HETEROGENEIDAD CELULAR EN LA ZONA VENTRICULAR TELENCEFÁLICA: UNA REGIÓN NEUROGÉNICA DEL CEREBRO DE Austrolebias charrua

J. C. Rosillo Martí^{ab} (#), G. Casanova Larrosa^{cd}(#), S. Olivera Bravo^e, A. Fernández^{ab}(*)

^a Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) ^b Neuroanatomía Comparada. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias (FC), Universidad de la República (UdelaR) ^c Sección Biología Celular, ^d Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión, FC - UdelaR, ^e Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE Montevideo, Uruguay

(*)Corresponding author, Email: <u>anabel@iibce.edu.uy</u>, Tel: (598 2) 487 1616 int.110, Fax: 598 2 5461 (#) Authors contributed equally to the work.

Recibido: Noviembre 2009. Aprobado: Abril 2010. Publicado: Mayo 2010.

RESUMEN

En contraste con los mamíferos los peces mantienen la capacidad regenerativa y neurogénica durante la adultez en numerosas regiones de su sistema nervioso. A través del uso de la 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU), inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión (MET) estudiamos la composición celular de la zona ventricular telencefálica (ZVT). La ZVT es uno de los sitios altamente proliferativos presentes en el cerebro de los peces *Austrolebias charrua*. Los núcleos marcados con BrdU mostraron variación en su forma y en el tipo de marcado. La combinación con BrdU/HuC/D puso en evidencia génesis de nuevas neuronas en esta región del cerebro. Por otro lado las células S-100+ allí presentes son abundantes y tapizan la primera fila de la luz ventricular. El análisis de la composición celular a través de la MET mostró claramente al menos tres tipos celulares que coexisten en la ZVT: células tipo I con núcleos muy electrondensos ubicados en la luz ventricular; células tipo II con núcleos de densidad media con forma irregular y células tipo III con núcleos de cromatina laxa, electronlúcida y abundante citoplasma. En muchas de estas células fue frecuente encontrar la presencia de un único cilio. Además de presentar características comunes con otros epitelios ependimarios, las uniones intercelulares encontradas exhibieron características particulares. Nuestros datos sugieren que la ZVT tiene capacidad neurogénica y comparte características descritas en nichos neurogénicos presentes en otros vertebrados. La presencia de numerosos tipos de uniones intercelulares, indican una gran actividad metabólica en esa zona.

CELL HETEROGENITY OF THE TELENCEPHALIC VENTRICULAR ZONE: A NEUROGENIC BRAIN REGION OF Austrolebias charrua

ABSTRACT

Contrary to mammals, several regions of the nervous system of adult fishes maintain their regenerative and neurogenic capacities. By using 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM), we have studied the cellular composition of the ventricular zone of the telencephalon (VZT), one of the highly proliferative zones found in the brain of *Austrolebias charrua* fishes. In VZT, BrdU positive nuclei exhibited different shapes and labelling. Double immunostaining of BrdU and HuC/D showed newly generated neurons. In addition, S-100 positive cells were abundant and cover the first line of the ventricle lumen. The TEM analysis of the cellular composition showed at least three cellular types cohabiting VZT: type I cells with very electrondense nuclei that face the ventricle lumen; type II cells with irregular and intermediate density nuclei and type III cells having electron lucid nuclei and abundant cytoplasm. Many of these cells showed a unique single cilium. Besides sharing common characteristics with other ependymal epithelia, intercellular junctions found exhibited particular features. In summary, our data suggest that VZT has neurogenic capacity and that the features of its cells share many aspects with those found in other vertebrate neurogenic niches. In addition, the presence of different intercellular junctions, suggest a significant metabolic activity in this zone.

Keywords: fishes, ventricular zone, neurogenesis.

INTRODUCCIÓN

Durante la embriogénesis, el plegamiento del ectodermo neural da origen al primordio del sistema

nervioso central (SNC) y a sus cavidades, futuras regiones ventriculares del cerebro. El epitelio adyacente a dichas cavidades, prolifera y da origen a todas las capas celulares

Fernández, et al.

que conformarán el SNC. En los organismos adultos, la capa de células adyacente a dichos ventrículos se denomina "zona ventricular" (ZV) [1], y consiste en un epitelio columnar pseudoestratificado, compuesto por células radiales. Hasta hace pocas décadas se pensaba que una vez finalizada la histogénesis de este sistema, el epitelio que tapizaba las zonas ventriculares y ependimarias, estaba compuesto por células que ya no eran capaces de proliferar [1,2]. Sin embargo actualmente se ha demostrado que en la edad adulta, persisten zonas similares a las embrionarias que mantienen la capacidad proliferativa y neurogénica [3]. En los mamíferos, dichas regiones están restringidas a unos pocos sitios como la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo [4]. En cambio en reptiles y aves, las zonas con capacidad proliferativa se encuentran ampliamente expandidas a diferentes regiones del cerebro [5]. Existen pocos datos respecto a lo que ocurre en peces teleósteos adultos. Estudios realizados en peces describen que, a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, la existencia de células con capacidad regenerativa y neurogénica persiste en numerosos sitios del SNC [6]. Estas "zonas matriz" o "nichos neurogénicos", funcionan como reservorios embrionarios a partir de los cuales podrían diferenciarse tanto neuronas como células gliales de acuerdo a las necesidades del sistema. La estructura fina de los sitios proliferativos ha sido extensamente estudiada en los mamíferos [4] y se conoce con menor detalle en reptiles y aves [7]. En peces teleósteos es mayormente desconocida. De estudios comparativos previos se desprende que estas regiones mitóticamente activas, presentan características en común y otras particulares de cada grupo estudiado [8]. Uno de los aspectos controversiales respecto del conocimiento sobre los nichos neurogénicos, es la determinación de las características estructurales que permitan identificar a la "célula madre". En este trabajo se describe la composición y disposición de las células y los tipos de asociación intercelular presentes en una de las zonas de mayor proliferación: la

zona ventricular telencefálica (ZVT) de *Austrolebias charrua*. Los estudios comparativos y el hallazgo de características celulares comunes en regiones equivalentes del SNC de distintos grupos zoológicos, podrían aportar información relevante para un mejor conocimiento del tema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se emplearon 11 ejemplares machos adultos de *Austrolebias charrua* de 6 meses de edad, distribuidos en dos grupos experimentales: 1) n = 8, ejemplares destinados a la realización de estudios de proliferación celular y 2) n = 3, destinados a análisis mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). Todo el estudio fue realizado bajo los lineamientos establecidos por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal del Uruguay (UdelaR).

Inyecciones de BrdU

Para determinar la presencia de células en estado de proliferación, los peces fueron inyectados con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma). Esta sustancia al igual que la timidina es captada durante la fase S del ciclo celular y es utilizada como marcador de proliferación. Se administró una dosis única intraperitoneal de 100 mg/Kg de BrdU, luego de la cual los peces se dejaron vivir 24 horas.

Todos los especímenes fueron anestesiados con Eugenol (sol. alcohólica al 10%) disuelto 1:1000 en el agua de la pecera. A continuación fueron perfundidos transcardíacamente con una solución salina heparinizada para el lavado de los vasos, seguida de la solución fijadora correspondiente. Las soluciones fijadoras utilizadas fueron: 1) paraformaldehído al 10 % en buffer fosfato (PB) 0.1 M a pH 7.4, para las técnicas de inmunocitoquímica y 2) paraformaldehído 4 % con glutaraldehído al 1 % en PB para MET.

Inmunocitoquímica (ICQ)

Luego de la perfusión con el fijador los cerebros fueron disecados y cortados en un vibrátomo a 60 µm de espesor. Secciones transversales a nivel del telencéfalo (fig. 1a) fueron lavadas sucesivas veces en PB, e incubadas toda la noche con un anticuerpo primario anti- BrdU de conejo 1:10.000 (Megabase Research) diluido en PB con Tritón X-100 al 0.3%. Luego de sucesivos lavados en PB los cortes fueron incubados por una hora en anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón o cabra anti-conejo. Para los estudios con microscopia de luz, se emplearon anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (1:500 Chemicon), diluidos en PB y con Tritón X-100 al 0.3%. El revelado se realizó mediante una reacción histoquímica con peróxido de hidrógeno y 3'-3' diaminobenzidina. Para los análisis mediante microscopia confocal, se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos: Alexa flúor 488 (verde) y 633 (rojo lejano) 1:2000 (Invitrogen).

A los efectos de determinar la estirpe celular de las células BrdU+ (proliferativas) se llevaron a cabo dobles marcados combinando el anticuerpo anti-BrdU con otro anticuerpo anti HuC/D 1:100 (marcador neuronal, Invitrogen), y anti S-100 1:200 (marcador de glia temprana, Sigma). Una vez culminada la incubación con el o los anticuerpos secundarios, los cortes fueron lavados en PB y montados con glicerol. Los controles consistieron en omitir en las incubaciones con el tejido, anticuerpos primarios o secundarios para comprobar la especificidad de las reacciones.

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de luz Nikon Eclipse E 200 y en un microscopio confocal Olympus FV300.

Microscopia Electrónica de Transmisión

Cortes transversales de telencéfalo de 100 a 150 μ m, análogos a los utilizados para ICQ, fueron post-fijados con OsO₄ al 2% en PB durante una hora a 4°C en oscuridad, lavados en PB, deshidratados en alcohol de

graduación creciente e incluidos en Araldita (Fluka). Los bloques se cortaron en un ultramicrótomo RMC MT-X equipado con una cuchilla de diamante DIATOME. Para ubicar la zona de interés (región ventricular del tercio anterior del telencéfalo: VT), se obtuvieron secciones semifinas (0.5 µm), que se colorearon con azul de metileno boráxico al 1% y se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E 200. Secciones finas (40 a 60 nm), fueron colectadas en rejillas de cobre con ventana (2x1mm), y colocadas sobre un film de Formvar. Luego de adheridas al film, se contrastaron por flotación en una solución saturada de acetato de uranilo acuoso y luego en citrato de plomo al 3 %. Los análisis se realizaron en un MET Jeol JEM 1010 operando a 80kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95 para captura de las imágenes. Las mismas fueron procesadas empleando el programa Photoimpact.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de los núcleos marcados con BrdU

A través de la utilización de BrdU en experimentos de corta duración (24 horas de sobrevida), nuestro grupo pudo determinar la existencia de al menos cinco sitios principales proliferativos en el cerebro de *Austrolebias*: bulbo olfatorio, paredes ventriculares del telencéfalo, torus longitudinalis, tectum óptico y cerebelo. Las reconstrucciones tridimensionales de los cerebros marcados con BrdU [9], mostraron una distribución continua de las células proliferativas a lo largo del eje rostro caudal, lindando con las regiones ventriculares del cerebro anterior, medio y posterior de estos peces.

En el telencéfalo, los núcleos BrdU+ se distribuyeron en las paredes ventriculares en toda la extensión del mismo. Para la realización de los estudios de MET, se escogió la porción del tercio anterior del telencéfalo, ya que exhibe mayor concentración de núcleos BrdU+.

En la (fig.1a) se muestra la zona donde se realizó nuestro estudio. Esta región podría considerarse como análoga a la zona subventricular (ZSV) de los mamíferos [10,11].

Fernández, et al.

Como se ha mencionado anteriormente, la ZSV es un engrosamiento del epitelio ependimario que conserva las características de la zona ventricular embrionaria con capacidad neurogénica. En ella hay una génesis continua de nuevas neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio, a lo largo de un camino restringido denominado **banda migratoria rostral**, cuya existencia ha sido comprobada en otros grupos de vertebrados [12]. Por ello se considera a la ZSV, como uno de los sitios neurogénicos indiscutidos que se mantienen en el adulto.

En un corte transversal a ese nivel, se observa que los núcleos BrdU+ pertenecen a las células que tapizan la pared ventricular. En la (fig.1b) se esquematiza un corte transversal donde se representa con puntos rojos la zona de los núcleos BrdU+ y en la (fig. 1c) se observa el marcado inmunocitoquímico con BrdU en el tejido, en una porción de la pared ventricular.



Fig. 1a. Microfotografía de la vista lateral del cerebro adulto de *Austrolebias* donde se destacan: Bulbo olfatorio (BO), Telencéfalo (Tel), Tectum óptico (TO) y Cerebelo (Ce). La línea roja discontinua indica el nivel telencefálico donde se realizó el estudio. 1b. Esquema de un corte transversal realizado a este mismo nivel. Los puntos rojos representan la distribución de células proliferantes (BrdU+)
en las paredes ventriculares y en la región ventrolateral de ambos hemisferios. 1c. Región del telencéfalo que exhibe proliferación celular constatada por inmunotinción de BrdU. Obsérvense los núcleos de color oscuro cercanos a la luz ventricular (LV).

Además; en dicha región, que proyecta hacia la luz ventricular (LV), hay un engrosamiento del epitelio ependimario con núcleos marcados (fig. 1c).También es posible apreciar diferentes tipos de marcado. Los núcleos redondos generalmente presentan una tinción más oscura y homogénea, mientras que los alargados muestran una marcación más clara y en algunos casos granular. En su mayoría los núcleos marcados presentan forma oval y el eje mayor se dispone perpendicular al borde de la pared ventricular que linda con la LV (fig. 1c). Los distintos tipos de marcado podrían representar diferencias en la incorporación de BrdU, debidas al momento de la fase de síntesis en que se hallaban las células cuando el marcador fue administrado, ó también podrían indicar la presencia de distintos tipos celulares proliferantes[13]

Inmunocitoquímica de doble marcado

Los datos provenientes de estos experimentos muestran la existencia de células neuronales HuC/D+, ubicadas fundamentalmente a partir de la segunda fila celular respecto del borde ventricular. HuC/D es una proteína ribosomal específica de neuronas y en estas células se expresa tanto en el citoplasma como en los nucléolos, por lo cual podemos corroborar con certeza su naturaleza neuronal. Algunas de estas neuronas se localizan en la primera fila (linderas a la luz ventricular), sin embargo la expresión de esta proteína es mucho menor (fig 2a). En algunos casos se observa la presencia de dobles marcados BrdU/HuC/D confirmando la potencialidad neurogénica de este sitio (fig. 2a) Inserto.

El marcador glial S-100 forma parte de una familia de proteínas involucradas en la activación de procesos dependientes de la transducción de señales mediadas por calcio, como la proliferación, la regulación del crecimiento celular y la exocitosis [14]. En general se utiliza como marcador glial temprano. En nuestro modelo se pudo constatar la presencia de células S-100+, localizadas preferentemente, en contacto con la LV (fig. 2b). La doble tinción con S-100 y HuC/D permite

Fernández, et al.

observar una estrecha relación entre los dos tipos celulares, donde las células S-100 completan todos los espacios que no están ocupados por las neuronas. Las prolongaciones de estas células, forman una intrincada red en la que las neuronas se encuentran inmersas (fig. 2c).

Análisis de la morfología subcelular

Los datos obtenidos a partir del análisis con MET de la ZVT confirman la presencia de más de un tipo celular como fue descrito con la ICQ. Es posible reconocer en las adyacencias de la luz ventricular al menos tres tipos de células bien diferenciables: 1) una población lindante con la luz ventricular, células tipo I, con núcleo heterocromático de perfil variable, citoplasma oscuro, y presencia frecuente de un cilio. En el citoplasma se observan cisternas de retículo endoplasmático rugoso y abundantes ribosomas libres, que contribuyen a la electrondensidad característica de éstas células. A menudo las células tipo I presentan entre sí complejos de unión de tipo zónula adherens (fig 2e). 2) Células tipo II, lindantes con la luz ventricular, aunque pueden estar presentes también en la segunda fila. Sus núcleos son de forma variada con indentaciones, cromatina homogénea y grado intermedio de condensación. Su citoplasma es más claro y presenta un notable desarrollo de los componentes del citoesqueleto, observándose grandes zonas ocupadas por haces de filamentos, lo que sugiere su naturaleza glial. Las células tipo II, pueden presentar ocasionalmente un cilio (dato no mostrado). Estas células contactan entre sí y con las células de tipo I, mediante uniones prominentes de tipo adherente desmosomas (figs 2 e,f). A ambos lados del desmosoma y adentrándose en el citoplasma, es posible observar largos filamentos que pueden extenderse por varias micras en el interior celular (fig. 2f). Muy a menudo, a escasa distancia de las uniones de tipo desmosoma y más alejadas de la superficie ventricular, las membranas de células vecinas se disponen perfectamente paralelas durante un tramo de longitud variable a lo largo de su trayecto uniones "tipo gap" (fig 2g), aunque no se

otros vertebrados. No se observa la estructura pentalaminar clásica presente en este tipo de uniones. A este nivel, la distancia entre ambas membranas es sumamente constante (aprox. 20 nm), y su aspecto se vuelve particularmente electrondenso. (fig 2g). 3) Células tipo III se disponen a una ó dos células de distancia de la luz ventricular (fig 2d). Están provistas de un núcleo eucromático de gran tamaño, esférico y con uno o dos nucléolos. El citoplasma es abundante y particularmente electronlúcido. No hay dudas que las células tipo III pertenecen a la población neuronal que probablemente se esté formando allí. La morfología de estas células y la presencia de uno o dos nucléolos prominentes, es concordante con las imágenes de ICQ realizada con el anticuerpo anti neuronal HuC/D (fig. 2a). la que nos garantiza la identidad celular.

Entre las interdigitaciones que rodean a este tipo celular, se ha detectado la existencia de especializaciones de membrana, en las que se observan proyecciones electrondensas, dispuestas regularmente en el espacio intermembrana. Estas uniones presentan similitudes con las de tipo septado (fig. 2h), descriptas entre membranas citoplasmáticas adyacentes de células gliales, características de invertebrados [15] y reportadas más recientemente- para vertebrados [16].

Las características celulares del epitelio ventricular del telencefalo de *Austrolebias*, concuerdan con lo conocido clásicamente para otros epitelios ependimarios: ser una zona proliferativa y presentar cilios que proyectan hacia la luz ventricular. Además, el aspecto y la distribución de los tres tipos celulares descriptos en este trabajo son homólogos a los observados por Zupanc a nivel de la pared del tercer ventrículo del cerebro de otra especie de pez teleósteo: *Eigenmannia sp.*. En este grupo, la presencia de núcleos electrondensos, con marcadas indentaciones (equivalentes a las células de tipo I de *Austrolebias*), refleja la elevada actividad mitótica de esta variedad celular [14]. Las células de densidad intermedia (tipo II, S-100+), presentan al MET características propias





Fig. 2 a-c. Imágenes de inmunocitoquímica de las paredes ventriculares del telencéfalo del cerebro de Austrolebias obtenidas en el microscopio confocal. 2a. Se muestran tres núcleos marcados con BrdU (rojo) situados en la periferia de la pared ventricular. Rodeando a estos núcleos se localizan neuronas (HuC+) en distinto grado de maduración incluyendo algunas recién generadas con doble marcación BrdU-HuC (inserto). 2b. En las proximidades de la luz ventricular, también se localizaron glias inmaduras dada su marcación positiva con S-100. 2c. Microfotografías que muestran marcación de HuC (rojo) y HuC(rojo)/S-100 (verde). Obsérvese que los espacios entre las neuronas HuC+ son ocupados por células gliales S-100+. 2d-h. Microfotografías obtenidas por MET. 2d. Las células tipo III son las neuronas jóvenes con núcleo redondo electronlúcido y uno o dos nucleolos. Las células tipo II, de densidad electrónica y tamaño intermedios respecto a las descritas anteriormente, se ubican próximas a la LV. Las células tipo I tienen igual ubicación que las tipo II, pero su cromatina es homogénea y de mayor densidad. Entre las células que conforman la pared ventricular, se observan importantes complejos de uniones intercelulares: 2e. uniones adherentes,

2f. desmosomas entre células tipo II; **2g.** uniones "tipo gap" más alejadas de la luz y **2h**. uniones similares a septadas. 157 Las uniones se indican con flechas y cada inserto son magnificaciones mayores, representativas de los tipos de unión.

de células gliales, comparables a las que Zupanc describe como "intermediate cells". Finalmente, las células tipo III que ocupan la zona interna adyacente a la ZVT y que –en algunos casos- incorporaron BrdU, coinciden en sus características con las identificadas por dicho autor como "young and migrating neurons" [17].

CONCLUSIONES

La zona periventricular del telencéfalo de *Austrolebias charrua* es una región altamente proliferativa, muestra células con fenotipo neuronal, glial y células que pueden representar estados de diferenciación intermedios. Entre ellas existen complejos de unión similares a los presentes en otros epitelios pero con características particulares. La existencia de numerosos tipos de uniones intercelulares, refuerza la idea de que nos encontramos frente a una zona neurogénica metabólicamente muy activa.

Algunas de las células de la ZVT mostraron la existencia de un cilio. Los datos sugieren que es una zona dinámica donde se están generando células gliales y en menor proporción neuronas. Estos resultados parecen coincidir con los previamente descritos en los nichos neurogénicos de otros grupos de vertebrados estudiados [3].

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a: Nibia Berois quien generosamente nos ha permitido utilizar el acuario, a María José Arezo quien nos cedió muchos de los ejemplares, y a Nicolás Papa quien mantiene el acuario. Agradecen también a PEDECIBA Biología quien ha financiado en gran parte este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

 Boulder Committee (1970) "Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology" *Anat. Rec.* 166:257–261.

- [2] M. Jacobson, *Develop. Neurobiol.*, Plenum Press, New York, 1991.
- [3] C.G. Gross (2000) "Neurogenesis in the adult brain: death of the dogma" *Nature Rev. Neurosci.* 5:308-315.
- [4] A. Álvarez-Buylla, J.M. García-Verdugo, A.D. Tramontin (2001) "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells" Nat.Rev.Neurosci. 2:287-293.
- [5] B.W. Lindsey, V. Tropepe (2006) "A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis" Prog. Neurobiol. 80:281-307.
- [6] G.K.H. Zupane (2006) "Neurogenesis regeneration in the adult fish brain" J. Comp. Physiol .192:649-670.
- [7] J.M. García-Verdugo, S. Ferron, N. Flames, L. Collado, E. Desfilis, E. Font (2002) "The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals" Brain Res. Bull. 57:765-775.
- [8] F. Doetsch, C. Scharff (2001) "Challenges for brain repair insights from adult neurogenesis in birds and mammals" Brain Behav. Evol. 58:306-322.
- [9] J.C. Rosillo, G. Casanova, S. Olivera, A.S. Fernández (2007) "Mapeo y caracterización de zonas proliferativas de peces del género Cynolebias" Actas Fisiol. 11:144.
- [10] A.B. Butler, W. Hodos Comparative Vertebrate Neuroanatomy: evolution and adaptation Wiley-Liss, New York, 1996.
- [11] E. Rink, M.F. Wullimann (2004) "Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafizh (Danio rerio)" Brain Res. 1011: 206-220.
- [12] A. Álvarez-Buylla, C. Lois (1995) "Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates" Stem Cells 13:263-272.
- [13] A.S. Fernández, J.C. Rosillo, G. Casanova, S. Olivera (2009) "Neurogenesis postnatal en cerebro de peces del género Austrolebias". XIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia pp. 174.

- [14] G.K.H Zupanc, M.M. Zupanc (1992) "Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (Eigenmannia sp.)" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9539-9543.
- [15] N. Lane (1984) "A comparison of the construction of intercellular junctions in the CNS of vertebrate and invertebrates" *TINS* 7:95-99.
- [16] S. Banerjee, A.D. Souza, M.A. Bhat (2006)
 "Organization and function of septate junctions: an evolutionary perspective" Cell. Biochem. Biophys. 46:65-77.
- [17] G.K.H. Zupanc (2001) "Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish" *Brain Behav. Evol.* 58:250-275.