

REPRODUCCIÓN EN PECES ANUALES ENDÉMICOS DEL GÉNERO *AUSTROLEBIAS*: HISTOLOGÍA GONADAL Y ULTRAESTRUCTURA DE LAS SUPERFICIES GAMÉTICAS

Por: Jimena Montagne

Orientadora: Nibia Berois

Tribunal: Nibia Berois, Graciela García y Flavio Zolessi

Universidad de la República, Facultad de Ciencias

Licenciatura en Ciencias Biológicas, orientación Biología Celular

Montevideo, Uruguay

2013



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



ANII
Agencia Nacional de
Investigación e Innovación

Agradecimientos

A la sección Biología Celular

Al grupo de Genética Evolutiva

Al tribunal

A la familia

A los amigos

Resumen

Los peces anuales son teleósteos de agua dulce que habitan masas de agua temporales de Sudamérica y África. En el género sudamericano *Austrolebias*, los peces adultos se reproducen desde el otoño hasta el final de la primavera. Presentan un comportamiento de cortejo que culmina con la deposición de los gametos en el sustrato donde ocurre la fecundación y el desarrollo de los embriones. Al comenzar el verano el hábitat acuático se seca resultando en la muerte de los adultos. Los embriones resisten la estación seca por su capacidad de detener el desarrollo (diapausas) y por la envoltura vitelina que los protege. Los peces anuales constituyen un modelo emergente para biología del desarrollo por algunas características favorables tales como: oviparidad, transparencia de los huevos y embriones, largos períodos de reproducción y fácil mantenimiento en el laboratorio. Al final del ciclo de vida, la rápida senescencia constatada genera preguntas sobre el envejecimiento de los vertebrados que están siendo abordadas. Durante la presente pasantía se realizó un acercamiento al modelo peces anuales, al manejo de los peces en el laboratorio y a preguntas que están siendo analizadas en este modelo. Primero, se realizó el mantenimiento de peces *A. affinis* y *A. charrua* y la obtención de embriones. Se estudiaron los embriones identificándose los estadios embrionarios definidos por Arezo y col. (2005). Segundo, se analizaron las gónadas de peces *A. charrua* adultos y seniles provenientes de La Coronilla (33°53'49.46"S 53°30'43.86"O). Mediante histología clásica se encontró que los peces adultos y seniles presentan gónadas funcionales con células germinales en todos los estadios de la gametogénesis. No se observan diferencias en la calidad de los tejidos y las células germinales al comparar adultos y seniles. Tercero, se estudiaron los gametos de *A. affinis* provenientes de Mercedes (33°07'17,2"S 58°02'11,55"O) y *A. charrua* provenientes de La Coronilla mediante microscopía electrónica de barrido. Se describe la superficie de la envoltura vitelina de los ovocitos y la morfología de los espermatozoides. Las envolturas vitelinas de ambas especies presentan filamentos cilíndricos y largos, con zonas proximales más gruesas y zonas distales que se afinan gradualmente. Las especies difieren en las dimensiones de los filamentos y el grado de diferenciación de los segmentos basales. Se visualizó el micropilo de *A. charrua*, un canal circular con una abertura exterior de 16-20 μm de diámetro y una abertura interior de 4,7-5,1 μm de diámetro. El micropilo es el único sitio de acceso de los espermatozoides a la membrana del ovocito. Los espermatozoides de ambas especies son similares en morfología y tamaño. Presentan núcleo esférico ($2,14 \pm 0,07 \mu\text{m}$ y $2,23 \pm 0,16 \mu\text{m}$ de diámetro *A. affinis* y *A. charrua* respectivamente), pieza media con mitocondrias dispuestas en un anillo y un flagelo con aletas laterales. Resulta interesante estudiar los gametos de más especies del género *Austrolebias* para determinar si en estas especies las dimensiones del micropilo contribuyen o no a la especie-especificidad.

Tabla de contenidos

Introducción	1
Los peces anuales como modelo biológico	1
Reproducción	2
Ovarios y ovogénesis	3
Testículos y espermatogénesis.....	5
Fecundación y gametos	5
Objetivos.....	7
Materiales y métodos.....	11
1)Mantenimiento de los peces anuales en el laboratorio	11
2)Análisis histológico de las gónadas	12
3)Análisis ultraestructural de los gametos de dos especies del género <i>Austrolebias</i>	14
Resultados y discusión.....	16
1)Mantenimiento de peces anuales en el laboratorio	16
2)Análisis histológico de las gónadas	19
Hembras	19
Machos	20
3)Análisis ultraestructural de los gametos de dos especies del género <i>Austrolebias</i>	24
Ovocitos.....	24
Espermatozoides	25
Conclusiones y perspectivas	29
BIBLIOGRAFÍA	30

Introducción

Los peces anuales como modelo biológico

Los peces anuales (Cyprinodontiformes; Aplocheiloidei) son teleósteos de agua dulce expuestos a ambientes extremadamente variables y que presentan tiempos de vida cortos. Habitan masas de agua temporales o charcos de Sudamérica y África¹. En el género sudamericano *Austrolebias* los adultos se reproducen a partir del otoño y hasta la primavera. Presentan un elaborado comportamiento de cortejo que culmina con la deposición de los gametos en el sustrato donde ocurre la fecundación y el desarrollo de los embriones. Al comenzar el verano el hábitat acuático se seca gradualmente y esta condición resulta en la muerte de todas las poblaciones adultas. La supervivencia de las especies depende de los embriones que permanecen enterrados en el sustrato. Los embriones resisten la estación seca por su capacidad de detener el desarrollo (diapausas) y porque la cubierta llamada envoltura vitelina o corion es sumamente resistente y los protege^{1, 2}. Una vez que los charcos se llenan en la siguiente estación lluviosa los embriones eclosionan y los alevines se desarrollan alcanzando la madurez sexual en unas ocho semanas².

Los peces anuales constituyen un modelo emergente para biología del desarrollo por algunas características favorables tales como: oviparidad, transparencia de los huevos y embriones, largos períodos de reproducción y fácil mantenimiento en el laboratorio². Debido a su ciclo de vida peculiar son fuente de preguntas sobre mecanismos del desarrollo que se apartan de los patrones mayoritarios del grupo de los peces teleósteos. Poseen un patrón de desarrollo embrionario temprano único en los vertebrados y la presencia de tres estadios de quiescencia (diapausas)^{2,3}. Por un lado, en referencia al desarrollo embrionario, la segmentación es meroblástica, se inicia siguiendo este patrón y resulta en la diferenciación (del interior hacia el exterior) de tres poblaciones celulares: capa sincitial interna, células profundas y capa envolvente. La primera característica especial del patrón de desarrollo de los peces anuales es la dispersión que ocurre durante la epibolia temprana. Esta etapa involucra las tres poblaciones celulares y el carácter diferencial con respecto al resto de los teleósteos es que las células profundas se dispersan en forma individual migrando hacia el polo vegetal. El número de células en esta etapa es bajo comparado con los teleósteos típicos². La segunda característica especial del desarrollo embrionario es la reagregación: las células profundas, que previamente se habían dispersado, convergen formando un agregado con forma de disco plano al iniciarse la gastrulación. Por lo tanto, en los peces anuales la epibolia está espacial y temporalmente separada de la gastrulación. A continuación se forma, en el disco, el eje embrionario con una morfología que recuerda a lo descrito para reptiles y aves, pero por mecanismos aún no

dilucidados. En referencia a la capacidad de experimentar diapausas, detenciones reversibles del desarrollo, éstas pueden ocurrir en tres estadios particulares: diapausa I en el estadio de dispersión, diapausa II en el estadio somítico medio (aproximadamente 30 somites) y diapausa III en los embriones pre-eclosión. La diapausa III ocurre en los embriones que han completado su desarrollo y es en este estadio en el cual los embriones pasan la estación seca. Las diapausas son variables en duración, facultativas u obligatorias dependiendo de los diferentes géneros. En el género *Austrolebias* las diapausas I y II son facultativas y la diapausa III es obligatoria^{2, 3}. Una tercera característica especial del modelo es la duración del desarrollo. Comparado con los teleósteos típicos el desarrollo embrionario en los peces anuales es más largo^{2, 3}. Las diapausas, de duración variable, aumentan el tiempo de desarrollo y la asincronía de las poblaciones de embriones. Incluso los huevos hermanos pueden producir embriones que se desarrollan en diferentes tiempos y es posible que esta característica sea beneficiosa en los ambientes impredecibles que estos peces habitan².

Al final del ciclo de vida, la rápida senescencia constatada en peces anuales genera preguntas sobre el envejecimiento de los vertebrados que están siendo abordadas^{4, 5}. El envejecimiento usualmente se define como una pérdida de funcionalidad progresiva acompañada por una disminución en la fertilidad y un aumento en la mortalidad al avanzar la edad⁶. El tiempo de vida de los peces anuales en la naturaleza se encuentra limitado por la duración de la estación lluviosa. En el laboratorio, y a pesar de mantener las condiciones de la estación lluviosa, su tiempo de vida no se prolonga de manera significativa. Al llegar el verano se constatan cambios anatómicos y fisiológicos en los ejemplares como consecuencia del envejecimiento. Estudios previos en los géneros *Austrolebias* y *Nothobranchius* han reportado que los peces anuales poseen un tiempo de vida definido, aún en cautiverio, que puede ser influenciado por la temperatura del agua y que desarrollan degeneraciones dependientes de la edad en órganos como ojos, hígado, riñones y timo⁴. A nivel macroscópico los peces seniles presentan cambios: pierden masa corporal, se observan escuálidos y con la columna espinal curvada⁴ (figura 1). Además, se ha reportado la pérdida de fertilidad con la edad⁴.

Reproducción

El grupo de investigación “Biología del Desarrollo y Reproducción de Peces” a cargo de la Dra. Nibia Berois y en el cual se desarrolla la presente pasantía ha descrito la diferenciación gonadal y la estructura de las gónadas y gametos de la especie *Austrolebias charrua* mediante análisis de histología clásica y microscopía electrónica⁷. En esta especie los embriones de 3 semanas, que ocupan más de la mitad de la superficie alrededor del vitelo, presentan primordios gonadales formados por células germinales y células somáticas. Es posible identificar las células germinales

en los preparados histológicos por su morfología y tamaño. Las células germinales indiferenciadas son de mayor tamaño que las células somáticas en las gónadas ($12 \pm 2,5 \mu\text{m}$ de diámetro), presentan una relación núcleo/citoplasma alta, núcleo con un nucleólo y citoplasma hialino⁷. Los embriones de 30 días se extienden alrededor del vitelo rodeándolo totalmente y se identifican dos tipos de tejido gonadal en diferentes individuos. El tejido gonadal tipo I presenta dos poblaciones de células germinales: una, cuyas células continúan presentando la morfología de célula germinal indiferenciada y otra constituida por células en mitosis. El tejido gonadal tipo II presenta menos células y todas con características de células indiferenciadas. En la mayoría de los teleósteos las células germinales en los ovarios presuntivos exceden en número a las células germinales de los testículos presuntivos. De acuerdo a este criterio en *A. charrua* la primera evidencia histológica de la diferenciación sexual se observa en los embriones de 30 días post-fecundación identificando a los tejidos gonadales tipo I como ovarios presuntivos⁷. Más avanzado el desarrollo algunos embriones pre-eclosión presentan ovarios en desarrollo y son clasificados como hembras y otros presentan tejidos gonadales con células germinales indiferenciadas y son clasificados como machos presuntivos (figura 2 a y b). En los peces juveniles (30-45 días post-eclosión) algunos individuos presentan ovarios y otros presentan testículos (figura 2 c y d). No habiéndose encontrado ningún ejemplar en un estadio intermedio entre ambos sexos se definió que el patrón de diferenciación sexual de *A. charrua* es gonocórico diferenciado⁷.

Ovarios y ovogénesis

En lo que refiere a las hembras de la especie *A. charrua*, en el estadio embrionario pre-eclosión los ovarios contienen oogonias y ovocitos pre-vitelogénicos⁷. Las oogonias se multiplican por mitosis y luego de la última división mitótica, al iniciar la meiosis se identifican los ovocitos. En los peces teleósteos, al igual que ocurre en los demás vertebrados, el desarrollo de los ovocitos está muy estrechamente relacionado con el de las células somáticas⁸. Los ovocitos se encuentran rodeados por células somáticas o foliculares formando los folículos ováricos. La meiosis en la ovogénesis de los vertebrados no es un proceso continuo, ya que presenta detenciones. La primera ocurre en el diploteno de la profase I. Los ovocitos en este estadio se denominan ovocitos primarios. Contienen los cromosomas duplicados y con la morfología típica de los plumulados, en el caso de los teleósteos. Ocurre un aumento en el número de nucleolos debido a la amplificación de los genes organizadores nucleolares. Los ARNm y ARNr son transportados al citoplasma el cual presenta afinidad por los colorantes básicos (como la hematoxilina) en los ovocitos pre-vitelogénicos. En los peces juveniles y adultos (*A. charrua*) los ovarios contienen oogonias, ovocitos pre-vitelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos vitelogénicos totales los cuales pueden ser identificados por su tamaño, morfología del núcleo y del citoplasma y la

presencia de envoltura vitelina⁷. La vitelogénesis es el proceso de incorporación de las proteínas vitelogeninas al citoplasma de los ovocitos. Las vitelogeninas son proteínas de síntesis hepática que viajan vía sanguínea e ingresan al citoplasma de los ovocitos por endocitosis mediada por receptores y vesículas recubiertas por clatrina⁹. El genoma de los peces teleósteos estudiados presenta múltiples genes de vitelogeninas (*vtgs*). En algunas especies y previo al ingreso de la vitelogenina, ocurre la acumulación de lípidos en el citoplasma de los ovocitos. En forma paralela a la vitelogénesis, en la superficie de los ovocitos ocurre la deposición de la envoltura vitelina. Las proteínas que forman la envoltura vitelina son proteínas de matriz extracelular y contienen un dominio ZP. Al mismo tiempo, en el polo animal, se forma el micropilo, un orificio en la envoltura. La localización del micropilo en el ovocito indica el futuro polo animal. Al final del proceso de ovogénesis ocurre la maduración: los ovocitos primarios culminan el estadio de diploteno y retoman la primera división meiótica. El núcleo de los ovocitos migra hacia el polo animal y el vitelo se vuelve homogéneo⁷. Ocurre la primera división meiótica con la liberación del primer cuerpo polar y el ovocito inicia la segunda división meiótica que resulta detenida en la metafase. Finalmente, los ovocitos son ovulados (separándose de las células somáticas) en el estadio de metafase II⁸. Desde la madurez sexual hasta la senescencia se observan en *A. charrua* células en todos los estadios de la ovogénesis, por lo tanto el patrón de desove es asincrónico⁷.

La atresia folicular es un proceso degenerativo que ocurre en los ovarios de peces y otros vertebrados y afecta la fertilidad de las hembras. En algunas especies de teleósteos se ha observado que el núcleo del ovocito se desintegra, la envoltura vitelina se fragmenta y las células foliculares se hipertrofian¹⁰. Los estudios ultraestructurales revelan la degradación de los organelos en el citoplasma del ovocito. Se ha encontrado mediante histoquímica y estudios de pinocitosis que las células foliculares hipertrofiadas presentan características fagocíticas. Se sugiere una acción sinérgica de las células foliculares y células del sistema inmune en la reabsorción del ovocito. Las células del sistema inmune (granulocitos eosinófilos y macrófagos) invaden el ovocito en degeneración, liberan sus gránulos y degeneran al final del proceso resultando en la formación de depósitos de pigmentos amarillos-marrones caracterizados como lipofuscinas¹⁰.

Testículos y espermatogénesis

Los testículos de los peces teleósteos se componen de dos compartimientos: tubular e intersticial. El primero contiene células de Sertoli y células de la línea germinal contenidas y limitadas por una lámina basal. El segundo contiene células de Leydig, fibroblastos, matriz conectiva y vasos sanguíneos. Grier (1981) ha definido dos tipos testiculares en base a la distribución de las espermatogonias: espermatogonial no-restringido y espermatogonial restringido¹¹. El tipo no-restringido presenta espermatogonias en toda la longitud de los túbulos y es el tipo testicular de la mayoría de los teleósteos. El tipo espermatogonial restringido es típico de los peces de la Serie Atherinomorpha (que incluye el Orden Cyprinodontiformes). Las espermatogonias se encuentran restringidas al extremo distal ciego de los túbulos inmediatamente por debajo de la túnica albugínea, asociadas con células de Sertoli (figura 3). Los testículos de la especie *A. charrua* corresponden al patrón espermatogonial restringido⁷. Las células de Sertoli se organizan formando nidos (también llamados cistos) en el momento en que las espermatogonias se transforman en espermatocitos. En esta especie se observan nidos con células germinales en todos los estadios de la espermatogénesis, correspondiendo con un patrón de reproducción continuo⁷. Los túbulos se extienden desde la periferia a la región central de las gónadas y allí se abren en una red de ductos deferentes. La espermatogénesis tiene lugar en los nidos y el desarrollo de las células germinales es sincrónico dentro de cada unidad¹¹. Los espermatocitos son células germinales que se encuentran en meiosis. La segunda división meiótica da como resultado espermatidas haploides las cuales entran en la espermiogénesis, una transformación nuclear y citoplásmica que resulta en la formación de los espermatozoides maduros. Durante este proceso las histonas asociadas al ADN son sustituidas por protaminas, resultando en una progresiva condensación de la cromatina. Las protaminas son sintetizadas por las espermatidas. Los detalles de la espermiogénesis varían considerablemente incluso entre especies cercanas. Durante la espermiación los espermatozoides son liberados a los ductos deferentes y las células de Sertoli pasan a formar las paredes de los mismos¹¹.

Fecundación y gametos

La fecundación en los peces teleósteos presenta características diferentes a la de otros vertebrados. El ovocito se encuentra recubierto por una envoltura vitelina (zona pelúcida o corion) al igual que todas las especies de vertebrados, pero la interacción con el espermatozoide ocurre en el micropilo¹². El micropilo es una estructura ovocitaria especial de los teleósteos. Se forma durante la deposición de la envoltura vitelina, se localiza en el polo animal y es el único sitio de entrada para el gameto masculino. En general es un canal con forma de embudo cuyo

diámetro interno es similar al diámetro de la cabeza del espermatozoide de la misma especie. Presenta diferencias morfológicas entre especies, con valor taxonómico. El espermatozoide de los teleósteos no posee acrosoma, por lo tanto durante la fecundación no hay reacción acrosómica. El espermatozoide se fusiona con la membrana del ovocito que subyace al micropilo. Luego de que el ovocito es activado por el espermatozoide el micropilo se cierra, un mecanismo asociado a la prevención de la polispermia¹².

La estructura de la envoltura vitelina se relaciona con las condiciones ambientales. De acuerdo con el comportamiento luego de la ovulación los peces generan dos clases de ovocitos: pelágicos (altamente hidratados y que flotan en el agua de mar) o demersales (generalmente en agua dulce que se adhieren a plantas o a un sustrato). Generalmente la envoltura vitelina de los ovocitos pelágicos es lisa y poco ornamentada mientras que la envoltura de los ovocitos demersales es adhesiva y ornamentada¹³. La envoltura vitelina de los ovocitos de los peces anuales del género *Austrolebias* se encuentra ornamentada por filamentos cuyo patrón ultraestructural difiere entre las especies. Estudios sobre varias especies del género han descrito filamentos filiformes (figura 4), y en algunas especies se distinguen dos segmentos en cada uno de los filamentos: segmento basal y segmento distal¹⁴. Para los peces de agua dulce en general y para los peces anuales en particular se ha sugerido que la ornamentación de la envoltura vitelina es especie-específica².

La morfología de los espermatozoides refleja el modo de reproducción de las especies. Los espermatozoides de los peces anuales son aquaspermas simples¹⁵. La forma del núcleo es esférica y las mitocondrias forman una banda detrás del núcleo formando una pieza media muy corta. En análisis de microscopía electrónica los espermatozoides de *A. charrua* presentan una cabeza esférica ($3,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro), una pieza media formada por mitocondrias esféricas organizadas en una sola fila y un flagelo con aletas laterales⁷ (figura 5). Las especies de teleósteos con fecundación interna presentan modificaciones en la morfología de los espermatozoides como alargamiento del núcleo y/o de la pieza media¹¹.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el entrenamiento en técnicas de Biología Celular y un acercamiento a preguntas de esta disciplina y de Biología del Desarrollo que actualmente son objeto de análisis por el grupo de investigación en el cual se desarrolla la pasantía. Específicamente se propone:

- 1) Conocer y manejar las pautas sobre el mantenimiento de los peces anuales en el laboratorio
- 2) Describir los cambios gonadales al final del ciclo de vida de estas especies e identificar señales estructurales de envejecimiento
- 3) Analizar la ultraestructura de los gametos de dos especies del género *Austrolebias* aportando al tema interacciones gaméticas

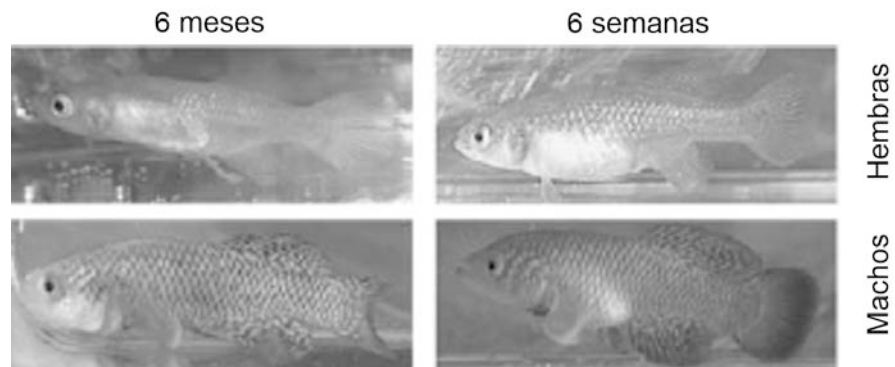


Figura 1- Peces anuales del género *Nothobranchius* de 6 meses (izquierda) y 6 semanas de edad (derecha). Es notable la pérdida de masa corporal en los peces seniles (6 meses). Imagen tomada de Genade y col. (2005)⁴.

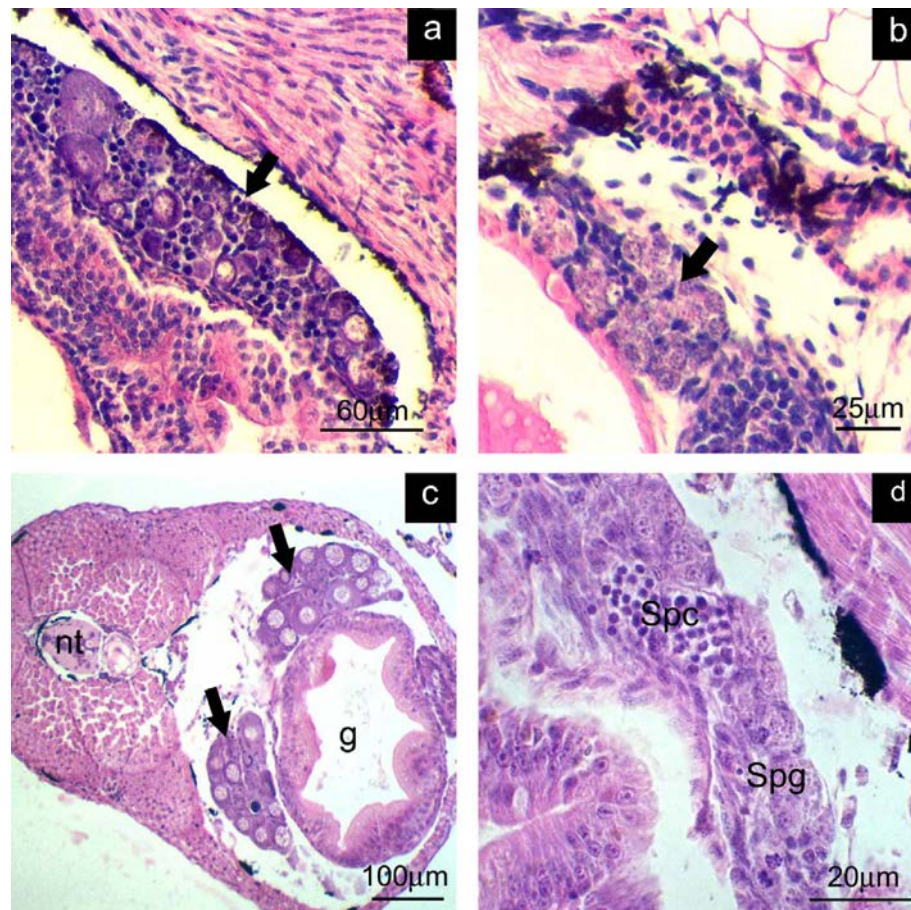


Figura 2- Desarrollo gonadal de *Austrolebias charrua*. a y b-Alevines el día de la eclosión, a-flecha: ovario, b-flecha: testículo presuntivo. c y d-Alevines 30 días luego de la eclosión: c-flechas: ovarios, g: tubo digestivo, nt: tubo neural, d-Spg: espermatogonias, Spc: espermatocitos en nidos. Imágenes tomadas de Arezo y col. (2007)⁷.

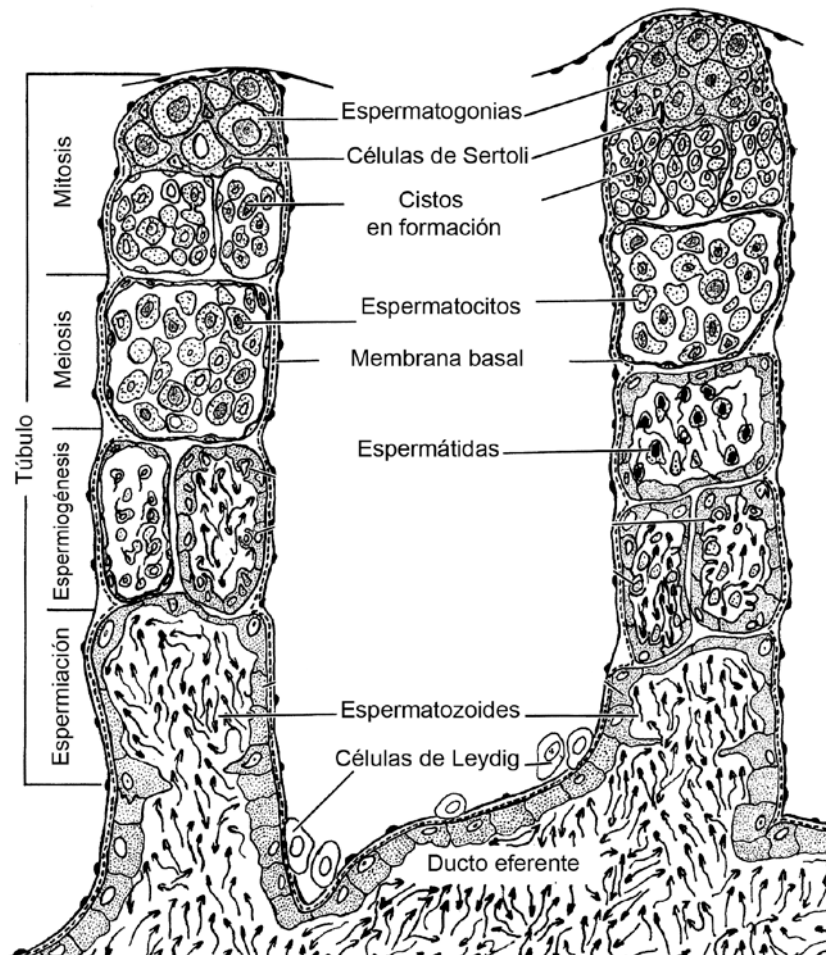


Figura 3- Representación esquemática de la estructura testicular de dos especies del género *Fundulus* correspondiente al modelo testicular restringido. Las espermatogonias se localizan solamente en la zona más distal de los túbulos intercaladas con células de Sertoli. Las células de Sertoli forman los cistos (nidos) en los cuales tiene lugar la espermatogénesis. Durante la espermiación las células de Sertoli pasan a formar la pared del ducto eferente. Esquema adaptado de Grier (1981)¹¹.

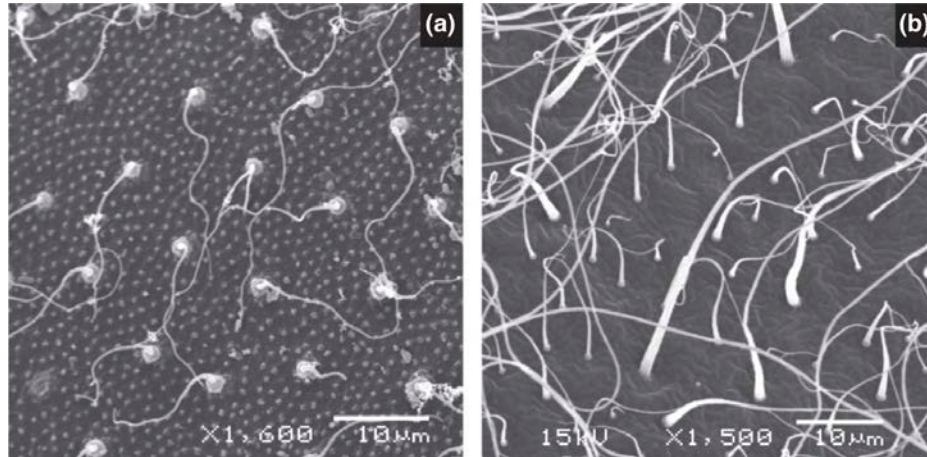


Figura 4- Ultraestructura (MEB) de la envoltura vitelina de dos especies del género *Austrolebias*: (a) *A. nigripinis*, (b) *A. charrua*. Se observan diferencias en las superficies coriónicas, la forma de los filamentos y su distribución. Imágenes tomadas de Berois y col. (2012)².

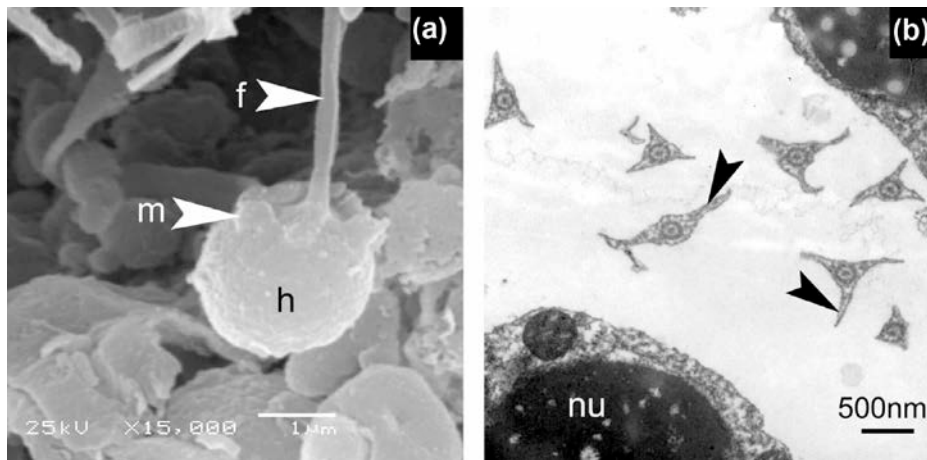


Figura 5- Ultraestructura de los espermatozoides de la especie *A. charrua*: (a) Microscopía electrónica de barrido (MEB) (h: cabeza, m: mitocondria, f: flagelo), (b) Microscopía electrónica de transmisión (MET) se aprecian las aletas laterales de los flagelos (flechas: aletas laterales, nu: núcleo). Imágenes tomadas de Arezo y col. (2007)⁷.

Materiales y métodos

El siguiente texto constará de tres secciones principales en correspondencia con los tres objetivos planteados en la introducción.

1) Mantenimiento de los peces anuales en el laboratorio

Los adultos fueron mantenidos en peceras de 30-40 litros con agua corriente declorinada (pH 6,5-7) con filtración y aireación continua, con cambios del 25% del agua dos veces por semana. Las peceras utilizadas tienen una división parcial inferior: en una mitad se prepara un filtro biológico con placas de plástico, piedras y un aireador y en la otra se puede colocar un recipiente con un sustrato para la puesta de los huevos. La alimentación fue diaria con alimento vivo *Tubifex* sp.

Mientras no necesitamos reproducir los ejemplares los adultos se mantuvieron separados en diferentes peceras. Las hembras pueden agruparse en bajo número pero los machos deben mantenerse en peceras individuales, dado su comportamiento territorial que puede llegar a ser agresivo.

Para la obtención de embriones se colocó una pareja o un macho y dos hembras en cada pecera, agregando, en el fondo de la pecera, un recipiente con turba o bolitas de vidrio de 500µm de diámetro (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) por 10-15 días. A continuación se retiró el recipiente y se obtuvieron los embriones mediante pipeteo cuidadoso del sustrato o utilizando un colador en el caso de usar bolitas de vidrio. Dado que el desove es diario conviene instrumentar un régimen de descanso de los reproductores 2 veces al mes retirando la turba por períodos de 5 días. Los embriones se colocaron en placas de Petri con agua declorinada, se limpiaron mediante desplazamiento en papel de filtro húmedo y se llevaron a otra placa con solución Yamamoto¹⁶. Los embriones pueden ser cultivados en solución Yamamoto en estufa a 25°C y puede observarse su desarrollo embrionario en el microscopio debido a que son transparentes. Se obtuvieron embriones de *A. affinis* y *A. charrua* los cuales se estudiaron colocándolos en una cámara especial con una gota de solución Yamamoto y observando mediante un microscopio de campo claro. Se identificaron los estadios embrionarios de acuerdo con Arezo y col. (2005)³.

Solución de Yamamoto (1L)

-  NaCl 7,5 g
-  KCl 0,2 g
-  CaCl₂ · 2H₂O 0,3 g
-  Llevar a pH 7.3 con NaOH antes de usar

Se guarda en heladera y una alícuota se mantiene en la estufa de 25°C donde están creciendo los embriones. Se puede agregar penicilina 0.06 g/L (100 U/ml).

Con el fin de completar el ciclo de vida en el laboratorio y optimizar la viabilidad de embriones y alevines se simula la estación seca en el laboratorio. Se retiran los recipientes conteniendo la turba con embriones de las peceras, se escurren y se dejaron secar al aire. Se debe llegar a un estado de humedad óptima; la turba no debe liberar agua al apretarla y si se toca con un papel, el papel no debe humedecerse. Cada turba se coloca en una bolsa de nylon cerrada, con una buena cantidad de aire y con identificación (procedencia, especie y fecha). Se mantienen las bolsas bien cerradas en oscuridad y a 19°C durante 3-7 meses. Pasado este tiempo se induce la eclosión hidratando las turbas con embriones. Las mismas se colocan en peceras, se agrega agua declorinada hasta los 3 cm y se coloca aireación suave. La eclosión ocurre entre 12 y 24 horas. No se suministra alimento el primer día. Gradualmente se agrega agua a las peceras y el segundo día comienza la alimentación diaria con larvas nauplius de *Artemia* sp. Se mantiene este régimen por 20 días. A continuación se suma *Daphnia* sp. al alimento anterior. A los dos meses de edad se puede visualizar el dimorfismo sexual externo y a partir de allí se los separa por tamaño, sexo o intereses experimentales.

2) Análisis histológico de las gónadas

Para abordar el segundo objetivo se analizaron las gónadas de peces *A. charrua* adultos y seniles mediante histología clásica. Los adultos (2874 y 2869) fueron colectados en el mes de setiembre del año 2012 en La Coronilla, Rocha 33°53'49.46"S 53°30'43.86"O. Los peces seniles (3153-3156) fueron capturados en el mes de octubre del mismo año y en la misma zona. Ambos grupos fueron sacrificados pocos días después de ser capturados. Por otro lado, algunos peces seniles provenientes de la misma zona fueron criados en el laboratorio durante aproximadamente 10 meses (2021-2026). No todos los peces considerados seniles presentaban la morfología típica (figura1). Al momento del sacrificio se siguió la reglamentación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Los animales fueron anestesiados y sacrificados mediante 2-fenoxietanol al 5%. Se realizó la disección de las gónadas utilizando pinzas y tijeras, y las muestras fueron fijadas por inmersión en la solución fijadora Bouin. A continuación se realizó la deshidratación, diafanización, impregnación e inclusión en bloque de parafina. Mediante microtomía en un micrótomos Reichert-Jung modelo 1130 Biocut se obtuvieron secciones finas de 5 a 6 µm de espesor adecuadas para el análisis mediante el microscopio óptico¹⁷. Los preparados fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina¹⁸. A continuación se detalla el procedimiento:

Fijación

- 📌 Solución madre Bouin (ácido pícrico 7,5 mL + formol puro 2,5 mL) + ácido acético 0,5 mL
- Inmersión durante 3 horas, a continuación pasar solución de etanol 70%

Deshidratación

- 📌 Alcohol 70% 30 minutos
- 📌 Alcohol 95% 2 lavados de 30 minutos
- 📌 Alcohol 100% 30 minutos

Diafanización

- 📌 Cloroformo I 20 minutos
- 📌 Cloroformo II 20 minutos
- 📌 Cloroformo III 20 minutos

Impregnación

- 📌 Paraplast I 30 minutos
- 📌 Paraplast II 30 minutos
- 📌 Paraplast III 30 minutos

Microtomía

Se realizaron secciones de 5 a 6 μm de espesor. Al salir de la cuchilla del micrótopo las secciones de parafina se unen entre si formando una cinta, son extendidas en un baño de agua destilada termostáticamente controlado (45°C) y desde allí montadas en los vidrios portaobjetos¹⁷. Los vidrios portaobjetos fueron previamente cubiertos con una fina capa de albúmina de Mayer (50 cm^3 clara de huevo + 50 cm^3 glicerol + una piedra de timol). Luego de montadas las muestras se llevaron a atmósfera de formol por 12 horas (en estufa 37°C).

Tinción con H y E

Desparafinado de los cortes

Se realiza mediante la inmersión de los cortes, colocados en un coplin, en xilol.

- 📌 Xilol I 5 minutos
- 📌 Xilol II 5 minutos

Rehidratación

Los colorantes elegidos fueron solubilizados en agua por lo cual los cortes desparafinados deben ser rehidratados para permitir su acción. La rehidratación se realiza con alcoholes de graduación decreciente.

- 📌 Alcohol 95% 5 minutos
- 📌 Alcohol 70% 5 minutos

- 🌿 Agua destilada 5 minutos

Coloración nuclear

- 🌿 Hematoxilina de Mayer 8 minutos
- 🌿 Agua destilada un lavado
- 🌿 Virado en agua corriente 10 minutos
- 🌿 Agua destilada dos lavados

Coloración citoplásmica

- 🌿 Eosina amarillenta alcohólica 4 minutos

Deshidratación

Debido a que el medio de montaje no es miscible en agua se hace imprescindible la deshidratación de los cortes.

- 🌿 Alcohol 95% I 1 minuto
- 🌿 Alcohol 95% II 1 minuto
- 🌿 Alcohol 100% 1 minuto

Intermediario

Se sumergen los preparados en xilol que es un solvente del medio de montaje y actúa como intermediario entre los alcoholes de deshidratación y el medio de montaje.

Montaje definitivo

El medio de montaje utilizado fue bálsamo de Canadá sintético (Biopack). Se coloca una gota y luego un vidrio cubreobjetos por encima cuidando que no se formen burbujas.

Los preparados fueron observados mediante un microscopio fotónico de campo claro y se tomaron imágenes digitales. Con el objetivo de analizar la actividad gonadal y la fertilidad, se analizó la frecuencia de ovocitos vitelogénicos y figuras de atresia en los ovarios. Para este fin se analizaron 4 secciones en diferentes sitios de la gónada de la hembra 2869 y 5 secciones de las hembras seniles 3135, 2023 y 2021.

3) Análisis ultra-estructural de los gametos de dos especies del género *Austrolebias*

El material analizado corresponde a las especies *A. affinis* y *A. charrua*. Los ejemplares, un macho y una hembra de cada especie, fueron mantenidos en acuarios de acuerdo a los procedimientos descritos en el ítem 1). Los de *A. affinis* provienen de Mercedes 33°07'17,2"S 58°02'11,55"O y los de *A. charrua* provienen de La Coronilla 33°53'49.46"S 53°30'43.86"O. Se analizaron ovocitos y espermatozoides. El material se fijó en glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato pH7,4 durante dos horas a temperatura ambiente y se conservó en heladera a 4°C. El procesamiento para observación mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) se describe a continuación:

Protocolo para observación mediante MEB

-  Fijación en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato pH7,4 durante dos horas
-  3 lavados en buffer fosfato pH7,4
-  Deshidratación en acetonas de concentración creciente (15%-30%-50%-70%-80%-100%) en baños de 15 minutos cada uno y 3 baños de acetona 100%
-  Secado al punto crítico del CO₂ en el equipo DCP-1: Critical Point Dryer DENTON
-  Montaje en porta-muestras cubiertos con cinta doble faz o con pintura de grafito
-  Metalizado con oro o paladio en Sputter Coater
-  Observación en el MEB (JEOL 5900 Low Vacuum)

Para los pasos de deshidratación y secado a punto crítico se colocó el material en recipientes porosos resistentes a solventes (EMS 800Å 12,7 mm x 15,5 mm).

Se analizó la ornamentación de la envoltura vitelina de los ovocitos y la morfología de los espermatozoides. Se tomaron medidas de las estructuras características de los gametos de ambas especies utilizando el software Image J. Se realizó un tratamiento estadístico de los datos utilizando el software Microsoft Excell 2012 y Sigma XL V6.

Resultados y discusión

1) Mantenimiento de peces anuales en el laboratorio

Durante la presente pasantía se han aprendido y aplicado las pautas de mantenimiento de peces anuales en el laboratorio que han sido desarrolladas por el grupo de investigación. Se obtuvieron buenos resultados: los peces se encontraban saludables y produjeron embriones viables que fueron estudiados en la misma pasantía, en clases prácticas demostrativas y en algunas otras aproximaciones que se llevaron a cabo por el grupo de investigación en el período de la pasantía.

Se mantuvo exitosamente una pareja de peces *A. affinis* y dos de *A. charrua*. Se obtuvieron embriones de ambas especies y se estudió el desarrollo embrionario mediante observación en un microscopio fotónico de campo claro. Los embriones de *A. affinis* miden entre 1262 y 1334 μm de diámetro. En la figura 6 se muestran dos de los embriones estudiados, uno se encuentra en diapausa I y el otro en un estadio de la organogénesis. Los embriones de *A. charrua* miden entre 1411 y 1445 μm de diámetro. En la figura 7 (a, b y c) se muestran embriones en diferentes estadios del desarrollo: (a) estadio de eje embrionario que corresponde a gastrulación, (b) embrión somítico con 40 somites, que en la zona de la cabeza presenta vesículas ópticas y óticas y (c) embrión en organogénesis con células pigmentadas en la zona dorsal. Mediante el microscopio fotónico es posible observar la envoltura vitelina y los filamentos que se muestran en las figuras 6d y 7d. Se observa claramente que la especie *A. charrua* presenta filamentos más largos.

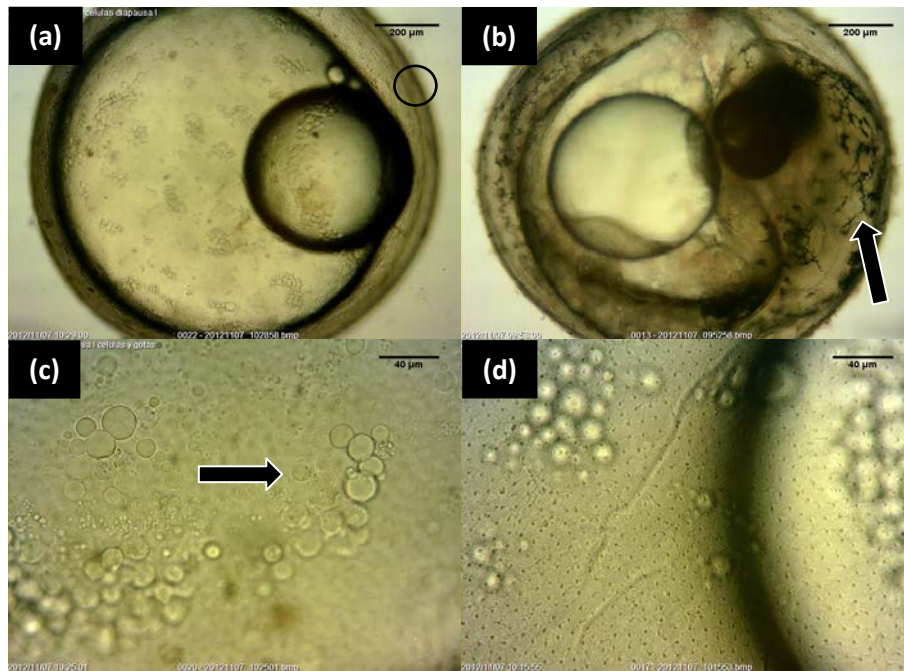


Figura 6- Embriones de *A. affinis* en diapausa I (a y c) y en un estadio de la organogénesis (b). En (a) se señala la envoltura vitelina con un círculo, en (c) la flecha indica blastómeras redondeadas. En (b) el embrión rodea casi totalmente el vitelo, se observa circulación sanguínea y células pigmentadas en la zona dorsal (flecha). (d) Imagen de la envoltura vitelina y los filamentos. Microscopia fotónica de campo claro.

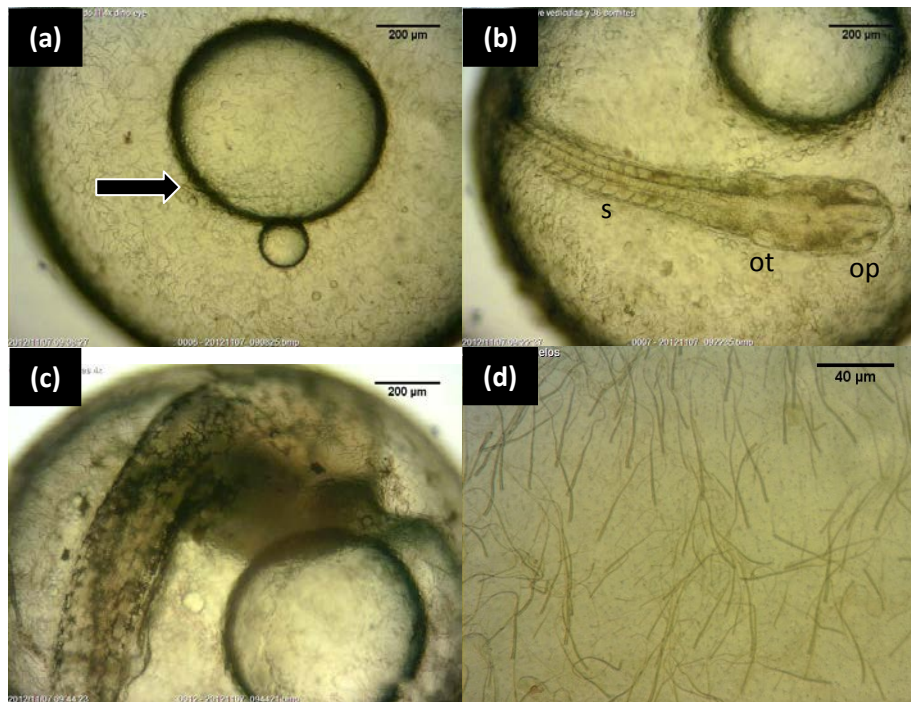


Figura 7- Embriones de *A. charrua* (a) en estadio de eje embrionario, (b) estadio de 40 somites, (c) organogénesis y (d) envoltura vitelina y filamentos. En (a) se señala el eje embrionario, en (b) somites (s), vesículas óticas (ot) y vesículas óticas (op). Microscopía óptica de campo claro.

2) Análisis histológico de las gónadas

Se estudió la estructura histológica y la morfología de las células germinales en las gónadas de juveniles y adultos de la especie *A. charrua*. Se describen algunos estadios juveniles y se profundiza el análisis en muestras de adultos y seniles.

Hembras

Los alevines hembras en el momento de la eclosión (día 0) presentan ovarios con oogonias y ovocitos pre-vitelogénicos (figura 8). Muchas de las oogonias se encuentran en mitosis, y en estos casos la cromatina es basófila con la tinción utilizada. En interfase, el núcleo es violeta claro y muestra un nucléolo; el citoplasma es hialino. Los ovocitos presentan núcleos de mayor tamaño, con cordones de cromatina basófila. El citoplasma también es basófilo en este estadio y se tiñe positivamente con hematoxilina. El diámetro de los ovocitos es de 12-27 μm , el amplio rango de tamaños refleja etapas de un proceso de crecimiento y diferenciación. En los ovocitos de mayor tamaño se observa un aumento en la cantidad de nucléolos. Las células foliculares que rodean los ovocitos son de forma alargada y con núcleo ovalado.

Las células germinales en las gónadas de las hembras adultas se clasifican por su tamaño, la morfología del núcleo y el citoplasma y la presencia de envoltura vitelina. Se identifican oogonias, ovocitos pre-vitelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos vitelogénicos totales, de acuerdo con Arezo y col. (2007)⁷. Las oogonias son las células germinales más pequeñas y se observan agrupadas en nidos. Los ovocitos pre-vitelogénicos presentan citoplasma basófilo, el núcleo presenta varios nucléolos y hacia el final de este estadio se observan alvéolos corticales en el citoplasma. Los ovocitos vitelogénicos transcurren por varias etapas de la ovogénesis a la vez que su tamaño aumenta. Primero, presentan grandes vacuolas en el citoplasma que aparecen vacías con las técnicas utilizadas. Segundo, se acumula gradualmente un material acidófilo en el citoplasma entre estas vacuolas y finalmente el contenido del citoplasma se fusiona formando un vitelo homogéneo (figura 9). Entre el ovocito y las células foliculares se observa la envoltura vitelina que aumenta de espesor gradualmente. Finalmente, los ovocitos vitelogénicos totales son las células más grandes, presentan vitelo homogéneo y alvéolos corticales (figura 9a). El núcleo se desplaza hacia un polo del ovocito. En los ovarios de las hembras seniles se identificaron todos los estadios ovocitarios y con las mismas características.

Los folículos atrésicos son frecuentes en los ovarios de hembras adultas y seniles. Se identificaron por presentar la envoltura vitelina fragmentada y el vitelo con aspecto granuloso. En algunas muestras se observan lipofuscinas asociadas a las figuras atrésicas (figura 9d). Al estudiar las frecuencias foliculares se encontró que los folículos atrésicos superan a los folículos de ovocitos

con vitelo homogéneo, tanto en una hembra adulta (2869) como en hembras seniles (3135, 2021 y 2023). La atresia puede disminuir el potencial reproductivo de las hembras o puede ser un mecanismo de control de la calidad de los ovocitos, asegurando que los ovocitos que son ovulados puedan ser fecundados y generar embriones viables. Los mecanismos que regulan la atresia folicular en los peces teleósteos son poco conocidos, especialmente en el nivel molecular¹⁰. En conclusión, no se encontraron signos claros de envejecimiento en los ovarios de las hembras seniles.

Machos

Las gónadas masculinas se diferencian 30 días luego de la eclosión. Los testículos de estos alevines (30 días post-eclosión) presentan la característica organización en nidos. Los nidos consisten en células germinales en el mismo estadio de diferenciación rodeadas por células de Sertoli. Las células germinales que se observan son espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Las espermatogonias poseen un núcleo esférico claro con un nucléolo y poco citoplasma hialino y los espermatocitos presentan la cromatina en hilos, indicativo del proceso de meiosis. Las espermátidas son más pequeñas que los tipos celulares anteriores, con un núcleo basófilo intenso y esférico. Las células de Sertoli son planas con núcleos ovalados (figura 11a).

Las gónadas de los machos adultos se encuentran organizadas en lóbulos delimitados externamente por una membrana basal que aparece eosinófila con la tinción utilizada. En el interior de los lóbulos la espermatogénesis ocurre en nidos. Los lóbulos se extienden desde la periferia hasta la región central de la gónada donde se abren en una red de ductos deferentes (figura 3 y 11c). Las células germinales se clasifican por su tamaño, características nucleares y citoplasmáticas; se identifican espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides de acuerdo con Arezo y col. (2007)⁷. Las espermatogonias se encuentran en los extremos ciegos de los lóbulos en la periferia de la gónada correspondiendo al modelo testicular restringido¹¹ y presentan la morfología descrita anteriormente. Los espermatocitos presentan la cromatina condensada (cromosomas meióticos) y el tamaño de las células disminuye con las divisiones meióticas. Las espermátidas presentan poco citoplasma y un núcleo esférico basófilo intenso. La cromatina se condensa gradualmente en el proceso de espermiogénesis. Los espermatozoides se observan en nidos y también libres en los ductos deferentes (figura 11 b y c). Los testículos de adultos y seniles presentan nidos con células germinales en todos los estadios de la espermatogénesis y los pigmentos amarillos-marrones (lipofuscinas) son escasos. No se encontraron signos claros de envejecimiento en los testículos.

Resultó difícil la implementación de un análisis de frecuencias de células en los diferentes estadios de la espermatogénesis. Se intentó realizar un conteo de los nidos con células en los

diferentes estadios pero en algunos casos no se pudo determinar los bordes de los nidos que están formados por células de Sertoli planas que se tiñen suavemente con eosina.

El análisis histológico de las gónadas de los peces provee información sobre el proceso de gametogénesis y el patrón de reproducción de las especies. Los peces anuales *A. charrua* se reproducen diariamente desde la madurez sexual hasta la senescencia. En concordancia, en los peces adultos se encuentran ovocitos y nidos espermatogénéticos en todos los estadios de diferenciación. El patrón de reproducción se denomina asincrónico para las hembras y continuo para los machos⁷.

El análisis de las gónadas de los alevines facilita el reconocimiento de los diferentes tipos celulares. Especialmente las gonias son fácilmente identificables mientras que en los tejidos de los adultos es más difícil reconocerlas. Por esta razón se incluye una breve descripción de dos estadios juveniles aunque este análisis no se relaciona directamente con el objetivo planteado.

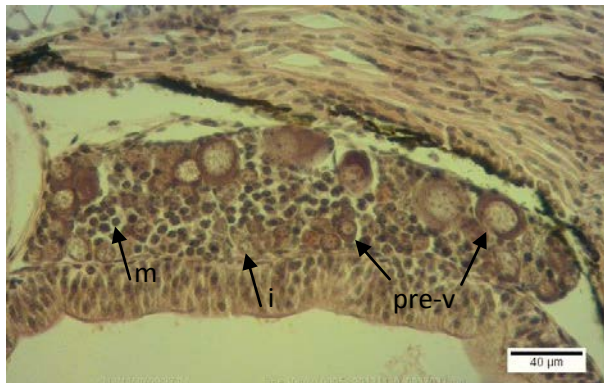


Figura 8- Corte histológico que muestra un ovario de un alevín hembra al momento de la eclosión, especie *A. charrua*. Se observan oogonias en mitosis (m) y en interfase (i) y ovocitos pre-vitelogénicos de diferentes tamaños (pre-v). Hematoxilina y eosina.

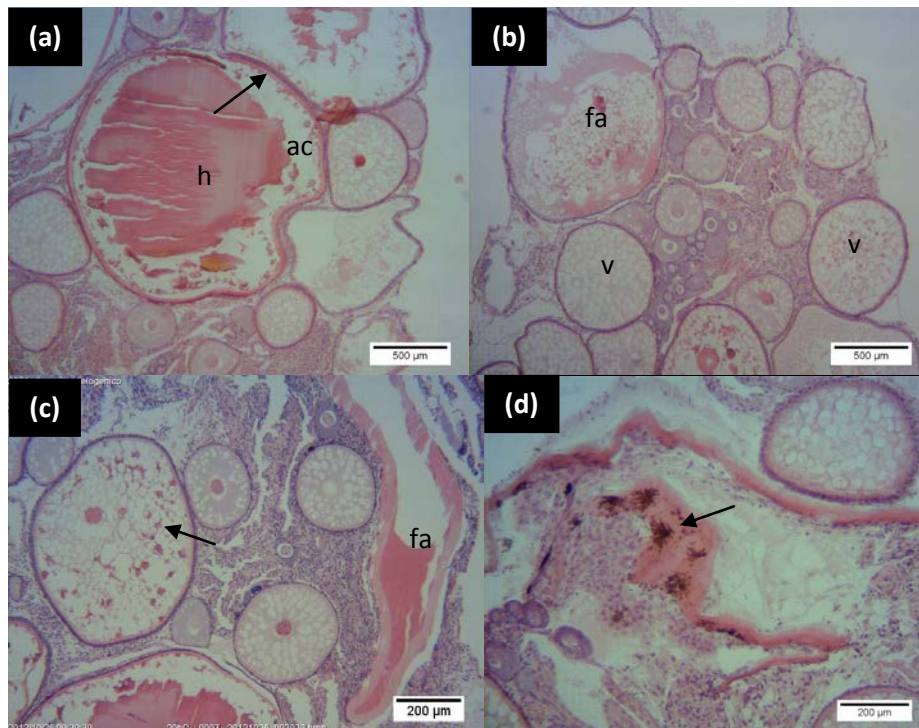


Figura 9-Histología de las gónadas de hembras adultas 2869, 3135 y 2021, especie *A. charrua*. (a)Ovocito vitelogénico total: h-vitelo homogéneo, ac-alveolos corticales, flecha-envoltura vitelina. (b)Ovocitos pre-vitelogénicos en el centro, v-ovocitos vitelogénicos con vacuolas en el citoplasma, fa-folículo atrésico. (c)-Ovocito vitelogénico con vitelo acidófilo entre las vacuolas (flecha), fa-folículo atrésico. (d) Atresia y lipofuscinas (flecha). Hematoxilina y eosina.

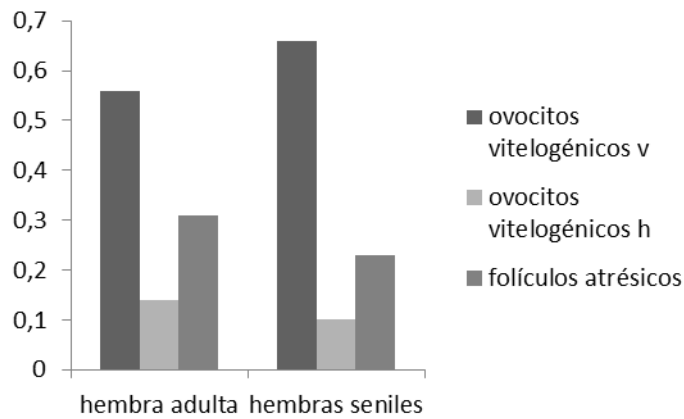


Figura 10-Representación gráfica de las frecuencias ovocitarias. Se analizó una hembra adulta (2869) y tres seniles (3135, 2023 y 2021). El número de ovocitos analizados fue 95 y 77 respectivamente. Los ovocitos vitelogénicos v corresponden a ovocitos con vacuolas en el citoplasma. Los ovocitos vitelogénicos h presentan vitelo homogéneo en el citoplasma. Los folículos atrésicos se describen en el texto.

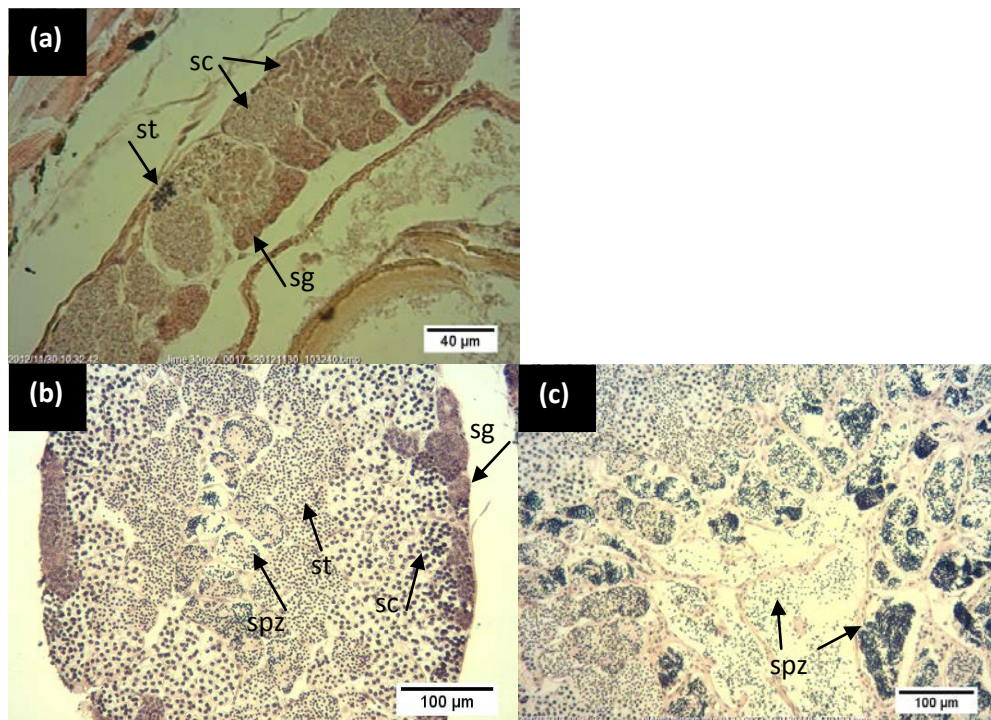


Figura 11-Histología de las gónadas de peces anuales machos, especie *A. charrua*. (a) Testículo de alevín 30 días post eclosión. (b) Testículo de un pez adulto, se observan las espermatogonias en la periferia de la gónada. (c) Testículo de un pez senil, se observa la zona de ductos deferentes. sg-espermatogonias, sc-espermatocitos, st-espermátidas y spz-espermatozoides. Hematoxilina y eosina.

3) Análisis ultraestructural de los gametos de dos especies del género *Austrolebias*

Ovocitos

Las envolturas vitelinas de los ovocitos de las especies *A. affinis* y *A. charrua* analizados mediante MEB presentan superficies suavemente rugosas con filamentos cilíndricos y largos. Los filamentos muestran zonas proximales más gruesas y zonas distales que se afinan gradualmente (figura 13). Las dos especies estudiadas difieren principalmente en las dimensiones de los filamentos y el grado de diferenciación de los segmentos basales. Los datos analizados se representan gráficamente en la figura 12. Las medidas se expresan como rango o media y desvío estándar.

Los ovocitos de *A. affinis* presentan leves elevaciones circulares en la superficie. Los filamentos exhiben segmentos basales circulares bien diferenciados ($1,3-1,7 \mu\text{m}$ diámetro, $n=4$). Los segmentos distales presentan en la base un diámetro de $1\pm 0,17 \mu\text{m}$ ($n=10$) y se afinan gradualmente hacia las zonas más distales. La longitud de los filamentos es de $9,0\pm 2,4 \mu\text{m}$ ($n=9$). La ornamentación de los ovocitos de *A. affinis* concuerda con la descripción realizada por Loureiro & de Sá (1996)¹⁴. Las medidas de ancho en la base de los segmentos distales y la descripción de los segmentos basales concuerdan. Las medidas de longitud de los filamentos reportadas previamente son un poco mayores ($20,1\pm 5,09 \mu\text{m}$)¹⁴. En ese trabajo se describe también la densidad de los filamentos, parámetro que no fue analizado en este trabajo. Los filamentos parecen ser flexibles porque se observan plegados hacia la superficie de la envoltura. En algunas imágenes, los filamentos se encuentran enredados o pegados a la superficie. Por estas observaciones se sugiere que posiblemente esta especie presenta alguna sustancia en la superficie de los ovocitos que dificulta la observación. Para resolver este problema se podría realizar una limpieza de la superficie de los ovocitos previo a la fijación. No se encontró el micropilo en los ovocitos de esta especie. La ornamentación de los ovocitos de *A. affinis* es similar a la de *A. nigripinis* que se muestra en la introducción (figura 4).

Los ovocitos de *A. charrua* presentan filamentos cónicos con segmentos basales en forma de anillos pero poco diferenciados ($0,85\pm 0,36 \mu\text{m}$ de diámetro, $n=16$). Los filamentos se afinan gradualmente desde los segmentos basales. La longitud de los filamentos es $45\pm 18 \mu\text{m}$ ($n=9$). Los filamentos se observan más erguidos que en la otra especie. Los ovocitos de *A. charrua* presentan filamentos más largos y mayor variación en la longitud. Se ha comunicado previamente que presentan dos poblaciones de filamentos (gruesos y finos) dispuestos regularmente⁷. Este patrón es similar a los ovocitos de las especies *A. reicherti* y *A. viarius*^{3,19}. Las especies *A. charrua* y *A. reicherti* pertenecen al complejo *A. adloffii* y *A. viarius* es una especie hermana del complejo¹⁹. Durante la observación fue posible visualizar el micropilo de la especie *A. charrua*. Cada ovocito presenta un micropilo que consiste en un túnel circular en forma de

embudo con una abertura exterior de 16-20 μm de diámetro y una abertura interior de 4,7-5,1 μm de diámetro (figura 13b).

Espermatozoides

Los espermatozoides de ambas especies son similares en morfología y tamaño. Presentan núcleo esférico, pieza media con mitocondrias dispuestas en un anillo y un flagelo con aletas laterales (figura 14). La presencia de estas aletas (proyecciones laterales de membrana) es una condición general de la serie *Atherinomorpha*¹⁵.

Los espermatozoides de *A. affinis* presentan cabezas de $2,14 \pm 0,07 \mu\text{m}$ de diámetro ($n=10$) y flagelos que miden $0,40 \pm 0,07 \mu\text{m}$ de ancho ($n=8$). Los espermatozoides de *A. charrua* presentan cabezas de $2,23 \pm 0,16 \mu\text{m}$ de diámetro ($n=8$) y flagelos de $0,39 \pm 0,17 \mu\text{m}$ de ancho ($n=11$). Las medidas de diámetro de *A. charrua* son menores que las reportadas previamente para la especie ($3,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$)⁷ lo cual sugiere que existen variaciones individuales o entre poblaciones.

Se considera que las dimensiones de los espermatozoides de *A. charrua* son adecuadas para ingresar al micropilo de la misma especie. Sin embargo, las dimensiones de los espermatozoides de *A. affinis* son similares. Se considera que en el caso en que los gametos de estas dos especies se encuentren es posible que los espermatozoides de *A. affinis* ingresen por el micropilo de *A. charrua*.

El análisis ultraestructural de los gametos realizado resulta valioso. Por un lado, se obtuvieron buenas imágenes de los gametos de la especie *A. affinis* de la cual hay pocos datos ultraestructurales. Por otro lado, se generaron nuevas imágenes de los ovocitos y el micropilo de la especie *A. charrua* que es la especie modelo del grupo de investigación.

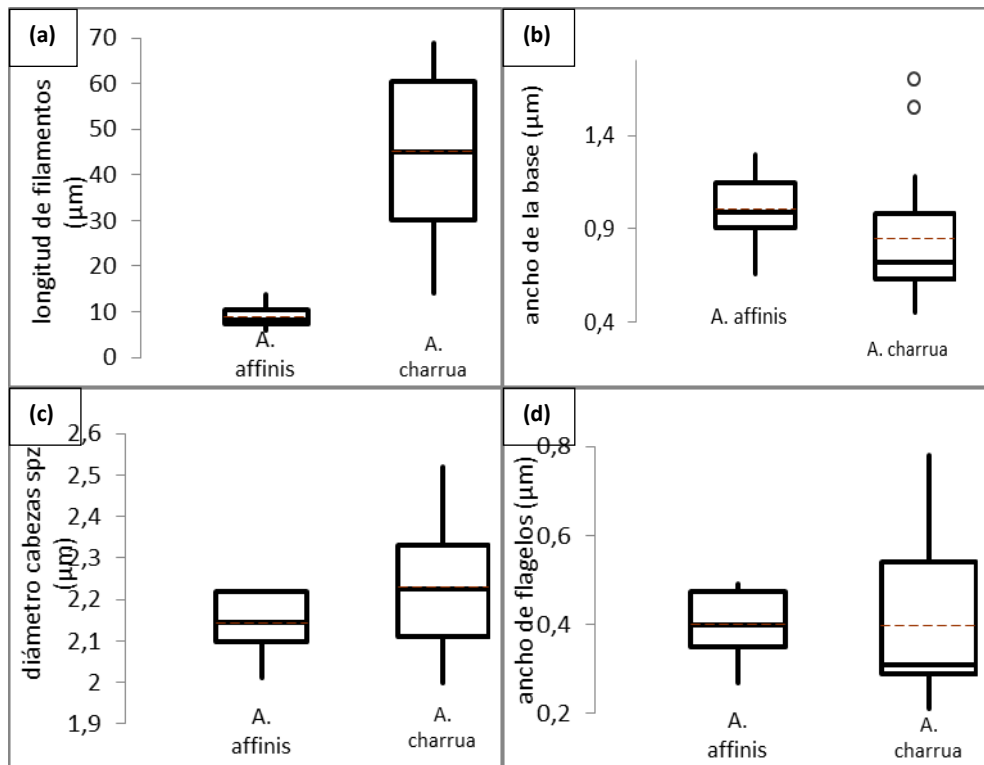


Figura 12-Representación gráfica de las medidas de longitud de los filamentos de los ovocitos (a), ancho de la base de los segmentos distales (b), diámetro de las cabezas de los espermatozoides (c) y ancho de los flagelos (d) de las dos especies analizadas (*A. affinis* y *A. charrua*). Spz- espermatozoides. Los gráficos son “box-plots” y representan las medias (líneas punteadas), las medianas (líneas sólidas) los desvíos estándar (rectángulos), los valores máximos y mínimos (líneas verticales) y los valores fuera del rango (círculos blancos).

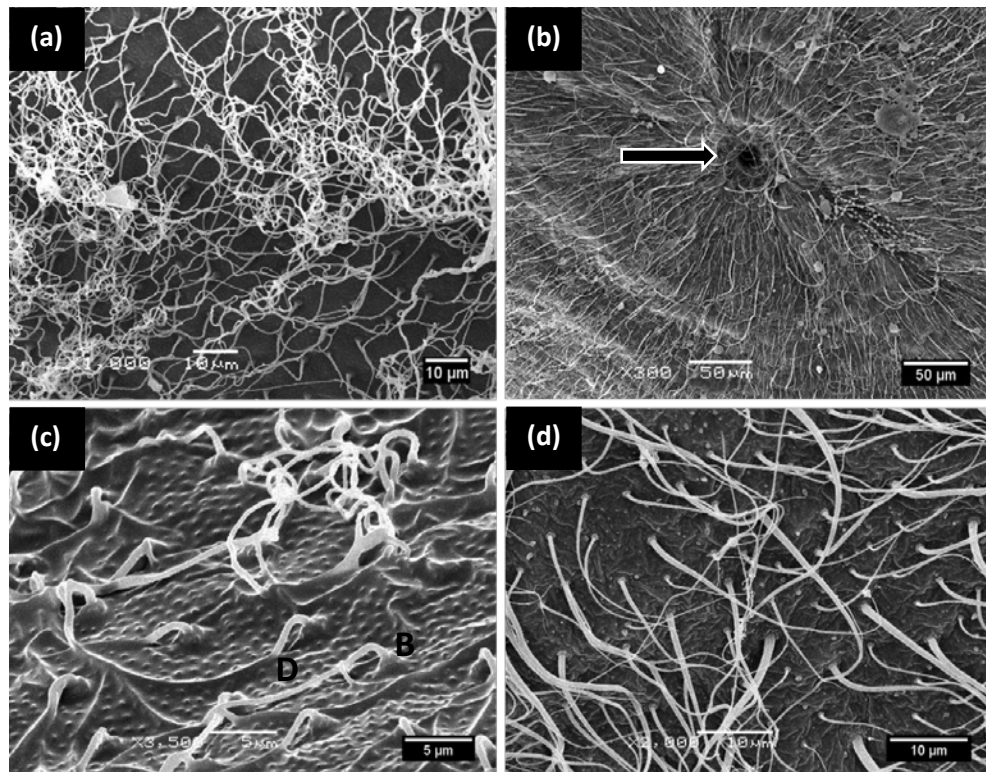


Figura 13- Superficies ovocitarias de *A. affinis* (a y c) y *A. charrua* (b y d). En (b) se visualiza el micropilo (flecha). En (c) B-segmento basal, D-segmento distal. Microscopía Electrónica de Barrido.

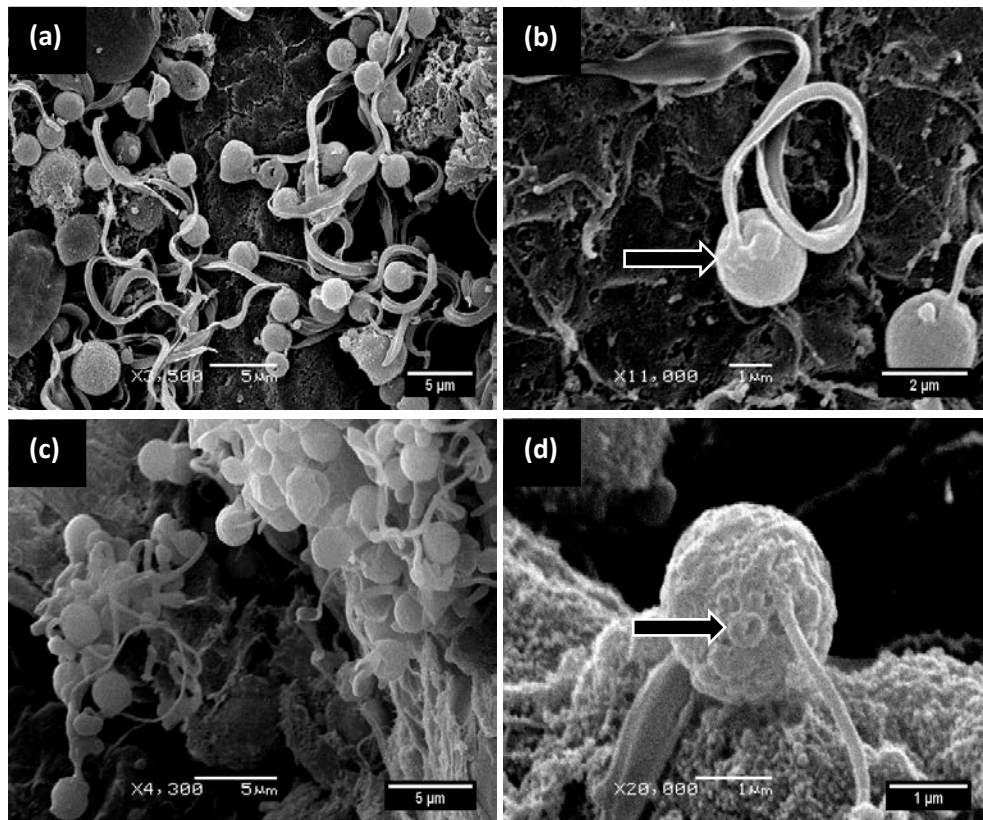


Figura 14-Morfología de los espermatozoides de *A. affinis* (a y b) y *A. charrua* (c y d). Imágenes de microscopía electrónica de barrido. Se indican las piezas medias con flechas.

Conclusiones y perspectivas

Durante la pasantía se realizó un acercamiento al modelo peces anuales y el manejo de los peces en el laboratorio. Se realizó el mantenimiento de adultos, la obtención y cultivo de embriones, eclosión y el cultivo de alevines. Se logró también un acercamiento a problemas que están siendo analizados en este modelo.

En la naturaleza, la expectativa de vida de los peces anuales está limitada por la duración estacional de su hábitat. Por lo tanto, representan un buen modelo para estudiar los efectos de una tasa de mortalidad extrínseca sobre la evolución de la senescencia y otros aspectos de la historia de vida⁴. Existen datos en peces anuales africanos del género *Nothobranchius* los cuales están expuestos a variaciones regionales en el clima y los patrones de precipitación. En concordancia con los patrones de precipitación, las diferentes especies presentan diferencias en la longevidad en cautiverio. La especie *N. furzeri* que habita en un ambiente árido presenta un tiempo de vida máximo de 3 meses en el laboratorio⁴. Las especies analizadas en la presente pasantía pertenecen a los peces anuales sudamericanos los cuales residen en hábitats relativamente húmedos y presentan tiempos de vida más largos en cautiverio⁴. En general la mortalidad se debe a factores extrínsecos y los animales seniles son escasos en la naturaleza⁶. En la presente pasantía se consideraron seniles los peces capturados al final de la estación húmeda o criados en acuarios durante 10 meses. Los criterios pueden ser discutibles porque no todos los peces presentaban la morfología típica de los seniles. Sería conveniente estudiar la supervivencia y la fertilidad de un grupo de peces criados en el laboratorio y luego estudiar el envejecimiento en la zona en la cual las curvas de supervivencia y/o fertilidad decaen.

Mediante histología clásica se encontró que los peces adultos y seniles presentan gónadas funcionales, con células germinales en todos los estadios de la gametogénesis. No se observan diferencias en la calidad de los tejidos y las células germinales al comparar adultos y seniles. Se destaca la identificación de pigmentos amarillos-marrones (lipofuscinas) en las gónadas de hembras y machos, condición que puede estar asociada al envejecimiento. Cualitativamente, se observa que en los ovarios los pigmentos son frecuentes y se asocian a las figuras atrésicas, mientras que en los testículos son escasos. Podría realizarse un análisis cuantitativo de los pigmentos mediante microscopía de fluorescencia porque los depósitos de lipofuscinas presentan autofluorescencia²⁰.

En referencia al aislamiento reproductivo entre especies cercanas, para los peces anuales, el comportamiento de cortejo podría ser importante. Sin embargo, se ha reportado que los patrones comportamentales durante el cortejo son conservados dentro del género

*Austrolebias*²¹. Por lo tanto el reconocimiento específico y las barreras contra la hibridación pueden estar en otros procesos como la fecundación. En los teleósteos los espermatozoides acceden a la membrana plasmática de los ovocitos a través del micropilo. En los análisis de MEB se encontró que las dimensiones de los espermatozoides de *A. charrua* y *A. affinis* son adecuadas para ingresar al micropilo de *A. charrua*. Resulta interesante estudiar las dimensiones del micropilo y los espermatozoides de otras especies del género *Austrolebias* para determinar si en estas especies las dimensiones del micropilo contribuyen o no a la especie-especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wourms, J. (1967). Annual fishes. En F.H.Wilt & N.Wessels *Methods in Developmental Biology* (págs. 123-137). New York: Thomas and Crowell Company.
2. Berois, N., Arezo, M. J., Papa, N., & Clivio, G. (2012). Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. *WIREs Dev Biol* 2012, 1, 1:595-602. doi: 10.1002/wdev.39.
3. Arezo, M. J., Pereiro, L., & Berois, N. (2005). Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology*, 66, 1357-1370.
4. Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D. R., Cattaneo, A., & Cellerino, A. (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell*, 4, 223-233.
5. Gutiérrez, V. A. (2009). *Patrones de senescencia molecular durante la ontogenia de peces anuales Sudamericanos del género Austrolebias (Cyprinodontiformes: Rivulidae)*. Proyecto de Doctorado, Área Biología, PEDECIBA.
6. Kirkwood, T.B.L. & Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
7. Arezo, M.J., D'Alessandro, S., Papa, N., & Berois, N. (2007). Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue & Cell*, 39, 89-98.
8. Le Men, F., Cerda, J., & Babin, P.J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. En J. Cerda, P.J. Babin, & E. Lubzens, *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* (págs. 1-38). Dorecht, The Netherlands: Springer.
9. Babin, J., Carnevali, O., Lubzens, E., & Schneider, W. (2007). Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. En J. Babin, J. Cerda, & E. Lubzens, *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* (págs. 39-76). Dorecht, The Netherlands: Springer.

10. Miranda, A., Bazzoli, N. & Rizzo, E. (1999). Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue & Cell*, 31, 480-488.
11. Grier, H. (1981). Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. *American Zoologist*, 21(2), 345-357.
12. Berois, N., Arezo, M. J. & Papa, N. G. (2011). Gamete interactions in teleost fish: the egg envelope. Basic studies and perspectives as environmental biomonitor. *Biological research*, 44(2), 119-24.
13. Rizzo, E., Sato, Y., Barreto, B.P. & Godinho, H.P. (2002). Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J Fish Biology*, 61, 615-632.
14. Loureiro, M & de Sá, R (1996). External Morphology of the Chorion of the Annual Fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*, 4, 1016-1022.
15. Jamieson BGM. (1991). *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press.
16. Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. En W. R. Hoar, *Fish Physiology*, vol III (págs. 117-175). New York: Academic Press.
17. Anderson, G., & Bancroft, J. (2002). Tissue processing and microtomy. En J. D. Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques* (págs. 85-107). Churchill Livingstone.
18. Horobin, R. W. (2002). Theory of staining and its practical implications. En J. D. Bancroft, & M. Gamble, *Theory and practice of histological techniques* (pp. 109-123). Churchill Livingstone.
19. García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M., Casanova, G., Clivio, G., & Olivera, A. (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 620-635.
20. Ding, L., Kuhne, W., Hinton, D., Song, J. & Dynan, W. (2010). Quantifiable Biomarkers of Normal Aging in the Japanese Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Plos One*, 5(10), 1-11.
21. García, D., Loureiro, M. & Tassinio, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 243-248.