP/PPn como la adyacente al Hd y TA, se observaron abundantes células de ciclado rápido (flechas amarillas, **A, E**) confirmadas por la proyección en los planos ortogonales XY y XZ **(F)**, intercaladas entre las activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, **A, E, F**). En la región intermedia se evidenciaron escasas células proliferantes agrupadas a nivel del receso lateral **(C, D)**. En todas las regiones del diencefalo analizadas las células madre fueron escasas **(B, G)**, confirmadas por la proyección en los planos ortogonales XY y XZ **(H)**, o ausentes **(D)**. Sin embargo, se encontró una población de posibles células quiescentes relativamente abundante en la ZP adyacente a la CP/PPn y Hd-TA (flechas verdes rellenas, **G**). Otras células con retención de larga duración del marcador más tenue y granular se hallaron fuera de los límites de la ZP (flechas verdes vacías **(G)**), las que corresponderían a células en migración. Escalas: **A-E, G**: 50 μm ; **F, H**: 5 μm .

Tectum Opticum y Torus Semicircularis

A nivel del límite entre la cT y el polo rostral del TeO las células proliferantes se encontraron distribuidas de manera homogénea y densa (Figs. 9A, B). Como se muestra en la Figura 9A, el tiempo corto entre la administración de los análogos permitió encontrar abundantes células activamente proliferantes (flechas verdes y rojas) y de ciclado rápido (flechas amarillas) cuya doble marcación se confirmó a través de las proyecciones en los ejes XY y XZ (inserto). Ambos tipos celulares presentaron núcleos redondeados a ovoides. El tiempo largo entre la administración de los análogos no evidenció una clara separación entre las células activamente proliferantes (flechas rojas) y las migrantes (flechas verdes vacías), aunque éstas parecieron localizarse predominantemente en torno a las células activamente proliferantes (Fig. 9B). Escasas posibles células madre fueron encontradas dentro de los límites de la ZP (flecha amarilla; Fig. 9B) cuya doble marcación se confirmó a través de las proyecciones en los ejes XY y XZ (inserto, Fig. 9B).

A nivel de los polos dorso-medial y ventro-lateral del TeO, el tiempo corto entre la administración de los análogos reveló la abundancia relativa de células de ciclado rápido (flechas amarillas, Figs. 9C, E-H), entremezcladas con células activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, Figs. 9C, E-H). Por el contrario, con el tiempo largo entre la administración de los análogos no se encontraron posibles células madre, y se observó una migración de corta distancia de las células migrantes (Fig.9D).

A nivel del polo caudal del TeO, se encontraron abundantes células de ciclado rápido junto al límite con el TS (Fig. 10A, C, D). Por su parte, las células activamente proliferantes y las células en migración no se superpusieron completamente (Fig. 10F, H). Las primeras se dispusieron en las capas tectales más profundas mientras que las segundas aparentaron haber migrado hacia las capas tectales más superficiales (Fig. 10F-H).

La composición celular de la ZP del TS fue similar a la del TeO dado que consistió en una gran proporción de células de ciclado rápido, sobre todo a nivel del polo caudal de esta región mesencefálica (flechas amarillas, Figs. 10A, C, G), entremezcladas con las células activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, Fig. 10A). Sólo se encontraron escasas posibles células madre (flecha amarilla, Figs. 10C, D, F) cuya doble marcación se confirmó a través de las proyecciones en los ejes *XY* y *XZ*. Escasas células migrantes mostraron una migración de corto rango desde capas profundas a superficiales del polo caudal del TS (flechas verdes vacías, Fig. 10C, D).

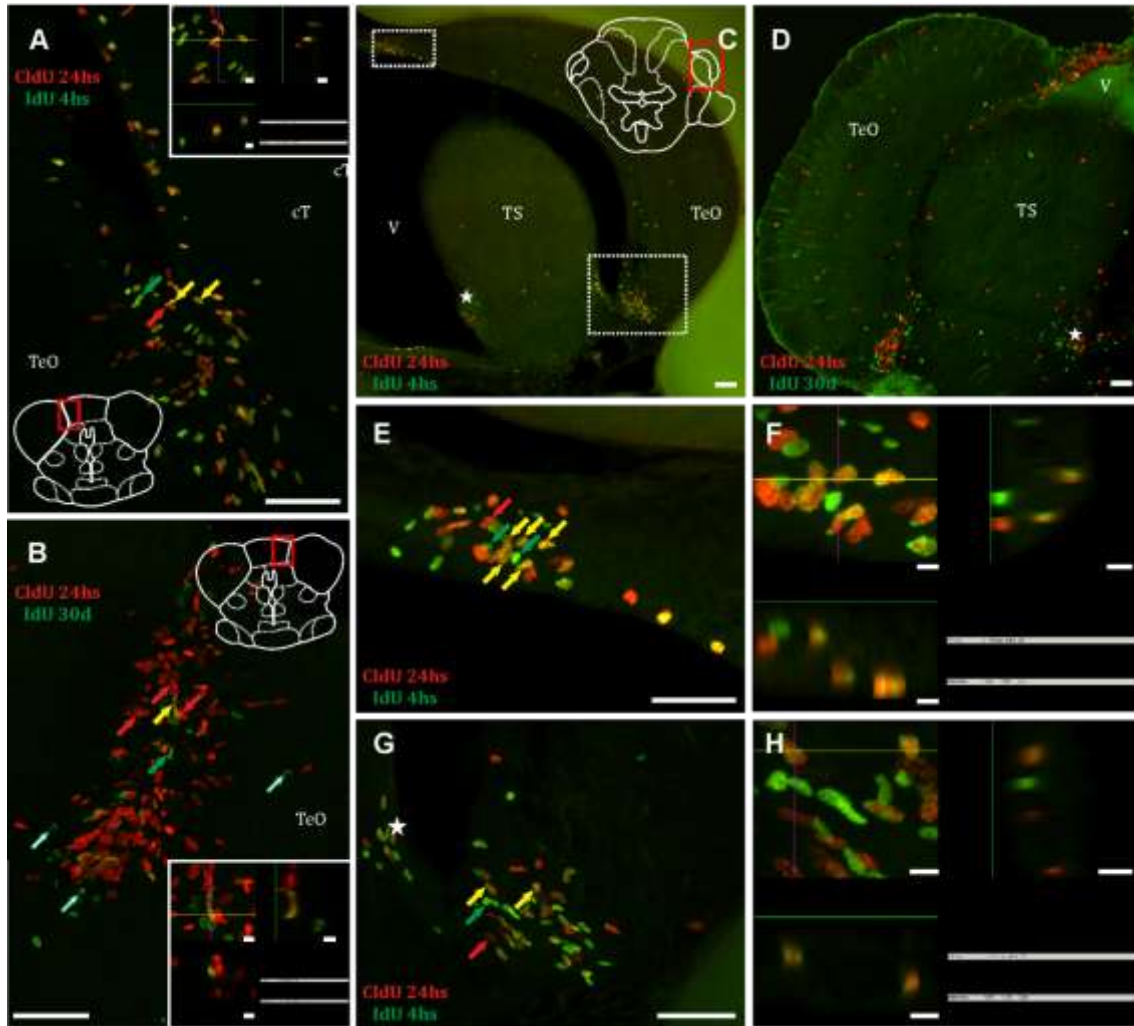


Figura 9. Composición celular de las zonas proliferativas del tectum opticum (TeO) y torus semicircularis (TS) evidenciadas mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (24 hs; A,C,E-H) y largo (30 d; B,D). Las microfotografías corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por el cuadrado rojo en los esquemas correspondientes. **(A)-(D)** corresponden a la proyección en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. **(E), (G)** corresponden a la proyección en un plano de 25 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. En **(A)** y **(B)** se evidencia la composición celular de la ZP del límite entre la comisura tectal (cT) y el polo rostral del TeO. La composición celular de las regiones dorso-medial y ventrolateral de la ZP del TeO se evidencia en **(C-E)** y **(C,D,G)**, respectivamente. En todas las ZPs tectales se observaron abundantes células de ciclado rápido (flechas amarillas, **A,E,G**) confirmadas por la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (inserto en **A; F,H**), intercaladas entre las activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, **A,E,G**). En la ZP del límite entre la cT y el TeO las células madre fueron escasas (flecha amarilla, **B**), confirmadas por la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (inserto, **B**) mientras que no se encontraron en las regiones de los polos dorso-medial y ventrolateral del TeO. Los asteriscos en **(C,D,G)** indican la ZP del TS. La cavidad que se observa entre el TeO y TS subyacente **(C,E,G)** corresponde a un artefacto donde se encuentra el ventrículo mesencefálico que se oblitera debido al desarrollo del TS. Escalas: **A-E, G**: 50 μm ; insertos, **F, H**: 5 μm .

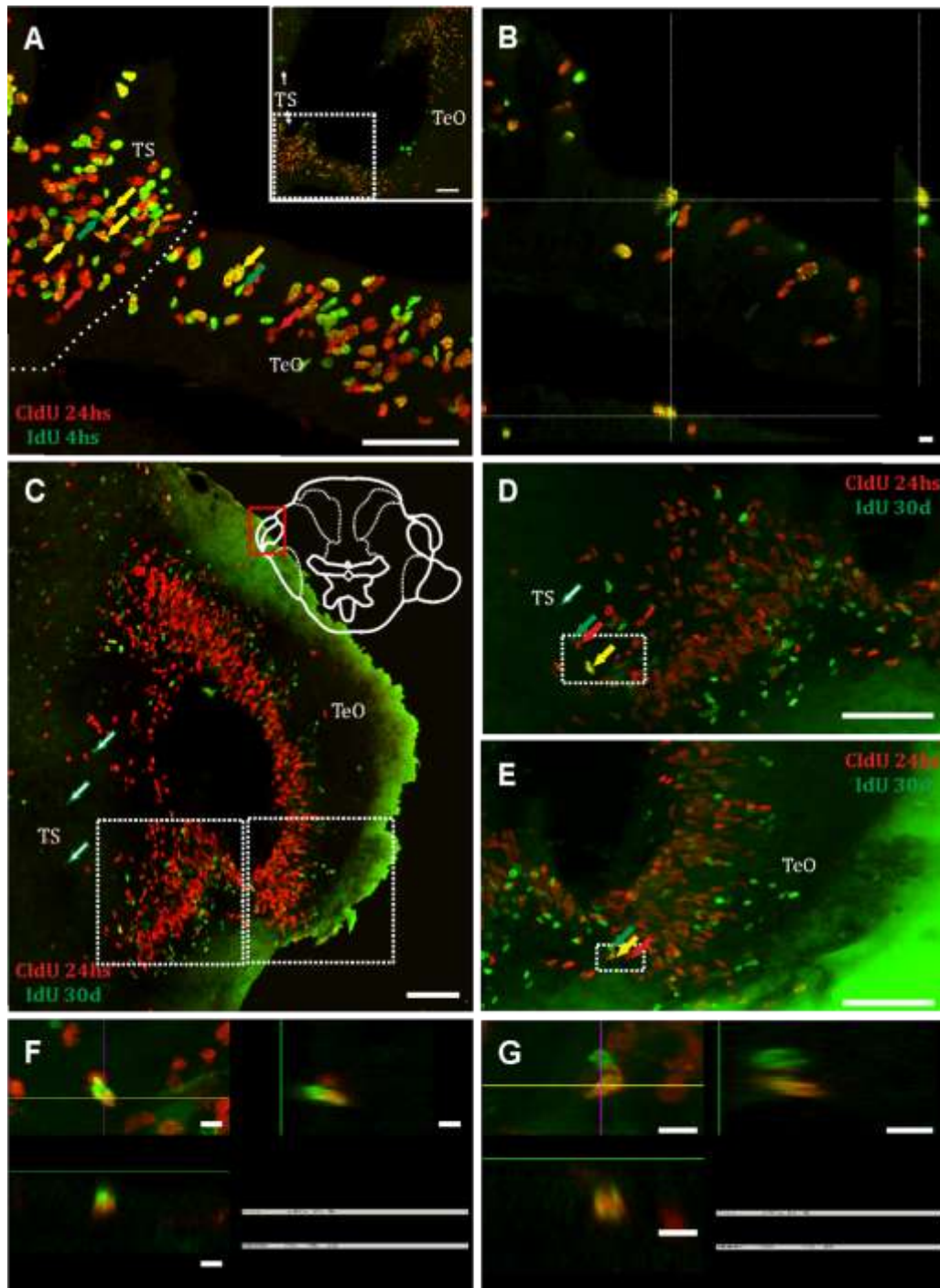


Figura 10. Composición celular de las zonas proliferativas de los polos caudales del tectum opticum (TeO) y torus semicircularis (TS) evidenciadas mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (24 hs; A,B) y largo (30 d; C-G). Las microfotografías corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por el cuadrado rojo en el esquema (C). (A,C-E) corresponden a proyecciones en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. En (A,C,D) se evidencia la composición celular de la ZP del polo caudal del TS y en (A,C,E) la zona ventro-lateral del polo caudal del TeO. La composición celular en ambas regiones fue similar. Se encontraron abundantes células de ciclado rápido (flechas amarillas, A) confirmadas para la zona ventro-lateral del polo caudal del TeO mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (B). Entre ellas se encontraron células activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, A). Se evidenciaron células en migración a distintas distancias desde la ZP del TS y del TeO (flechas verdes vacías, C-E). Escasas células madre fueron encontradas en ambas ZPs (flechas amarillas, D,E), confirmadas por la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (F) y (G), respectivamente. Escalas: A, C-E: 50 μm ; B, F, G: 5 μm .

Cerebelo

El tiempo corto entre la administración de los análogos reveló la presencia de células de ciclados rápidos y activamente proliferantes muy abundantes en la ZP del CCb, tanto en la CCb-mol dorsal como ventral (Figs. 11A, C), confirmadas por la proyección en los planos ortogonales *XY* y *XZ* (Figs. 11B, D). El tiempo largo entre la administración de los análogos evidenció la presencia de escasas posibles células quiescentes (flechas verdes llenas, Figs. 11E, G) y posibles células madre (flecha amarilla, Fig. 11G). Este protocolo también evidenció abundantes células que han migrado una distancia considerable, desde la ZP hacia la CCb-gra (flechas verdes vacías, Figs. 11E, G).

En la VCb, se encontraron células de ciclados rápidos abundantes y densamente empaquetadas en toda la extensión de VCb-mol, dispuestas de manera más densa en las cercanías al CCb (Fig. 12A) y a la línea media (Figs. 12A-C). Prácticamente no se observaron células proliferantes en VCb-gra, con la excepción de algunas células de ciclados rápidos, activamente proliferantes (Figs. 12B, D, E) y posibles células madre (Figs. 12 H, I), alineadas a nivel del borde ventral de esta capa. Por el contrario, se evidenciaron abundantes células en migración dispuestas en toda la extensión de la VCb-gra de manera dispersa y homogénea (Figs. 12F-I).

En ambas ZP de la EGM, el tiempo corto de administración entre análogos permitió encontrar un predominio de células de ciclados rápidos, dispuestas densamente homogéneas entre abundantes células activamente proliferantes (Figs. 13A, B). Escasas células de ciclados rápidos fueron encontradas a nivel de la EGp-gra (Fig. 13C). Con el tiempo largo entre la administración de los análogos no se hallaron posibles células quiescentes ni células madre. Por el contrario, se evidenciaron abundantes células en migración, algunas que se mantuvieron dentro de los límites de la ZPEV de la Egm-gra, y otras hacia la EGp-gra (Figs. 13D-F). Algunas células de ciclados rápidos se hallaron también en la EGp-gra, pero no fue posible encontrar células activamente proliferantes (Fig. 13C). En la capa molecular entre la EGM-gra y la EGp-gra (Fig. 13A), sólo se evidenciaron escasas células proliferantes independientemente del protocolo utilizado.

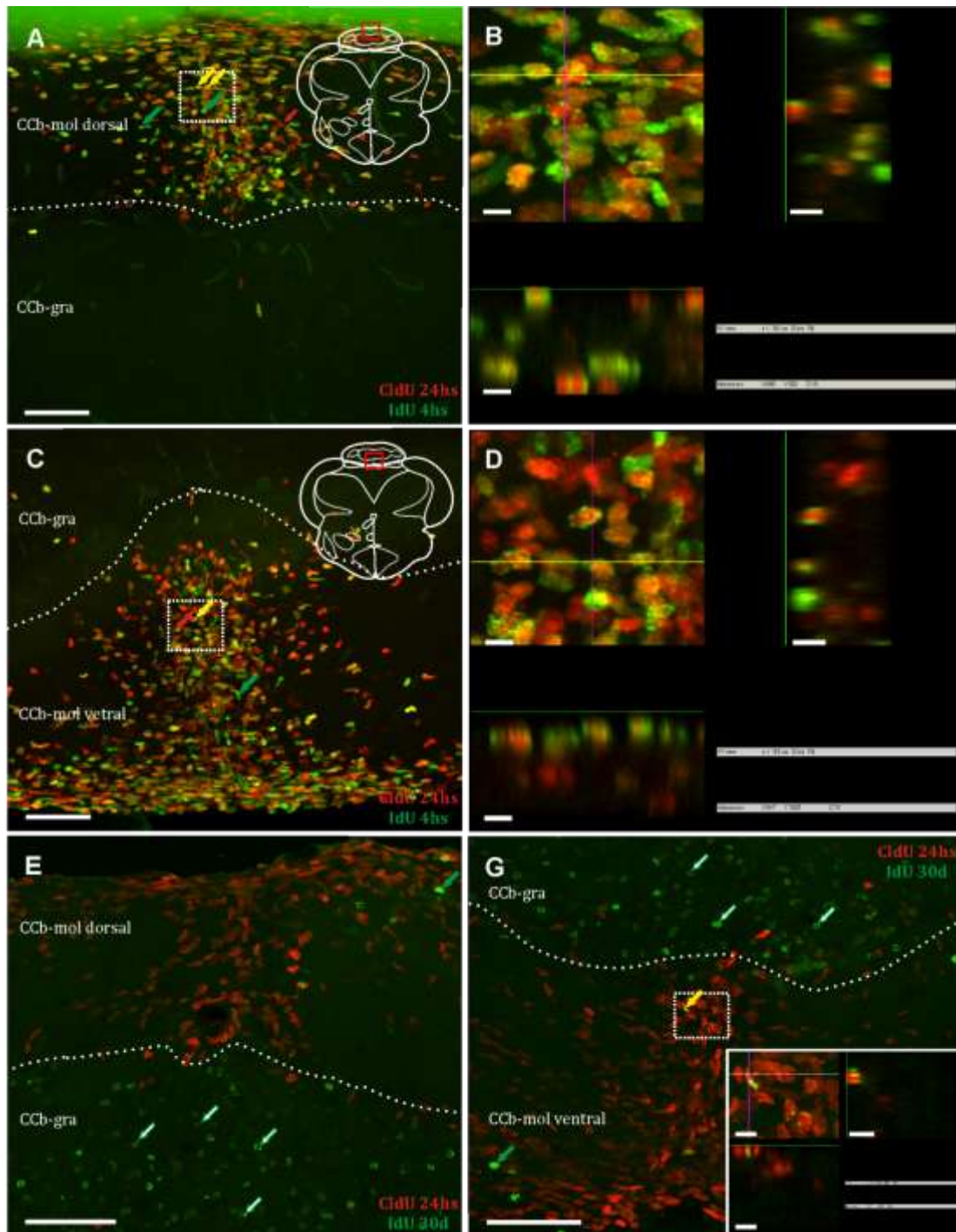


Figura 11. Composición celular de la zona proliferativa extra-ventricular, el corpus cerebelli (CCb), evidenciada mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (A-D; 24 hs) y largo (E-G; 30 d). Las microfotografías en (A y E), y en (C y G) corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por los cuadrados rojos en (A) y (C), respectivamente. (A y C) y (E y G) corresponden a la proyección en un plano de 20 y 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial, respectivamente. La ZP del CCb se encontró a nivel de la región medial de la capa molecular tanto a nivel dorsal (CCb-mol dorsal) como ventral (CCb-mol ventral). Se encontraron abundantes células de ciclado rápido confirmadas mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (B,D) así como células activamente proliferantes (flechas rojas y verdes llenas). Las posibles células madre (flecha amarilla, G) fueron escasas; se confirmaron mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (inserto en G). Nótese la abundante cantidad de posibles células en migración (flechas verdes vacías) en la capa granular (CCb-gra). Escalas: A, C, E, G: 50 μm ; B, D, inserto: 5 μm .

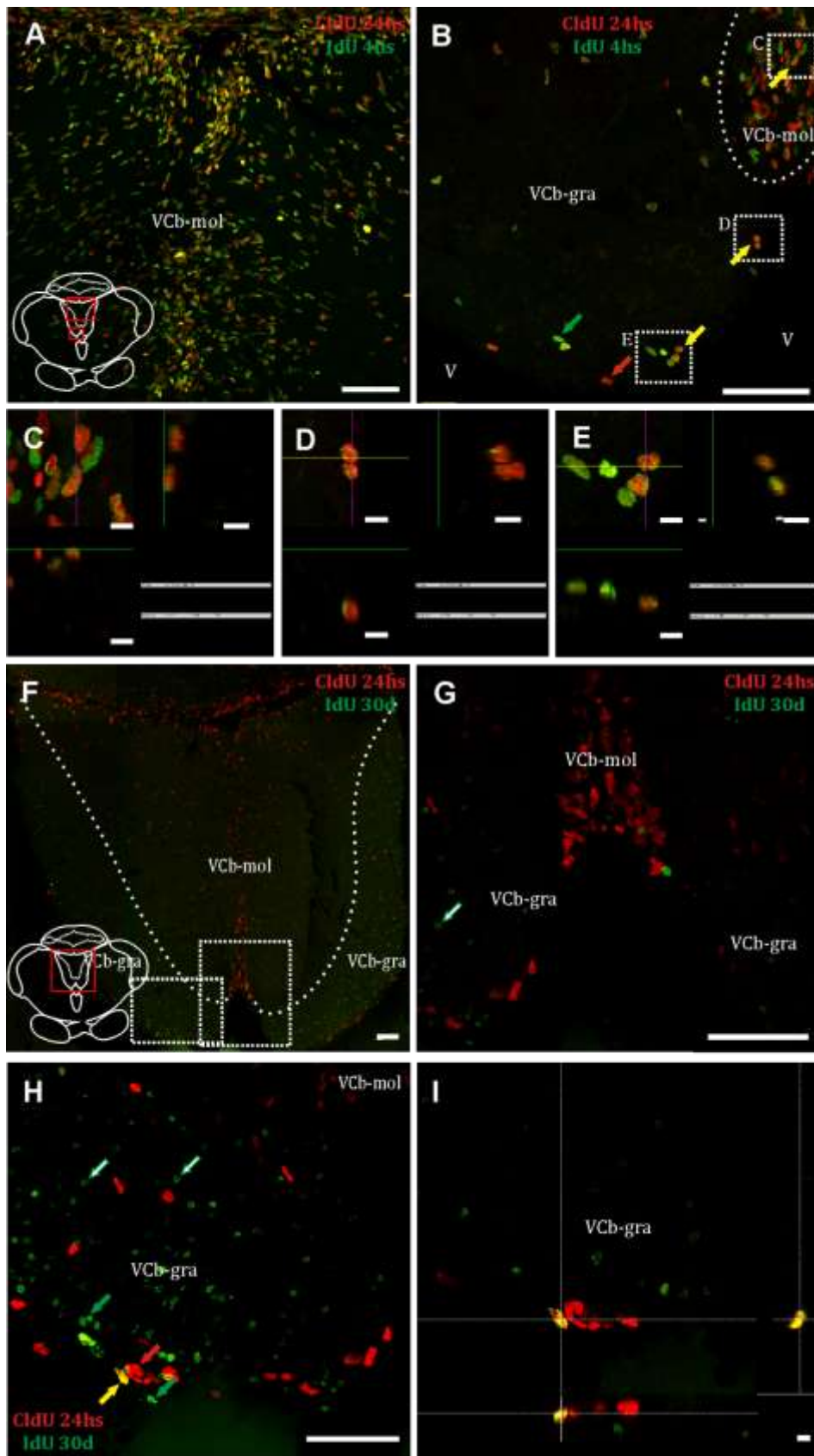


Figura 12. Composición celular de la zona proliferativa extra-ventricular, la valvula cerebelli (VCb), evidenciada mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (A-E; 24 hs) y largo (F-I; 30 d). Las microfotografías en (A), (B) y (F) corresponden a imágenes confocales de secciones frontales a nivel de las zonas delimitadas por los cuadrados rojos en (A) y (F). (A), (B, G, H) y (F) corresponden a las proyecciones en un plano de 20, 25 y 30 planos confocales adquiridos cada 1 μ m, de modo secuencial, respectivamente. Se encontraron abundantes células de ciclado rápido en la capa molecular (VCb-mol; A, flecha amarilla en B) confirmadas mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (C). Las posibles células madre fueron escasas (flecha amarilla, H) y se confirmaron mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (I). Nótese la abundancia de posibles células en migración (flechas verdes vacías) en la capa granular (CCb-gra; F-I). Escalas: A, B, F-H: 50 μ m; C-E, I: 5 μ m.

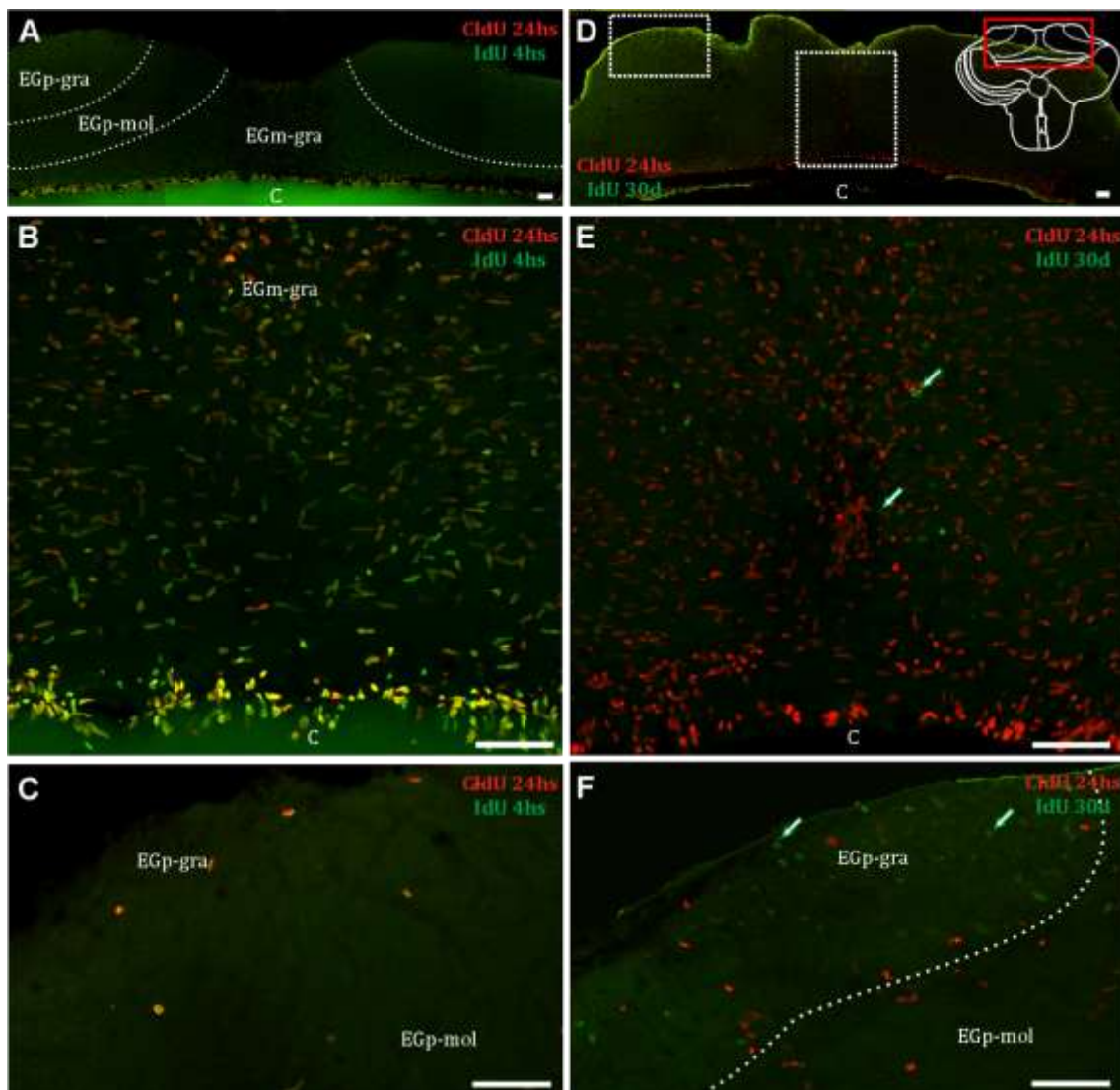


Figura 13. Composición celular de las zonas proliferativas del lóbulo vestibulo-caudal del Cb, evidenciadas mediante doble marcación con análogos de la timidina (CldU e IdU), separados por un intervalo corto (A-C; 24 hs) y largo (D-F; 30 d). Las microfotografías en (A) y (D) corresponden a imágenes de un plano confocal de secciones frontales a nivel de la zona delimitada por el cuadrado rojo en (D). (B,C,E,F) corresponden a la proyección en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial, de las regiones indicadas por los rectángulos en D. Las células de ciclado rápido y activamente proliferantes fueron abundantes en la capa granular de la eminencia granular media (EGm-gra; A, B) pero escasas en la capa granular de la eminencia granular posterior (EGp-gra; C). Las posibles células en migración se encontraron a nivel de la capa granular de la EGp-gra (flechas verdes vacías, F) aunque algunas permanecieron en la EGM-gra (flechas verdes vacías, E). Escalas: 50 μm .

Lóbulo electrosensorial de la línea lateral

Se evidenció la presencia de células de ciclado rápido así como de células activamente proliferantes en las ZPEV ubicadas entre las capas mol y PCL y dorsalmente a la GCL (flechas amarillas; rojas y verdes, respectivamente, Fig. 14). Las posibles células migrantes parecen encontrarse predominantemente dentro de la ZPs del ELL, y más raramente haber migrado a otras capas de esta región del rombencéfalo (flechas verdes vacías, Figs. 14D, E).

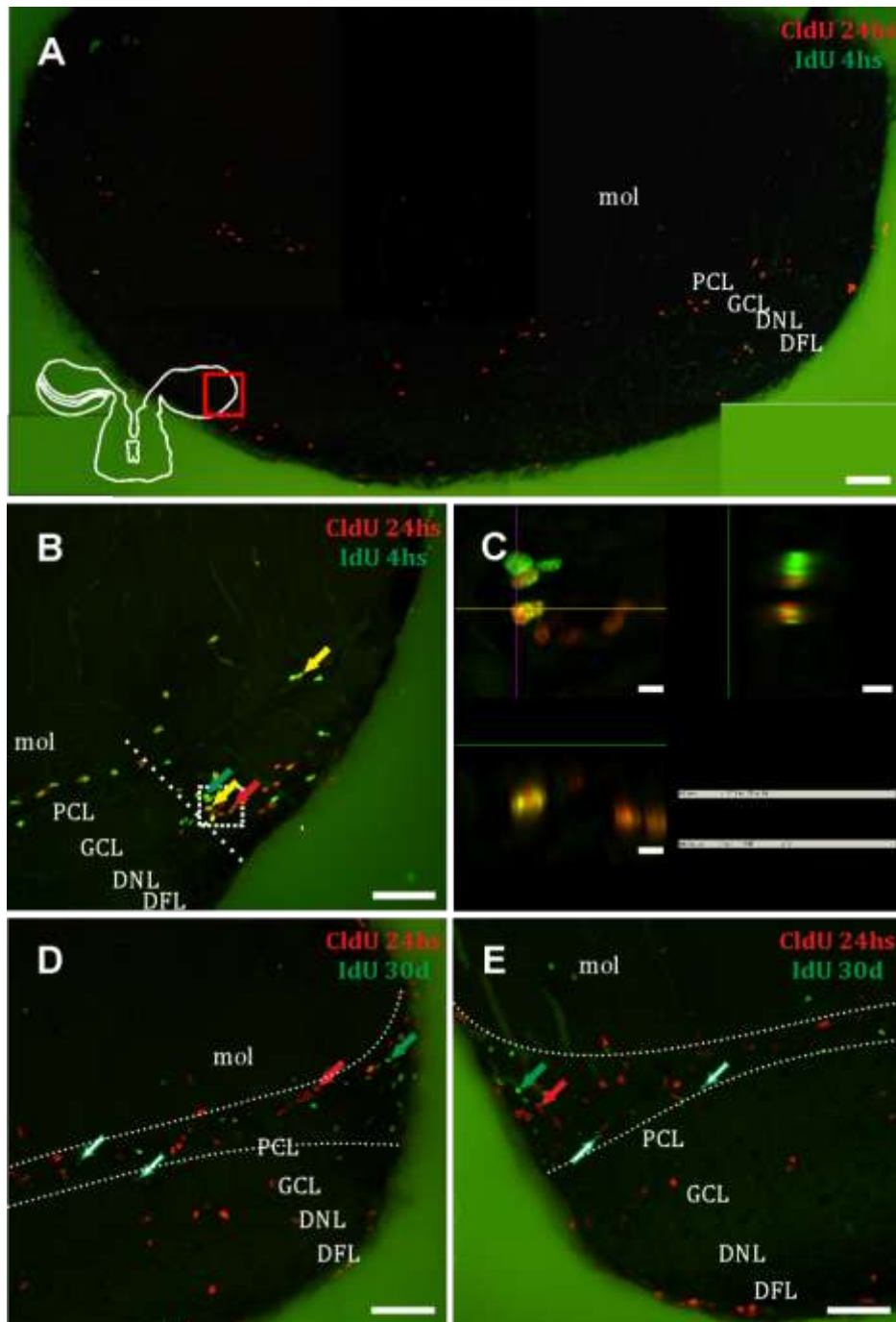


Figura 14. Composición celular de la zona proliferativa extra-ventricular del lóbulo electrosensorial de la línea lateral (ELL), evidenciada mediante intervalo corto (24 hrs; A-C) y largo (30 d; D,E). La microfotografía en (A) corresponde a una vista panorámica del ELL derecho. (B,D,E) corresponden a microfotografías de la región del ELL indicada por el cuadro rojo en el esquema en (A). (A,B,D,E) corresponden a la proyección en un plano de 30 planos confocales adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. Células de ciclado rápido (flechas amarillas, B) confirmadas mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (C) fueron encontradas entre las activamente proliferantes (flechas rojas y verdes, B). Éstas se dispusieron entre las capas molecular (mol) y de células principales (PCL). Células activamente proliferantes también fueron halladas entre las capas granular (GCL) y la PCL. Nótese la presencia de posibles células migrantes dentro de la zona proliferativa (flechas verdes vacías, D,E). DNL: Capa neuropílica profunda; DFL: Capa de fibras profunda. Escalas: A,B,D,E: 50 μm ; C: 5 μm .

Capítulo 3: Cuantificación de los tipos celulares en el corpus cerebelli mediante estereología confocal

El análisis cuantitativo de la distribución de las células proliferantes en el CCb se basó en valores de densidad por unidad de volumen, calculados a partir de valores del volumen del CCb y sus capas, y de la cantidad de cada tipo celular, estimados por estereología confocal en muestras de animales de los Protocolos 1 y 3. Para ello, se realizó un muestreo no sesgado de toda la extensión rostro-caudal de las capas CCb-mol dorsal y ventral, y de la CCb-gra. Los datos que se detallan a continuación corresponden a las medias y desvíos estándar.

Se contaron un total de 16255 ± 25079 células en el CCb de especímenes del Protocolo 1 y un total de 3349 ± 2059 células en el CCb de especímenes del Protocolo 3. El volumen de cada capa del corpus cerebelli y la cantidad de tipos celulares estimados se resumen en la Tabla 2 para los especímenes tratados según el Protocolo 1 y en la Tabla 3 para los tratados según el Protocolo 3.

El volumen total del CCb estimado en especímenes del Protocolo 1, fue de $0.37 \pm 0.14 \text{ mm}^3$, del cual $0.09 \pm 0.04 \text{ mm}^3$ correspondieron a la CCb-mol dorsal, $0.12 \pm 0.04 \text{ mm}^3$ a la CCb-mol ventral y $0.16 \pm 0.06 \text{ mm}^3$ a la CCb-gra (Tabla 2). El volumen total del CCb estimado en animales del Protocolo 3 fue de $0.83 \pm 0.25 \text{ mm}^3$, del cual $0.19 \pm 0.08 \text{ mm}^3$ correspondieron a la CCb-mol dorsal, $0.25 \pm 0.08 \text{ mm}^3$ a la CCb-mol ventral y $0.39 \pm 0.21 \text{ mm}^3$ a la CCb-gra (Tabla 3).

El total de células estimadas en especímenes del Protocolo 1 (CdU 24hs -intervalo IdU 4 hs) correspondió a 39828 ± 11443 , de las cuales 17470 ± 4604 fueron CldU positivas, 3244 ± 2399 fueron IdU positivas y 19113 ± 6095 doble marcadas. Del total de células marcadas con este protocolo, 16524 ± 5367 se ubicaron en la CCb-mol dorsal, 22571 ± 6017 en la CCb-mol ventral, y 732 ± 173 en la CCb-gra.

Con el Protocolo 3 (intervalo 30d), el total de células estimadas correspondió a 26354 ± 15869 , de las cuales las CldU fueron 15944 ± 13076 , las IdU fueron 5695 ± 3119 y las doble marcadas fueron 4715 ± 5374 . Del total de células marcadas con este protocolo, 3608 ± 1537 se ubicaron en la CCb-mol dorsal, 5016 ± 955 en la CCb-mol ventral, y 17729 ± 15115 en la CCb-gra.

Por lo tanto, aproximadamente el 99% de las células proliferantes estimadas en especímenes del Protocolo 1 se hallaron en la CCb-mol, y sólo el 1% en la CCb-gra. Por otra parte, en especímenes tratados según el Protocolo 3, aproximadamente el 50% de las células proliferantes se hallaron en la CCb-gra, mientras que el resto permanecieron en la CCb-mol, distribuidas por igual entre sus zonas dorsal y ventral.

Las densidades por unidad de volumen calculadas a partir de los datos de volumen y cantidad de células estimados para cada uno de los tipos de células, en cada capa del CCB de especímenes tratados según los Protocolos 1 y 3 se muestran en la Fig. 15.

No se encontraron diferencias significativas en los valores estimados de las células proliferantes marcadas con el Protocolo 1 entre ambas capas moleculares (Figs. 15A y B), como indican los parámetros para las células marcadas con IdU (U=5; p=0,471), CldU (U=4; p=0,312) y doble marcadas (U=5; p=0.471).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores estimados de las células proliferantes marcadas con el Protocolo 3 entre ambas capas moleculares (Figs. 15A y B), como lo indica los parámetros para las células marcadas con IdU (U=7; p=0,296), CldU (U=11; p=0,834) y doble marcadas (U=12; p=1).

La cantidad de células marcadas con CldU/ mm³ en la capa molecular luego de una sobrevida de 30 d (Protocolo 3) fue significativamente menor que hallada a las 24 hs de administrado el mismo análogo (Protocolo 1) (Fig. 15A, B). Por otra parte, se encontró un aumento significativo de las células CldU positivas en la capa granular (U=0; p=0,019) (Fig. 15C).

Tabla 2. Volumen de las tres capas del corpus cerebelli y cantidad de tipos celulares estimados por estereología confocal en especímenes tratados según el Protocolo 1 (CldU 24hs-IdU 4hs). Los datos se expresan en medias y desvíos estándar.

	CCb-mol dorsal	CCb-mol ventral	CCb-gra
Volumen (mm³)	0.09±0.04	0.12±0.04	0.16±0.06
Células CldU+	7472,75±2491,66	9704,5±2167,8	292,75±111,1
Células IdU+	1099±3427,1	2101±1715,8	44,3±42,9
Células CldU+/IdU+	7952,5±2725,9	10766±3385,4	395,3±64,4

Tabla 3. Volumen de las tres capas del corpus cerebelli y cantidad de tipos celulares estimados por estereología confocal en especímenes tratados según el Protocolo 3 (CldU 30d-IdU 4hs). Los datos se expresan en medias y desvíos estándar.

	CCb-mol dorsal	CCb-mol ventral	CCb-gra
Volumen (mm³)	0.19±0.08	0.25±0.08	0.39±0.21
Células CldU+	605,6±568,3	470,6±628,6	12483±9139,9
Células IdU+	2074±1933,9	3380±1416,5	239,8±169,7
Células CldU+/IdU+	928±1249,2	1165,4±1399	2621,6±3154,2

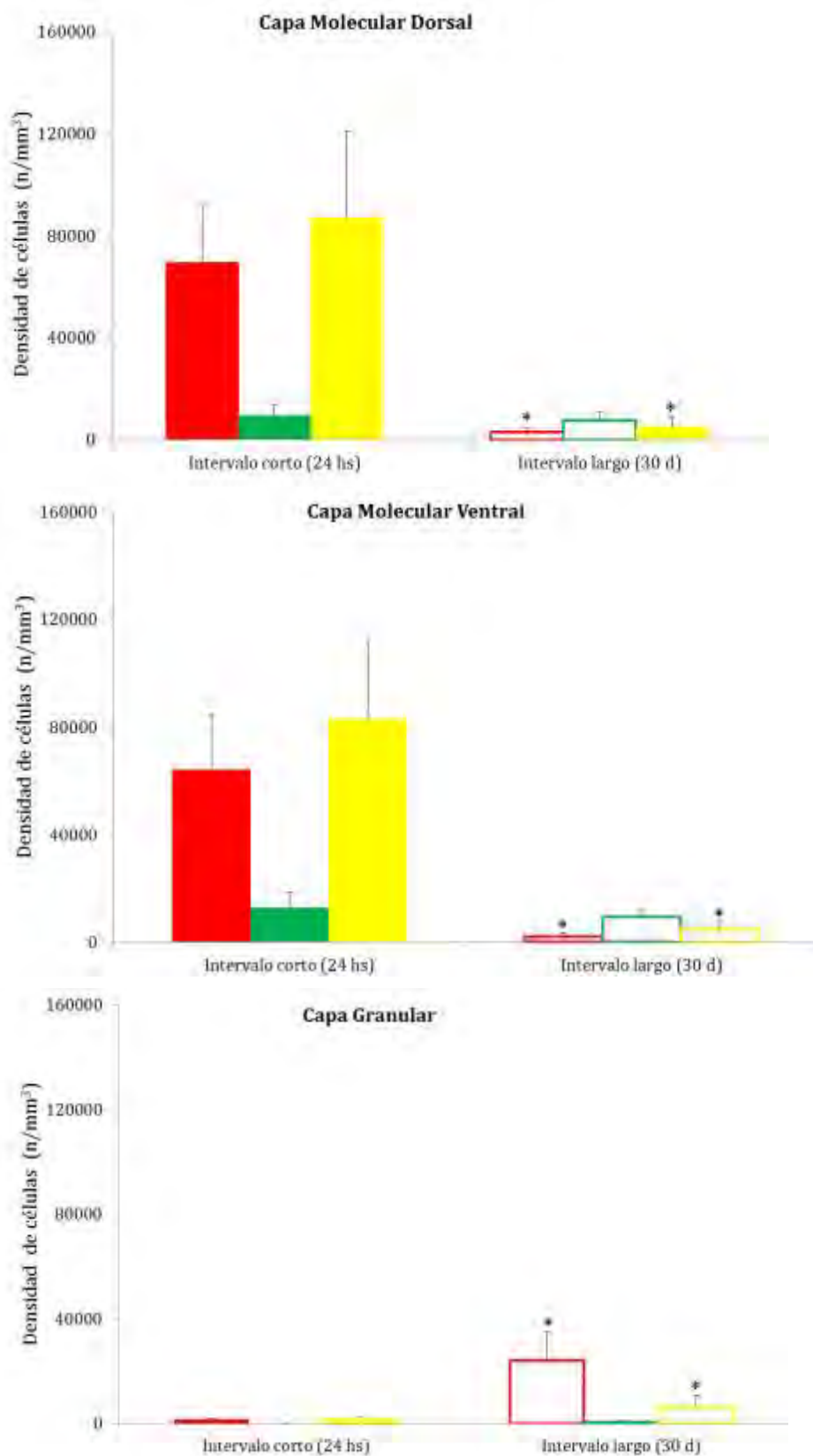


Figura 15. Densidad de células proliferantes en las tres capas del CCb a nivel medial. Se cuantificaron las células proliferantes evidenciadas mediante intervalo corto (columnas llenas, 24 hs) y largo (columnas vacías, 30 d) entre administración de CldU e IdU. Se realizó la cuantificación de células marcadas con CldU (rojo), IdU (verde) y doble marcadas (amarillo) mediante estereología confocal. Los datos se expresan en medias (columnas) y desvíos estándar (barras). Las diferencias entre la cantidad de tipos celulares se analizaron con el test U de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

Capítulo 4: Destino de las células proliferantes

Migración de células derivadas hacia su destino final

La comparación de la distribución de las células activamente proliferantes y de las que retienen marcación de análogos de larga duración (30, 90 y 180 d) permitió diferenciar las ZPs de las zonas de migración donde ocurrirá la diferenciación de las células derivadas, es decir, su destino final en la vida adulta de *G. omarorum*.

Las que retienen marcación de análogos de larga duración, que se encontraron fuera de los límites de las ZPs y que mostraron una intensidad de marcación relativamente tenue, fueron interpretadas, de acuerdo con la bibliografía, como posibles células migrantes.

Treinta días luego de la administración de un análogo, el desplazamiento de las células migrantes fue notorio principalmente a nivel del cerebelo (en sus tres divisiones: CCb, VCb y lóbulo caudal; Figs 11, 12 y 13) y del telencéfalo ventral (subpallium, Fig. 7), y en menor grado a nivel del hipotálamo (dorsal y ventral, Figs. 8E, G).

En general, las células en migración presentaron una marcación granular del análogo. Además, mostraron mayoritariamente una forma nuclear redondeada en cortes frontales, como por ejemplo a nivel de la capa granular del CCb (Figs. 11E, G) y VCb (Figs. 12F-I), lo que indica que se perdió la figura característica de células en migración para adoptar una forma nuclear típica de células que comenzarán su diferenciación.

En la región adyacente a la superficie de la región ventral del ventrículo telencefálico, enfrentando al subpallium, se encontraron posibles células migrantes a distintas distancias desde los límites de la ZP, sugiriendo que en el plazo de 30 d ocurrió migración de modo radial (Figs. 7D, E).

A nivel del hipotálamo, las posibles células en migración parecen haberse desplazado en sentido dorsal-ventral (Fig. 8G).

En el mismo tiempo luego de la administración del análogo, las posibles células en migración se encontraron mayoritariamente distribuidas de manera homogénea en toda la extensión de la CCb-gra (Figs. 11E, G). De manera similar, en la VCb estas células se encontraron mayoritariamente distribuidas de manera homogénea en toda la extensión de la VCb-gra (Figs. 12F-I). Finalmente, en el lóbulo caudal del Cb, se encontraron predominantemente en la EGp-gra, y en menor grado permanecieron en los confines de la

ZPEV de la EGm-gra; sólo escasas células migrantes se hallaron en la EGp-mol (Figs. 13E-F).

La utilización de tiempos de sobrevida luego de la administración de los análogos de mayor duración permitió evidenciar el proceso de migración en otras zonas del cerebro de *G. omarorum*, tales como el pallium (datos no mostrados), el TeO y el TS indicando que la velocidad de migración varía entre regiones.

Diferenciación hacia la estirpe neuronal evidenciada por demostración de expresión de HuC/HuD en célula con retención de larga duración CldU

Con el objetivo de estudiar la diferenciación de las células proliferantes en el cerebro adulto de *G. omarorum* se realizó doble inmunohistoquímica para evidenciar simultáneamente la retención de larga duración de la marcación nuclear con CldU y expresión del marcador de estirpe neuronal HuC/HuD. La utilización de distintos tiempos de sobrevida (30, 90 y 180d) luego de la administración del análogo, permitió evidenciar la progresiva diferenciación hacia la estirpe neuronal de las células derivadas de las distintas ZPs del cerebro adulto de *G. omarorum*.

Subdivisión anterior del núcleo preóptico periventricular

En el diencefalo, particularmente a nivel de la PPa, se encontraron células derivadas que mostraron retención de larga duración del CldU y que expresaron el marcador de estirpe neuronal HuC/HuD, como se demuestra por la co-localización mediante doble inmunohistoquímica en la Fig. 16. Dichas células se encontraron a distintas distancias de la ZP adyacente la pared ventricular del receso preóptico del ventrículo diencefálico, indicando una migración de corta distancia (menor a las 100 μm).

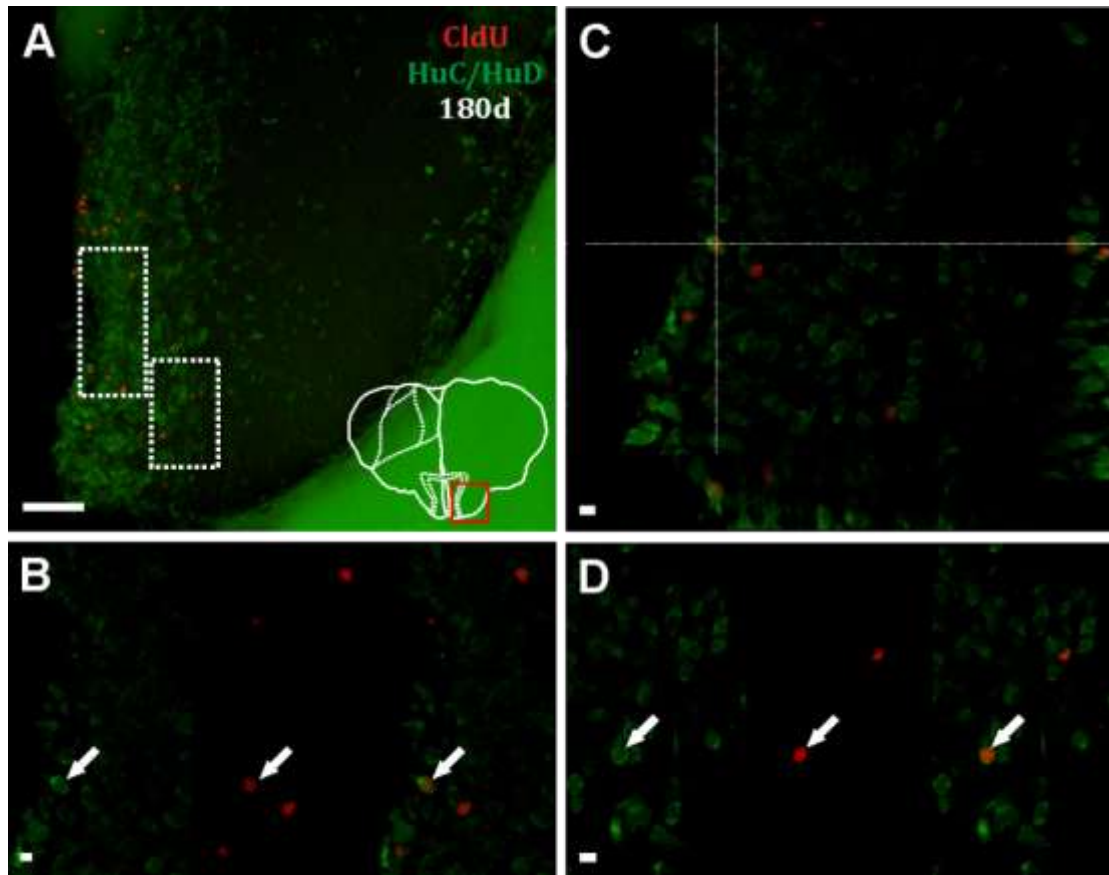


Figura 16. Expresión de HuC/HuD en células con retención de larga duración (180 d) de CldU en la subdivisión anterior del núcleo preóptico periventricular (PPa). La imagen en **(A)** corresponde a la proyección de 20 planos confocales adquiridos cada 0,5 μm de modo secuencial a nivel de la región indicada por el rectángulo rojo en el esquema. En **(B)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y la correspondiente superposición. En **(C)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU en la misma célula mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes XY y XZ. En **(D)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU en otra célula, mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición, Escalas: **A:** 50 μm ; **C-D:** 5 μm .

Tectum opticum y torus semicircularis

Utilizando un tiempo de sobrevida de 90d luego de la administración de CldU, se encontraron células derivadas que retuvieron la marcación con CldU y expresaron HuC/HuD a nivel de la polo caudal del TeO (Fig. 17A-E). Como se observa en la Fig. 17A, y se indica con las flechas blancas en la Fig. 17B, éstas se encontraron en las capas más profundas del TeO de toda la extensión dorso-ventral del stratum periventriculare (SPV), y con menor densidad en el límite entre el stratum album centrale (SAC) y el stratum griseum centrale (SGC). Las células doble marcadas presentaron una forma circular en cortes frontales, que correspondió a figuras esféricas, como se muestra en las proyecciones ortogonales en Figs. 16D, E.

Por su parte, utilizando el mismo tiempo de sobrevida, las células derivadas que retuvieron la marcación con CldU y expresaron HuC/HuD en el TS, se encontraron dispuestas en la parte central de su región ventral (Figs. 17A, F, G).

Utilizando un tiempo de sobrevida de 180d luego de la administración de CldU, fue evidente en cortes rostrales del polo caudal del TeO una migración de las células derivadas que retuvieron la marcación con CldU. Como se evidencia en la Fig. 18A las células derivadas marcadas con CldU se desplazaron aproximadamente 100 μm desde la región dorsal de la ZP del TeO (Fig. 18A) y parecieron estar agrupadas en el espesor de la SPV, la SAC, e incluso algunas alcanzaron la SGC (Figs. 18A-C). Algunas de las células derivadas que retuvieron CldU, también expresaron HuC/HuD como se evidencia en las Figs. 18B, C. A nivel de la región ventro-lateral del TeO la migración de células derivadas no parece tan evidente como en la región dorso-medial. Igualmente se encontraron algunas células derivadas que retuvieron CldU, y también expresaron HuC/HuD (Fig. 18D, E).

Por otra parte, las células derivadas que retuvieron CldU se encontraron en toda la extensión del TS acumulándose en su parte medial de su región ventral (Fig. 18A, D). Algunas de esas células derivadas que retuvieron CldU, también expresaron HuC/HuD (Figs. 18F-H). Cabe destacar la presencia de algunas células doble marcadas con morfología elongada, característica presente en células migrantes.

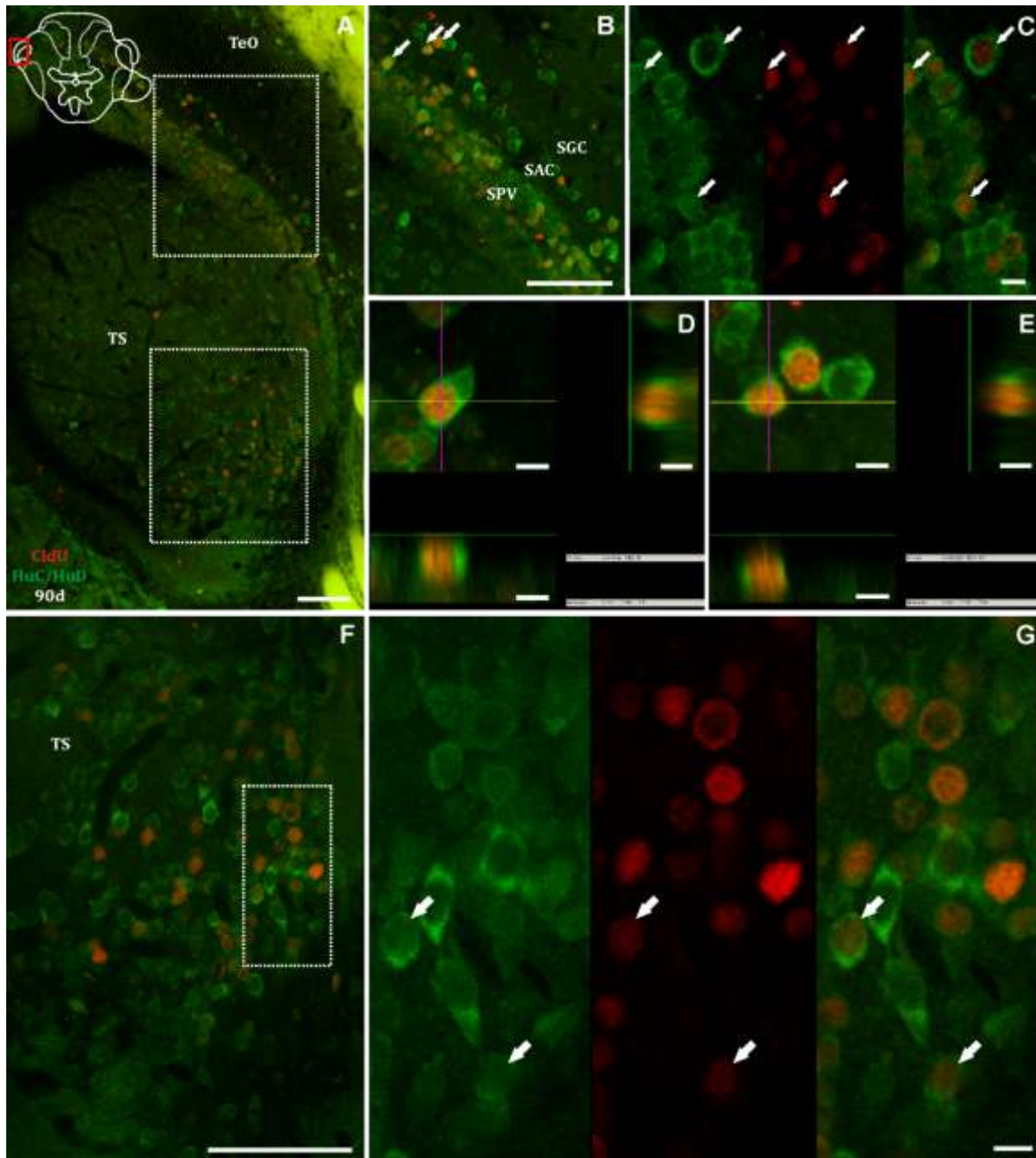


Figura 17. Expresión de HuC/HuD en células con retención de larga duración (90d) de CldU en el polo caudal del TeO y TS. Las imágenes en (A,B,F) corresponden a la proyección en un plano de 20 planos confocales adquiridos cada 0,5 μm de modo secuencial; (A) a nivel de la región indicada por el rectángulo rojo en el esquema y (B) y (F) a nivel de los rectángulos blancos en (A). En (C) se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU en las células indicadas por las flechas blancas en (B) mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. En (D,E) se confirma la co-localización mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes XY y XZ de las células señaladas con flechas blancas en (B). En (G) se muestra la co-localización de las células ubicadas en el rectángulo en (F). SGC: stratum griseum centrale, SAC: stratum álbum centrale, SPV: stratum periventriculare. Escalas: A,B,F: 50 μm ; C-E,G: 5 μm .

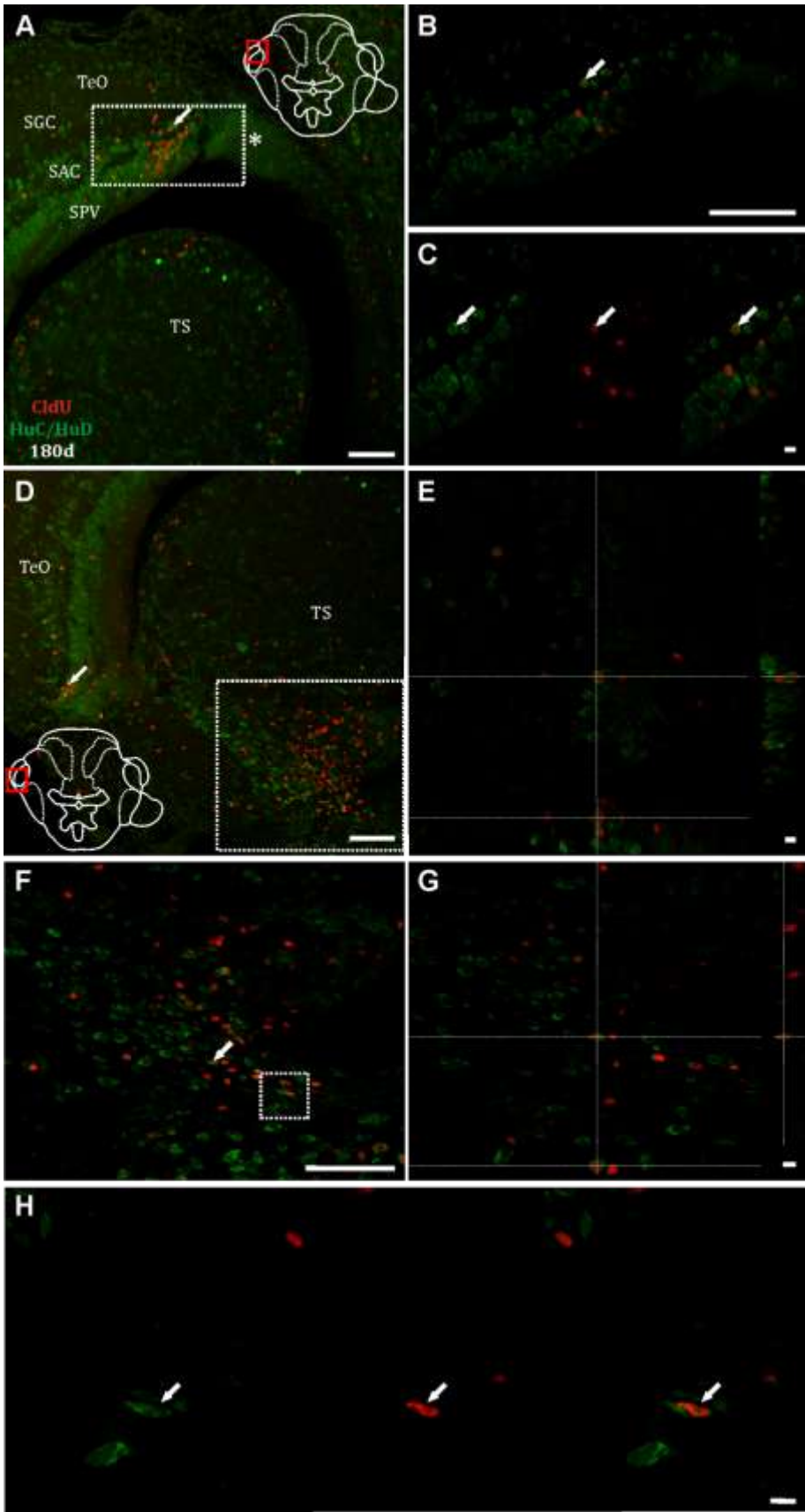


Figura 18. Expresión de HuC/HuD en células con retención de larga duración (180d) de CldU en el polo caudal del TeO y TS. Las imágenes en **(A,D,F)** corresponden a la proyección en un plano de 20 planos confocales adquiridos cada 0,5 μm de modo secuencial, **(A)** y **(D)** a nivel de la región indicada por el rectángulo rojo en los esquemas correspondientes y **(F)** a nivel del rectángulo en **(D)**. La imagen en **(B)** corresponde a un plano confocal adquirido de modo secuencial de la zona delimitada por el rectángulo blanco en **(A)**. En **(C)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición de la célula indicada por la flecha blanca en **(B)**. En **(E)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes *XY* y *XZ* de la célula indicada por la flecha blanca en **(D)**. La co-localización de las células indicadas por la flecha blanca y el rectángulo blanco en **(F)** se confirmó en **(G)** y **(H)** respectivamente. Asterisco: región dorso-medial de la ZP del TeO. SGC: stratum griseum centrale, SAC: stratum album centrale, SPV: stratum periventriculare. Escalas: **A,B,F**: 50 μm ; **C-E,G**: 5 μm .

Corpus cerebelli

Utilizando un tiempo de sobrevida de 30d luego de la administración de CldU, se encontraron células derivadas que retuvieron la marcación del análogo a nivel de la CCB-gra, como se mencionó previamente, implicando una posible migración de al menos 100 μm . La doble inmunohistoquímica reveló escasas células derivadas que retuvieron CldU y expresaron HuC/HuD en dicha capa del CCB (Figs. 19A, B). A diferencia de lo mostrado en el TeO y TS, las células doble marcadas en esta región del Cb, fueron de pequeño tamaño y presentaron un halo citoplasmático HuC/HuD positivo muy delgado, a diferencia de otras células de mayores dimensiones cuyo halo citoplasmático fue más grueso y por tanto intensamente teñido.

Utilizando tiempos de sobrevida de 90 y 180d, se encontró un número mayor de células doble marcadas con características estructurales similares a las halladas a los 30d, aunque con una inmunotinción HuC/HuD relativamente más evidente (Figs. 19C, D).

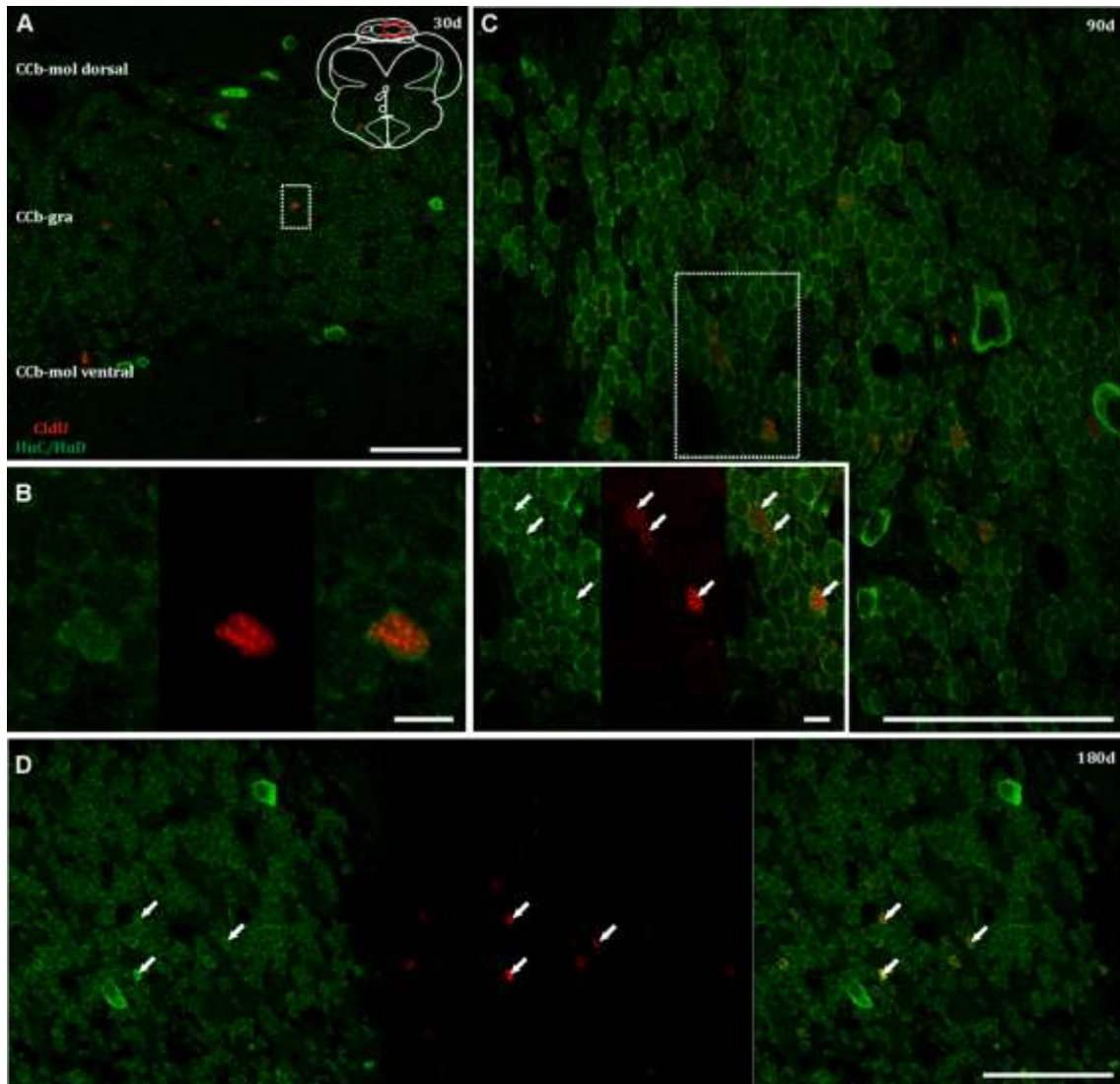


Figura 19. Expresión de HuC/HuD en células con retención de larga duración (30, 90, 180d) de CldU en el corpus cerebelli. Las microfotografías corresponden a un plano confocal adquirido de modo secuencial. La imagen en **(A)** corresponde a la región indicada por el rectángulo rojo en el esquema. En **(B)** se confirma la co-localización de HuC/HuD y CldU de la célula indicada por el rectángulo blanco en **(A)** mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. En el inserto en **(C)** se confirma la co-localización de las células en la región señalada por el rectángulo blanco mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. En **(D)** se muestran microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición evidenciando la co-localización en un espécimen a 180d de administrado el análogo. Escalas: **A,C,D**: 50 μ m; **B**, inserto: 5 μ m.

Lóbulo electrosensorial de la línea lateral

Utilizando tiempos de sobrevida de 90 y 180d, se encontraron muy escasas y dispersas células derivadas que retuvieron la marcación del análogo a nivel del ELL. Varias de las células derivadas que retuvieron la marcación del análogo expresaron HuC/HuD. Éstas se encontraron usualmente en la GCL, cercanas al límite con las capas adyacentes y presentaron un tamaño pequeño y un halo citoplasmático delgado, al igual que las células doble marcadas del CCb.

Diferenciación hacia la estirpe neuronal mediante la doble marcación con CldU y neurobiotina en el corpus cerebelli

La neurobiotina, trazador neuronal aplicado a nivel de la región dorsal y medial del CCb, se transportó a través de las proyecciones de celulares desde la CCb-mol hacia la CCb-gra, donde se ubicó a nivel de los somas de pequeñas neuronas. Esto fue evidente a los 90d de sobrevida de administración de CldU, (Fig. 21A). Más aún, la cantidad de células derivadas marcadas con neurobiotina pareció ser más abundante a los 180d luego de administrado el CldU (Fig. 21B-D).

Estos resultados sugieren que existe una diferenciación hacia la estirpe neuronal en el CCb de *G. omarorum* adulto principalmente de las células granulares.

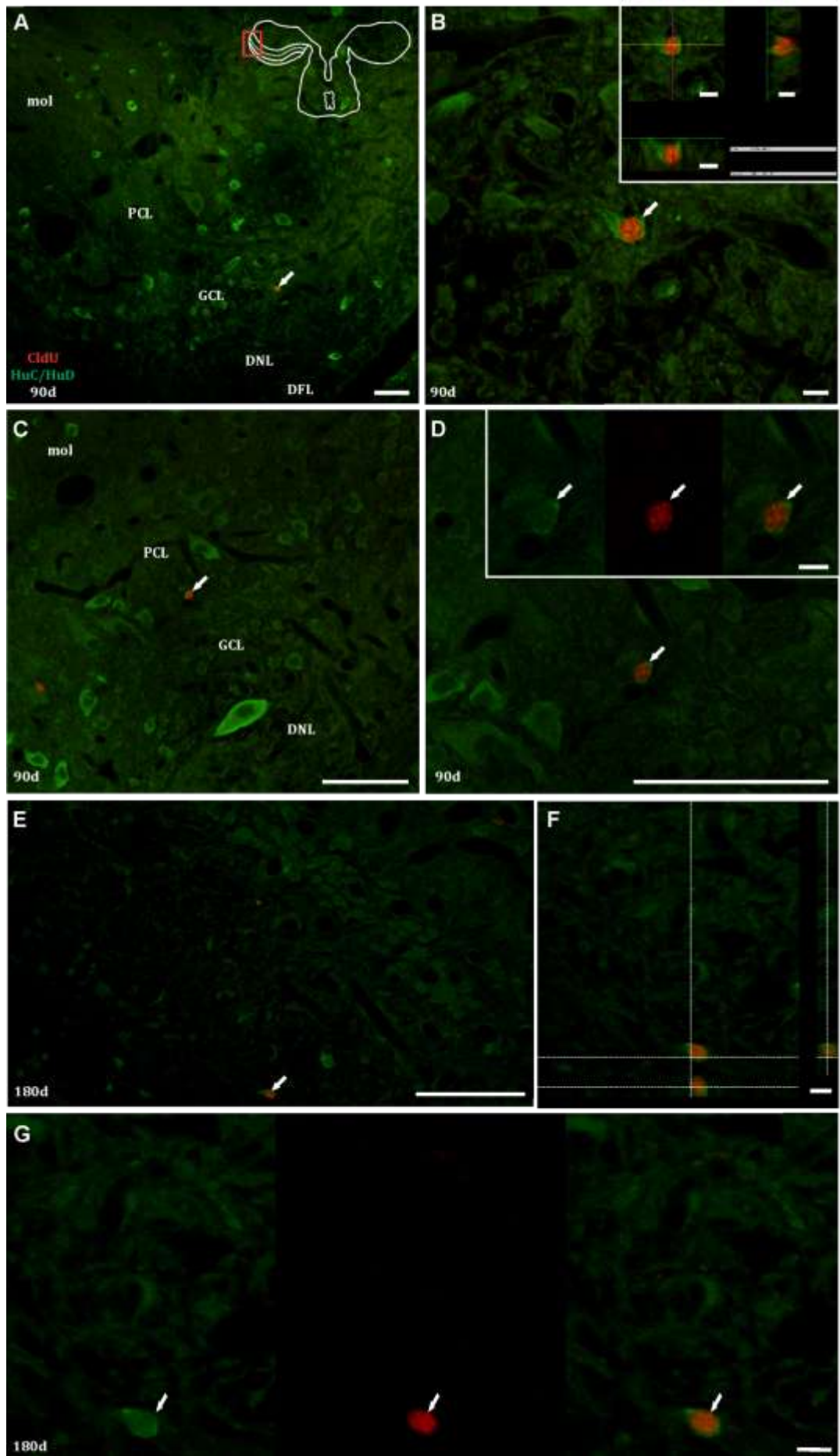


Figura 20. Expresión de HuC/HuD en células con retención de larga duración (90, 180d) de CldU en el lóbulo electrosensorial de la línea lateral. Las microfotografías corresponden a un plano confocal adquirido de modo secuencial. La imagen en **(A)** corresponde a la región indicada por el rectángulo rojo en el esquema. En **(B)** se muestra a mayor magnificación la célula señalada por la flecha blanca en **(A)** y se confirma en el inserto la co-localización de HuC/HuD y CldU mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes *XY* y *XZ*. En **(D)** se señala a mayor magnificación la célula señalada por la flecha blanca en **(C)** y se confirma en el inserto la co-localización mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. En **(F)** y **(G)** se confirma la co-localización de la célula señalada con la flecha blanca en **(E)** mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes *XY* y *XZ* y la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición, respectivamente. Escalas: **A-E**: 50 μm ; **F,G**, insertos: 5 μm .

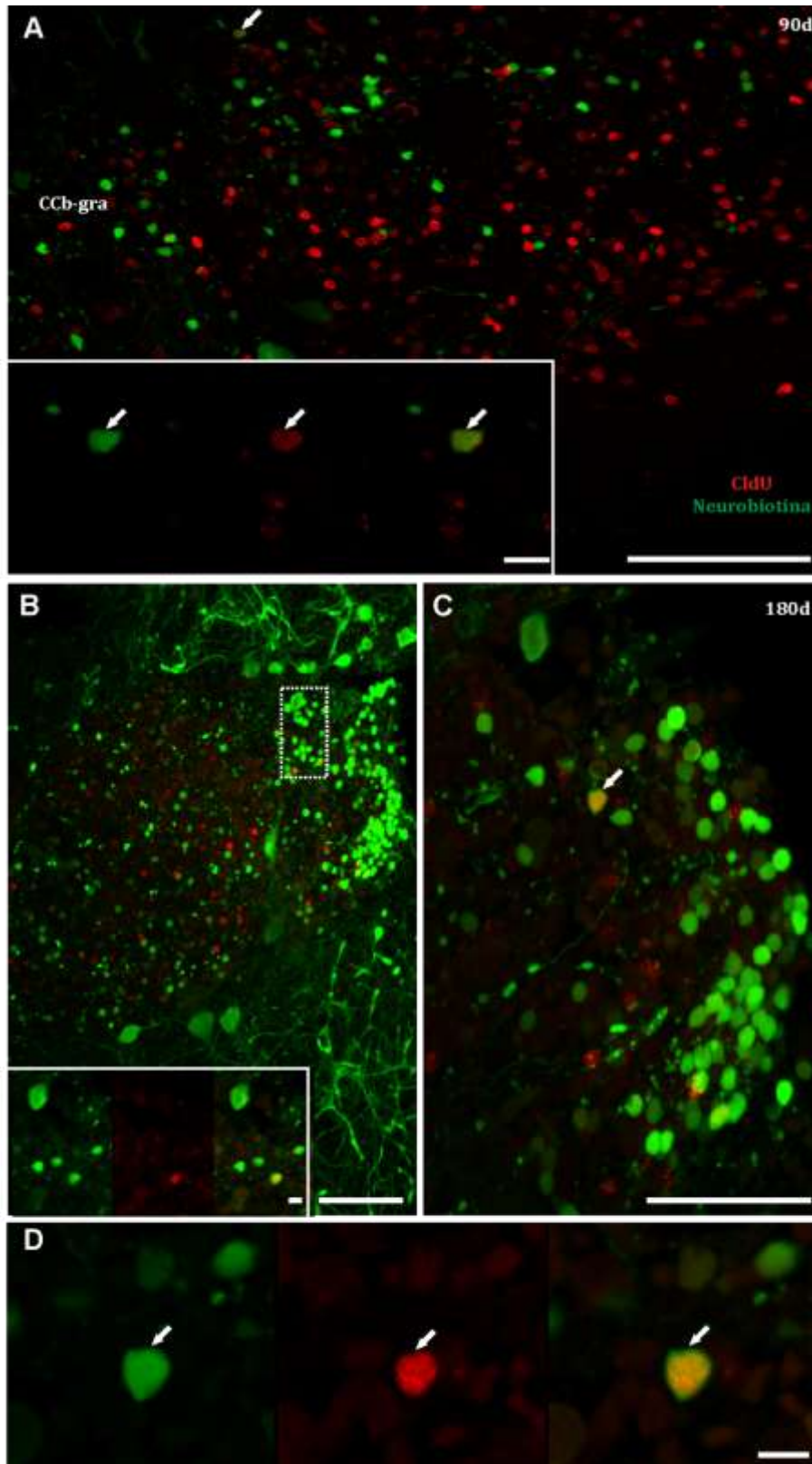


Figura 21. Revelado del transporte de neurobiotina en células con retención de larga duración (90, 180d) de CldU en el corpus cerebelli. (A) es una microfotografía que corresponde a la proyección en un plano de 21 planos confocales adquiridos cada 0,5 μm de modo secuencial a nivel de la capa granular del corpus cerebelli. La co-localización de CldU con neurobiotina de la célula señalada con la flecha blanca se confirmó mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición (inserto). La microfotografía en (B) corresponde a la proyección en un plano de 14 planos adquiridos cada 2 μm , de modo secuencial. El inserto corresponde a la región indicada por el rectángulo blanco donde se confirmó la co-localización mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. (C) es una microfotografía que corresponde a la proyección en un plano de 14 planos adquiridos cada 1 μm , de modo secuencial. En (D) se confirmó la co-localización de la célula señalada con la flecha blanca en (C) mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición. Escalas: A-C: 50 μm ; D, insertos: 5 μm .

Diferenciación neuronal de células catecolaminérgicas en el subpallium

Con el objetivo de evidenciar el fenotipo neuronal de las neuronas generadas en el subpallium de *G. omarorum*, se realizó doble inmunohistoquímica para evidenciar simultáneamente la retención de larga duración de la marcación nuclear con CldU y expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), marcador de neuronas catecolaminérgicas.

A los 180d de sobrevida de administrado el CldU, se encontraron células doble marcadas con TH a nivel del subpallium (Fig. 22). Estas neuronas presentaron una marcación del CldU intensa y un citoplasma inmunoreactivo para la TH bien definido como se indica en las Figs. 22C, D, G, H.

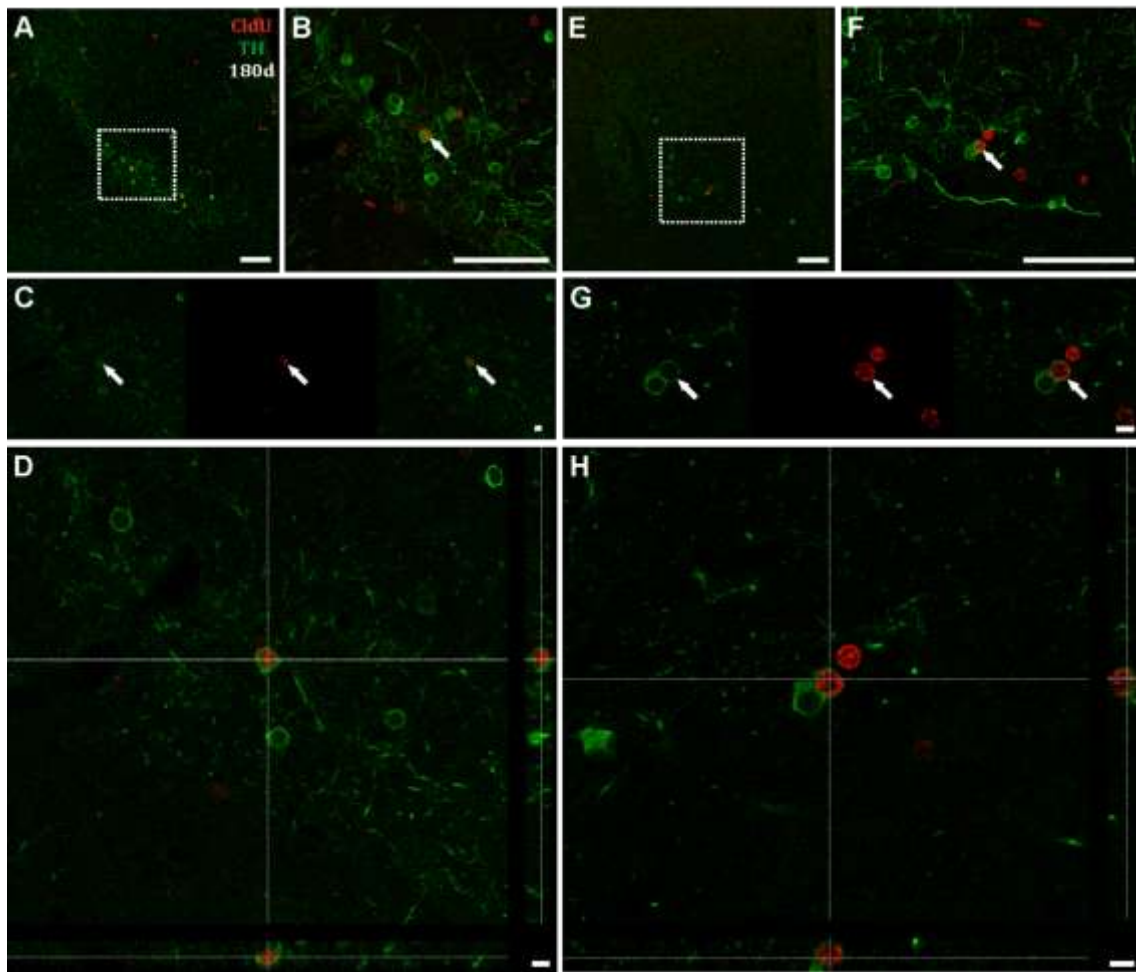


Figura 22. Expresión de TH en células con retención de larga duración (180d) de CldU en el subpallium telencefálico. (A) y (E) son microfotografías que corresponden a un plano confocal adquirido de modo secuencial. (B) y (F) son microfotografías que corresponden a la proyección en un plano de 19 planos confocales adquiridos cada 0,5 μm , de modo secuencial, de la región señalada con el rectángulo blanco en (A) y (E), respectivamente. En (C) y (G) se confirmó la co-localización de TH y CldU mediante la visualización de las microfotografías correspondientes a cada canal y su superposición de las regiones de interés señaladas con flechas blancas en (B) y (F), respectivamente. En (D) y (H) se confirmó la co-localización de los marcadores mediante la proyección en los planos ortogonales en los ejes XY y XZ. Escalas: A,B,E,F: 50 μm ; C,D,G,H: 5 μm .

DISCUSIÓN

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo forman parte de un manuscrito cuya versión final ha sido aceptada para su publicación por la revista *Frontiers in Neuroanatomy* y se adjunta en el Anexo I. En este trabajo se evidenció la distribución espacial, composición celular y capacidad neurogénica de las ZPs de todas las divisiones del cerebro adulto de *G. omarorum*. Como se mencionó anteriormente, los vertebrados anamniotas muestran amplia neurogénesis en la vida adulta y notoria capacidad de regeneración. Si bien los primeros estudios de la neurogénesis adulta en peces teleósteos datan de aproximadamente cincuenta años atrás, todavía son escasas las especies estudiadas como para sustentar la hipótesis de la reducción filogenética de la neurogénesis (Kempermann, 2013). El presente trabajo constituye un aporte en ese sentido. La distribución de las ZPs en el cerebro de *G. omarorum* resultó ser similar a las de otras especies de teleósteos, algunas de ellas filogenéticamente cercanas y otras más alejadas. Esto apoya la noción de que existiría un plan de proliferación celular común en teleósteos adultos el cual podría ser uno de los mecanismos involucrados en la generación de su morfotipo básico común. Todas las ZPs analizadas en *G. omarorum* presentaron una composición celular heterogénea y muchas de ellas mostraron potencialidad neurogénica *in vivo*. Algunas ZP se localizaron en regiones relevantes desde el punto de vista comparativo (como la ZP adyacente al subpallium que da origen a nuevas células que migran localmente o hacia el OB), otras desde el punto de vista funcional (como las del Cb, ELL, TS y TeO, involucradas en el procesamiento de la información electrosensorial, modalidad relevante en *G. omarorum*). Hasta el momento no había sido reportada la ZP del ELL, ni demostrada su capacidad neurogénica *in vivo* en peces eléctricos adultos.

Consideraciones metodológicas

El uso de dos análogos de la timidina, variando la ventana temporal entre la administración de ambos, permitió discriminar subpoblaciones entre las células proliferantes en el cerebro de *G. omarorum*.

En base a los protocolos de Vega y Peterson (2005) y Alunni et al. (2010), en este trabajo se administraron CldU e IdU (separados entre sí 24 hs o 30 d). Así, se evidenciaron las células que se encontraban en fase S del ciclo celular al momento de la administración de cada uno de ellos. Las células marcadas con ambos re-entraron en el ciclo celular al momento de la administración del segundo.

Las células proliferantes, marcadas con uno o ambos análogos, presentaron una marcación granular o difusa, tenue o intensa. Estas diferencias en el tipo de marcación pueden deberse a la etapa dentro de la fase S en la cual las células estuvieron expuestas al momento de la administración del análogo. La apariencia que presenta el ADN una vez replicado, evidenciada mediante microscopía confocal (Manders et al., 1992) y electrónica (Jaunin et al., 1998), depende de la duración de la exposición al análogo y de la etapa de la fase de síntesis del ADN durante la cual ocurrió. Las marcaciones difusa y granular corresponderían a la exposición en etapas tempranas y tardías de la fase S, respectivamente (Manders et al., 1992; Jaunin et al., 1998). Variaciones similares en el tipo de marcación fueron encontradas también en *Austrolebias* (Fernández et al., 2011).

También se encontró variabilidad en la intensidad de marcación. Una alta proporción de células proliferantes (marcadas con uno o ambos análogos) presentaron una marcación nuclear intensa en tiempos cortos luego de la administración del análogo. Al incrementar el tiempo de sobrevivencia, los núcleos presentaron generalmente una marcación menos intensa. Estas variaciones pueden deberse a diferencias en el tiempo de exposición al análogo, en la duración del ciclo celular y en el número de divisiones celulares luego de la administración del mismo. Como ha sido evidenciado por Manders et al. (1992), la exposición al análogo durante la fase S tardía produce una marcación más intensa que durante la fase más temprana. La intensidad de la marcación también disminuye tras sucesivas divisiones celulares, dado que la timidina endógena reemplaza a los análogos de origen exógeno (Zupanc et al., 2005; Alunni et al., 2010). Por lo tanto, cuando se analiza la marcación luego de un tiempo de sobrevivencia más o menos prolongado, por ejemplo 30 días o más, aquellas células con un ciclo celular corto (células de ciclo rápido) presentarían una marcación más débil que aquellas con ciclos celulares más prolongados (células madre), o las que se encuentran “en espera” o estadios quiescentes (Zupanc y Zupanc, 1992). En *G. omarorum* se encontraron, en animales tratados con un intervalo largo entre ambos análogos, núcleos intensamente marcados con el primero administrado y localizados dentro de las ZPs (posibles células quiescentes), núcleos más tenues localizados a distintas distancias desde las ZPs que podrían corresponder a células en proceso de migración, y células doble marcadas que corresponderían a posibles células madre. Resultados similares fueron encontrados en *Eigenmannia sp* (Zupanc y Zupanc, 1992), *D. rerio* (Zupanc et al., 2005) y *O. latipes* (Alunni et al., 2010).

Finalmente, la forma de los núcleos marcados también presentó variaciones, tanto dentro de cada ZP como entre ellas, y dependiendo del tiempo de sobrevivencia luego de la administración del análogo. En general, aquellos núcleos hallados dentro de los límites de

las ZPs fueron redondeados a ovoides en tiempos cortos entre administración de análogos y elongados en tiempos largos. Esta última figura nuclear podría corresponder a glioblastos o neuroblastos que aún no migraron fuera de los límites de la ZP. Además, algunos núcleos fueron redondeados u ovoides dentro de algunas ZPs o elongados en otras, independientemente del tiempo de sobrevida.

La mayoría de los núcleos de células que aparentaron haber migrado mostraron una forma redondeada y usualmente una marcación granular y débil. Esta diversidad en la morfología nuclear también fue descrita en otros teleósteos (*D. rerio*: Zupanc et al., 2005; *O. latipes*: Alunni et al., 2010).

Distribución celular de las zonas proliferativas de *G. omarorum*

La descripción espacial de las ZPs del cerebro adulto de *G. omarorum* se basó en el análisis de la localización de las células activamente proliferantes correspondiente a una sobrevida de 4 o 24hs luego de la administración de los análogos. Esto permitió contemplar dos aspectos de esta metodología previamente utilizada en otras especies de peces teleósteos. Por un lado, abarcar el intervalo de tiempo que los análogos están metabólicamente disponibles (Zupanc y Horschke, 1995) y por otro, no superar el tiempo en el que comienza la migración de las células derivadas (Ekström et al. 2001). En este estudio, no se encontró una clara diferencia en la disposición de las células proliferantes entre ambos tiempos lo cual indica que a las 24hs de administrado el análogo, las células proliferantes aún permanecen dentro de los límites de las ZPs.

Se encontraron zonas discretas del tejido nervioso donde se evidenció activa proliferación celular y que por lo tanto fueron identificadas como ZPs de acuerdo a definiciones previas (Ekström et al. 2001; Kirsche, 1967, citado por Raymond y Easter, 1983).

Las ZPs del cerebro de *G. omarorum* se encontraron en toda su extensión rostro-caudal, desde el telencéfalo al rombencéfalo. En todas las divisiones cerebrales se encontraron ZPs adyacentes al sistema ventricular-cisternal entre las que se destacan las adyacentes al subpallium en el telencéfalo, a la PPa e hipotálamo en el diencéfalo y al TeO y TS en el mesencéfalo. Además, a nivel del rombencéfalo se encontraron ZPs alejadas del sistema ventricular-cisternal, las ZPEV de las tres divisiones del Cb, y la del ELL. Este patrón de distribución de las ZPs del cerebro de *G. omarorum* en la vida adulta es similar al observado en larvas tardías (Iribarne y Castelló, 2014) indicando que, al menos en el período de vida estudiado, no parece existir una notoria modulación del número, localización y extensión de las ZPs durante la vida posnatal.

La localización de las ZPs en cada una de las regiones mencionadas podría estar involucrada con su modo de crecimiento. En el TeO y TS las ZPs se encuentran a nivel de sus polos caudales, y las nuevas células adicionales provocarían un crecimiento rostro-caudal de las estructuras (Easter, 1983; Raymond y Easter, 1983). Algo similar ocurriría en el ELL; por lo dicho anteriormente, el mismo crecería en sentido rostro-caudal y medio-lateral. Debido a la disposición extensa y distribuida de sus ZPs, el Cb presenta un crecimiento multi-direccional (Zupanc, 2008).

Debido a la extensión y densidad de células proliferantes, las ZPs de las tres divisiones del Cb resultaron ser las más prominentes del cerebro de *G. omarorum*. Como ha sido propuesto previamente por Zupanc et al. (1996), las nuevas células generadas en el Cb podrían reemplazar a células que se hayan perdido o agregarse a la población ya existente. El hecho de que el Cb de *G. omarorum* presente un crecimiento notorio aún en la vida adulta (Iribarne y Castelló, 2014) apoyaría la segunda hipótesis, aunque sería necesario demostrar que las nuevas células generadas persisten por un período de tiempo prolongado y que se diferencian en neuronas.

La ZP del ELL, ubicada a nivel de su borde latero-caudal, adyacente a la superficie externa del cerebro, aún no había sido descrita en peces eléctricos adultos de pulso ni de onda. Sin embargo, ha sido descrita en distintas etapas del desarrollo posnatal en *G. omarorum* (Iribarne y Castelló, 2014) y *Eigenmannia* (Lanoo et al., 1990) por lo cual es posible que sea una característica común a los peces eléctricos.

Tanto el Cb como el ELL no sólo presentan ZPEV intrínsecas sino que también se hallan cercanos a ZPV adyacentes a la cisterna. Esto permitiría un aporte dual de nuevas células en ambas estructuras, aportando de manera continua cantidades relativamente mayores de nuevas células en comparación con otras regiones del cerebro. Si una cantidad relativamente importante de estas células sobreviven, perduran en el tiempo y devienen en neuronas, estarían sustentando el crecimiento relativamente mayor de estas estructuras rombencefálicas (Fig. 3).

Es llamativo que muchas de las ZPs descritas en el cerebro de *G. omarorum* (tectal, toral, cerebelosa y del ELL) se encuentran en regiones que forman parte de los circuitos neurales involucrados en el procesamiento de la información electrosensorial (Carr y Maler, 1986; Bell y Maler, 2005), modalidad sensorial considerada como prevalente en *G. omarorum*. Esto permitiría suponer que la neurogénesis adulta cumpliría un papel funcional vinculado a la capacidad sensorial de esta especie.

Comparación de la distribución de las zonas proliferativas de G. omarorum con otros teleósteos electrorreceptivos y no electrorreceptivos

La distribución y localización de las células proliferantes en el cerebro adulto de *G. omarorum* fueron similares a las previamente descritas para otros teleósteos, aunque se observaron algunas diferencias.

Se encontraron escasas células proliferantes en la región rostral del OB, mayormente dispuestas en la periferia (Fig. 6A) que no aparentaron constituir una ZP. Contrariamente, en la región caudal del OB se encontró una ZP adyacente a la porción más rostral del ventrículo telencefálico. (Fig. 6B). Estos resultados son similares a los hallados en *D. rerio* (Byrd y Brunjes, 2001; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Zupanc, 2011), *A. burtoni* (Maruska et al., 2012) y *O. mossambicus* (Teles et al., 2012). Contrariamente, en *G. acuelatus* se encontraron células proliferantes en la capa celular interna (Ekström et al., 2001) y en *Austrolebias* en todas las capas del OB, principalmente en sus regiones medial y ventral (Fernández et al., 2011).

Se encontró una extensa ZP adyacente a toda la extensión de la superficie ventricular del telencéfalo, siendo más prominente a nivel del subpallium, similar a las de *G. acuelatus* (Ekström et al., 2001), *D. rerio* (Adlof et al., 2006; Grandel et al., 2006; Zupanc, 2011), *O. bonariensis* (Strobl-Mazulla et al., 2010), *A. burtoni* (Maruska et al., 2012) y *O. mossambicus* (Teles et al., 2012). En cambio, en *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995) y *O. latipes* (Kuroyanagi et al., 2010) las ZPs telencefálicas más prominentes están a nivel del telencéfalo dorsal.

La ZP más prominente a nivel del diencefalo rostral se encontró en la región preóptica donde las células proliferantes se hallaron dispuestas en la superficie del receso preóptico del ventrículo diencefálico, adyacente a la PPa. Esta distribución es similar a la descrita en *A. leptorhynchus*, *O. latipes*, *N. furzeri*, *A. burtoni*, *O. mossambicus* (Zupanc y Horschke, 1995; Kuroyanagi et al., 2010; Maruska et al., 2012; Teles et al., 2012; Tozzini et al., 2012). El análisis comparativo con *D. rerio* se dificulta debido a discrepancia de hallazgos previos reportados por otros autores. Mientras que los resultados de Zupanc et al. (2005) y Zupanc (2011) son similares a los de *G. omarorum*, los reportados por Adolf et al. (2006) y Grandel et al. (2006), indican que esta zona está restringida a la parte ventral del ventrículo diencefálico.

Otra ZP diencefálica en *G. omarorum* fue encontrada en la superficie ventricular del hipotálamo incluyendo sus recesos, de manera similar a lo que ocurre en *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001), *D. rerio* (Grandel et al., 2006) y *A. burtoni* (Maruska et al., 2012). Esta ZP hipotalámica es menos evidente en *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995), *O. latipes* (Kuroyanagi et al., 2010) y *O. mossambicus* (Teles et al., 2012) mientras que no fue descrita en *Austrolebias* (Fernández et al., 2011) ni en *B. gauderio* (Dunlap et al., 2011).

A nivel del mesencéfalo, las ZPs más prominentes se encontraron en el TeO y TS. La del TeO resultó ser una banda extensa de células proliferantes que se extendieron a lo largo sus bordes dorso-medial y ventro-lateral, convergiendo en el polo caudal, constituyendo una única ZP en forma de herradura, abierta en sentido rostral. Esta disposición es similar a la descrita en *C. auratus* (Raymond y Easter, 1983), *O. latipes* (Nguyen et al., 1999; Kuroyanagi et al., 2010), *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001), *O. mossambicus* (Teles et al., 2012), *N. furzeri* (Tozzini et al., 2012) y *A. burtoni* (Maruska et al., 2012), pero diferente a las encontradas en *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995), *Austrolebias* (Fernández et al., 2011) y *B. gauderio* (Dunlap et al., 2011). *A. leptorhynchus* presenta una única ZP a nivel del polo caudal del TeO; en el resto de esta estructura los autores sólo encontraron escasas células distribuidas homogéneamente en todas las capas tectales. Las *Austrolebias* presentan células proliferantes homogéneamente distribuidas en toda la extensión rostro-caudal de la ZPV, además de la ZP en el polo caudal. Nuevamente, la comparación con *D. rerio* se dificulta debido a las discrepancia entre Zupanc (2011) y Zupanc et al. (2005) por un lado, y Grandel et al. (2006) e Ito et al. (2010) por otro. Los primeros evidencian células proliferantes más abundantes a nivel de las capas tectales superficiales, homogéneamente distribuidas en toda la extensión rostro-caudal y una ZP notoria a nivel de la ZPV del polo caudal. En cambio, de acuerdo a Grandel et al. (2006) e Ito et al. (2010), el patrón de distribución de las células proliferantes del TeO de *D. rerio* es similar a lo antes descrito en *G. omarorum*.

La ZP del TS en *G. omarorum* se restringió al polo caudal, disposición similar a la encontrada en *A. leptorhynchus* (la denominada zona X, Zupanc y Horschke, 1995) y *D. rerio* (Grandel et al., 2006). Además, en *G. omarorum* esta ZP se extendió rostralmente a nivel de los bordes ventro-medial y dorso-lateral de la región caudal del TS. En cambio, en *G. aculeatus* esta ZP es aún más extensa en sentido rostral cubriendo la mayor parte de la superficie libre del TS (Ekström et al., 2001). Por el contrario, no parece existir una ZP toral en *A. burtoni* (Maruska et al., 2012), *B. gauderio* (Dunlap et al., 2011) y *O. mossambicus* (Teles et al., 2012), especies en las que las células proliferantes fueron escasas y distribuidas de manera difusa.

Las ZPs del TeO y del TS en *G. omarorum* convergieron entre sí a nivel de sus polos caudales, similar a lo que ocurre en *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995), *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001) y *A. burtoni* (Maruska et al., 2012).

La ZP del TL se encontró en su región ventral, adyacente al ventrículo mesencefálico subyacente, al igual que en *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995), *Austrolebias* (Fernández et al., 2011) y *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001). En *D. rerio*, Grandel et al. (2006) encontraron células proliferantes en la superficie ventricular del TL, mientras que de acuerdo a Zupanc et al. (2005) se encuentran a nivel de sus regiones medial y dorsal.

La distribución espacial de las ZPs del Cb en *G. omarorum* fue similar a las de *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horschke, 1995; Zupanc et al., 1996) y *O. mossambicus* (Teles et al., 2012). Al igual que en dichas especies, las células proliferantes ocuparon la parte medial de las regiones dorsal y ventral de la CCb-mol, la región medial de la VCb-mol y la mayor parte de la superficie de la Egm-gra. En todas las divisiones del Cb, tanto la densidad de las células proliferantes como la distribución de las ZPs parecieron ser mayores en *G. omarorum* que las descritas para otros teleósteos, incluyendo *A. leptorhynchus*. En el extremo rostral del CCb, las células proliferantes fueron escasas en *A. leptorhynchus* pero muy abundantes en *G. omarorum* extendiéndose por la región medial del CCb rostral, a modo de puente entre las CCb-mol dorsal y ventral (Fig. 5B). Las células proliferantes en el CCb y VCb de *G. omarorum* se encontraron homogéneamente distribuidas como ocurre en *A. leptorhynchus*, lo cual difiere de *D. rerio* (Grandel et al., 2006; Kaslin et al., 2009) y *Austrolebias* (Fernández et al., 2011). Estas variaciones en las ZPs del Cb pueden estar relacionadas a diferencias en la citoarquitectura cerebelar de estas especies de teleósteos mencionadas. En *G. omarorum* y *A. leptorhynchus* la CCb-mol es una capa continua mientras que en *Austrolebias* y en *D. rerio* presenta múltiples repliegues que podrían generarse por la proliferación celular a modo de estructuras radiales.

La ZP del ELL no había sido descrita previamente en gimnótidos de onda adultos. Dunlap et al. (2011) encontraron un gradiente de células proliferantes pero concluyeron que las características no son suficientes para determinar la existencia de una ZP en el ELL de *B. gauderio*. En *A. leptorhynchus*, las células proliferantes del ELL están distribuidas homogéneamente en toda la extensión medial-lateral del ELL (Zupanc y Horschke, 1995), aunque en sentido dorso-ventral se encuentran más concentradas en las capas celulares. Se encontraron dos ZPs en el ELL durante el desarrollo posnatal: en *Eigenmannia*, una medial, adyacente al segmento ampular medial y otra lateral, adyacente al segmento lateral tuberoso (Lanoo et al., 1990). En *G. omarorum* también se encontraron dos ZPs

adyacentes a la superficie del segmento lateral, una más dorsal entre la capas mol y PCL y otra entre PCL y GCL (Iribarne y Castelló, 2014). Por lo tanto, la ZPEV del ELL parece conservarse a lo largo del desarrollo postnatal de esta especie.

En suma, el patrón de distribución de las ZPV y ZPEV en *G. omarorum* fue similar al descrito para otros teleósteos, en particular *A. leptorhynchus*, *G. aculeatus*, *D. rerio* y *O. mossambicus* (Zupanc y Zupanc, 1992; Zupanc y Horschke, 1995; Zupanc et al., 1996; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Teles et al., 2012). Las diferencias encontradas con especies no electrorreceptivas podrían ser debidas a diferencias en la especialización funcional (Zupanc y Horschke, 1995; Grandel et al., 2006). Sin embargo, parte de los resultados de este trabajo difieren de los reportados en *A. leptorhynchus*, pez eléctrico en el cual varias cuyas regiones cerebrales están involucradas en el procesamiento de la información electrosensorial, al igual que *G. omarorum*. Además de existir diferencias reales entre ambas especies, también podrían atribuirse a variaciones en las aproximaciones metodológicas aplicadas o a diferencias en la interpretación de los resultados obtenidos. De acuerdo al esquema del árbol filogenético mostrado en la Fig. 23, el patrón de distribución de las ZPs en *G. omarorum* es similar tanto al de especies filogenéticamente cercanas (el cypriniforme *D. rerio* y el gymnotiforme *A. leptorhynchus*) como al de algunas especies más alejadas (los perciformes *O. mossambicus* y *A. burtoni* y el gasterosteiforme *G. aculeatus*). Las características similares del patrón de distribución de las células proliferantes entre especies filogenéticamente distantes aportan evidencia de la existencia de un plan de proliferación conservado en la radiación de los teleósteos, lo que contribuiría al desarrollo y mantenimiento de la organización anatómica básica (“*bauplan*”) del cerebro de peces teleósteos (Grandel et al., 2006; Kuroyanagi et al., 2010). Siguiendo esta línea de pensamiento, algunas de las diferencias podrían estar vinculadas a las desviaciones de dicho “*bauplan*” asociadas a la especialización funcional de cada especie.

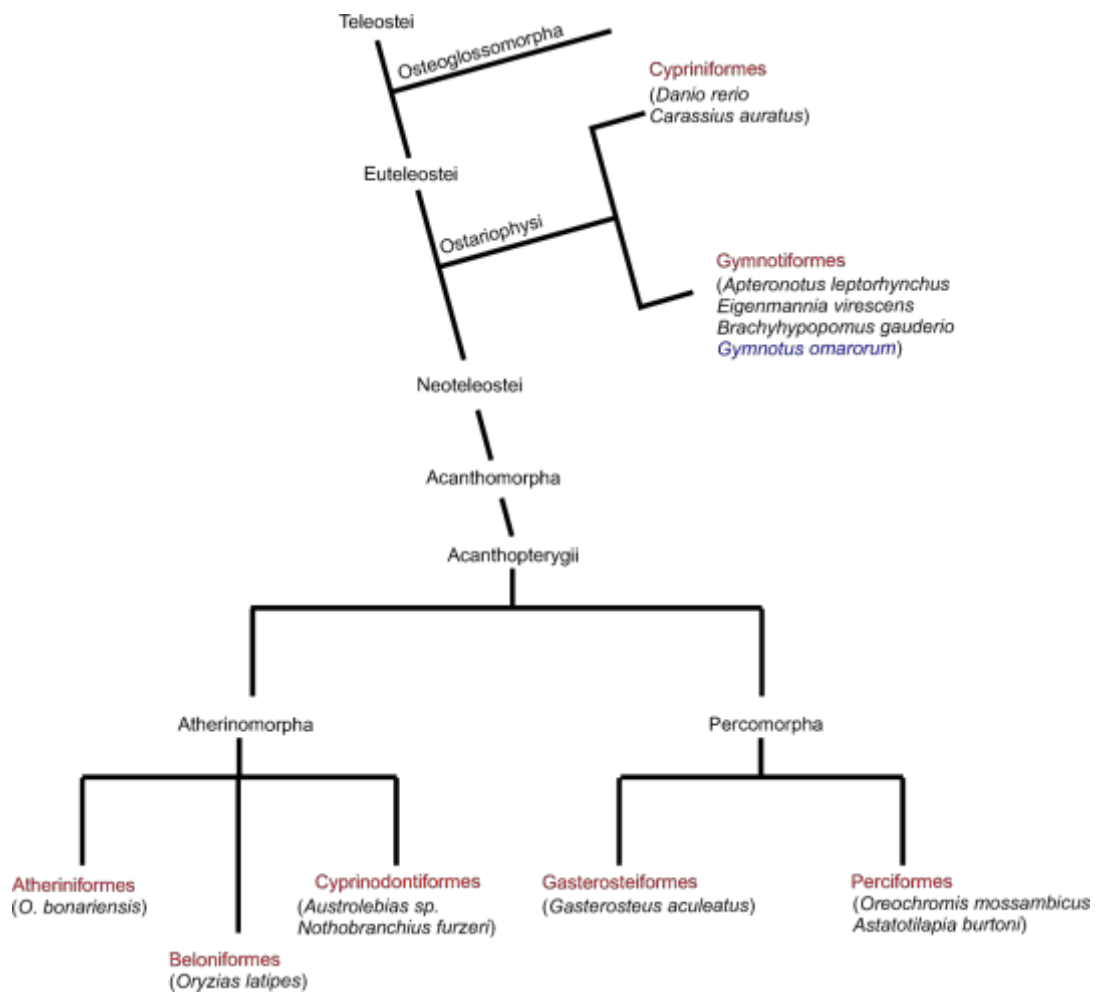


Figura 23. Representación esquemática de la distribución taxonómica de *G. omarorum* y de las especies de teleósteos con las cuales se comparó la distribución de sus zonas proliferativas cerebrales. Modificado de Moller, 1995.

Composición celular de las zonas proliferativas de *G. omarorum*

Se logró discriminar los principales tipos de células proliferantes en todas las ZPs analizadas del cerebro de *G. omarorum*. Los tipos, cantidades relativas y localización de las células proliferantes en este trabajo mostradas, son consistentes con las características previamente descritas en amniotas (Vega y Peterson, 2005; Llorens-Martín et al., 2010), anamniotas (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) e invertebrados (Sullivan et al., 2007).

El uso de una ventana temporal corta entre la administración de los análogos permitió evidenciar en todas las ZPs estudiadas en *G. omarorum* a las células de ciclado rápido, mientras que una ventana temporal larga permitió evidenciar a posibles células

quiescentes, células madre y células en migración. Estos resultados concuerdan con lo reportado en *D. rerio* (ventana: 19d; región: telencéfalo; Adolf et al., 2006) y *O. latipes* (ventana: 14d; región: TeO; Alunni et al., 2010).

Cuantificación de los tipos celulares en el corpus cerebelli de *G. omarorum*

El análisis cuantitativo de las células proliferantes del CCb realizado en este trabajo se basó en la cuantificación de aproximadamente 20000 células en dos grupos experimentales. Aproximadamente el 99% de las células proliferantes estimadas en especímenes del Protocolo 1 se hallaron en la CCb-mol, distribuidas por igual entre sus zonas dorsal y ventral, confirmando la localización de la ZP del CCb a nivel de esta capa. Estos datos, sumado a que a nivel del polo rostral del CCb las CCb-mol dorsal y ventral están conectadas entre sí en las cercanías de la línea media, sugieren que el CCb tiene una única ZP en CCb-mol (ver Fig. 5B). El 1% restante se encontró en la CCb-gra. Este valor podría corresponder a un bajo porcentaje de células que habrían migrado desde la CCb-mol a la CCb-gra en un período de tiempo entre 4 y 24hs. Por otra parte, el bajo porcentaje de células proliferantes hallado en la CCb-gra también podría deberse a dificultades metodológicas ya que el desfasaje del límite entre las capas CCb-mol y CCb-gra en el espesor del corte podría haber provocado un error en la adjudicación de la localización de células que se encuentran en el límite entre ambas capas. Sin embargo, en *A. leptorhynchus* el porcentaje de células proliferantes que se encuentran en la CCb-gra 2hs luego de administrado el análogo alcanza el 16%, del cual la mitad están distribuidas homogéneamente en toda la CCb-gra, y el resto a nivel de la zona medial del límite entre ambas capas del CCb (Zupanc et al., 1996). Estas diferencias sugieren que la velocidad de migración de las células derivadas varían entre especies filogenéticamente cercanas.

En especímenes tratados según el Protocolo 3, aproximadamente el 50% del total de células proliferantes se hallaron en la CCb-gra, mientras que el resto permanecieron en la CCb-mol. La importante disminución en la cantidad de las células proliferantes al aumentar el tiempo de sobrevida luego de la administración del primer análogo indicaría que en el transcurso del tiempo aquellas células activamente proliferantes que se encontraron a nivel de ambas CCb-mol pudieron optar por al menos tres destinos: migrar hacia su localización final, degenerar o permanecer dentro de los límites de la ZP. La gran cantidad de células con retención de larga duración del análogo dispuestas en la CCb-gra sugiere que un alto porcentaje de células derivadas migraron a dicha capa en 30d. En *A. leptorhynchus*, aproximadamente el 31% de las células proliferantes se encuentran en la

CCb-gra a los 2 días luego de administrado el BrdU mientras que el 80% y 93% lo hacen a los 10 días y 28 días, respectivamente (Zupanc et al., 1996). Por lo tanto, la velocidad de migración de las células derivadas en *G. omarorum* es mucho menor que en *A. leptorhynchus*. Por otra parte, el 50% de las células proliferantes en *G. omarorum* permanecieron en la CCb-mol de las cuales un bajo número corresponderían a posibles células madre y quiescentes (ver Figs. 11E, G). Por último, un alto porcentaje de células proliferantes del Cb de *A. leptorhynchus* sufren muerte celular programada una vez que alcanzan su destino final (Soutschek y Zupanc, 1996). Esto sugiere que la apoptosis participaría como un mecanismo de regulación del número de células proliferantes en el cerebro adulto (Zupanc, 2008, 2011) lo cual podría ocurrir en el CCb de *G. omarorum* al igual que en el de *A. leptorhynchus*.

Utilizando un tiempo corto de administración de análogos, las células activamente proliferantes de la CCb-mol, luego de 4hs de administrado el IdU, alcanzaron valores promedio en torno a las 11000 células/mm³, mientras que 24hs luego del CldU alcanzaron valores promedio en torno a las 67000 células/mm³. Esto indicaría que las células proliferantes marcadas con CldU se habrían dividido al menos 2 veces en un periodo de 20hs, lo que implica que la duración del ciclo celular en *G. omarorum* sería de no más de 10hs, duración mucho menor que la hallada por Zupanc y Zupanc (1992) en el ventrículo diencefálico de *A. leptorhynchus* (aproximadamente 48hs).

En suma, los resultados obtenidos en el CCb de *G. omarorum*, mediante la cuantificación de los distintos tipos celulares, confirman la existencia de la ZP a nivel de la CCb-mol (con una alta tasa de proliferación celular) y el sitio de migración de las células derivadas, la CCb-gra. También sugieren su diferenciación en células granulares de dicha capa.

En este estudio cuantitativo también se evidenciaron tipos celulares descritos en otras especies, como otros teleósteos y mamíferos. Se encontraron aproximadamente entre 1800 y 3000 células/mm³ con retención de larga duración de CldU en las CCb-mol. Estas células podrían pertenecer a dos poblaciones: células quiescentes o posibles células madre. Otra población de posibles células madre (doble marcadas) consistió en aproximadamente 5000 células/mm³ en cada CCb-mol. Por su parte, las células de ciclado rápido alcanzaron aproximadamente 85000/mm³ en cada CCb-mol (Fig. 15). Estos resultados confirman la abundancia de células de ciclado rápido en la ZPEV cerebelosa, en comparación con la población de células madre y quiescentes. Proporciones similares fueron encontradas mediante el análisis cualitativo en otras ZPs de otras regiones del cerebro de *G. omarorum*.

Migración de células derivadas de las zonas proliferativas hacia su localización definitiva

En varias regiones del cerebro de *G. omarorum*, se evidenció la presencia de posibles células en migración localizadas a distintas distancias desde las ZPs. En algunos casos, la migración resultó ser de corto rango como el caso del TeO y TS. En otros se observó migración de mayor distancia como el caso del subpallium y las tres divisiones del Cb. Esto sugiere que las células derivadas presentan distintas velocidades de migración dependiendo de la región cerebral en la que se originan. La dirección y sentido en la que las células migrantes parecen migrar, también varió entre regiones, siendo posiblemente radial a nivel del subpallium, dorso-ventral a nivel del hipotálamo y más compleja y multidireccional en el Cb.

En general, las células en migración presentaron una marcación granular del análogo, lo que sugiere que éste pudo diluirse progresivamente en el transcurso del tiempo sustituyéndose en cada división por la timidina endógena. Además, presentaron mayoritariamente una forma nuclear redondeada en cortes frontales (como el caso de las CC-gra y VCb-gra), lo que indica que perdieron la figura característica de células en migración. Además, en un estudio paralelo se evidenció que la ZPV adyacente a la región más rostral del ventrículo telencefálico origina células que migran tangencial y radialmente para alcanzar la capa celular interna del OB (Lasserre, 2014).

Las zonas proliferativas en *G. omarorum* constituyen zonas neurogénicas

La demostración de retención de larga duración de CldU y la expresión de HuC/HuD o TH, o el transporte de neurobiotina permitió estudiar la capacidad neurogénica de las ZPs de *G. omarorum*. Los resultados obtenidos indican que existen regiones neurogénicas en todas las divisiones del cerebro: subpallium telencefálico, la PPa diencefálica, el TeO y TS mesencefálicos, el Cb y el ELL rombencefálicos.

A nivel del telencéfalo, se constató la expresión de TH en células que retuvieron CldU (Fig. 22) y que migraron desde la ZPV. Este fenómeno implicó un recorrido de aproximadamente 250 μm , hasta alcanzar los núcleos del subpallium en un período de 180d. Esto es consistente con los hallazgos de Sas et al. (1990) que indican que en el subpallium de *A. leptorhynchus* se encuentran núcleos catecolaminérgicos (dopaminérgicos). Algunas de las células doble marcadas en *G. omarorum* presentaron un

citoplasma muy delgado y no se observaron procesos evidentes de tipo dendrítico o axonal. En cambio en otras, se observó una disminución de la relación núcleo/citoplasma y fueron evidentes procesos neuronales posiblemente dendríticos. Estas observaciones sugieren que las células derivadas corresponden a nuevas neuronas en distinto grado de maduración. La expresión de la enzima TH indica que estas células pertenecen al sistema catecolaminérgico. Sería necesario evidenciar la expresión de dopamina β -hidroxilasa o del neurotransmisor dopamina para elucidar si corresponden a neuronas noradrenérgicas o dopaminérgicas (Sas et al., 1990). Resultados similares se encontraron en *D. rerio* (Adolf et al., 2006).

Como se mencionó previamente, en estudios paralelos a este trabajo, se obtuvieron resultados compatibles con la existencia de una corriente migratoria rostral, similar a lo que ocurre en mamíferos adultos (inclusive humano). Más aún, se encontró que varias de las nuevas células que alcanzan las capas celular interna y periglomerular del OB presentaron retención de CldU de larga duración y expresaron HuC/HuD o TH presentando una morfología compatible con la de las interneuronas de dichas capas (Fig. 24; Lasserre, 2014).

En la PPa diencefálica, se encontraron células de retención de larga duración cercanas al ventrículo que expresaron HuC/HuD. Esto indica que células que han migrado una corta distancia (10-50 μm) ya iniciaron su proceso de diferenciación hacia la estirpe neuronal. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Grandel et al. (2006) en *D. rerio* ya que las nuevas neuronas que retienen BrdU por un período de 46 d expresan HuC/HuD o TH.

En el polo caudal del TeO se evidenció una población de células derivadas con retención de CldU de larga duración localizadas en las capas tectales más profundas a una distancia de aproximadamente 100 μm desde la ZP tectal desde la cual se originarían. En esta estructura las células derivadas aparentan estar migrando “en grupo” (Fig. 18A). La expresión de HuC/HuD en células con retención de CldU de larga duración sustenta la capacidad neurogénica de la ZP de esta región. Dado que el TeO es una estructura cortical y debido a que las células doble marcadas se distribuyeron en estratos correspondientes a distintas capas y presentaron aspectos diferentes (en tamaño y relación núcleo/citoplasma), se puede suponer que las nuevas neuronas corresponden a distintos tipos celulares del TeO (Fig. 17B).

En niveles rostrales de la ZP del TS, se observaron células doble marcadas que presentaron morfología compatible con la de células en migración indicando que durante este proceso también ocurre la diferenciación (Figs. 18F-H). En cambio, a niveles más caudales no se observaron células con dicha morfología (Figs. 17F,G). Esto indicaría que la maduración neuronal progresa en dirección caudal-rostral.

Al igual que lo reportado en *A. leptorhynchus* (Zupanc et al. 1996) y *D. rerio* (Zupanc et al., 2005), a nivel del CCb de *G. omarorum* las células derivadas se diferencian hacia la estirpe neuronal en la CCb-gra. Como se evidencia en la Fig. 19, dichas células son pequeñas y presentan una delgada marcación de HuC/HuD rodeando el núcleo marcado con el análogo relativamente grande. Todo ello indica que corresponderían a células granulares. Además, las nuevas células incorporaron y transportaron neurobiotina desde la capa molecular a la granular, lo cual indicaría que estas células cuyos somas se ubican en la CCb-gra, extienden fibras nerviosas que alcanzan la CCb-mol. Esto indicaría que las nuevas células grano del CCb de *G. omarorum* no sólo logran diferenciarse en la vida adulta sino que también se integran a circuitos pre-existentes (Zupanc, 2008).

Las células derivadas con retención de larga duración de CldU que expresaron HuC/HuD se encontraron en los límites entre la GCL y capas adyacentes del ELL. Esto sumado a su tamaño y morfología, sugiere que las nuevas células del ELL también se diferenciarían en células granulares, demostrando por primera vez la capacidad neurogénica de la ZP del ELL.

Las estructuras rombencefálicas y el TeO comparten una organización circuital de tipo cerebeloso (Bell, 2002) y están involucradas, junto con el TS, en el procesamiento de la información electrosensorial en *G. omarorum*. La incorporación de nuevas células en estas regiones que se diferenciarían en algunos tipos neuronales específicos de los circuitos neurales, permite suponer que la neurogénesis estaría afectando su capacidad de procesamiento. La neurogénesis en estas estructuras estaría vinculada a la especialización funcional de *G. omarorum* en el cual el sistema electrosensorial es una modalidad muy relevante para el comportamiento de la especie. Sin embargo, el hecho de que en *G. omarorum* exista neurogénesis a nivel del OB conduce a re-dimensionar el papel funcional de la olfacción en esta especie y por lo tanto re-dimensionar la modalidad electrosensorial.

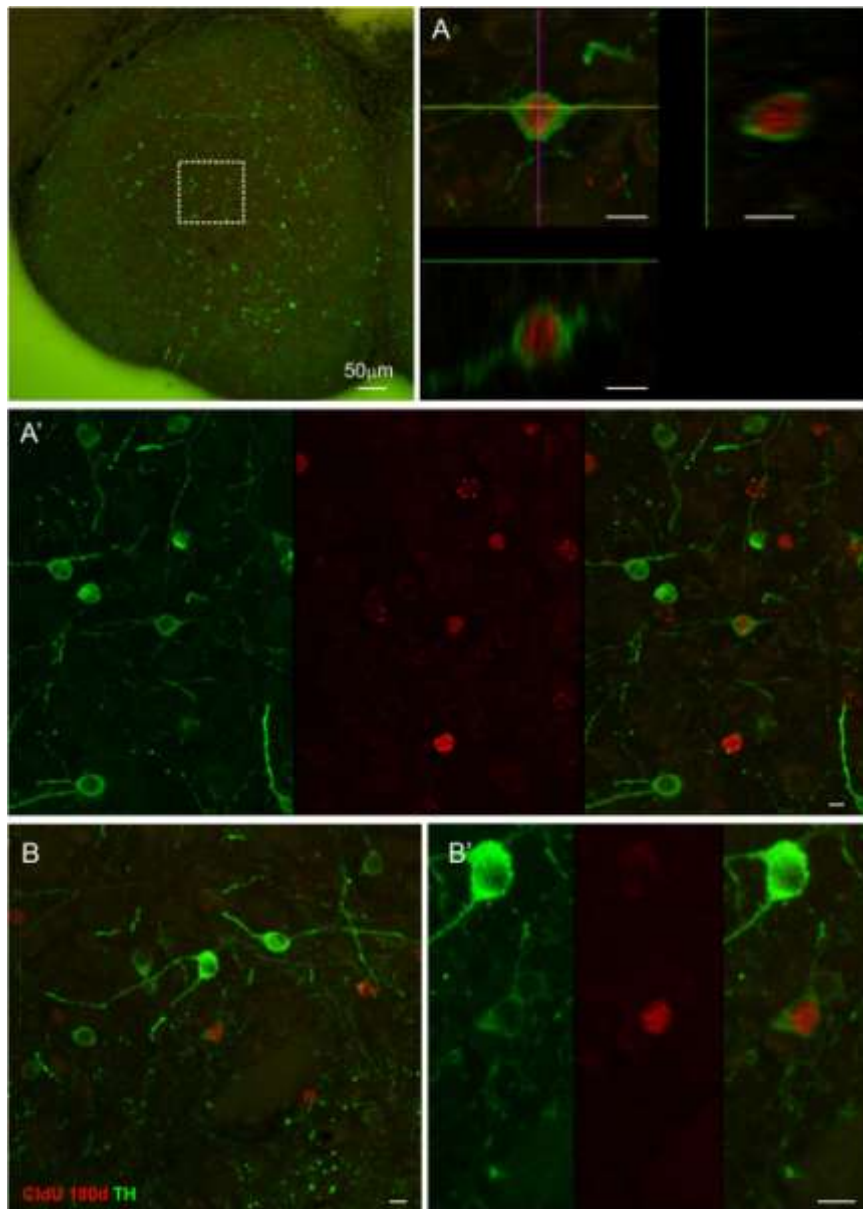


Figura 24. Expresión de TH en células de retención de larga duración de CldU (180d) en el bulbo olfatorio rostral de *G. omarorum*. La co-localización de los marcadores se confirmó mediante la proyección en los planos ortogonales XY y XZ (**A**) de la región de interés señalada por el rectángulo blanco o mediante la visualización de cada canal y su superposición (**A',B'**). Escalas: 5 μ m. Modificado de Lasserre, 2014.

Conclusiones generales

En este trabajo se comprobó la presencia de múltiples ZPs localizadas en todas las divisiones del cerebro adulto del pez eléctrico de pulso *G. omarorum* utilizando un protocolo que permite identificar el momento de nacimiento celular mediante la administración de dos análogos de la timidina. Estos resultados son similares a los hallados en otras especies de teleósteos, lo que aporta más evidencia a favor de la existencia de un plan común de proliferación celular en el cerebro de este grupo de peces. Las diferencias encontradas con especies electrorreceptivas y no electrorreceptivas podrían deberse a la especialización funcional del cerebro de *G. omarorum*. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias con la especie filogenéticamente cercana *A. leptorhynchus* (Zupanc y Horscke, 1995), principalmente a nivel de la zona proliferativa del ELL.

Asimismo, se estudió la composición celular de varias ZPs, mediante un protocolo de doble marcación con análogos de la timidina y se encontró que en prácticamente todas las ZPs de las regiones estudiadas presentan una composición celular heterogénea. Estas ZPs se componen de distintos tipos celulares que difieren en la duración de sus ciclos celulares y su posible destino final: células de ciclado rápido, posibles células en migración, células quiescentes y madres.

En el CCb, región que presentó una gran abundancia de células proliferantes, fue posible cuantificar los distintos tipos celulares mediante un análisis no sesgado utilizando estereología confocal. Así, se confirmó la existencia de la ZP a nivel de la CCb-mol y se evidenció la localización definitiva de las células derivadas a nivel de la CCb-gra.

Se demostró la potencialidad neurogénica en varias regiones de todas las divisiones del cerebro de *G. omarorum* estudiadas mediante demostración de la expresión del marcador de estirpe neuronal HuC/HuD o la enzima TH en células de retención de larga duración del análogo. En particular, en el CCb se evidenció además la marcación retrógrada con neurobiotina de células derivadas de la CCb-gra indicando que se diferencian en células grano y posiblemente se integren a circuitos pre-existentes. También se demostró por primera vez que el ELL presenta capacidad neurogénica generándose muy probablemente células granulares.

Además de contribuir al conocimiento acerca de la proliferación y neurogénesis posnatal en una especie en particular, *G. omarorum*, este trabajo contribuye a aumentar la cantidad de especies estudiadas dentro del taxón teleósteos. De esta manera, a través del análisis

comparativo, se podría llegar a vislumbrar los aspectos que podrían ayudar a comprender la regulación y el papel funcional de la neurogénesis adulta.

Perspectivas

La profundidad de conocimiento respecto a las zonas proliferativas del cerebro adulto de *G. omarorum* hasta al momento alcanzada constituye la base para en el futuro ahondar en distintos aspectos. Por un lado, será necesario estudiar el fenotipo celular de las posibles células madre aquí evidenciadas en las distintas regiones del cerebro adulto de *G. omarorum*. Estudios previos en *D. rerio* evidenciaron que las células madre del telencéfalo expresan marcadores y presentan morfología de glía radial (Adolf et al., 2006; Pellegrini et al., 2007; Lim et al., 2008). Sin embargo, en el cerebelo de dicha especie, se demostró que las células madre no son gliales sino que retienen características de células neuroepiteliales (Kaslin et al., 2009). Por su parte, en individuos juveniles y adultos de *O. latipes*, las células madre del TeO no expresan marcadores de glía radial (Alunni et al., 2010). El estudio del fenotipo celular en varias regiones de una misma especie permitiría aportar evidencias a la variabilidad de fenotipos de las células madre. Por estas razones, sería interesante continuar este trabajo mediante el estudio del fenotipo celular de células madre en el cerebro adulto de *G. omarorum* en la vida adulta.

Por otra parte, se podría analizar el fenotipo celular de las células con retención de larga duración para completar el análisis del fenotipo de las nuevas neuronas generadas en la vida adulta. La doble marcación de CldU y TH observada en este trabajo en células del telencéfalo, como las encontradas en el OB, indica que las nuevas células generadas serían catecolaminérgicas. Será necesario continuar este estudio para discriminar si estas células son dopaminérgicas o noradrenérgicas. Ello se podría lograr a través de la demostración inmunohistoquímica de la expresión de dopamina-beta-hidroxilasa y de dopamina. Además, para evidenciar la diferenciación en otros tipos neuronales se podría complementar con el estudio de la co-localización de retención de larga duración de análogos de la timidina y neurotransmisores tales como 5HT y GABA, mediante doble-inmunohistoquímica.

En cuanto al ELL, sería interesante estudiar la incorporación de las nuevas células en los circuitos mediante la marcación transganglionar de las células grana luego de la aplicación del trazador neuronal neurobiotina en nervios periféricos y demostrar la co-localización del trazador neuronal con retención de larga duración de análogos de la timidina.

REFERENCIAS

- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., & Bally-Cuif, L.** (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.* 295, 278–93.
- Altman, J.** (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–457.
- Altman, J.** (2011). The discovery of adult mammalian neurogenesis. En: Neurogenesis in the Adult Brain I. Eds. T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, & A. Alvarez-Buylla Tokyo: Springer, Japan.
- Altman, J., & Das, G.** (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–35.
- Alunni, A., Pierucci, F., Aita, M., Margotta, V., De Vita, R. & Alfei, L.** (2001). Proliferative activity and motoneurone recruitment persist at the spinal cord central canal during larval and some postlarval stages in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur. J. Histochem.* 45, 191-202.
- Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., & Joly, J.-S.** (2010). Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* 70, 693–708 713.
- Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287–93.
- Alvarez-Buylla, A. & Lim, D.A.** (2004). For de long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 41, 683-686.
- Ampatzis, K. & Dermon, C. R.** (2007). Sex differences in adult cell proliferation within the zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1030–40.
- Barker, M.J. Boonstra, R. & Wojtowicz, J.M.** (2011). From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *J. Eur. Neurosci.* 34, 963-977.
- Bennett, M.V.L.** (1967). Mechanisms of electroreception. En: Lateral line detectors. Eds. Chan, P. University Press, Indiana.
- Bell, C.** (2002). Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav. Evol.* 59, 312-326.
- Bell, C.C. & Maller, L.** (2005). Central neuroanatomy of electrosensory systems in fish. En: Electroreception. Eds. Bullock, T.H., Hopkins, C.D., Popper, A.N. & Fay, R.R.
- Bullock, T.H., Northcutt, R.G. & Bodznick, D.A.** (1982). Evolution of electroreception. *TINS.* 5, 50-53.
- Byrd, C.A. & Brunjes, P.C.** (2001). Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neuroscience.* 105(4), 793-801.
- Candal, E., Anadón, R., Bourrat, F. & Rodríguez-Moldes, I.** (2005a). Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosta.s): a segmental approach. *Dev. Brain Res.* 160, 157–175.
- Candal, E., Anadón, R., DeGrip, W.J. & Rodríguez-Moldes, I.** (2005b). Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Dev. Brain Res.* 154, 101-119.
- Carr, C.E. & Maler, L.** (1986). Electroreception in gymnotiform fish. Central anatomy and physiology. En: Electroreception. Eds. Bullock, T.H. Heiligenberg, W. Wiley, New York. 319-373.

- Chapouton, P., Jagasia, R. & Bally-Cuif, L.** (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*. 29, 745–757.
- Castelló, M.E. & Iribarne, L.** (2010). Postnatal cell proliferation in the brain of the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. V International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology, Santa Cruz, Chile
- Clint, S.C. & Zupanc, G.H.K** (2001). Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia. *Dev. Brain. Res.* 130(1), 15-23.
- Delgado, L. M. & Schmachtenberg, O.** (2011). Neurogenesis in the adult goldfish cerebellum. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 294, 11–5.
- Di Luca, M., Baker, M., Corradetti, R., Kettmann, H., Mendlewicz, J., Olesen, J., Ragan, I. & Westphal, M.** (2011). Consensus document on European brain research. *Eur. J. Neuro.* 33, 768-818.
- Doetsch, F.** (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 543–550.
- Dunlap, K. D., Silva, A. C., & Chung, M.** (2011). Environmental complexity, seasonality and brain cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *J. Exp. Biol.* 214, 794–805.
- Easter, S. S.** (1983). Postnatal neurogenesis and changing connections. *TINS*. 53-56.
- Ekström, P., Johnsson, C. M. & Ohlin, L. M.** (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. Comp. Neurol.* 436, 92–110.
- Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G. & Olivera-Bravo, S.** (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): A comparative study. *Neuroscience*. 189, 12–24.
- Ferraro, F. & Lo Celso, C.** (2010). Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol.* 695, 155-168.
- Finlay, B.L., Hersman, M.N. & Darlington, R.B.** (1998). Patterns of vertebrate neurogenesis and the paths of vertebrate evolution. *Brain Behav. Evol.* 52, 232-242.
- Garstang, W.** (1922). The theory of recapitulation: a critical re-statement of the biogenetic law. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology.* 35 (232), 81-101.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I. & Brand, M.** (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295, 263–77.
- Grandel, H. & Brand, M.** (2012). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev. Genes. Evol.* 223 (1-2), 131-147.
- Gratzner, H.G.** (1982). Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 218, 474-475.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D.** (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 4(1), 9.
- Hermann, A., Suess, C., Fauser, M., Kanzler, S., Witt, M., Fabel, K., Schwarz, J., Höglinger, G. U. & Storch, A.** (2009). Rostro-caudal gradual loss of cellular diversity within the periventricular regions of the ventricular system. *Stem Cells*. 27, 928–41.
- Hinsch, K., & Zupanc, G. K. H.** (2006). Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. *J. Neurosci. Methods*. 158, 75–88.
- Hodos, W. & Buttler, A.B.** (1997). Evolution of sensory pathways in vertebrates. *Brain Behav. Evol.* 50, 189-197.

- Iribarne, L. & Castelló, M. E.** (2014). Postnatal cell proliferation in the brain of the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *J. Physiol. (Paris)*. DOI:10.1016/j.jphysparis.2014.05.001
- Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T. & Takeuchi, H.** (2012). p53 Mutation suppresses adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 627–31.
- Ito, H., Isinikawa, Y., Yoshimoto, M. & Yamamoto, N.** (2007). Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain Behav. Evol.* 69, 76-86.
- Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H. & Ohshima, T.** (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Dev. Biol.* 342, 26–38.
- Jaunin, F., Visser, A.E., Cmarko, D., Aten, J.A. & Fakan, S.** (1998). A new immunocytochemical technique for ultrastructural analysis of DNA replication in proliferating cells after application of two halogenated deoxyuridines. *J. Histochem. Cytochem.* 46 (10), 1203-1209.
- Kaslin, J., Ganz, J. & Brand, M.** (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 101–22.
- Kaslin, J., Ganz, J. & Geffarth, M.** (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *J. Neurosci.* 29, 6142–53.
- Kaslin, J., Kroehne, V., Benato, F., Argenton, F. & Brand, M.** (2013). Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish: from embryo to adult. *Neur. Devel.* 8, 1-15.
- Kazanis, I.** (2009). The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain. *Brain.* 132, 2909-2921.
- Kemperman, G.** (2006). Adult neurogenesis. Stem cells and neuronal development in the adult brain. Oxford University Press. New York.
- Kempermann, G.** (2013). Adult neurogenesis. En: Neuroscience for the 21st century. Eds. Pfaff. D.W. 7, 161-177.
- Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Nobaka, S., Kawakami, K., García-Verdugo, J.M. & Sawamoto, K.** (2011). Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 59, 3549-3565.
- Kotrschal, K., van Staaden, M.J. & Huber, R.** (1998). Fish brains: evolution and environmental relationships. *Rev. Fish. Biol. and Fisher.* 8, 373-408.
- Kuroyanagi, Y., Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Kubo, T. & Takeuchi, H.** (2010). Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res.* 1323, 33–40.
- Lanoo, M.J., Vischer, H.A. & Maler, L.** (1990). Development of the electrosensory nervous system of *Eigenmannia* (Gymnotiformes): II. The electrosensory lateral line lobe, midbrain, and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 294, 37-58.
- Lasserre, M.** (2014). Evaluación de la capacidad neurogénica adulta en el telencéfalo de *Gymnotus omarorum*. Tesina de grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas.
- Lindsey, B. W. & Tropepe, V.** (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80, 281–307.
- Lisney, T.J., Bennett, M.B. & Collin, S.P.** (2007). Volumetric analysis of sensory brain areas indicates ontogenetic shifts in the relative importance of sensory systems in elasmobranchs. *The raffles bulletin of zoology.* 14, 7-15.

- Lim, D.A., Huang, Y.C. & Alvarez-Buylla, A.** (2008) Adult subventricular zone and olfactory bulb neurogenesis. En: *Adult Neurogenesis*. Eds. Gage, F.H., Kempermann, G. & Song, H. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Llorens-Martín, M., Tejada, G.S. & Trejo, J.L.** (2010). Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *Plos One*. 5(8), 1-15.
- Llorens-Martín, M. & Trejo, J. L.** (2011). Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects. *Front. Neurosci.* 5, 76.
- Ma, D., Ming, G., Gage, F. H., & Song, H.** (2008). Neurogenic niches in the adult mammalian brain. En: *Adult Neurogenesis*. Eds. F. H. Gage, G. Kempermann & H. Song. New York: Oxford University Press. 207–255.
- Maeyama, K. & Nakayasu, H.** (2000). Postembryonic Neurogenesis in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain: Presence of Two Different Systems. *Zoolog. Sci.* 17, 959–966.
- Maler, L., Sas, E., Johnston, S. & Ellis, W.** (1991). An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Chem. Neuroanat.* 4, 1-38.
- Manders, E.M.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., Van Driel, R. & Aten, J.A.** (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labeling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell. Science.* 103, 857-868.
- Maruska, K. P., Carpenter, R. E. & Fernald, R. D.** (2012). Characterization of cell proliferation throughout the brain of the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and its regulation by social status. *J. Comp. Neurol.* 520, 3471–91.
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesel, B., Takamiya, M., Lam, C. S., Kah, O., Bally-Cuif, L. & Strähle, U.** (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia.* 58, 870–88.
- Meek, J. & Nieuwenhuys, R.** (1998). Holosteans and teleosts. En: *The Central Nervous System of Vertebrates*. Eds. R. Nieuwenhuys, H. J. ten Donkelaar & C. Nicholson. Berlin: Springer. 759–938.
- Moller, P.** (1995). *Electric fishes. History and behavior.* Ed. Champan & Hall. Boundary Row, Londres.
- Mueller, T. & Wullimann, M.F.** (2002). BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. *Mechanisms. Devel.* 117, 123-135.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C.** (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 132, 598-611.
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J-S., 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. *J. Comp. Neurol.* 413, 385-404.
- Nieuwenhuys, R.** (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain Behav. Evol.* 73, 229-252.
- Nowakowski, R. & Hayes, N.** (2008). “Numerology of Neurogenesis: Characterizing the Cell Cycle of Neurostem Cells. En: *Adult Neurogenesis*. Eds. F. H. Gage, G. Kempermann & H. Song. New York: Oxford University Press. 7–23.
- Ott, R., Zupanc, G.H.K. & Horschke, I.** (1997). Long-term survival of postembryonically born cells in the cerebellum of gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Neurosci. Letters.* 221, 185-188.

- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M. Marmignon, M.H., Brion, F., Pakdel, F. & Kah, O.** (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 125-167.
- Peterson, D.A.** (1999). Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. *Methods.* 18(4), 493-507.
- Raymond, P. & Easter, S.** (1983). Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I. Location of germinal cells and numbers of neurons produced. *J. Neurosci.* 5, 1077-1091.
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R. & Albert, J. S.** (2009). A New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia.* 538-544.
- Riquelme, P.A., Drapeau, E. & Doetsch, F.** (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363, 123-137.
- Sas, E. Maler, L. & Tinner, B.** (1990). Catecholaminergic systems in the brain of Gymnotiform teleost fish: an immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 292, 127-162.
- Sawada, M., Huang, S., Hirota, Y., Kaneko, N. & Sawamoto, K.** (2011). Neuronal migration in the adult brain. En: Neurogenesis in the Adult Brain I. Eds. T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, and A. Alvarez-Buylla. Tokyo: Springer Japan. 14, 337-353.
- Shumway, C.A.** (2008). Habitat complexity, brain, and behavior. *Brain Behav. Evol.* 72, 123-134.
- Soutschek, J. & Zupanc, G.H.K.** (1996). Apoptosis in the cerebellum of adult teleost fish, *Apterontus leptorhynchus*. *Dev. Brain. Res.* 97, 279-286.
- Strobl-Mazzulla, P. H., Nuñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Kah, O. & Somoza, G. M.** (2010). Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain. Behav. Evol.* 76, 20-31.
- Sullivan, J.M., Benton, J.L., Sandeman, D.C. & Beltz., B.S.** (2007). Adult neurogenesis: A common strategy across diverse species. *J. Comp.Neurol.* 500, 574-584.
- Taupin, P.** (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res. Rev.* 53, 198-214.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J. M. & Doetsch, F.** (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-88.
- Teles, M. C., Sirbulescu, R. F., Wellbrock, U. M., Oliveira, R. F. & Zupanc, G. K. H.** (2012). Adult neurogenesis in the brain of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 198, 427-49.
- Terzibazi, E., Baumgart, M., Battistoni, G. & Cellerino, A.** (2012). Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging cell.* 1-12.
- Vega, C. & Peterson, D.** (2005). Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat. Methods.* 2, 167-170.
- West, M.J.** (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurob. Aging.* 14, 275-285.
- Wilczynski, W.** (1984). Central neural systems subserving a homoplasous periphery. *Amer. Zool.* 24, 755-763.
- Zikopoulos, B. Kentouri, M. & Dermon, C.R.** (2000). Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain. Behav. Evol.* 56, 310-322.

- Zupanc, G. H. K.** (2001). A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. *Brain. Behav. Evol.* 58, 246–9.
- Zupanc, G. K. H.** (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 192, 649–70.
- Zupanc, G.K.H.** (2008). Adult neurogenesis in Teleost Fish. En: Adult Neurogenesis Eds. Gage, F.H., Kempermann, G. & Song, H. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York .
- Zupanc, G. K. H.** (2011). Adult Neurogenesis in Teleost Fish. En: Neurogenesis in the Adult Brain I. Eds. T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, and A. Alvarez-Buylla. Tokyo: Springer Japan. 137–168.
- Zupanc, G. K. H. & Clint, S.C.** (2003). Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleosts fish. *Glia.* 43, 77-86.
- Zupanc, G. K. H., Hinsch, K. & Gage, F. H.** (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* 488, 290–319.
- Zupanc, G. & Horschke, I.** (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353, 213–33.
- Zupanc, G.H.K., Horschke, I., Ott, R. & Rascher, G.B.** (1996). Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *J. Comp. Neurol.* 370, 443-464.
- Zupanc, G.H.K. & Sirbulescu, R.F.** (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Euro. J. Neurosci.* 34, 917-929.
- Zupanc, G.H.K. & Zupanc, M.M.** (1992). Birth and migration of neurons in the centralposterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia* sp). *PNAS.* 89, 9539-9543.

Anexo I: Versión final del manuscrito enviado a la revista *Frontiers in Neuroanatomy*

Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*

Valentina Olivera-Pasilio, Daniel A Peterson and María Esmeralda Castelló

Journal Name:	Frontiers in Neuroanatomy
ISSN:	1662-5129
Article type:	Original Research Article
First received on:	12 May 2014
Revised on:	04 Aug 2014
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

1. Introduction

In contrast to mammals, the adult central nervous system of teleosts exhibits a widespread distribution of proliferation zones with high neurogenic potential (Lindsey and Tropepe, 2006; Chapouton et al., 2007; Sullivan and Benton, 2007; Kaslin et al., 2008; Grandel and Brand, 2013). Neurogenesis is a process which involves cell proliferation, migration to target brain areas and differentiation into new neurons (Nowakowski and Hayes, 2008). Whereas in adult mammals *in vivo* neurogenesis occurs in two brain regions, the subventricular zone of the lateral ventricle (SVZ) and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (Altman and Das, 1965; Altman, 1969, 2011), in adult teleosts it occurs not only in their homologous structures but also in several other regions of all brain divisions (Lindsey and Tropepe, 2006; Zupanc, 2006, 2008; Chapouton et al., 2007; Kaslin et al., 2008; Grandel and Brand, 2013). Among teleosts, adult cell proliferation and neurogenesis have been thoroughly characterized in wave type weakly electric gymnotids, particularly in *Apteronotus leptorhynchus* [*A. leptorhynchus*: (Zupanc and Horschke, 1996; Zupanc et al., 1996; Zupanc, 2001; Hinsch and Zupanc, 2006); *Eigenmannia sp.*: (Zupanc and Zupanc, 1992); and *Brachyhyppopomus gauderio*: (Dunlap et al., 2011)]. The spatial distribution of brain proliferation zones in adult wave type weakly electric gymnotids roughly resembles that of other teleosts [*Astatotilapia burtoni* (Maruska et al., 2012); *Austrolebias* (Fernández et al., 2011); *Carassius auratus* (Raymond and Easter, 1983; Delgado and Schmachtenberg, 2011); *Danio rerio* (Maeyama and Nakayasu, 2000; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Ampatzis and Dermon, 2007; Kaslin et al., 2009; Ito et al., 2010; März et al., 2010; Zupanc, 2011); *Gasterosteus aculeatus* (Ekström et al., 2001); *Nothobranchius furzeri* (Tozzini et al., 2012); *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al., 2010); *Oreochromis mossambicus* (Teles et al., 2012); *Oryzias latipes* (Nguyen et al., 1999; Candal et al., 2005a; Alunni et al., 2010; Kuroyanagi et al., 2010; Isoe et al., 2012) and *Salmo trutta fario* (Candal et al., 2005b)], despite the phylogenetic distance to most of those species. However, differences have been observed that were attributed to the functional specialization of weakly electric fish (Zupanc and Horschke, 1995; Grandel et al., 2006; Grandel and Brand, 2013).

The brain of the pulse type weakly electric gymnotid *Gymnotus omarorum* also shows a widespread distribution of proliferation zones in late larvae (Iribarne and Castelló, 2014) and juveniles (Castelló and Iribarne, 2010) as evidenced by short chase of 5' bromodeoxyuridine (BrdU), but the distribution of brain proliferation zones remains unexplored in adults. In late larvae and juveniles, brain regions involved in electrosensory processing show particular proliferation zones, either adjacent to the ventricular-cisternal system, for example the torus semicircularis (TS) and the tectum opticum (TeO), or distant from it [the electrosensory lateral line lobe (ELL) and the cerebellum (Cb)]. Mesencephalic and rombencephalic structures differ in their relative growth along postnatal development (Iribarne and Castelló, 2014), suggesting differences in the cellular composition, cell population dynamics, and/or neurogenic potential of their proliferation zones as occurs in mammals (Hermann et al., 2009).

Our objective was to characterize adult brain proliferation zones in *G. omarorum*. Here we show the qualitative distribution of adult *G. omarorum*'s brain proliferation zones and provide evidence for a new adult brain proliferation zone at the lateral-caudal border of the ELL. We analyzed the cellular composition of brain proliferation zones by means of a double thymidine analog labeling technique (Vega and Peterson, 2005).

All brain proliferation zones showed a heterogeneous cellular composition. Within the boundaries of all brain proliferation zones, we found abundant fast cycling proliferating cells and sparse slow cycling proliferating cells that probably correspond to amplifying progenitor and stem cells,

46 respectively. Beyond the borders of brain proliferation zones, we also found long term weak
47 thymidine analog label retaining cells that likely correspond to migrating newborn neural cells. Our
48 results provide further evidences of conserved features of adult teleosts brain proliferation and form
49 the basis for further analysis of survival and differentiation of newly-generated cells, as well as for
50 the characterization of *G. omarorum* brain proliferation zones milieu throughout postnatal
51 development. These findings contribute to understand the features that preserve adult neurogenic
52 potential and subserve the continuous growth and high regenerative potential of teleosts brain. By
53 providing this cytoarchitectural framework, we hope to facilitate future studies to elucidate the
54 factors that modulate adult neurogenesis in amniotes.

55 2. Materials and methods

56 2.1. Animals

57 Seventeen adult specimens of *G. omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) consisting of 11 females
58 and 6 males (weight: 18.51 ± 10.2 ; length: 17.66 ± 4.03 cm) were collected from Laguna del Cisne,
59 Uruguay (latitude $35^{\circ}50'$ S, longitude $55^{\circ}08'$ W). Animals were kept in individual tanks on a 12 h:12
60 h light:dark cycle and daily fed with *Tubifex tubifex*. Water conductivity was adjusted to 200 μ S and
61 temperature maintained at 24°C .

62 For intraperitoneal administration of drugs, fish were first anesthetized by immersion in ethyl 3-
63 aminobenzoate methanesulfonate salt (MS-222, 120 mg/L Sigma, #A5040). For transcardial
64 perfusion of fixative, fish were deeply anesthetized by immersion in MS-222 (500 mg/L) followed by
65 gill perfusion of the same anesthetic solution.

66 All procedures were performed in accordance to the guidelines of CHEA (Comisión Honoraria de
67 Experimentación Animal, ordinance number: 4332-99, Universidad de la República). Experiments
68 were approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biológicas
69 Clemente Estable (protocol number 010/09/2011).

70 2.2. Thymidine analogs preparation and administration

71 The use of thymidine analogs has long been the most common tool for the study of cell proliferation,
72 particularly within the nervous system (Gratzner, 1982; Taupin, 2007; Altman, 2011). More recently,
73 the administration of two thymidine analogs discriminated by way of specific primary antibodies,
74 along with experimental modification of the temporal windows between analogs administration
75 (Vega and Peterson, 2005; Llorens-Martín and Trejo, 2011), has advanced the discrimination of
76 proliferating cell subpopulations in the brains of amniotes (Vega and Peterson, 2005; Llorens-Martín
77 et al., 2010), anamniotes (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) and invertebrates (Sullivan and
78 Benton, 2007). To characterize the distribution and cellular composition of brain proliferation zones
79 in adult *G. omarorum*, two thymidine analogs, 5' chlorodeoxyuridine (CldU; Sigma, #C-6891) and 5'
80 iododeoxyuridine (IdU; MP Biomedicals, #100357) were administered according to two protocols
81 (Vega and Peterson, 2005; Alunni et al., 2010). Equimolar solutions of CldU (2.3 mg/ml) and IdU
82 (1.7 mg/ml) dissolved in 0.7% NaCl and 0.7% NaCl containing 0.04N NaOH, respectively, were
83 administered i.p. at 25 μ l/g. Each thymidine analog was given in a single injection. Thymidine
84 analogs were sequentially administered with short (24h, Protocol 1) or long (30d, Protocol 2) chase
85 between them. Animals were fixed after survival of 4h (Protocol 1) or 24h (Protocol 2) following the
86 last thymidine analog administration.

87 2.3. Fixation and immunohistochemistry

88 Animals were fixed by transcardial perfusion of 10% paraformaldehyde (PAF) dissolved in
89 phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 (PB) preceded by saline perfusion to wash blood out from the
90 circulatory system. Brains were dissected out and postfixed in the same fixative for 24h at 4°C. After
91 embedding in a gelatin/albumin mixture denatured with glutaraldehyde, frontal serial sections (60
92 µm) were obtained with a vibratome (Leica VT1000S, Wetzlar, Germany).

93 In order to expose the proliferation markers, tissue sections were pretreated to break double-stranded
94 DNA into single strands, by incubation in 2 N HCl in PB containing 0.3 % Triton X-100 (PB-T) for
95 50 min. After rinsing in PB (3 x 10 min), sections were incubated overnight at 4°C in both rat anti
96 BrdU-CldU (AbD Serotec Cat# OBT0030, RRID:AB_609568; clone BU1/75; ICR1) and mouse anti
97 BrdU-IdU (BD Biosciences Cat# 347580, RRID:AB_400326, Clone B44) at a dilution of 1:500 (in
98 PB-T). Subsequently, sections were rinsed in PB (3 x 10 min) and incubated in donkey anti rat
99 biotinylated secondary antibody at 1:500 (Jackson Immuno Research, # 712-065-153) in PBS-T for
100 1h. After that, sections were rinsed 3 times in PB and incubated in a mixture of streptavidin Cy3 at
101 1:500 (Jackson, Cat#016-160-084) and donkey anti mouse Alexa 488 at 1:500 [Molecular Probes
102 (Invitrogen) Cat# A21202, RRID:AB_141607] in PB-T for 90 min. After rinsing in PB (3 x 10 min),
103 sections were mounted in PVA-DABCO coverslipping solution for immunofluorescence. Negative
104 controls included omission of thymidine analog administration or omission of primary antibody
105 incubation; both controls resulted in no detectable staining (data not shown).

106 2.4. Antibody Characterization

107 The mouse monoclonal anti-BrdU antibody, Clone B44, was first obtained by immunization of mice
108 with IdU (Gratzner, 1982). The author proved that this antibody binds with high specificity with
109 BrdU and IdU, does not cross-react with thymidine, and is useful to detect BrdU incorporated into
110 the DNA of individual cells due to DNA replication. The rat anti-BrdU antibody, Clone BU1/75
111 (ICR1) binds with BrdU and CldU but not with IdU (Bakker et al., 1991; Aten et al., 1992). More
112 recently, Vega and Peterson (2005) found that the mouse anti-BrdU antibody, but not the rat anti-
113 BrdU monoclonal antibody detects IdU in tissue samples from animals exposed to this thymidine
114 analog. On the other hand, the rat anti-BrdU antibody, but not the mouse anti-BrdU monoclonal
115 antibody, detects CldU in tissue samples from animals exposed to this thymidine analog (Vega and
116 Peterson, 2005). Cross reactivity of primary antibodies with the thymidine analogs was tested by
117 incubation of sections of CldU only and IdU only treated animals with anti-IdU or anti-CldU
118 antibodies, respectively (followed by incubation in the corresponding secondary antibodies;
119 Supplementary figure 1).

120 2.5. Image acquisition and processing

121 Sections were imaged on a confocal system (Olympus BX61 microscope equipped with a FV300
122 confocal module and four lines of excitation: 405 nm, 488 nm, 543 nm and 633 nm). Acquisition
123 settings were adjusted in order to ensure the use of the whole dynamic range of detection. Images
124 correspond to 30 confocal planes that were sequentially scanned every 1 µm, and projected to one
125 plane. If needed, post-acquisition modifications were limited to small changes in the distribution
126 histogram to achieve full use of the dynamic range. Co-expression of markers was confirmed by
127 orthogonal projections in the X-Z and Y-Z planes.

128 2.6. Mapping Qualitative Distribution

129 For mapping the spatial distribution of brain proliferation zones we obtained low power images of
130 coronal sections (every 700 μm) stained with the Nissl technique. Briefly, brain serial sections were
131 mounted on gelatine-coated slides, dried at room temperature and stained with 1% methylene blue.
132 After dehydration in an ethanol series, the preparations were cleared in xylene and permanently
133 mounted with Canada balsam. A dissecting microscope (AmScope, Irvine, CA, USA) equipped with
134 a digital camera (DCM130, LabOptix, Sale, U.K.) was used to acquire 2-D images of all selected
135 sections. A schematic diagram of each section was drawn using Inkscape, and the location of actively
136 cells cycling (4 and 24h after thymidine analog administration) and long term weak thymidine
137 analog label retaining cells were represented by red and blue dots, respectively. The nomenclature
138 and abbreviations used in this article to describe the location of brain proliferation zones in *G.*
139 *omarorum* correspond to those used by Maler et al. (1991), Zupanc et al., (1996) and Meek and
140 Nieuwenhuys (1998).

141

142 3. Results

143 3.1. General characteristics of nuclear labeling and methodological considerations

144 Two main types of nuclear labeling were found with both thymidine analogs, IdU and CIdU,
145 irrespective of the duration of the chase and the survival period after analog administration. Some
146 nuclei showed homogeneous labeling while others presented granular staining. In both cases, the
147 intensity of the labeling usually decreased with the duration of the post thymidine analog
148 administration survival. Nevertheless, few cells remained intensely stained in spite of a long post
149 thymidine analog survival. Both thymidine analogs stained similarly in double labeled nuclei, either
150 granular or smooth. However, some double labeled nuclei showed homogeneous labeling of the first
151 thymidine analog and granular labeling of the second (Figure 1). The shape of labeled nuclei also
152 differed within and among proliferation zones, and as a function of post thymidine analog survival.
153 Nuclei located within the boundaries of the proliferation zones were generally round to ovoid at short
154 survivals and ovoid to rod-like at long survivals, in frontal sections, (Figure 1). Besides, nuclei were
155 round to ovoid within some proliferation zones and elongated to rod-like within others, regardless of
156 the survival exposure. The nuclei of most cells that appeared to have already migrated out of the
157 proliferation zones were round and presented granular and weak staining, as reported in other
158 teleosts.

159 Variations in the texture of nuclear staining (diffuse vs grainy) might correspond to exposure to the
160 thymidine analogs during early or late periods of the S-phase, as evidenced by confocal (Manders et
161 al., 1992) and electron microscopy (Jaunin et al., 1998). In turn, variability in nuclear labeling
162 intensity can be attributed to differences in the duration of thymidine analog exposure, the timing of
163 analog exposure within the S-phase period (late S-phase exposure produces brighter labeling;
164 Manders et al., 1992), and/or the duration of the cell cycle and the resultant amount of cell divisions
165 between thymidine analog administration and animal fixation (labeling intensity decreases with
166 subsequent cell divisions by replacement of exogenous thymidine analogs by endogenous thymidine;
167 Zupanc et al., 2005; Alunni et al., 2010). Thus, proliferating cells with short cell cycles and hence
168 high proliferative activity would show weaker label retaining than cells with long cell cycles or under
169 a “wait” or quiescent state (Zupanc and Zupanc, 1992; Alunni et al., 2010). Variations in nuclear
170 shape in frontal sections may be related to different states of the cells, as for example the rod-like

171 nuclear shape of migrating newborn cells, and the round shape of already migrated nuclei (*D. rerio*:
172 Zupanc et al., 2005; *O. latipes*: Alunni et al., 2010). Note that even though many nuclei had a
173 circular shape in frontal sections, their three-dimensional shape was ellipsoidal or rod-like in some
174 cases, and spherical in others, as evidenced by orthogonal projections (Figures 1C,D, respectively).

175 3.2. Cellular composition of brain proliferation zones

176 Double immunohistochemical demonstration of IdU and CldU revealed three populations of
177 proliferative cells, reflecting DNA replication in the presence of only one or both thymidine analogs,
178 independently of the chase duration (Fig. 1). Thus, single labeling demonstrated cells that were
179 cycling at the moment of each analog administration (*actively cycling cells*), whereas double labeling
180 evidenced cells that were cycling at the moment when each analog was administered, thus detecting
181 cells that had reentered cell cycle (Nowakowski et al., 2002; Vega and Peterson, 2005; Kempermann,
182 2006; Llorens-Martín and Trejo, 2011). The use of two chase durations (short and long; Protocols 1
183 and 2, respectively) allowed us to further discriminate between proliferating cell types, based on the
184 following criteria: a) the labeling of the nucleus with both or only one thymidine analog (as indicator
185 that the cell had or had not reenter the cell cycle, b) the duration period of inter-thymidine analog
186 administration, or post thymidine analog survival, c) the location of the nucleus (within or out of the
187 proliferation zone), and d) the intensity of the labeling (intense or weak). Considering these criteria,
188 we identified at least four cell types: 1) Cells that reenter the cell cycle after a short chase, indicating
189 short cell cycle duration and thus correspond to *fast cycling cells* (yellow arrows, Figure 1A). 2) Cells
190 that reentered the cell cycle after a long chase, indicating long cell cycle duration and thus were
191 considered *slow cycling cells* (yellow arrows, Figure 1B). 3) Cells that intensely retained the first
192 thymidine analog after a long chase but did not incorporate the second thymidine analog, and
193 remained within the boundaries of the proliferation zone (*long term intense thymidine analog label*
194 *retaining cells*). These characteristics indicate that the cells did not divide or divided rarely after
195 incorporating the first thymidine analog, and did not divide at the moment of the second thymidine
196 analog administration. 4) Cells that faintly retained the first thymidine analog after a long chase (*long*
197 *term weak thymidine analog label retaining cells*), indicating that had cycled at the moment of the
198 first thymidine analog administration, divided several times after that, but did not divide at the
199 moment of the second thymidine analog administration. Cells of this type were usually found at
200 diverse distances from the boundaries of the proliferation zones, evidencing that have already
201 undergone a process of out-migration from the proliferation zones on other brain zones or subzones
202 (arrowheads, Figure 1B). Nonetheless, some long term weak thymidine analog label retaining cells
203 remain within the proliferation zones.

204 3.3. Spatial distribution of adult brain proliferation zones

205 To depict the spatial distribution of *G. omarorum* brain proliferation zones, we analyzed the
206 localization of actively cycling cells after two short post analog administration survivals: 4h after IdU
207 (Protocol 1) and 24h after CldU (Protocol 2). The distribution of proliferating cells in the brain of
208 adult *G. omarorum* was uneven. Most labeled nuclei were found scattered in the midst of the gray
209 matter throughout the whole brain; some nuclei were located within the white matter and others
210 adjacent to the walls of blood vessels. Over this background, we identified several particular well-
211 defined zones of brain tissue populated by densely packed proliferating cells (Figure 2) that, in
212 agreement with descriptions of proliferation zones in *A. leptorhynchus* by Zupanc and Horschke
213 (1995) conformed brain proliferation zones. As shown in Figures 1A,C, the location and extent of the
214 proliferation zones did not appear to differ between post administration survivals of 4 and 24h,
215 validating the use of both groups of results.

216 Brain proliferation zones were found at two main locations: either at the lining and subventricular
217 zones of the ventricular-cisternal system (ventricular proliferation zones) or distant from the
218 ventricular-cisternal system (extraventricular proliferation zones; Zupanc and Horschke, 1995;
219 Ekström et al., 2001). Ventricular proliferation zones were found all along the rostral-caudal
220 extension of the brain (Figure 2). The most striking extraventricular proliferation zones were found in
221 all divisions of the cerebellum (Cb, Figures 2E-I). Another extraventricular proliferation zone was
222 found at the most caudal portion of the lateral border of the ELL (Figure 2J). In other brain regions,
223 such as the TeO and TS, actively cycling cells were found in zones that appear distant from the
224 ventricular-cisternal system, but correspond to zones that were adjacent to the ventricles during
225 development and thus are considered as remnants of ventricular proliferation zones (Figures 2F,G;
226 Zupanc and Horschke, 1995; Hinsch and Zupanc, 2007; Zupanc, 2011).

227 3.3.1. Telencephalic proliferation zones

228 Similar to other vertebrates and teleosts, the telencephalon of *G. omarorum* comprises the paired
229 olfactory bulbs (OB), the cerebral hemispheres (comprising a dorsolateral pallium and a ventromedial
230 subpallium), and the caudal telencephalon impar (Nieuwenhuys, 2009). Regardless of the double
231 thymidine labeling protocol used, only sparse proliferating cells were found near the free surface of
232 the rostral and intermediate regions of the OB and did not appear to conform a clear proliferation
233 zone (Figures 2A,3A,B,B'). Conversely, in the intermediate portion of the OB, proliferating cells
234 were grouped at its dorso-medial region, populating the lining of the most rostral portion of the
235 telencephalic ventricle, forming a clear proliferation zone (Figure 2A). In frontal sections, labeled
236 cells showed round to ovoid nuclei (data not shown).

237 The telencephalic hemispheres are solid and comprise two subdivisions, the subpallium or ventral
238 telencephalon (formed by four regions: dorsal -Vd-, nother -Vn-, posterior -Vp-, and ventral -Vv;
239 Figures 2B,C,3A-D,B'-D') and the pallium or dorsal telencephalon (formed by five regions: medial,
240 dorsal, central, lateral (DL), and posterior; Figures 2A-C, 3A-D). DL is in turn sub-divided in dorsal,
241 posterior, and ventral regions. Telencephalic labeled cells were contained in two ventricular
242 proliferation zones, one facing all regions of the dorsal everted telencephalon (proliferation zone *1a*,
243 Figures 2A-C, 3) and another facing all regions of the ventral telencephalon (proliferation zone *1b*,
244 Figures 2B,C, 3). No clear boundaries were found either between the proliferation zone of the
245 intermediate OB and proliferation zone *1b*, or between proliferation zone *1a* and proliferation zone
246 *1b*.

247 The nuclei of proliferating cells adjacent to DD and DL were round to ovoid and sparsely distributed,
248 while those adjacent to DM were round and densely packed (Fig. 3B'). Most labeled nuclei of
249 proliferation zone *1b* were elongated, densely packed, and frequently aligned, either perpendicularly
250 or obliquely with respect to the ventricle surface. This arrangement resembles the appearance of
251 migrating cells (green and red double arrowheads in Figures 3A',B'). The extent of proliferation zone
252 *1b* did not change with the duration of the post thymidine survival from 4 to 24h, as evidenced by the
253 overlapped distribution of CldU⁺ and IdU⁺ nuclei using Protocol 1 (Figure 3A'). These indicate that a
254 migration process is already occurring 24h after CldU administration, but the duration was
255 insufficient for derived cells to migrate out of the proliferation zone *1b* boundaries.

256 Both telencephalic ventricular proliferation zones showed a heterogeneous cellular composition. A
257 short chase between analogs (Protocol 1, chase = 24 h) revealed double labeled nuclei of fast cycling
258 cells (yellow arrows in Figures 3A',A'') as well as actively cycling cells at the moment of each
259 analog administration (CldU⁺ and IdU⁺: red and green arrows respectively in Figure 3A'). A long

260 chase (Protocol 2) revealed rare double labeled nuclei of slow cycling cells (yellow arrows in Figures
261 3B',D') confirmed by orthogonal projections (Figures 3B'',D''), and few long term intense
262 thymidine analog label retaining cells that remain within the proliferation zones (filled green arrow in
263 Figures 3B', C').

264 3.3.2. Diencephalic proliferation zones

265 The diencephalon, flanked by the telencephalon and mesencephalon, includes the epithalamus, dorsal
266 and ventral thalamus, and hypothalamus. According to Meek and Nieuwenhuys (1998) it also
267 comprises the preoptic region and the synencephalic/pretectal region, despite their possible extra-
268 diencephalic origin.

269 The rostralmost diencephalic proliferation zone in *G. omarorum* was found at the level of the
270 preoptic region (Figure 2C). This proliferation zone surrounded the preoptic recess of the
271 diencephalic ventricle, extending from the anterior commissure to the optic chiasm and thus facing
272 the anterior (PPa, Figures 2C, 4A,B) and posterior subdivisions of the nucleus preopticus
273 periventricularis, and the suprachiasmatic nucleus (Sc; Figures 4C,D). Other diencephalic ventricular
274 proliferation zones faced the pretectal nucleus A (A, Figure 2D) and the epithalamic habenula
275 (Figures 2D, 4C',D'), the dorsomedial thalamus and the diencephalic central-posterior nucleus (CP,
276 Figures. 2E, 4E',F') located medial to the prepacemaker nucleus (Figure 2E). Ventral to these
277 regions, ventricular proliferation zones also faced, from rostral to caudal, the thalamus, the nucleus
278 posterioris periventricularis and the periventricular nucleus of the posterior tuberculum (Figure 2E).
279 An extended ventricular proliferation zone was found all along the walls of the hypothalamic
280 ventricle, facing the hypothalamus anterioris (Figures. 2D, 4C',D'), dorsalis (Figures 4E',F')
281 ventralis (Figures 2E, 4F'), lateralis (Figure 2E) and caudalis.

282 The appearance of labeled nuclei and spatial organization of proliferating cells varied between rostral
283 (preoptic, Figures 4A,B), intermediate (epithalamic-thalamic, Figures 4C,D) and caudal (thalamic-
284 hypothalamic, Figures 4E,F) regions of the diencephalic ventricular proliferation zones. Densely
285 packed, rounded to ovoid nuclei populated the whole width of the ventricular lining along the entire
286 rostral-caudal extension of the ventricular recess surrounded by the preoptic region (Figures 4A,B).
287 The hypothalamic proliferation zones (Figures 4E,F) were characterized by densely packed
288 proliferating cells that covered most of the extension of the ventricular lining. Conversely, at the
289 intermediate part of the diencephalon, proliferating cells were less abundant and distributed in a
290 patchy fashion.

291 Proliferating cells of the preoptic ventricular proliferation zone were round or ovoid and placed at
292 varying distances from the preoptic recess' ventricular surface, a disposition that contributed to a
293 pseudostratified appearance of the ventricular proliferation zone (Figures 4A,B). A short chase
294 between thymidine analogs (24 h, Protocol 1) revealed the relative abundance of fast cycling cells
295 (yellow arrows in Figures 4A',A'') homogeneously distributed among actively cycling cells (red and
296 green arrows in Figure 4A'). Conversely, a long chase (1 month, Protocol 2) evidenced scarce slow
297 cycling cells (yellow arrows in Figures 4B',B'').

298 Proliferating cells were rare at the intermediate portion of the diencephalic ventricle (Figures 4C,D),
299 with the exception of the lining of the lateral recess of the diencephalic ventricle that separates the
300 habenula from the hypothalamus anterioris (arrowheads in Figures 4C',D'). At that location, there
301 was an evident wedge-like thickening of the ventricular lining, populated by a small cluster of
302 proliferating cells with elongated nuclei (Figures 4C',D'). The cellular composition of this

303 ventricular proliferation zone appeared different from other ventricular proliferation zones as neither
304 Protocol 1 (Figure 4C') nor Protocol 2 (Figure 4D') identified cells reentering the cell cycle after a
305 short or long chase.

306 An outstanding dorsal thalamic proliferation zone was evident at the ventricular lining facing the
307 central posterior/prepacemaker nucleus complex (Figures 4 E',E'',F',F''), and the periventricular
308 nucleus of the posterior tuberculum (Figures 4 E',E'',F',F''). This proliferation zone consisted of two
309 to four sets of proliferating cells aligned parallel to the ventricular surface, including abundant fast
310 cycling cells intermingled with actively proliferating cells (Protocol 1, either CldU or IdU labeled,
311 Figures 4E',E'') and few slow cycling cells (Figure 4F',F''). All proliferating cells showed round or
312 elongated nuclei, whose main axis was perpendicular to the ventricular surface. At the same rostral-
313 caudal brain level, a noteworthy proliferation zone populated both the dorsal and the ventral rims of
314 the lateral recess of the hypothalamic ventricle (Figures 4E',E'',F') facing the hypothalamus dorsalis
315 and the nucleus tuberis anterior, respectively. This proliferation zone also showed abundant fast
316 cycling cells (yellow arrows in Figures 4E',E'') intermingled with actively proliferating cells (red
317 and green arrows (Figures 4E',E'').

318 3.3.3. Mesencephalic proliferation zones

319 The mesencephalon comprises a dorsal midbrain roof, including the TeO and torus longitudinalis
320 (TL), a ventrolateral TS, and a ventromedial tegmentum (Meek and Nieuwenhuys, 1998). All these
321 brain regions presented particular proliferation zones in *G. omarorum*.

322 The TeO is a cortical paired structure that covers most of the dorsal and lateral aspects of the
323 mesencephalon. Both TeO converge at their rostral pole where they are interconnected by the tectal
324 commissure (cT). The rostral portion of cT stands perpendicular to the main brain axis, parallel to the
325 frontal plane, between the rostral poles of both TeO (Figures 5A,B); caudally, cT undergoes an
326 almost 90 degree rotation so that it becomes flattened in the dorsal-ventral direction. A noticeable
327 proliferation zone was evident at each border between the rostral portion of cT and the medial edge
328 of the rostral pole of the TeO (Figures 5A,B). A short chase between thymidine analogs (Protocol 1,
329 Figure 5A) revealed the relative abundance of fast cycling cells (yellow arrows) intermingled with
330 actively cycling cells at the moment of CldU (red arrows) and IdU (green arrows) administration. A
331 long chase (Protocol 2) revealed scarce slow cycling cells (yellow arrow, Figure 5B). In each TeO we
332 found a single horseshoe-shaped proliferation zone. Thus, in frontal sections the tectal proliferation
333 zone looked as if it was formed by three independent proliferation zones, one at the narrow, dorso-
334 medial border (Figures 2E-G; 5C- E), another at the blunt, ventro-lateral border (Figures 2E-G,
335 5C,D,F), and a third at the caudal pole of each TeO (Figure 5G). The tectal area diminished in the
336 rostral-caudal direction, while the sectional area of the dorso-medial and ventro-lateral regions of the
337 tectal proliferation zone enlarged. Thus, dorso-medial and ventro-lateral regions of tectal
338 proliferation zone approach each other to coalesce at the caudal pole of TeO (Figure 5H).
339 Proliferating cells were extended across the whole arc of the TeO caudal pole (Figure 5G). In all the
340 extension of the tectal proliferation zone, proliferating cells occupied almost all TeO layers. As
341 evidenced by Protocol 1, fast cycling cells were abundant (Figure 5C; yellow arrows, in Figures
342 5D',E') and distributed among actively cycling cells (red and green arrows in Figures
343 5E',F',5E'',F''). Conversely, slow cycling cells were very rare.

344 The TL, also a paired structure, lies at each side of the midline, underneath the horizontal portion of
345 cT. TL is populated by densely packed granule cells that project to the ipsilateral superficial stratum
346 marginale of the TeO; comprising a cerebellum-like circuit (Meek and Nieuwenhuys, 1998; Bell,

347 2002). A single-cell width proliferation zone covered the ventral ventricular surface of the TL (Figure
348 2E) all along its rostral-caudal extension, facing the obliterated mesencephalic ventricle (Figure 2E).

349 The TS is a prominent layered structure of the ventro-lateral tegmentum whose growth obliterates the
350 mesencephalic ventricle in *Gymnotus*. We also found a proliferation zone at the medial-ventral and
351 lateral-dorsal border of the TS (asterisks in Figures 5C',D',F,H), also converging at the caudal end of
352 the TS (Figures 5H, H'). Note that, at the caudal pole of TeO and TS, both proliferation zones appear
353 to be contiguous (Figures 5G,H). The cellular composition of TS proliferation zone was similar to
354 that of TeO proliferation zone as it contained a high proportion of fast cycling cells and few slow
355 cycling cells (yellow arrow in Figure 5H').

356 3.3.4. Rombencephalic proliferation zones

357 The rombencephalon comprises a ventral, basal plate-derived motor zone, an intermediate visceral
358 zone, and a dorsal alar plate-derived zone. The latter includes, rostrally, the cerebellum (Cb) and
359 caudally, the somatosensory zone. The somatosensory zone consists of a general somatosensory
360 trigeminal nucleus and a specialized somatosensory nucleus. In *G. omarorum*, like other weakly
361 electric gymnotids, the rombencephalon is dominated by the specialized lateral line region,
362 particularly the mechanosensory medial octavolateral nuclei and the ELL (Figures 2H-J). The Cb is
363 formed by three main regions: a caudal or vestibule-lateral lobe, a central corpus (CCb, Figures 2E-
364 G), and a rostral valvula cerebelli (VCb, Figure 2F), protruding into, and almost occluding, the
365 midbrain ventricle. The vestibule-lateral lobe of Cb consists of a caudal lobe and two granular
366 eminences, one anterior (Figure 2G) and another posterior, in turn subdivided into a medial granular
367 eminence (Egm, Figures 2G,H) and a lateral-posterior granular eminence (Egp, Figures 2H,I) (Meek
368 and Nieuwenhuys, 1998).

369 An extended ventricular proliferation zone was localized along all the extension of the lining of the
370 narrowed fourth ventricle and the cerebello-medullary cisternal system in adult *G. omarorum*
371 (Figures 2G-J). In addition, extraventricular proliferation zones were found in the Cb (Figures 2E-I,
372 6, 7) and the ELL (Figures 2H-J; 8). The cerebellar extraventricular proliferation zone was the most
373 extended and densely populated proliferation zone of *G. omarorum* brain. Each Cb division has its
374 own proliferation zone. In the CCb, (Figures 2E-G, 6A,B,D,E) and the VCb (Figures 2F, 6C,E) the
375 proliferation zones were circumscribed to the molecular layers. In both cases, the cellular density
376 decreased in medial-lateral direction. Conversely, in the caudal lobe of the Cb, the proliferation zone
377 was restricted to the granular layer of EGm, (EGm-gra, Figures 2G-I, 7). The EGp-gra, and the
378 molecular layer of both EGm and EGp were almost devoid of proliferating cells. At the caudal pole
379 of EGm, proliferating cells were aligned almost parallel to the brain surface. More rostrally, where
380 the molecular layer widens and the brain expands in the dorsal-ventral direction, a band of
381 proliferating cells could be observed extending along the midline from the dorsal edge of the EGm-
382 gra up to the dorsal brain surface. Close to the brain surface, the proliferation zone expands in
383 medial-lateral direction and thus acquires a triangular shape in frontal sections (Figure 2H). In all
384 cerebellar divisions, the distribution of proliferating cells was homogeneous as evidenced both in
385 frontal (Figs. 6, 7B, E) and parasagittal sections (data not shown).

386 The ELL is a layered, cerebellum-like structure (Bell, 2002) that protrudes from the dorsal surface of
387 the medulla, at each side and below the caudal lobe of Cb from which it is separated by a cistern (C,
388 Figures 2I,J). The primary afferents that innervate cutaneous electroreceptors project somatotopically
389 onto deeper layers of the ELL and contact secondary neurons; ELL principal cells project to the
390 magnocellular mesencephalic nucleus or mesencephalic TS which projects back to the ELL, directly

391 or via the Cb. ELL proliferating cells were sparse and usually aligned with the boundaries between
392 ELL layers (Figures 2I,J, arrows in Figure 8A) or grouped at the border between ELL segments
393 (straight dotted line in Figure 8A). At the caudal pole of the ELL, proliferating cells appear to be
394 more abundant near the lateral edge of the boundary between the principal cell layer (PCL) and the
395 molecular layer (mol). Thus, this proliferation zone usually appeared wedged-shaped in frontal
396 sections (region between curved dotted lines in Figures 8B,C). At the same rostral-caudal level, a
397 small number of proliferating cells were found in the ventral zone of the medulla, including the
398 electromotor bulbar nucleus but did not appear to constitute a proliferation zone.

399

400 3.4. Distribution of long term thymidine analog label retaining, newborn brain cells

401 As mentioned in section 3.2., the use of a double labeling protocol with a long chase between
402 thymidine analogs' administrations (Protocol 2; chase 30d) allowed us to reveal the location of long
403 term thymidine analog label retaining cells in the brain of adult *G. omarorum*. Among this cell type,
404 few nuclei corresponded to long term intense thymidine analog label retaining cells that remained
405 within the proliferation zones, while the majority presented the characteristics of long term weak
406 thymidine analog label retaining cells that already traversed the proliferation zones limits. Thus, their
407 distribution evidenced the likely migration of newborn cells.

408 Unlike short post thymidine survivals, 30 days after thymidine analog administration several long
409 term weak thymidine analog label retaining cells appeared within the OB, mainly at the internal cell
410 layer (ICL) of both its intermediate (blue dots, Figure 2A) and rostral regions (not shown). Long term
411 weak thymidine analog label retaining cells were frequent within the subpallium, lateral to the
412 boundaries of the proliferation zone *1b*, and extending throughout adjacent Vd and Vv (blue dots,
413 Figure 2B; double green arrowheads, Figures 3B-D). Contrarily, long term weak thymidine analog
414 label retaining cells were rare throughout the pallium (DM, DD, DL or DC) as mostly remained
415 within the proliferation zone *1a* (3B', B'') intermingled with actively cycling cells.

416 Within the rostral diencephalon, the long chase duration appeared to be sufficient for most long term
417 weak thymidine analog retaining cells to migrate out the proliferation zone; only few cells remained
418 within or near the ventral portion of the PPa after a chase of 30 d (blue dots, Figure 2C; green double
419 arrow heads, Figure 4B'). Conversely, in the caudal diencephalon, actively cycling cells were clearly
420 segregated from long term weak thymidine analog retaining cells which appeared to have migrated
421 from the dorsal to the ventral rim of the lateral recess of the hypothalamic ventricle (Figure 2E; green
422 double arrow heads, Figure 4F').

423 After 30 days of survival, long term weak thymidine analog retaining cells were rare throughout the
424 mesencephalic TS and the TeO. At the rostral-most pole of the TeO, long term weak label retaining
425 proliferating cells remained within cT proliferation zone, while others (Figure 2D; double green
426 arrow heads, Fig 5B') already dislodge from actively cycling cells (red arrows, Fig 5B') at the
427 medial-ventral end of cT proliferation zone). At the rostral region of tectal and toral proliferation
428 zones, most long term weak label retaining proliferating cells were placed within or quite near the
429 proliferation zones. No obvious migration of these cells was evidenced by Protocol 2 (Figures 2E,F;
430 also compare the location of proliferating cells in Figures 5C and 5D, corresponding to the same
431 rostral-caudal level of the TeO of animals treated according to Protocol 1 and 2, respectively). 30
432 days after thymidine analog labeling only a short-range shift of long term weak thymidine analog

433 retaining cells from deep to superficial layers of the caudal pole of the TeO was evidenced (double
434 arrow heads, Figure 5G').

435 Conversely, the distribution of long term weak thymidine analog retaining cells completely differed
436 from that of actively proliferating cells after a chase of 30 d in all cerebellar divisions. Unlike
437 actively cycling cells (Fig. 6A-C), most long term weak thymidine analog retaining cells were found
438 within the CCb-gra and VCb-gra, but only rarely in the corresponding molecular layers (Figures
439 2E,F; double arrow heads in Figures 6D-F). In the caudal Cb, a long range migration of long term
440 weak thymidine analog retaining cells was also evident. Many cells of this type were abundantly and
441 homogeneously distributed in the EGp-gra (double arrow heads, Figure 7F). Fewer long term weak
442 thymidine analog retaining cells remained within the Egm-gra proliferation zone (Figures 2H-I;
443 double arrow heads, Figure 7E).

444 The distribution of long term weak thymidine analog retaining cells in the caudal region of the ELL
445 was almost coincident with that of actively cycling cells, occupying a band extending from the
446 boundary between the mol and PCL, through the PCL up to the underlying plexiform layer, and from
447 the ELL lateral border, up to the medial limit of this rombencephalic brain region. Some cells also
448 migrated towards mol (double arrow heads, Figures 8B,C).

449

450 Discussion

451 In this study we used thymidine analog labeling followed by a short survival, to identify and explore
452 the distribution of actively cycling cells in the brain of adult *G. omarorum*, and test whether the
453 proliferation zones described in late larvae (Iribarne and Castelló, 2014) persist during adulthood. To
454 characterize the cellular composition of adult brain proliferation zones, we evidenced main types
455 of proliferating cells by means of the double thymidine analog labeling technique (Vega and
456 Peterson, 2005). Finally, as a first attempt to study the fate of newborn cells, we examined the
457 distribution of derived cells after a long survival period after thymidine analog labeling.

458 4.1. Multiple proliferation zones persist in the brain of adult *G. omarorum*

459 Abundant proliferating cells were evident within all brain divisions of adult *G. omarorum*. The most
460 remarkable proliferation zones were located adjacent to the telencephalic subpallium, the
461 diencephalic PPa and hypothalamus, the mesencephalic TeO and TS, and all divisions of the
462 rombencephalic Cb. Some proliferation zones were extensive (such as those of the Cb and
463 hypothalamus) whereas others were discrete (as in TeO, TS and ELL). The resemblance between the
464 distribution of adult *G. omarorum* proliferating cells and larva's distribution (Iribarne and Castelló,
465 2014) indicates the persistence of a specific pattern of cell proliferation throughout postnatal life in
466 the brain of *G. omarorum*. As occurs in other teleosts, this might subserve the continuous brain
467 growth that accompanies indefinite body growth, along with the maintenance of the particular brain
468 morphology (Candal et al., 2005; Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc et al.,
469 2005; Zupanc et al., 2006).

470 The relative position of the proliferation zones vary among brain regions. These differences might
471 subserve diverse modes of growth due to differences in the spatial pattern of newborn cells' addition.
472 The widespread and extended distribution of cerebellar proliferation zones, appear to enable its
473 multidimensional growth (Zupanc, 2008). Proliferation zones restricted to the caudal regions of the

474 ELL, TS and TeO, may contribute to their continuous and concerted growth in rostral-caudal
475 direction (Easter, 1983; Raymond y Easter, 1983; Lannoo et al., 1990). This may be relevant for
476 the preservation of the functional organization of the electrosensory system since information
477 processing involves the reciprocal connection between these somatotopically organized brain
478 centers (Bastian, 1982; Heiligenberg and Dye, 1982; Car et al., 2004; Krahe and Maler, 2014).

479 4.2. Comparative aspects of distribution of adult brain proliferation zones

480 The spatial distribution of adult *G. omarorum* proliferation zones closely resembled those reported in
481 other teleosts. In addition to the proliferation zones described in other weakly electric fish, we found
482 a proliferation zone nearby the caudal-lateral border of the ELL of adult *G. omarorum*, a location still
483 not reported in adults, but already described along the development of weakly electric gymnotids
484 *Eigenmannia* (Lannoo et al., 1990) and *G. omarorum* (Castelló and Iribarne, 2014).

485 Proliferating cells were distributed all along the extension of the ventricular lining of the
486 telencephalon in *G. omarorum*, with a prominent proliferation zone adjacent to the subpallium,
487 similar to *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001), *D. rerio* (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006;
488 Zupanc, 2011), *O. bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al., 2010), *A. burtoni* (Maruska et al., 2012), *O.*
489 *mossambicus* (Teles et al., 2012), *A. leptorhynchus* (in which the dorsal-lateral telencephalic division
490 showed the largest amount of proliferating cells; Zupanc and Horschke, 1995), and *O. latipes*
491 (Kuroyanagi et al., 2010). Very scarce proliferating cells were found in the OB of adult *G.*
492 *omarorum*, most of which were located within the glomerular layer or at the dorsal-medial surface of
493 the intermediate zone of the OB (corresponding to the rostralmost region of the telencephalic
494 ventricle). This is consistent with the results reported in *D. rerio* (Byrd and Brunjes, 2001; Adolf et
495 al., 2006; Grandel et al., 2006; Zupanc, 2011), *A. burtoni* (Maruska et al., 2012), and *O.*
496 *mossambicus* (Teles et al., 2012). Conversely, Ekström et al. (2001) reported proliferating cells at the
497 internal cell layer of *G. aculeatus*, and Fernández et al. (2011) found labeled cells in all OB laminae
498 of *Austrolebias* (with the highest long term thymidine label retaining cells. concentration in its
499 medial and rostral part. Taking into account the scarce population of proliferating cells and its sparse
500 distribution in most of *G. omarorum* OB, in our opinion, we did not find a clear proliferation zone,
501 with the exception of the small cluster of proliferating cells located adjacent to the telencephalic
502 ventricle. These are consistent with the findings of Grandel et al. (2006) in the OB of *D. rerio*.

503 The most conspicuous diencephalic proliferation zone of *G. omarorum* was found at the preoptic
504 region, populating the lining of the preoptic recess of the diencephalic ventricle, facing the PPa. This
505 is in agreement with the results reported in *A. leptorhynchus*, *O. latipes*, *N. Furzeri*, *A. burtoni*, and
506 *O. mossambicus*, (Zupanc and Horschke, 1995; Kuroyanagi et al., 2010; Tozzini et al., 2012;
507 Maruska et al., 2012; Teles et al., 2012) and *D. rerio* (Zupanc et al., 2005; Zupanc, 2011). However,
508 according to Adolf et al. (2006) and Grandel et al. (2006) this proliferation zone in *D. rerio* is
509 restricted to the ventral portion of the diencephalic ventricle. Another outstanding diencephalic
510 proliferation zone in *G. omarorum* was found at the ventricular lining of the hypothalamic ventricle,
511 including all its recesses, similar to what was described in *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001), *D.*
512 *rerio* (Grandel et al., 2006) and *A. burtoni* (Maruska et al., 2012). The hypothalamic proliferation
513 zone is less notorious in *A. leptorhynchus* (Zupanc and Horschke, 1995), *O. latipes* (Kuroyanagi et
514 al., 2010), and *O. mossambicus* (Teles et al., 2012) and, and was not reported in *Austrolebias*
515 (Fernández et al., 2011) and *B. gauderio* (Dunlap et al., 2011).

516 Within the mesencephalon of *G. omarorum*, the most outstanding proliferation zones were located in
517 the TeO and the TS. Two poles of cell proliferation were found in the TeO. The most evident tectal

518 proliferation zone was located along the dorsal-medial and ventral-lateral borders of the caudal third
519 of the TeO, converging at its caudal pole. This pattern closely resembled those reported in *C. auratus*
520 (Raymond and Easter, 1983), *O. latipes* (Nguyen et al., 1999; Kuroyanagi et al., 2010); *G. aculeatus*
521 (Ekström et al., 2001), *O. mossambicus* (Teles et al., 2012), and *N. furzeri* (Tozzini et al., 2012), but
522 differed from those reported in *A. leptorhynchus* (Zupanc and Horschke, 1995), *Austrolebias*
523 (Fernández et al., 2011), and *B. gauderio* (Dunlap et al., 2011). The comparison with *D. rerio* is
524 hindered by the discrepancies in the descriptions of Zupanc (2011) and Zupanc et al. (2005) on one
525 side, and Grandel et al. (2006) and Ito et al. (2010) on the other side. The pattern of proliferating
526 cells' distribution in the TeO of *G. omarorum* appears closer to those described by Grandel et al.
527 (2006) and Ito et al. (2010) in *D. rerio*. In the ventral border of the TL of *G. omarorum* a row of
528 proliferating cells was also evident as occurs in *A. leptorhynchus* (Zupanc and Horschke, 1995),
529 *Austrolebias* (Fernández et al., 2011) and *G. aculeatus* (Ekström et al., 2001). In *D. rerio*, Grandel et
530 al. (2006) found proliferating cells at the ventricular surface of TL, while the graphical representation
531 of TL proliferating cells in Zupanc et al. (2005) indicates a prevailing location at the medial and
532 dorsal portion of this mesencephalic brain region. Another noteworthy proliferation zone in the
533 mesencephalon of *G. omarorum* was located in the caudal pole of the TS, similar to *A. leptorhynchus*
534 (zone X, Zupanc and Horschke, 1995) and *D. rerio* (Grandel et al., 2006), but different from *G.*
535 *aculeatus* whose TS proliferation zone is more extended in rostral-caudal direction and covers most
536 of the dorsal-lateral ventricular surface of TS (Ekström et al., 2001). Unlike these species, a diffuse
537 distribution of proliferating cells was reported in the TS of *A. burtoni* (Maruska et al., 2012), *B.*
538 *gauderio* (Dunlap et al., 2011), and *O. mossambicus* (Teles et al., 2012).

539 The most outstanding *G. omarorum* brain proliferation zone, both because of its extension and
540 cellular density, was located in the rombencephalic Cb. Numerous densely packed proliferating cells
541 were found in the three main regions of Cb, as occurs in other teleosts (Zupanc and Horschke, 1995;
542 Zupanc et al., 1996; Ekström et al., 2001; Grandel et al., 2006; Ampatzis and Dermon, 2007; Kaslin
543 et al., 2009; Delgado and Schmachtenberg, 2011; Fernández et al., 2011; Teles et al., 2012). The
544 spatial distribution of proliferating cells of *G. omarorum* cerebellar proliferation zones very closely
545 resembled those of *A. leptorhynchus* (Zupanc and Horschke, 1995; Zupanc et al., 1996) and *O.*
546 *mossambicus* (Teles et al., 2012): proliferating cells populated the medial region of the dorsal and
547 ventral portions of CCb-mol, the medial region of VCb-mol, and most of the extension of EGm-gra.
548 These proliferation patterns differed from those of *O. latipes* (Kuroyanagi et al., 2010), *Austrobelias*
549 (Fernández et al., 2011) and *C. aureatus* (Delgado and Schmachtenberg, 2011). In all cerebellar
550 divisions, proliferating cells' density and proliferation zones' extension appeared to be greater in *G.*
551 *ommarorum* than any other species, including *A. leptorhynchus*. At the rostral end of CCb,
552 proliferating cells are rare and restricted to a 150 µm wide strip in *A. leptorhynchus*, but very
553 abundant and spread over a wider extension (about 300 µm) of the middle portion of CCb-mol in *G.*
554 *ommarorum*. In this species, a band of proliferating cells was even found at the rostralmost pole of the
555 CCb, extending all along the dorsal-ventral extension of CCb-mol. Proliferating cells within the CCb
556 and VCb proliferation zones of *G. omarorum* were homogeneously distributed as occurs in *A.*
557 *leptorhynchus*, and not aligned along radial spokes, as occurs in *D. rerio* (Grandel et al., 2006; Kaslin
558 et al., 2009) and *Austrobelias* (Fernández et al., 2011). These variations in cerebellar proliferation
559 zones characteristics could be related to differences in the cerebellar cytoarchitecture among the
560 compared teleost species.

561 Within the rombencephalon of *G. omarorum* we also found a discrete proliferation zone extending
562 along the lateral border of the caudal pole of the ELL (adjacent to the lateral border of the principal
563 and granular cell layers). This proliferation zone was not reported before in adult weakly electric

564 gymnotids, even though Dunlap et al. (2011) found a lateral to medial gradient of proliferating cells
565 in the ELL of adult *B. gauderio*. In adult *A. leptorhynchus*, ELL proliferating cells are evenly
566 distributed along the medial lateral ELL extension (Zupanc and Horschke, 1995). In both species,
567 proliferating cell density was also uneven in the dorsal-ventral axis, showing higher values at a band
568 extending from the granular cell layer to the pyramidal cell layers (*B. gauderio*, Dunlap et al., 2011)
569 or the stratum fibrosum (*A. leptorhynchus*, Zupanc and Horschke, 1995). Conversely, two
570 proliferation zones were identified in ELL during postnatal development of weakly electric fish: one
571 medial, adjacent to the medial ampullary segment of the ELL (*Eigenmannia*: Lannoo et al., 1990),
572 and another at the caudal-lateral border of the ELL (*Eigenmannia*: Lannoo et al., 1990; *G.*
573 *omarorum*: (Castelló and Iribarne, 2010, 2014) by the lateral tuberos segments of the ELL.

574 In sum, the pattern of ventricular proliferation zones and extraventricular proliferation zones spatial
575 distribution in *G. omarorum* resembled the distribution pattern reported in other teleosts, particularly
576 in *D. rerio*, *G. aculeatus*, *O. mossambicus* and *A. leptorhynchus* (Adolf et al., 2006; Grandel et al.,
577 2006; Zupanc et al., 2005; Ekström et al., 2001; Teles et al., 2012; Zupanc and Zupanc, 1992; Zupanc
578 and Horschke, 1995; Zupanc et al., 1996). The striking similarities in the pattern of distribution of
579 proliferating cells among evolutionary distant fish species provides evidence for a ground plan of
580 brain proliferation patterning of euteleosts, contributing to the development and maintenance of the
581 euteleostean brain bauplan, as pointed out by Grandel et al. (2006) and Kuroyanagi et al. (2010). We
582 also found differences with non-electroreceptive-electrogenic fish, which can be attributed to
583 differences in functional specialization (Zupanc and Horschke, 1995; Grandel et al., 2006). As
584 mentioned before, our findings also differed from those of the weakly electric fish *A. leptorhynchus*,
585 both in brain regions involved with electrosensory information processing and in brain regions with
586 other functions.

587 4.3. *G. omarorum* brain proliferation zones contain a heterogeneous cellular composition

588 The implementation of the sequential administration of two thymidine analogs along with their
589 specific and simultaneous immunohistochemical demonstration, by means of already tested
590 antibodies and visualization by confocal microscopy, allowed us to reveal the heterogeneous cellular
591 composition of adult *G. omarorum* brain proliferation zones. According to Zupanc and Horschke
592 (1995), once a thymidine analog is administrated, it is available for its incorporation into DNA for
593 two to four hours. In addition, Zupanc and Zupanc (1992) estimated the duration of ventricular
594 proliferating cells cycle in two days, but also demonstrated that 10-30% of ventricular cells undergo
595 mitosis within twelve hours. Thus, the protocols we employed were appropriated to label both
596 actively cycling cells at the moment of IdU and CldU administration, in addition to cells that
597 progressed through successive S-phases, thus revealing their proliferative history (Vega and
598 Peterson, 2005; Llorens-Martín and Trejo, 2011).

599 Taking into account previous descriptions of proliferating cells in diverse species (Alvarez-Buylla et
600 al., 2001; Doetsch, 2003; Vega and Peterson, 2005; Adolf et al., 2006; Kuhn and Peterson, 2008; Ma
601 et al., 2008; Tavazoie et al., 2008; Alunni et al., 2010; Llorens-Martín and Trejo, 2011) we propose a
602 correlation between labeling patterns and types of proliferative/derived cells. As already shown, we
603 *G. omarorum* proliferation zones presented abundant cells that reenter the cell cycle after a short
604 period and thus correspond to fast cycling cells. These features correspond to those of intermediate
605 amplifier progenitors or transitory amplifying cells (Alunni et al., 2010). We also identified scarce
606 cells that reenter the cell cycle after a long period. These long lasting label retaining, self-renewing
607 progenitor cells can be attributed to stem cells, as shown in *D. rerio* telencephalon (chase: 19 days,
608 Adolf et al., 2006), and *O. latipes* TeO (chase: 14 days; Alunni et al., 2010). The third cell type

609 within the proliferation zones' boundaries were scarce and presented intense, homogeneous long term
610 label retaining of only the first thymidine analog, indicating that cycled only at the moment of the
611 first analog exposure. Thus, these cells might correspond either to cells that had entered a quiescent
612 state or to stem cells that did not re-enter the cell cycle at the moment of the second analog
613 administration (Zupanc and Zupanc, 1992; Alunni et al., 2010). A forth cell type faintly retained the
614 first thymidine analog after a long post thymidine survival; most of these cells were usually located
615 outside the boundaries of the proliferation zones, and probably correspond to newborn neural cells
616 that were undergoing migration from the proliferation zone to other brain regions or sub-regions.

617 We cannot assure the lineage of adult *G. omarorum* newborn brain cells since we did not study the
618 expression of neuronal or glial markers in conjunction with long term thymidine label retention.
619 However, it is plausible that most of adult newborn cells in *G. omarorum*'s brain correspond to the
620 neuronal lineage, and a minor proportion to the glial lineage, as occurs in other teleosts, even though
621 the proportion of newborn neurons and glial cells varied among species, brain regions and sub-
622 regions, and duration of the survival after thymidine analog administration (Adolf et al., 2006;
623 Fernández et al., 2011; Teles et al., 2012; Terzibasi et al., 2012; Zupanc et al., 1996, 2005, 2007). In
624 fact, scarce neurogenesis -evidenced by co-localization of thymidine analogs and the neuronal marker
625 Hu- was found as early 1 day (*Austrolebias* telencephalon, mesencephalon and rombencephalon;
626 Fernández et al., 2011), 3 days (*D. rerio* dorsal telencephalon; Adolf et al., 2006) and 7 days (*N.*
627 *furzeri* telencephalon, TeO and Cb; Terzibasi et al., 2012). Fifteen days after BrdU administration, the
628 proportions of newborn neurons in OB and telencephalon of *D. rerio* reaches 40 % and 75%,
629 respectively, (Adolf et al., 2006). Almost 50% of the total amount of proliferating cells differentiate
630 into neurons at a survival period of 270 – 744 days (Zupanc et al., 2005; Hinsch & Zupanc, 2007),
631 even though a great variation among brain regions exists (hypothalamus: 7%; OB: 9%; TeO: 12%;
632 telencephalon: 42%; Hinsch & Zupanc, 2007). Similarly, Teles et al. (2012) found a high and
633 variable proportion of adult born brain cells expressing Hu in *O. mossambicus* 100 d after BrdU
634 administration (dorsal telencephalon: 41 - 56%; OB glomerular and granular layers: 19 and 58%;
635 VCb-mol and VCb-gra: 44 and 80%).

636 On the other hand, the proportion of newborn glia, as evidenced by co-localization of thymidine
637 analogs and the glial markers GFAP or S-100, is low in the adult brain of teleosts after long lasting
638 post thymidine survival (*D. rerio*; 1%; Zupanc et al., 2005; *O. mossambicus*: dorsal telencephalon: 14
639 - 24%; OB glomerular and granular layers: 41 and 14%; VCb-mol and VCb-gra: 19 – 10%; Teles et
640 al. 2012).

641 Further studies in progress, combining double thymidine analog labeling technique with
642 immunohistochemistry for neuronal and/or glial epitopes, or with tract tracing neuronal labeling, will
643 be necessary to show the fate of newborn cells and reveal the neurogenic potential of adult *G.*
644 *omarorum* brain.

645 4.4. Migration of derived cells.

646 We looked for evidence of migration by newborn cells derived from brain proliferation zones, by
647 combining a long post IdU (30 days) and a short post CldU (24 h) survival (Protocol 2). This allowed
648 us to simultaneously reveal the boundaries of the proliferation zones (short term label retaining CldU
649 positive cells) and the position of derived newborn cells (long term label retaining IdU positive
650 nuclei) relative to the location of both, the proliferation zones and the surrounding brain regions in
651 adult *G. omarorum*.

652 We found differences in the migratory behavior of derived cells. In some brain regions the
653 distribution of IdU and CldU labeled cells almost overlapped, indicating a very slow pace of
654 migration of derived cells, if any at all. This was the case of pallial proliferation zone *Ia*. In other
655 brain regions, as for example the caudal pole of the TeO and TS, we found a slight shift in the spatial
656 distribution of CldU and IdU labeled cells, indicating a short range or slow pace of migrating cells.
657 The same protocol also revealed a clear segregation of the spatial distribution of CldU and IdU
658 labeled cells in the subpallial proliferation zone *Ib* and the three divisions of CCb, providing
659 evidence for middle to long range and faster pace of migration of newborn cells. In fact, we found
660 long term weak analog label retaining cells at distances as much as 200 μm lateral from the subpallial
661 proliferation zone *Ib*, indicating a radial migration of subpallial proliferation zone-derived cells into
662 Vd, Vv and the caudalmost portion of the ICL as shown in *D. rerio* (Adolf et al., 2006; Grandel et al.,
663 2006;). Besides, we also found newborn cells within the intermediate and rostral region of the OB,
664 suggesting a tangential migration from proliferation zone *Ib* into the OB. Preliminary results indicate
665 that newborn cells migrated into the OB and differentiate into neurons at longer survivals after CldU
666 administration (Lasserre, 2014), further supporting the conserved characteristics of the rostral
667 migratory stream among anamniotes (Adolf et al., 2006; Kishimoto et al., 2011; Teles et al., 2012)
668 and amniotes including humans (Lim et al., 2008; Wang et al., 2011).

669 In all Cb divisions, derived cells also showed long range and/or relatively fast migration: derived
670 cells almost completely shifted their position between cerebellar layers (from CCb-mol to CCb-gra,
671 VCb-mol to VCb-gra, or even from EGm-gra, through EGp-mol, up to EGp-gra) after a post-
672 thymidine analog survival of one month. Nuclei of already migrated cells were usually round and
673 presented weak and granular staining, unlike those of proliferating cells within cerebellar
674 proliferation zones,, indicating that derived cells had undergone several cell divisions and thus had
675 partly substituted the exogenous thymidine analog by endogenous thymidine before or during
676 migration. All these features argue in favor of differentiation of cerebellar newborn cells into
677 granular cells as is also indicated by preliminary results of simultaneous demonstration of long term
678 label retaining and the expression of neuronal markers or “*in vivo*” tract tracing in *Gymnotus*
679 (Olivera, 2014) as shown in other teleosts (Zupanc et al., 1996; Zupanc et al., 2005; Kaslin et al.
680 2009; Delgado and Schmachtergerb, 2011; Teles et al., 2012).

681 The comparative analysis of proliferation zones’ distribution and fate of newborn neural cells is
682 considered an important input for the understanding of the functional role and of the mechanisms that
683 control adult neurogenesis along evolution (Lindsay y Tropepe, 2006; Sullivan et al., 2007; Kaslin et
684 al., 2008; Brand and Grandel, 2012). Several proliferation zones here described in the brain of adult
685 *G. omarorum* deserve particular attention because of their potential as source of newborn neural
686 cells, many of which may differentiate into neurons that finally will be incorporated into pre-existing
687 neural circuits. Such is the case of the ventricular proliferation zone adjacent to the subpallium which
688 might be the source of newborn neurons that migrate tangentially up to the OB -and thus constitute
689 the anamniote counterpart of the amniote rostral migratory stream- (Adolf et al., 2006; Grandel et al.,
690 2006) or radially to the adjacent Vd and Vv, the teleostean homologous of the amniotes striatum and
691 septum (Ganz et al., 2012; Harvey-Girard et al., 2013). Interestingly, although in mammal striatum
692 does not occur neurogenesis “*in vivo*”, and the SVZ gives rise to neuroblasts that migrate to the OB,
693 striatal ischemic lesions induce the generation of neuroblasts from the SVZ that migrate in chains
694 into the striatum (Yamashita et al., 2006). The comparative relevance of migration and/or potential
695 neurogenesis in other brain regions (ELL, TS, TeO and Cb) emerge from their involvement in
696 sensory information processing, motor control and/or sensory-motor integration. The potential
697 incorporation of newborn neurons at different relay stations of the neural circuits involved in

698 electrosensory information processing may have functional consequences on the computational
699 power of the network and thus, in the functional specialization of *G. omarorum* brain.

700 In conclusion, in this work we provide further evidences that adult cell proliferation is a conserved
701 feature of euteleosts. In fact, the spatial distribution of adult *G. omarorum* brain proliferation zones is
702 similar to closely related as well as phylogenetically distant species within the euteleostean radiation.
703 We also demonstrated the heterogeneous cellular composition of all analyzed *G. omarorum* adult
704 brain proliferation zones, and the ubiquitous presence of putative stem cells. Our results also revealed
705 the profuse generation of newborn cells, whose pace of migration varied among proliferation zones.
706 Further studies in progress, combining double thymidine analog labeling technique with
707 immunohistochemistry to evidence the expression of neuronal markers or with tract tracing, will
708 reveal the cellular identity of newborn cells. This will allow us to further envisage the functional role
709 of adult cell proliferation and neurogenesis.

710 4. Acknowledgement

711 This work was partially supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación
712 (#FCE_2009_1_2246, #FCE_3_2011_1_6168) and Programa para el desarrollo de Ciencias Básicas
713 (PEDECIBA). The authors thank Ranch Los Mojinetes (Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay) for
714 cooperating with this investigation by allowing and assisting with the exploration of the Laguna del
715 Sauce northern coast.

716 References

- 717 Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., and Bally-
718 Cuif, L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish
719 telencephalon. *Dev. Biol.* 295, 278–93. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.023.
- 720 Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell
721 proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting
722 neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433–457.
723 doi:10.1002/cne.901370404.
- 724 Altman, J. (2011). "The discovery of adult mammalian neurogenesis, " in *Neurogenesis in the Adult*
725 *Brain I.*, eds. T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, and A. Alvarez-Buylla Tokyo: Springer
726 Japan doi:10.1007/978-4-431-53933-9.
- 727 Altman, J., and Das, G. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal
728 neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–35. doi: 10.1002/cne.901240303.
- 729 Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., and Joly, J.-S. (2010). Evidence for
730 neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* 70, 693–
731 713. doi:10.1002/dneu.20799.
- 732 Alvarez-Buylla, a, García-Verdugo, J. M., and Tramontin, a D. (2001). A unified hypothesis on the
733 lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287–93. doi:10.1038/35067582.
- 734 Ampatzis, K., and Dermon, C. R. (2007). Sex differences in adult cell proliferation within the
735 zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1030–40. doi:10.1111/j.1460-
736 9568.2007.05366.x.
- 737 Aten, J. A., Bakker, P. J., Stap, J., Boschman, G. A., and Veenhof, C. H. (1992). DNA double
738 labelling with IdUrd and CldUrd for spatial and temporal analysis of cell proliferation and
739 DNA replication. *J. Histochem.* 24, 251–259. doi: 10.1007/BF01046839.
- 740 Bakker, P. J., Stap, J., Tukker, C. J., van Oven, C. H., Veenhof, C. H., and Aten, J. (1991). An
741 indirect immunofluorescence double staining procedure for the simultaneous flow cytometric

742 measurement of iodo- and chlorodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry* 12, 366–
743 72. doi:10.1002/cyto.990120412.

744 Bell, C. C. (2002). Evolution of cerebellum-like structures. *Brain. Behav. Evol.* 59, 312–26. doi:
745 10.1159/000063567.

746 Byrd, C. A., and Brunjes, P. C. (2001). Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish.
747 *Neuroscience* 105, 793–801. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00215-9.

748 Candal, E., Anadón, R., Bourrat, F., and Rodríguez-Moldes, I. (2005a). Cell proliferation in the
749 developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental
750 approach. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 160, 157–75. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.08.009.

751 Candal, E., Anadón, R., DeGrip, W. J., and Rodríguez-Moldes, I. (2005b). Patterns of cell
752 proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain*
753 *Res. Dev. Brain Res.* 154, 101–19. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.10.008.

754 Castelló, M. E., and Iribarne, L. (2010). Postnatal cell proliferation in the brain of the weakly electric
755 fish *Gymnotus omarorum*. in Abstr. LASDB, P–100.

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

758 Delgado, L. M., and Schmachtenberg, O. (2011). Neurogenesis in the adult goldfish cerebellum.
759 *Anat. Rec. (Hoboken)*. 294, 11–5. doi:10.1002/ar.21291.

760 Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 543–550.
761 doi:10.1016/j.gde.2003.08.012.

762 Dunlap, K. D., Silva, A. C., and Chung, M. (2011). Environmental complexity, seasonality and brain
763 cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhyppopomus gauderio*. *J. Exp. Biol.* 214,
764 794–805. doi:10.1242/jeb.051037.

765 Easter, S. S. (1983). Postnatal neurogenesis and changing connections. *TINS*. 6, 53-56. doi:
766 10.1016/0166-2236(83)90025-5.

767 Ekström, P., Johnsson, C. M., and Ohlin, L. M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of
768 an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones.
769 *J. Comp. Neurol.* 436, 92–110. doi: 10.1002/cne.1056.

770 Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., and Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in
771 the brain of adult fish *Austrolebias* (*Cyprinodontiform: Rivulidae*): A comparative study.
772 *Neuroscience* 189, 12–24. 10.1016/j.neuroscience.2011.05.063.

773 Ganz, J., Kaslin, J., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M. and Brand, M. (2012). Subdivisions
774 of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. *J. Comp. Neurol.* 520: 633–
775 655. doi: 10.1002/cne.22757.

776 Grandel, H., and Brand, M. (2013). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in
777 vertebrates. *Dev. Genes Evol.* doi:10.1007/s00427-012-0425-5.

778 Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. (2006). Neural stem cells and
779 neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell
780 fate. *Dev. Biol.* 295, 263–77. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.040. 1.

781 Gratzner, H. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for
782 detection of DNA replication. *Science* 218, 474–475. doi: 10.1126/science.7123245.

783 Harvey-Girard, E. Giassi, A. C., Ellis, W. and Maler L. (2013). “Expression of the cannabinoid CB1
784 receptor in the gymnotiform fish brain and its implications for the organization of the teleost
785 pallium. *J. Comp. Neurol.* 521, 949–975. DOI: 10.1002/cne.23212.

786 Hermann, A., Suess, C., Fauser, M., Kanzler, S., Witt, M., Fabel, K., Schwarz, J., Höglinger, G. U.,
787 and Storch, A. (2009). Rostro-caudal gradual loss of cellular diversity within the
788 periventricular regions of the ventricular system. *Stem Cells* 27, 928–41. doi:10.1002/stem.21.

789 Hinsch, K., and Zupanc, G. K. H. (2006). Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem
790 cells from adult fish brain. *J. Neurosci. Methods* 158, 75–88.
791 doi:10.1016/j.jneumeth.2006.05.020.

792 Hinsch, K., and Zupanc, G. K. H. (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in
793 the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience* 146, 679–96.
794 doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.071.

795 Iribarne, L and Castelló, M. E. (2014). Castelló, M. E., and Iribarne, L. (2014). Postnatal cell
796 proliferation in the brain of the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *J. Physiol. (Paris)*
797 in press. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.05.001

798 Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T., and Takeuchi, H. (2012). p53 Mutation suppresses
799 adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423,
800 627–31. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.125.

801 Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., and Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and
802 their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Dev. Biol.* 342, 26–38.
803 doi:10.1016/j.ydbio.2010.03.008.

804 Jaunin, F., Visser, a. E., Cmarko, D., Aten, J. a., and Fakan, S. (1998). A New Immunocytochemical
805 Technique for Ultrastructural Analysis of DNA Replication in Proliferating Cells After
806 Application of Two Halogenated Deoxyuridines. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1203–1209.
807 doi:10.1177/002215549804601014.

808 Kaslin, J., Ganz, J., and Brand, M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-
809 mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 101–22.
810 doi:10.1098/rstb.2006.2015.

811 Kaslin, J., Ganz, J., and Geffarth, M. (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation
812 and maintenance of a novel stem cell niche. *J. Neurosci.* 29, 6142–53.
813 doi:10.1523/JNEUROSCI.0072-09.2009.

814 Kempermann, G. (2006). “Technical Notes,” in *Adult Neurogenesis. Stem cells and neuronal*
815 *development in the adult brain*, ed. G. Kempermann (New York: Oxford University Press),
816 192–225.

817 Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami,
818 K., García-Verdugo, J.M., Sawamoto, K. (2011). Migration of neuronal precursors from the
819 telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.*
820 519(17): 3549-65. doi: 10.1002/cne.22722.

821 Kuhn, H., and Peterson, D. (2008). “Detection and phenotypic characterization of adult
822 neurogenesis.,” in *Adult Neurogenesis*, eds. F. H. Gage, G. Kempermann, and H. Song (New
823 York: Oxford University Press), 25–47.

824 Kuroyanagi, Y., Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Kubo,
825 T., and Takeuchi, H. (2010). Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain.
826 *Brain Res.* 1323, 33–40. doi:10.1016/j.brainres.2010.01.045.

827 Lannoo, M. J., Vischer, H. a, and Maler, L. (1990). Development of the electrosensory nervous
828 system of *Eigenmannia* (gymnotiformes): II. The electrosensory lateral line lobe, midbrain,
829 and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 294, 37–58. doi:10.1002/cne.902940105.

830 Lasserre (2014). *Evaluación de la capacidad neurogénica adulta en el telencéfalo de G. omarorum*.
831 Tesina de Grado, Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica.

832 Lim, D.A., Huang, Y., Alvarez-Buylla, A. (2008). Adult subventricular zone and olfactory bulb
833 neurogenesis. En: *Adult Neurogenesis*. (Gage, F.H., Kempermann, G., Song, H., eds) pp 175-
834 206, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- 835 Lindsey, B. W., and Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological
836 principles of adult neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80, 281–307.
837 doi:10.1016/j.pneurobio.2006.11.007.
- 838 Llorens-Martín, M., Tejada, G. S., and Trejo, J. L. (2010). Differential regulation of the variations
839 induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual
840 birthdating analysis. *PLoS One* 5, e12188. doi:10.1371/journal.pone.0012188.
- 841 Llorens-Martín, M., and Trejo, J. L. (2011). Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a
842 line-up of the usual suspects. *Front. Neurosci.* 5, 76. doi:10.3389/fnins.2011.00076.
- 843 Ma, D., Ming, G., Gage, F. H., and Song, H. (2008). “Neurogenic niches in the adult mammalian
844 brain,” in *Adult Neurogenesis*. eds. F. H. Gage, G. Kempermann, and H. Song (New York:
845 Oxford University Press), 207–255.
- 846 Maeyama, K., and Nakayasu, H. (2000). Postembryonic Neurogenesis in Zebrafish (*Danio rerio*)
847 Brain: Presence of Two Different Systems. *Zoolog. Sci.* 17, 959–966. doi:10.2108/zsj.17.959.
- 848 Maler, L., Sas, E., Johnston, S., and Ellis, W. (1991). An atlas of the brain of the electric fish
849 *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Chem. Neuroanat.* 4, 1–38. doi: 0.1016/0891-0618(91)90030-
850 G.
- 851 Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R., and Aten, J. a (1992). Dynamics of three-
852 dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA
853 and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 3, 857–62. Available at:
854 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478975>.
- 855 Maruska, K. P., Carpenter, R. E., and Fernald, R. D. (2012). Characterization of cell proliferation
856 throughout the brain of the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and its regulation by
857 social status. *J. Comp. Neurol.* 520, 3471–91. doi:10.1002/cne.23100.
- 858 März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C. S., Kah, O.,
859 Bally-Cuif, L., and Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the
860 ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia* 58, 870–88.
861 doi:10.1002/glia.20971.
- 862 Meek, J., Nieuwenhuys, R. (1998). “Holoosteans and teleosts,” in *The Central Nervous System of*
863 *Vertebrates*, eds. R. Nieuwenhuys, H. J. ten Donkelaar, and C. Nicholson (Berlin: Springer),
864 759–938.
- 865 Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J. S., Wittbrodt, J., Chourrout, D., and Bourrat,
866 F. (1999). Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a
867 morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *J. Comp.*
868 *Neurol.* 413, 385–404. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19991025)413:3<385::AID-
869 CNE3>3.0.CO;2-P.
- 870 Nieuwenhuys, R. (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain. Behav. Evol.* 73, 229–
871 52. doi:10.1159/000225622.
- 872 Nowakowski, R., and Hayes, N. (2008). “Numerology of Neurogenesis: Characterizing the Cell
873 Cycle of Neurostem Cells,” in *Adult Neurogenesis*. eds. F. H. Gage, G. Kempermann, and H.
874 Song (New York: Oxford University Press), 7–23.
- 875 Nowakowski, R. S., Caviness, V. S., Takahashi, T., and Hayes, N. L. (2002). Population dynamics
876 during cell proliferation and neuronogenesis in the developing murine neocortex. *Results*
877 *Probl. Cell Differ.* 39, 1–25. doi: 10.1007/978-3-540-46006-0_1
- 878 Olivera-Pasilio, V. (2014). *Distribución espacial, composición celular y capacidad neurogénica de*
879 *las zonas proliferativas del cerebro de *Gymnotus omarorum* en la vida posnatal*. Tesis de
880 Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, PEDECIBA.
- 881 Raymond, P., and Easter, S. (1983). Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I.
882 Location of germinal cells and numbers of neurons produced. *J. Neurosci.* 5, 1077-

883 1091. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/3/5/1077.short> [Accessed March 19,
884 2014].

885 Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R., and Albert, J. S. (2009). A New Species of *Gymnotus*
886 (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in
887 Neurophysiological Research. *Copeia* 2009, 538–544. doi:10.1643/CI-07-103.

888 Strobl-Mazzulla, P. H., Nuñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Kah, O., and Somoza, G. M.
889 (2010). Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain. Behav.*
890 *Evol.* 76, 20–31. doi:10.1159/000316022.

891 Sullivan, J., and Benton, J. (2007). Adult neurogenesis: a common strategy across diverse species. *J.*
892 *Comp. Neurol.* 500, 574–584. doi:10.1002/cne.

893 Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls,
894 limitations, and validation. *Brain Res. Rev.* 53, 198–214.
895 doi:10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.

896 Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-
897 Verdugo, J. M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem
898 cells. *Cell Stem Cell* 3, 279–88. doi:10.1016/j.stem.2008.07.025.

899 Teles, M. C., Sîrbulescu, R. F., Wellbrock, U. M., Oliveira, R. F., and Zupanc, G. K. H. (2012).
900 Adult neurogenesis in the brain of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J.*
901 *Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 198, 427–49.
902 doi:10.1007/s00359-012-0721-6.

903 Tozzini, E. T., Baumgart, M., Battistoni, G., and Cellerino, A. (2012). Adult neurogenesis in the
904 short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular
905 characterization and effects of aging. *Aging Cell* 11, 241–51. doi:10.1111/j.1474-
906 9726.2011.00781.x.

907 Vega, C., and Peterson, D. (2005). Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal
908 halogenated thymidine analog discrimination. *Nat. Methods* 2, 167–170.
909 doi:10.1038/NMETH741.

910 Wang, C., Liu, F., Liu, Y. Y., Zhao, C. H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q.,
911 Zhang, Y., Chen, R., Song, H., Yang, Z. (2011). Identification and characterization of
912 neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain.
913 *Cell Res.* 21(11): 1534–50. doi: doi:10.1038/cr.2011.83.

914 Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernández Acosta, P., García-Verdugo, J. M., Sunabori, T.,
915 Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., Araki, N., Abe, K., Okano,
916 H., Sawamoto, K. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate
917 into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 26, 6627–6636.

918 Zupanc, G. K. (2001). A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis.
919 *Brain. Behav. Evol.* 58, 246–9. doi:57568.

920 Zupanc, G. K. H. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp.*
921 *Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 192, 649–70. doi:10.1007/s00359-006-
922 0104-y.

923 Zupanc, G. (2008). “Adult neurogenesis in teleosts fish,” in *Adult Neurogenesis*, eds. F. Gage, G.
924 Kempermann, and H. Song (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 571–592.

925 Zupanc, G. K. H. (2011). “Adult Neurogenesis in Teleost Fish,” in *Neurogenesis in the Adult Brain I*,
926 eds. T. Seki, K. Sawamoto, J. M. Parent, and A. Alvarez-Buylla (Tokyo: Springer Japan),
927 137–168. doi:10.1007/978-4-431-53933-9.

928 Zupanc, G., and Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a
929 quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353, 213–33. doi:10.1002/cne.903530205.

- 930 Zupanc, G. K., and Zupanc, M. M. (1992). Birth and migration of neurons in the central
931 posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia*
932 *sp.*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9539–43. doi: 10.1073/pnas.89.20.9539.
- 933 Zupanc, G. K., Horschke, I., Ott, R., and Rascher, G. B. (1996). Postembryonic development of the
934 cerebellum in gymnotiform fish. *J. Comp. Neurol.* 370, 443–64. doi:10.1002/(SICI)1096-
935 9861(19960708)370:4<443::AID-CNE3>3.0.CO;2-4.
- 936 Zupanc, G. K. H., Hinsch, K., and Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal
937 differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp.*
938 *Neurol.* 488, 290–319. doi:10.1002/cne.20571.
- 939
940

941 5. Figure legends

942 Figure 1. Cellular composition of adult *G. omarorum* brain proliferation zones revealed by the double
943 thymidine analog labeling technique. (A, B) Projections of twenty five confocal planes (sequentially
944 acquired at one micron intervals) into a single plane of frontal sections at the level of the
945 rombencephalic ventricle of fish treated with Protocol 1 (A) or 2 (B). (C, D) Orthogonal projections
946 in the XZ and YZ axes, crossing at the position indicated by the yellow arrows in (A) and (B),
947 respectively. As shown in (A,C), a high proportion of proliferating cells was double-labeled after a
948 short chase (24 h) indicating cell cycle reentry, and thus correspond to fast cycling cells (yellow
949 arrow). Single labeled cells correspond to actively cycling cells at the moment of IdU (green arrow)
950 and CldU (red arrow) exposure. Double labeled cells in (B) and (D) reentered the cell cycle after a
951 long chase (1 month) and thus correspond to slow cycling cells which were scarce (yellow arrow).
952 Note the pleiotropic nuclear staining, with varying labeling intensity and surface aspect (either
953 smooth or grainy). Scale bars: A, B =50 μm ; C, D = 5 μm . Generalized green staining at the brain
954 surface in panel B is due to non-specific fluorescence of remaining embedding gelatin/albumin
955 mixture.

956 Figure 2. Spatial distribution of proliferating cells in *Gymnotus omarorum* brain after a short (4h; red
957 dots) and long (30 days; blue dots) survivals after thymidine analog administration. The distribution
958 of proliferating cells, as revealed by thymidine analog labeling followed by a 4-hour survival, is
959 qualitatively represented by the red dots in the schematic diagrams of frontal sections (A-J)
960 corresponding to the planes indicated in the lateral view of the brain (K). Ventricular proliferation
961 zones were found in the caudal olfactory bulb (A), telencephalon (A-C), diencephalon (C-E),
962 mesencephalon (D-G) and rombencephalon (H-J). Extraventricular proliferation zones were found at
963 the three divisions of the cerebellum (Cb): within the molecular layers of the corpus cerebelli (CCb-
964 mol; E-G) and the valvula cerebelli (VCb-mol; F), and at the granular layer of the eminentia
965 granularis pars medialis (EGm-gra; G-I). Another extraventricular proliferation zone was found at the
966 lateral-caudal border of the electrosensory lateral line lobe (ELL; J). The distribution of long label
967 retaining proliferating cells after a long post thymidine analog survival is qualitatively represented by
968 the location of the blue dots. Long range migration of long term weak thymidine label retaining cells
969 was evident in the olfactory bulb (OB; A), subpallium (ventral telencephalon, dorsal subdivision -
970 Vd-; ventral telencephalon, ventral subdivision -Vv-; B) and Cb [cerebellum, granular layer -CCb-
971 gra- (E, F); eminentia granularis pars anterior -EGa (G), eminentia granularis pars posterior, granular
972 layer -EGp-gra- (H, I), and valvula cerebelli, granular layer -VCb-gra-(F)]. Intermediate to short
973 range migration was found in the diencephalon (C-E), optic tectum (TeO, D - G), torus semicircularis
974 (TS, G), and ELL (I, J). A: Pretectal nucleus; AC: Anterior commissure; ALLN: Anterior lateral line
975 nerve; C: Cerebello-medullary cistern; CCb-mol: Cerebellum, molecular layer; CC: Crista
976 cerebellaris; CCb: Corpus cerebelli; CE: Central nucleus of the inferior lobe; CLS: Centrolateral
977 segment (ELL); CMS: Centromedial segment (ELL); CP: Central-posterior nucleus; cT: Tectal
978 commissure; DC: Central division of dorsal forebrain; DD: Dorsal division of the dorsal forebrain;
979 DFl: Nucleus diffusus lateralis of the inferior lobe; DLd: Dorsolateral telencephalon, dorsal
980 subdivision; dLL: Decussation of lateral lemniscus; DM1: Dorsomedial telencephalon, subdivision 1;
981 DM2: Dorsomedial telencephalon, subdivision 2; EGa: EGa-mol: Eminentia granularis pars anterior,
982 molecular layer; EGp: Eminentia granularis pars posterior; EGp-mol: Eminentia granularis pars
983 posterior, molecular layer; ELL: Electrosensory lateral line lobe; eELL: ELL efferents; eTS: Torus
984 semicircularis efferents; FB: Forebrain bundle; G: Glomerular nucleus; H: Habenula; Ha:
985 Hypothalamus anterioris; Hl: Hypothalamus lateralis; Hv: Hypothalamus ventralis; ICL: Internal cell
986 layer; IL: Inferior lobe; LL: Lateral lemniscus; LS: Lateral segment (ELL); MgN: Magnocellular
987 mesencephalic nucleus; MLF: Medial longitudinal fasciculus; mol: Molecular layer (ELL); MS:

988 Medial segment (ELL); Pd: Nucleus praeminentialis dorsalis; PGI: Periglomerular nucleus, lateral
989 subdivision; PGr: Periglomerular nucleus, rostral subdivision; PM: Pacemaker nucleus; POC:
990 Postoptic commissure; PPa: Nucleus preopticus periventricularis, anterior subdivision; PPn:
991 Prepacemaker nucleus; PTh: Nucleus prethalamicus; RF: Reticular formation; RMT: Rostral
992 mesencephalic tegmental nucleus; Sc: Suprachiasmatic nucleus; TA: Nucleus tuberis anterior; TEL:
993 Telencephalon; TL: Torus longitudinalis; TPP: Periventricular nucleus of the posterior tuberculum;
994 tST: Subtectal tract; tStF: Tractus stratum fibrosum; V: Ventricle; Vp: Ventral telencephalon,
995 posterior subdivision; ZT: Transitional zone. Scale bars: 1 mm.

996 Figure 3. Telencephalic proliferation zones: location and cellular composition. Confocal images of
997 frontal sections at rostral (A-B) intermediate (C) and caudal levels (D) of the telencephalic
998 hemispheres and caudal levels of the olfactory bulb (A,B) of animals treated according to Protocol 1
999 (A) or 2 (B-D). Images in (A,A'-D,D') correspond to 30 sequentially acquired confocal planes (every
1000 1µm) projected to one plane. To corroborate the double labeling of nuclei, XZ and YZ orthogonal
1001 projections of the stacks were obtained at the sites indicated by the crossing lines (A''-D''). The
1002 location and boundaries of three telencephalic proliferation zones, determined by the spatial
1003 distribution of actively cycling cells IdU⁺ (green arrows in A',A''), CldU⁺ (red arrows in A'-D') and
1004 (A''-D''), were represented by arrowheads in (A-D) and dotted lines in (A'-D'): proliferation zone 1a
1005 at the free surface of the dorsal telencephalon; proliferation zone 1b at the ventral bulge of the
1006 telencephalic ventricle. Abundant double labeled nuclei were detected using Protocol 1 (fast cycling
1007 cells, yellow arrows in A'; A''), while few double labeled nuclei were found using Protocol 2 (slow
1008 cycling cells, yellow arrows in B', D'; B'', D''). Note that some cells that appeared to be double
1009 labeled in the projected images (white arrow in (C')), in fact corresponded to neighboring cells at the
1010 same x-y position but at different focal planes and separately labeled with only one of the thymidine
1011 analogs (C). Chains of elongated IdU⁺ or CldU⁺ nuclei are indicated by green and red double
1012 arrowheads, respectively. Long term weak analog label retaining cells are indicated by double green
1013 arrowheads in (C'-D'), indicating a long range radial migration. Scale bars: A-D,A'-D' = 50 µm;
1014 A''-D'' = 5 µm. DC: Central division of dorsal forebrain; DD: Dorsal division of the dorsal
1015 forebrain; DM: Dorsomedial telencephalon; DLd: Dorsolateral telencephalon, dorsal subdivision; V:
1016 Ventricle; Vd: Ventral telencephalon, dorsal subdivision; Vp: Ventral telencephalon, posterior
1017 subdivision; Vv: Ventral telencephalon, ventral subdivision.

1018

1019 Figure 4. Diencephalic proliferation zones: location and cellular composition. Confocal images of
1020 frontal sections at rostral (A,B) intermediate (C,D) and caudal levels (E,F) of the diencephalon of
1021 animals treated according to Protocol 1 (A,C,E) or 2 (B,D,F). Areas indicated by the dotted
1022 rectangles are shown at higher resolution (A' to F') as 30 sequentially acquired confocal planes (at 1
1023 µm intervals) projected to one plane. To corroborate the double labeling of nuclei, XZ and YZ
1024 orthogonal projections of the stacks were obtained at the sites indicated by the crossing lines (A''-
1025 D'',E',F'). Diencephalic proliferation zones were almost always restricted to the ventricular lining. In
1026 the most rostral diencephalic region, a noticeable proliferation zone lay underneath the anterior
1027 commissure, facing the anterior subdivision of the nucleus preopticus periventricularis (PPa, A,B).
1028 Further caudal, less populated proliferation zones were found at the lateral angles of the diencephalic
1029 ventricle that separates the habenula from the hypothalamus anterioris (Ha) ventrally (C,D). At the
1030 caudal-most region of the diencephalon (E,E',F,F'), there was an extended proliferation zone,
1031 covering almost continuously the lining of the hypothalamic ventricle and facing all hypothalamus
1032 divisions: dorsalis (Hd), lateralis (Hl), ventralis (Hv) and caudalis. Note the abundance of double
1033 labeled, fast cycling cells evidenced with Protocol 1 (A',A'',E',E''), and the scarcity of double

1034 labeled, slow cycling cells, evidenced with Protocol 2 (B',B'',F',F''). A clear migration process of
1035 long term weak labeling retaining cells was evident at the hypothalamic proliferation zone (double
1036 green arrow heads, F'). Scale bars: A-F, A'-F' = 50 μ m; A'',B'',E'',F'' = 5 μ m.

1037 Figure 5. Mesencephalic proliferation zones: location and cellular composition of tectum opticum
1038 (TeO) and torus semicircularis (TS) proliferation zones. Confocal images of frontal sections at rostral
1039 (A,B) and caudal levels (C,D,G,H) levels of the mesencephalon of animals treated according to
1040 Protocol 1 (A,C,E,F) or 2 (B,D,G,H). Images in (A'-D',E-H) correspond to 30 sequentially acquired
1041 confocal planes (at 1 μ m intervals) projected to one plane. To corroborate the double labeling of
1042 nuclei, XZ and YZ orthogonal projections of the stacks were obtained (A'',B'',E''-H'') at the sites
1043 indicated by the color coded arrows and the rectangles in the low power images. A, B) The tectal
1044 commissure (cT) was flanked by two proliferation zones (arrowheads, A,B). Two groups of
1045 proliferating cells were evident in the dorsomedial and ventrolateral borders of the caudal part of the
1046 TeO (C',D',E,F) that converge into one at the caudal pole of the TeO (G). A single proliferation zone
1047 was evident at the ventromedial region of the TS (asterisks in C',D', F). Note the relative abundance
1048 of fast cycling cells in cT (A',A'') and TeO (E,E',F,F') and the scarcity of slow cycling cells in cT
1049 (B',B'') and the caudal pole of TeO (G',G''). A shift in the distribution of IdU + and CldU+ actively
1050 cycling cells was found in cT proliferation zone (B'). Scale bars: A-D,G,H, A'-H' = 50 μ m;
1051 A'',B'',E''-H'' = 5 μ m.

1052

1053 Figure 6. Cerebellar (corpus cerebelli -CCb- and valvula cerebelli -VCb-) proliferation zones:
1054 location and cellular composition. Confocal images of frontal sections at the level of the CCb
1055 (A,B,D,E) and VCb (C,E) of animals treated according to Protocol 1 (A-C) or 2 (D-F). Images in
1056 (A',B,C,D',E,F) correspond to 30 sequentially acquired confocal planes (at 1 μ m intervals) projected
1057 to one plane; images (A,D) correspond to 15 sequentially acquired confocal planes (at 2 μ m intervals)
1058 projected to one plane; images in (C',F') correspond to sequentially acquired images of a single
1059 plane. As shown by Protocol 1, densely packed fast cycling cells (double labeled cells in (A-C) were
1060 found at a band near the midline of the dorsal (A) and ventral (B) molecular layers of CCb (CCb-
1061 mol) and of the molecular layer of VCb (C, VCb-mol). In animals treated according to Protocol 2, the
1062 proliferation zones of both cerebellar divisions showed few long term intense thymidine analog label
1063 retaining cells within the proliferation zone's boundaries; green arrows in D-F) and slow cycling cells
1064 (double labeled nuclei, yellow arrow in E), whereas abundant long term weak thymidine label
1065 retaining cells moved from CCb-mol and VCb-mol to the corresponding granular layers (double
1066 green arrowheads in D-F). Scale bars: A-D,A'-D' = 50 μ m; A''-D'' = 5 μ m.

1067

1068 Figure 7. Cerebellar (caudal lobe of Cb) proliferation zones: location and cellular composition.
1069 Confocal images of frontal sections at the level of the caudal lobe of the Cb of animals treated
1070 according to Protocol 1(A-C) or 2 (D-F). Panels A and B show low power confocal images of the
1071 caudal lobe of the cerebellum that depict the location of caudal Cb proliferation zones. Panels B-F
1072 correspond to 30 sequentially acquired confocal planes (at 1 μ m intervals) projected to one plane.
1073 Note that the granular layer of EGm (EGm-gra) was populated by actively cycling cells most of
1074 which corresponded to fast cycling cells (double labeled nuclei in A,B). Conversely, actively cycling
1075 cells were almost absent in both the molecular layer (EG-mol,C) and the granular layer of EGp (EGp-
1076 gra, C). Slow cycling cells were rare (not found in the shown images). Few long term weak

1077 thymidine label retaining cells were found throughout EGm-gra (double green arrowheads in E) but
1078 also migrated up to EGp-gra (double green arrowheads in F). Scale bars: 50 μm .

1079

1080 Figure 8. *G. omarorum*'s electrosensory lateral line lobe (ELL) proliferation zones. Confocal images
1081 of frontal sections at caudal levels of the rombencephalon of animals treated according to Protocol 1
1082 (A,A') or 2 (B,C). Images in (A',B,C) correspond to 30 sequentially acquired confocal planes (at 1 μm
1083 intervals) projected to one plane. To corroborate the double labeling of nuclei, XZ and YZ orthogonal
1084 projections of the stacks were obtained at site indicated by the yellow arrow in (A',A'',B, inset in B).
1085 A group of proliferating cells was found at the lateral edge of the caudal pole of the ELL, near the
1086 border between the molecular (mol) and the principal cell layer (PCL) (delimited by dotted lines in
1087 B,C). Some proliferating cells were also aligned along most lateral-medial extension of the border
1088 between PCL and mol (arrowheads in A). Fast cycling cells were relatively abundant (yellow arrows
1089 in A',A''), while slow cycling cells were scarce (note that the apparently double labeled nuclei in B
1090 in fact corresponds to a pair of nuclei, one IdU+ and the other CldU+ located at the same X-Y but
1091 different Z location as evidenced by the orthogonal projection in B''). At long chase, long term weak
1092 thymidine label retaining cells were found at the PCL (B,C). Scale bars: A-C,A' = 50 μm ; A''-B'' =
1093 5 μm .

1094 Supplementary Figure 1. Controls for specificity of primary antibodies. IdU only treated sections were
1095 incubated with mouse anti BrdU-IdU/Donkey anti mouse Alexa 488 (upper left panel) or rat anti
1096 BrdU-CldU/Donkey anti rat Alexa 633 (lower left panel). CldU only treated sections were incubated
1097 with rat anti BrdU-CldU/Donkey anti rat Alexa 633 (lower right panel) or mouse anti BrdU-
1098 IdU/Donkey anti mouse Alexa 488 (upper right panel). Confocal system settings were adjusted in
1099 order to use all the dynamic range with the positive samples of each experiment. The same settings
1100 were used for each of the cross reactivity experiments. Both primary antibodies showed minor cross
1101 reactivity. Scale bars: 10 μm .

1102

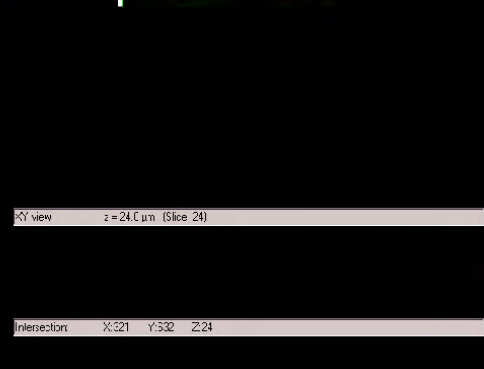
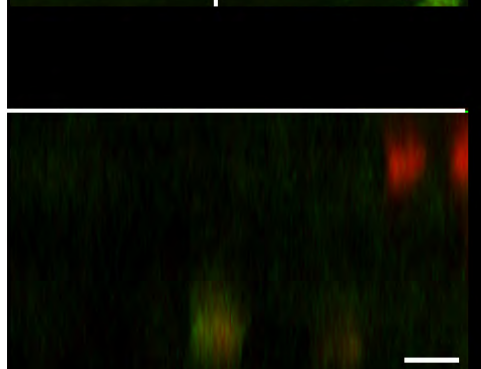
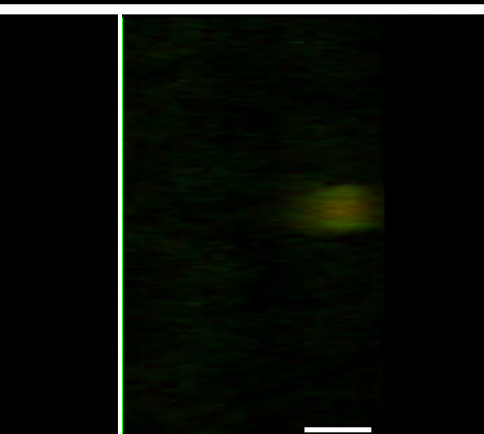
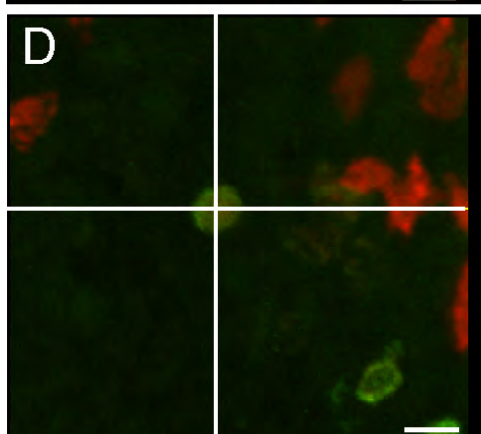
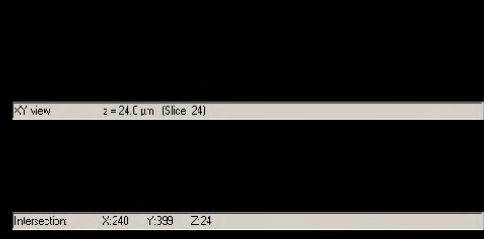
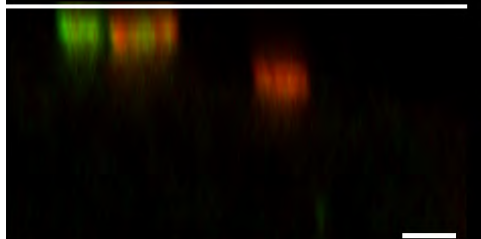
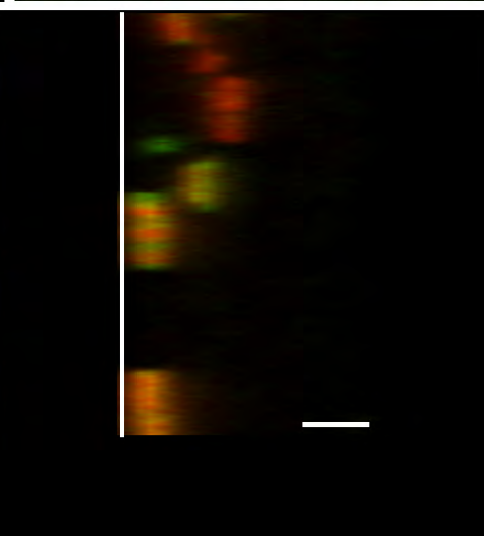
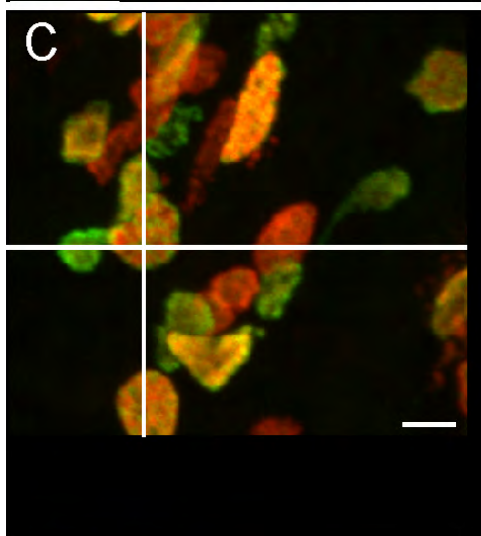
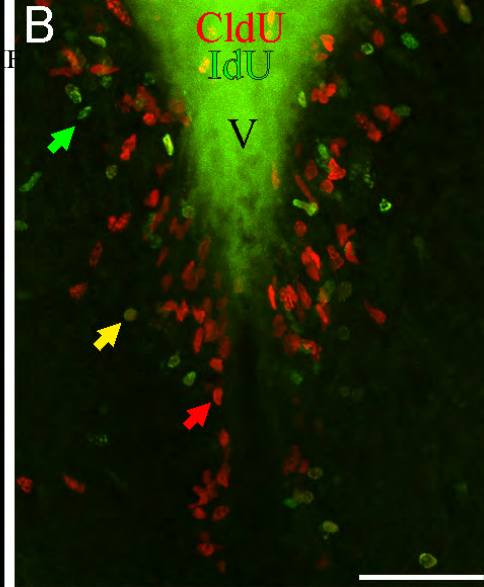
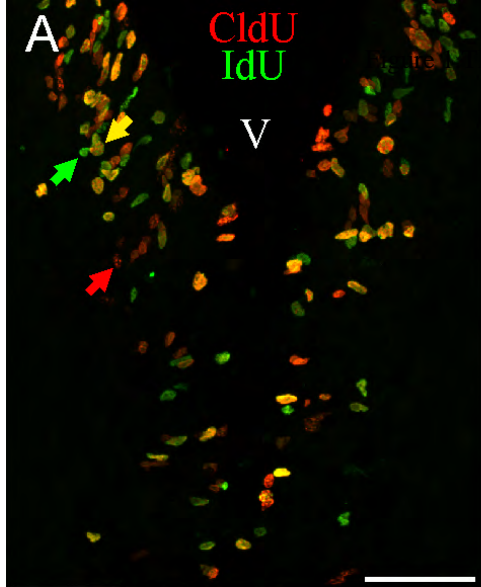


Figure 2.TIF

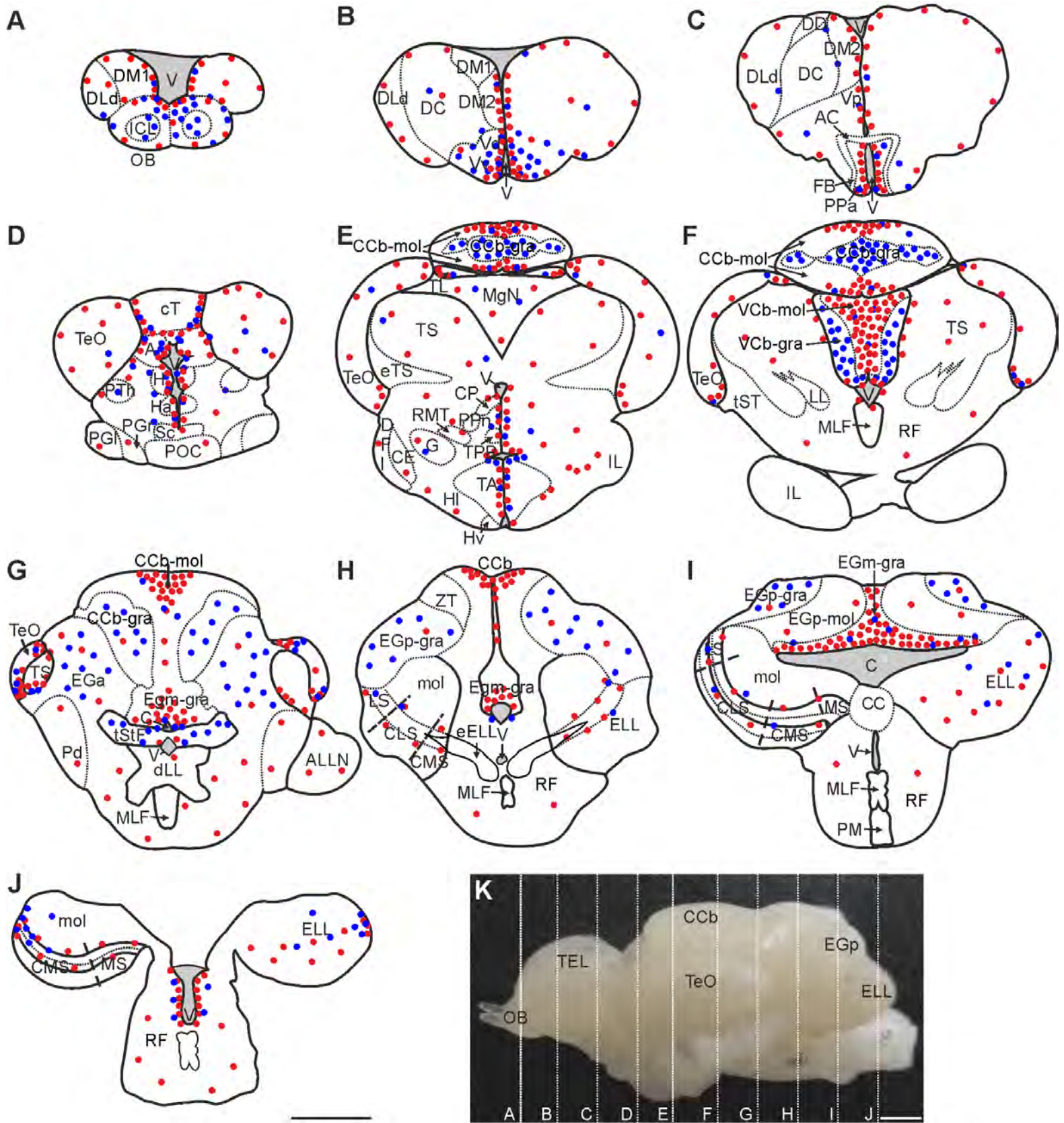


Figure 3.TIF

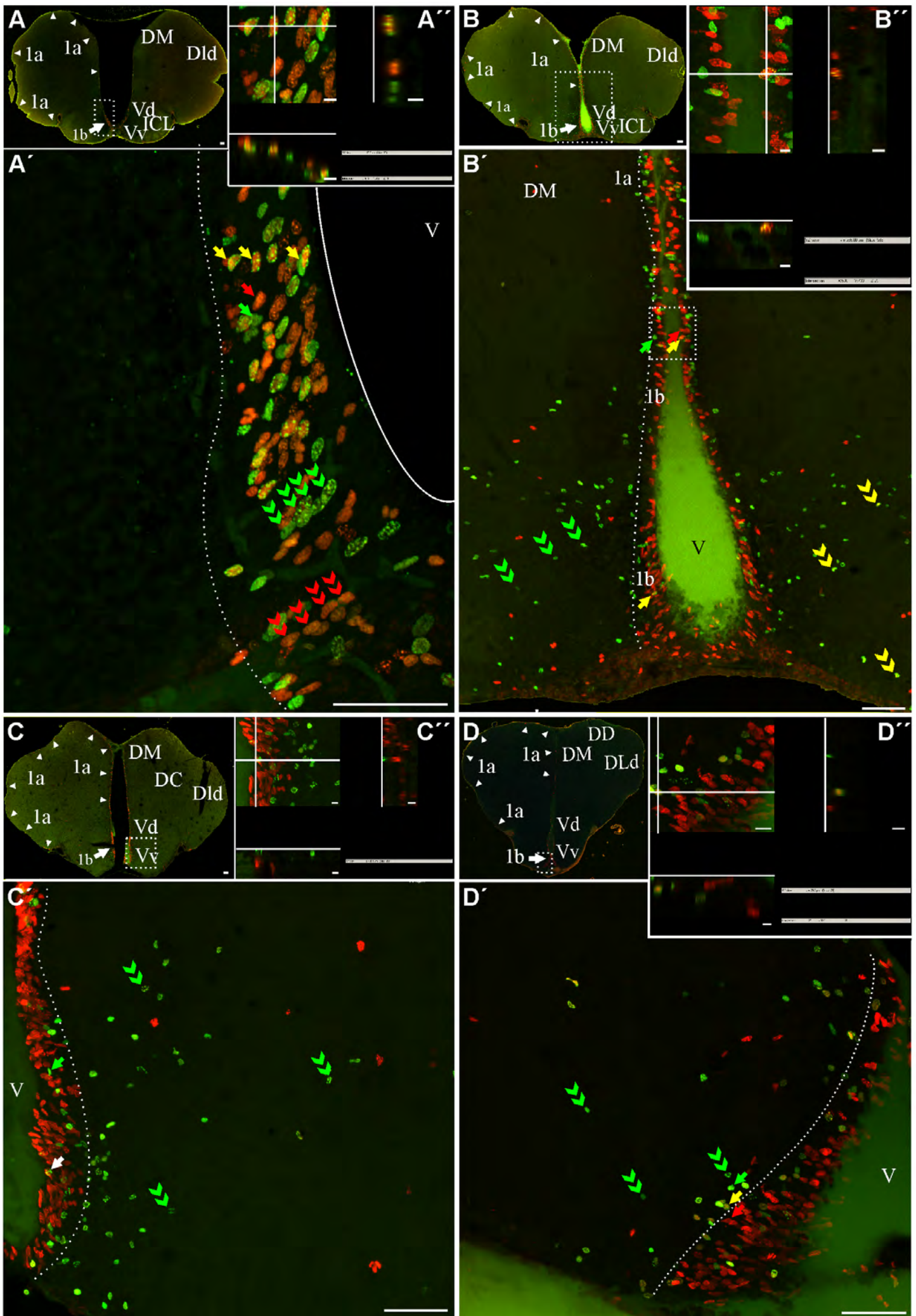


Figure 4.TIF

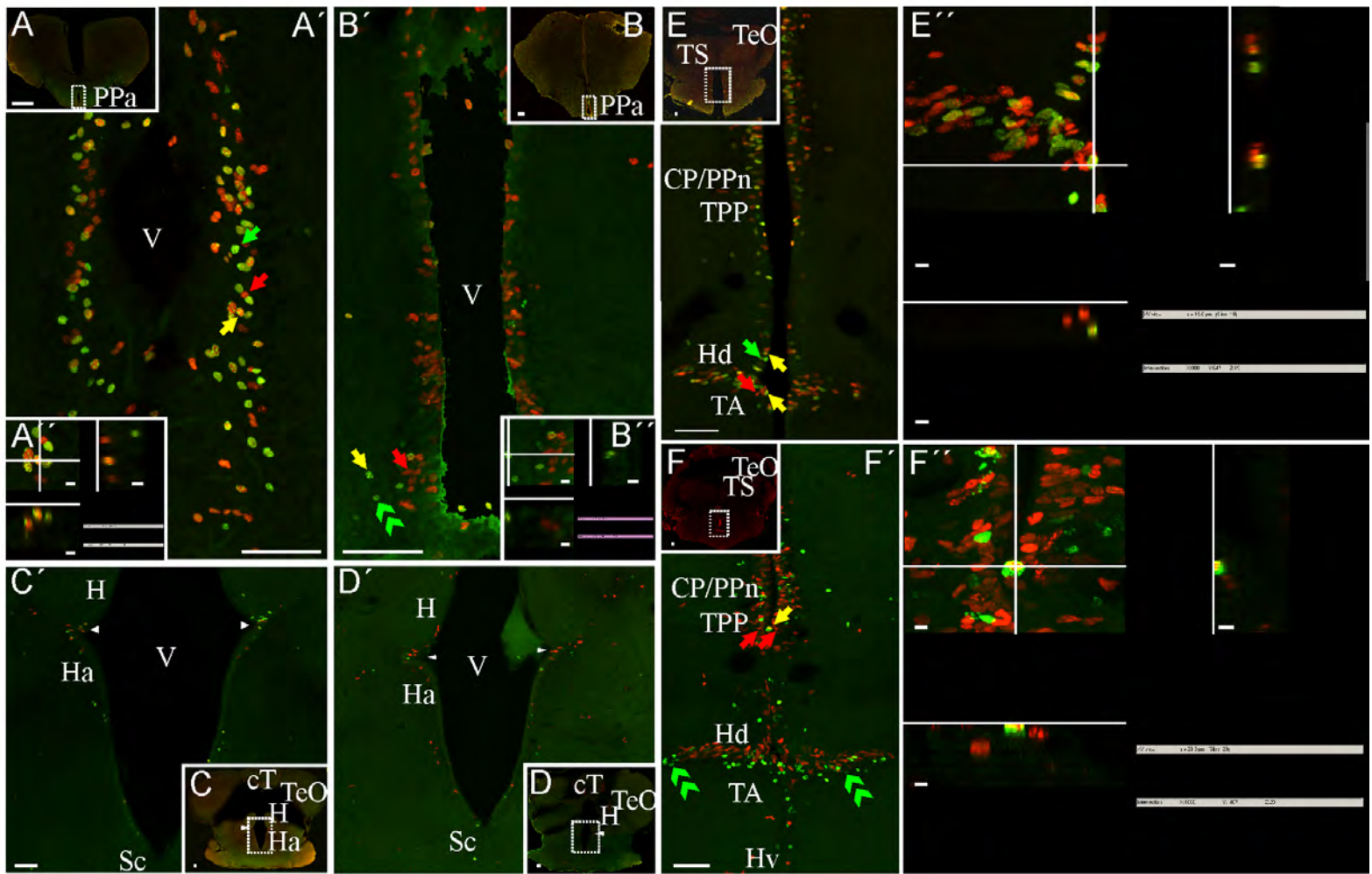


Figure 5.TIF

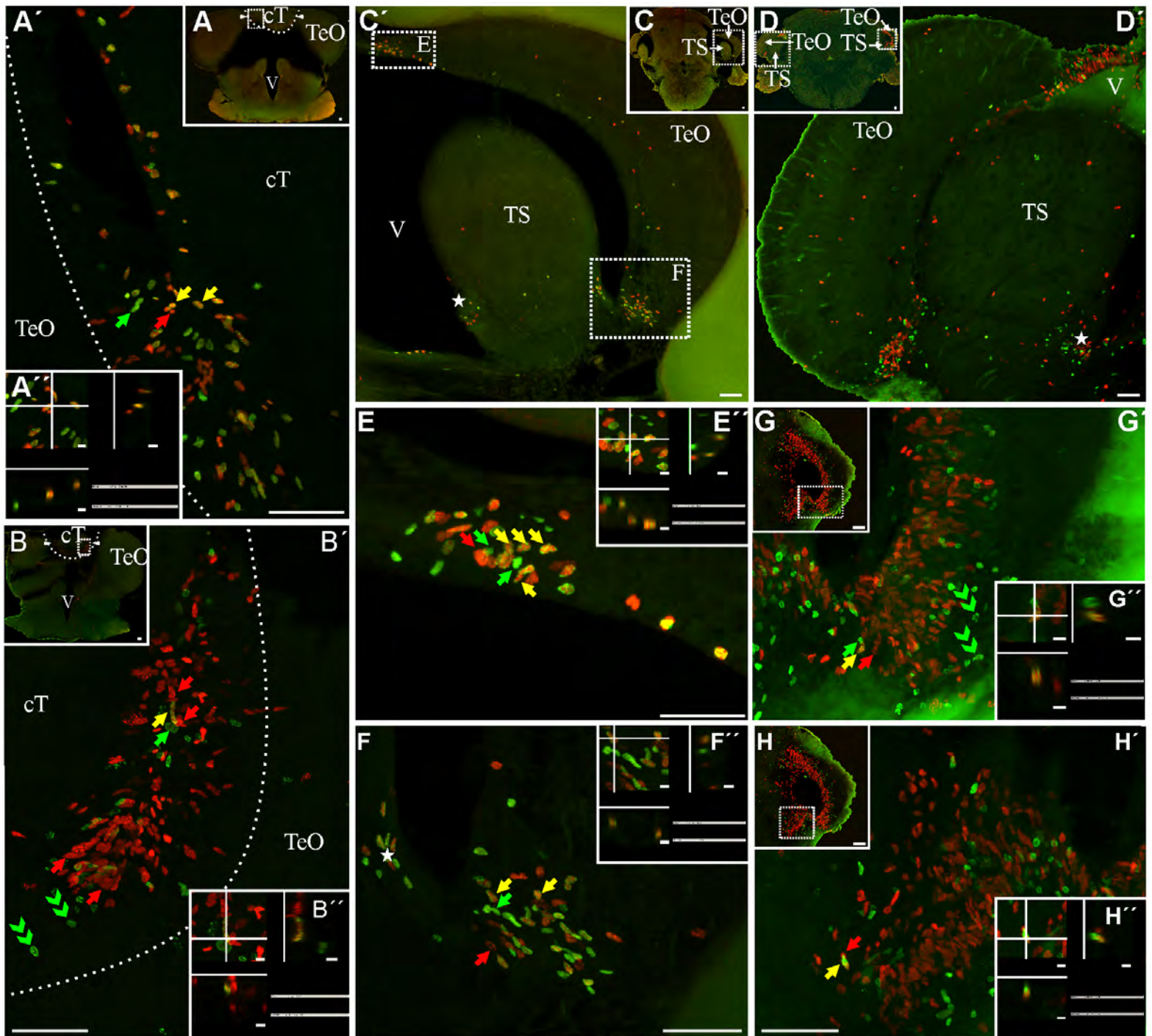


Figure 6.TIF

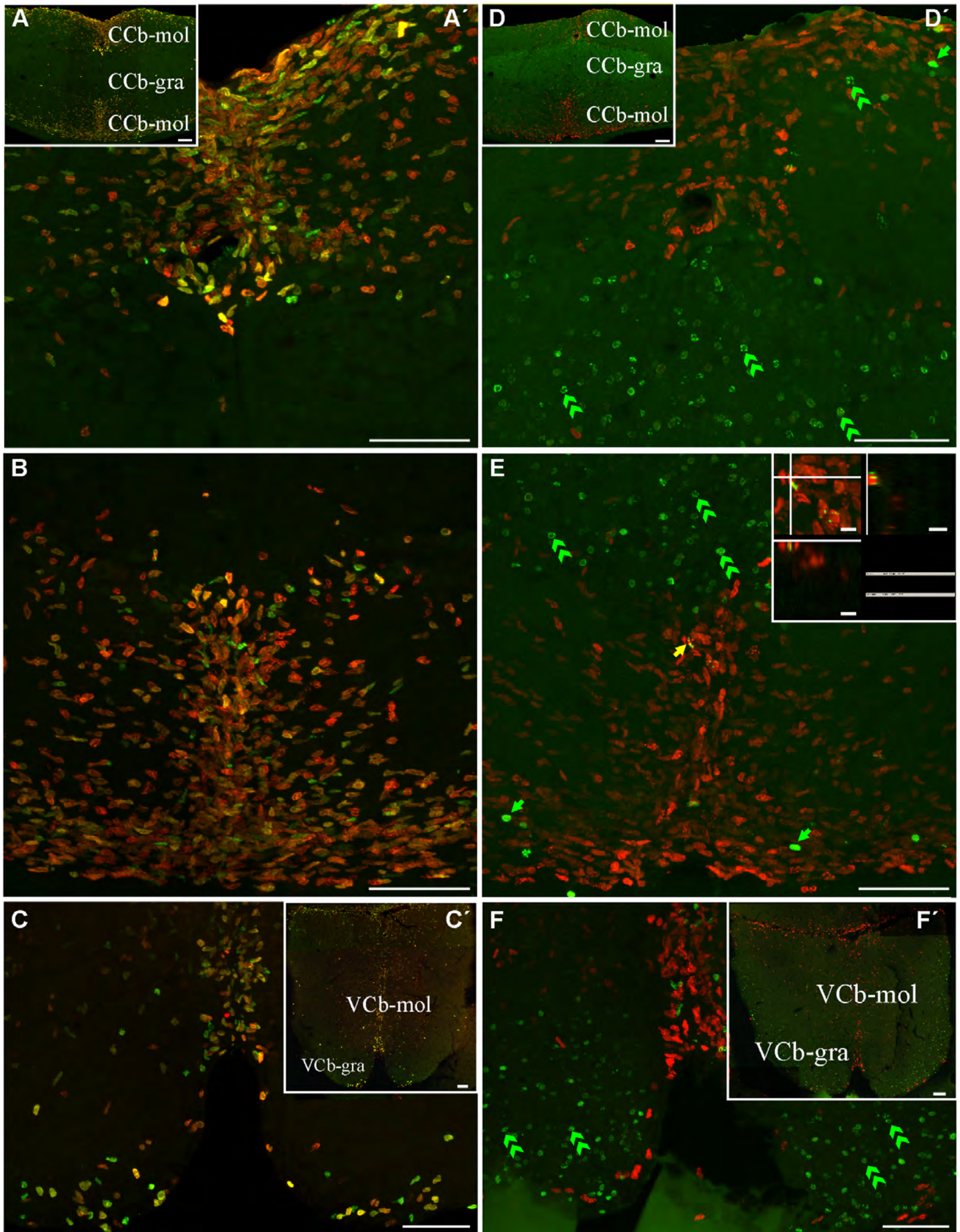


Figure 7.TIF

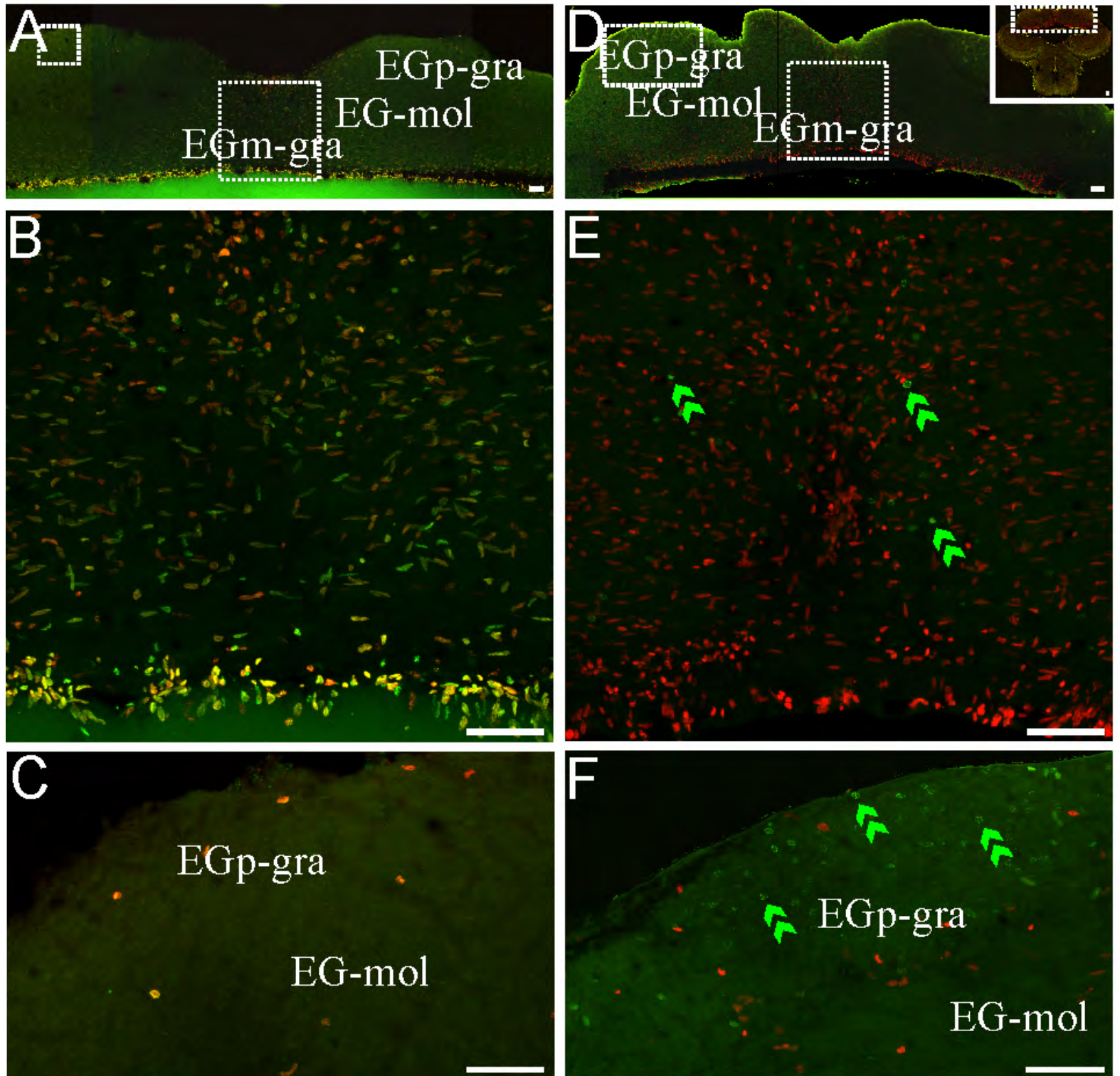


Figure 8.TIF

