

Características dimórficas de las zonas proliferativas e identificación de células progenitoras en tres regiones encefálicas anteriores en *Austrolebias charrua*

María Laura Herrera

Orientadora: Anabel Fernández

Co-orientador: Maximiliano Torres

Tribunal: Gabriela Casanova, Alejandra Kun, Anabel Fernández

Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales,
Laboratorio de Neuroanatomía Comparada, IIBCE

Tesina para optar por el grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas,
Orientación Neurociencias
Facultad de Ciencias, Udelar - 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Anabel Fernández y Maximiliano Torres que me han guiado a lo largo de este proceso, a veces tortuoso, de mi pasantía de grado. Por todo el tiempo que dedicaron en ayudarme, horas en el procesamiento de los peces, horas de microscopio y horas de viajes accidentados para conseguir los peces. No solo les agradezco por su tutoría en mi pasantía, sino que les agradezco por todas las valiosas lecciones para mi carrera de investigación, que, espero, recién comienza. Además, agradezco profundamente a mis compañeros de laboratorio Inés Berrosteguieta y Juan Carlos Rosillo, por todo el apoyo también a lo largo de mi pasantía y todas las enseñanzas. A Nicolás Papa, María José Arezo, Ignacio González, Hellen Schlieb y Martín Figares por darme el gustito de investigar en peces anuales.

Agradezco al tribunal, Gabriela Casanova y Alejandra Kun, por todas las valiosas recomendaciones, ideas y correcciones.

Agradezco finalmente a todos mis amigos, a mi familia, a mis padres y a mi corrector de tesis incondicional, Alfonso, por haber estado ahí a lo largo de todo este proceso, sin duda sin ustedes no habría sobrevivido.

RESUMEN

En peces anuales, machos y hembras desarrollan conductas claramente diferentes durante el cortejo que precede al desove. En base a ello, este trabajo propone que la existencia de dimorfismos en el encéfalo de *Austrolebias charrua* podrían subyacer a las diferencias comportamentales desplegadas en ambos sexos. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que los encéfalos de *A. charrua* adultos presentan dimorfismos sexuales anatómicos, que podrían encontrarse sustentados por diferencias en la proliferación celular. Las glías radiales (GR) que expresan aromatasa B (AroB, un complejo enzimático capaz de aromatizar los andrógenos produciendo estrógenos) son progenitores neurales altamente proliferativos y podrían estar vinculadas a la generación de esta proliferación diferencial. Los objetivos de este trabajo fueron, entonces, (1) determinar la existencia de dimorfismos sexuales a nivel neuroanatómico y proliferativo en el cerebro anterior de *A. charrua* y (2) correlacionar la presencia de glías radiales que expresan AroB con las zonas proliferativas.

En primer lugar, se realizó una comparación anatómica y de las tasas proliferativas del bulbo olfatorio (BO), lóbulos telencefálicos (TEL) y región preóptica (POA), áreas que han sido relacionadas con este tipo de comportamientos. Se estimó el volumen de los encéfalos y de las áreas seleccionadas mediante reconstrucción tridimensional. Las tasas proliferativas fueron aproximadas a través de la cuantificación de núcleos positivos para un marcador de proliferación (BrdU, tratamiento de una semana). Para detectar la presencia de células madre y progenitores neurales en las zonas proliferativas se utilizaron diferentes marcadores de estirpe celular detectados mediante inmunohistoquímica: vimetina (Vim) y AroB para reconocimiento de glías radiales (GR) y HuC como marcador neuronal. Adicionalmente, se utilizó la técnica histoquímica de NADPH diaforasa para la detección de GR AroB+.

El análisis anatómico del encéfalo y de cada región seleccionada mostró volúmenes totales mayores en machos que en hembras, tanto en valores absolutos como en relación a su tamaño corporal. El estudio de la proliferación celular demostró que, para ambos sexos, la región de mayor proliferación fueron los BOs. Al comparar entre sexos, los machos presentaron tasas proliferativas significativamente mayores en las tres regiones analizadas. Las zonas de proliferación se ubicaron mayormente en la zona ventricular (ZV), donde también se detectaron los somas de las GR AroB+, cuyas prolongaciones atraviesan el parénquima. La colocalización de BrdU y AroB revela la presencia de GR con potencial proliferativo en la adultez. En las ZV no hubo colocalización de las GR con marcadores neuronales. En el parénquima nervioso, se observó colocalización de BrdU y HuC, constatándose neurogénesis en la adultez.

Se especula que el hábitat y el ciclo de vida particular de estos peces, estarían ejerciendo grandes presiones sobre su comportamiento social y reproductivo y, por lo tanto, sobre las estructuras neurales que los sustentan. La proliferación neural, puede ser uno de los determinantes en el establecimiento y mantenimiento de estos dimorfismos.

Índice

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Los peces teleósteos	7
Los peces anuales como modelo de estudio	8
Hipótesis.....	9
Objetivos	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos.....	10
METODOLOGÍA	11
Cría y recolección de los peces anuales	11
Tratamiento con BrdU	12
Fijación, disección y obtención de secciones histológicas.....	12
Reconstrucción tridimensional	12
Inmunohistoquímica	13
Controles	14
Cuantificación de núcleos marcados con BrdU	14
Análisis estadístico de los datos	14
NADPH diaforasa.....	15
Esquematización	15
RESULTADOS	16
Reconstrucción tridimensional	16
Análisis de la proliferación celular en el cerebro de machos y hembras.....	20
Cuantificación de núcleos BrdU positivos.....	20
Localización de los núcleos BrdU+	23
Detección de la glía radial AroB+.....	27
Tinción por NADPH-diaforasa.....	27
Tinción por inmunohistoquímica de marcadores gliales y neuronales	31
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	38
Dimorfismos anatómicos y proliferativos	38
Localización de los núcleos BrdU+ y glías radiales AroB+	42
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la Historia, las diferencias comportamentales de machos y hembras han despertado el interés de incontables investigadores, sobre todo cuando se trata de conductas sociales o sexuales. Con numerosos descubrimientos, la investigación ha pasado a centrarse sobre sus bases neurales y del desarrollo. Un sinnúmero de especies ha desarrollado comportamientos específicos de cada sexo, cuya importancia radica en permitir el reconocimiento, apareamiento y cría de la progenie de forma exitosa (Dulac and Kimchi, 2007).

En este sentido, Jacobs (1996) plantea que el estudio de las diferencias entre sexos debe realizarse en conjunto con análisis evolutivos, con vista en la selección sexual. Las demandas cognitivas asociadas con la reproducción podrían, potencialmente, determinar cambios dimórficos en diferentes estructuras del cerebro, el sustento neural de las conductas.

Así es que, en mamíferos, se ha descrito el llamado “cerebro social”, que incluye una red de núcleos comprendidos principalmente en el telencéfalo y diencefalo, siendo de particular importancia el área preóptica. Este concepto ha sido también extendido comparativamente a áreas homólogas en otros animales, como reptiles, aves y teleosteos. Los nodos principales de esta red han sido relacionados con múltiples comportamientos sociales, como la agresión, cuidado parental y conductas reproductivas. Estas regiones, además de encontrarse interconectadas, contienen, por definición, receptores de hormonas sexuales esteroideas (Revisado en O’Connell and Hofmann, 2011). Es entonces, que numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de estructuras cerebrales dimórficas que puedan subyacer a los diferentes comportamientos. El extensivo estudio en esta temática ha llevado por un lado, al descubrimiento de muchas especies que presentan dimorfismo sexual desde el nivel molecular hasta el anatómico y funcional, permitiendo a la vez identificar a las hormonas gonadales como factores cruciales en la generación de estos dimorfismos (Cooke et al., 1998; Dulac and Kimchi, 2007).

Los estrógenos (hormonas esteroideas clásicamente consideradas feminizantes) fueron inicialmente caracterizados por su rol central en las funciones reproductivas, pero actualmente se conoce su participación en un gran número de diferentes procesos, como la mineralización de los huesos, o su acción sobre el sistema cardiovascular, o incluso en la generación y diferenciación de neuronas en el sistema nervioso (Revisado en Diotel et al., 2010; y en Garcia-Segura, 2008).

En un comienzo, se creía que los estrógenos eran únicamente producidos en las gónadas por parte de la enzima aromatasa, sin embargo, actualmente se ha demostrado que estas hormonas pueden ser producidas activamente en otros tejidos esteroideogénicos, como las glándulas suprarrenales y en el sistema nervioso. De hecho, uno de los principales productores sería el sistema nervioso central, que posee todas las enzimas esteroideogénicas (Diotel et al., 2010).

El complejo aromatasa (formado por la citocromo P450 aromatasa, producto del gen *CYP19*, y la NADPH-citocromo P450 reductasa) es la única enzima capaz de convertir los andrógenos C19, como ser la testosterona, en estrógenos C18, como por ejemplo, el estradiol. Dadas las múltiples funciones que presentan los estrógenos, la aromatasa es una parte integral del desarrollo y funcionamiento de múltiples tejidos, como en particular, el sistema nervioso (Diotel et al., 2010; Forlano et al., 2006; Lephart, 1996). Por lo tanto, al regular los niveles de estrógenos en el sistema nervioso central, la aromatasa estaría participando en la diferenciación sexual de diferentes regiones cerebrales, entre otras funciones. Esto ha llevado a la postulación de la “hipótesis de la aromatización”, que plantea que la masculinización del cerebro de machos se da por la aromatización de andrógenos a estrógenos, y no por la acción directa de los andrógenos sobre

sus propios receptores (Revisado en Garcia-Segura, 2008). Los estrógenos podrían organizar una gran variedad de acciones celulares claves en el sistema nervioso central, incluyendo la muerte y migración celular, formación y eliminación de sinapsis, diferenciación celular, e incluso podrían influenciar el comportamiento y proliferación de células progenitoras en el cerebro embrionario y adulto y, por lo tanto, la neurogénesis (Harding, 2004; Mouriec et al., 2008)

Muchos investigadores se han preguntado cuáles pueden ser los procesos que se encuentran en la base de los dimorfismos. Uno de ellos podría ser la proliferación neural y la neurogénesis modulada por hormonas. Es así que, tanto en especies de aves y peces, como en mamíferos, se han observado dimorfismos sexuales en la capacidad neurogénica. Por lo tanto, pueden relacionarse los comportamientos diferenciales con la plasticidad neuroanatómica de cada sexo (Ampatzis et al., 2012).

Durante mucho tiempo predominó el dogma que establecía que no se generaban nuevas neuronas en el cerebro adulto (Gross, 2000; Zupanc, 2001a). En el desarrollo embrionario de todos los vertebrados, las células neuroepiteliales se extienden radialmente, transformándose en glías radiales. Estas células presentan un soma posicionado en la zona ventricular y un proceso radial, que se extiende atravesando el parénquima nervioso, hasta contactar un vaso sanguíneo o la superficie pial. Su proliferación da lugar al surgimiento de neuroblastos que migran radialmente guiados por las prolongaciones de la glía radial hasta alcanzar su localización final donde se diferencian en neuronas y cumplen su rol funcional (Noctor et al., 2002). Anteriormente, se creía que la zona ventricular proliferativa desaparecía para transformarse en la capa ependimaria no proliferativa. Sin embargo, trabajos pioneros de Altman (1962) demostraron que existía neurogénesis adulta en el cerebro de ratas. De igual modo se ha demostrado la existencia de neurogénesis en un gran rango de organismos, desde invertebrados hasta humanos (Altman, 1962; Cayre et al., 2002; Eriksson et al., 1998; Fernández et al., 2011; Kaplan and Hinds, 1977; Sullivan et al., 2007). Estudios comparativos han demostrado que las células progenitoras del sistema nervioso adulto corresponden a células gliales. En el caso de mamíferos, las glías radiales desaparecen en la adultez, pero en otros vertebrados, como aves y peces teleósteos, estas persisten durante toda la vida, actuando ya sea como progenitores neurales, o como reguladores en los nichos neurogénicos (García-Verdugo et al., 2002; Sullivan et al., 2007). El crecimiento del sistema nervioso en la vida posnatal está vinculado a la proliferación celular y neurogénesis en sitios específicos del cerebro (Lindsey and Tropepe, 2006). El estudio de la proliferación permite abordar su desarrollo a lo largo de la vida posnatal, por lo que el análisis de la población celular proliferativa brinda información, tanto sobre las zonas y la magnitud del crecimiento y probable neurogénesis, como de las características de las células progenitoras y de los diferentes mecanismos regulatorios, que finalmente podrían subyacer a las diferencias observadas entre sexos en diferentes especies.

Muchos investigadores han constatado la existencia de dimorfismos sexuales anatómicos y funcionales en muchas áreas del encéfalo.

En roedores, se ha estudiado extensivamente el área preóptica medial (mPOA) como un modelo de dimorfismo sexual. Esta área se encuentra muy relacionada con los comportamientos sexuales y parentales en ambos sexos. Dentro de la mPOA, se ha descrito un núcleo llamado núcleo dimórfico del área preóptica, que presenta un mayor volumen en machos que en hembras, diferencia que ha sido observada incluso en humanos (Revisado en Cooke et al., 1998). En estudios de proliferación, se ha observado que estas diferencias pueden establecerse por una desigualdad en la cantidad de células proliferativas en cada sexo, que podría encontrarse modulada por las hormonas sexuales. La adición de estas nuevas células podría actuar como un mecanismo activo para mantener o establecer los dimorfismos estructurales y funcionales en el cerebro (Ahmed et al., 2008).

También en roedores, se ha reportado un dimorfismo sexual en el bulbo olfatorio accesorio. Se ha observado que las ratas macho poseen mayor volumen y número de células mitrales que las hembras, diferencias que son revertidas mediante castraciones o tratamientos hormonales. Estas evidencias sugieren que estos dimorfismos podrían encontrarse organizados de forma diferente por la aromatización de esteroides gonadales durante la etapa posnatal crítica (Revisado en Segovia et al., 1999). El grupo de Peretto et al. (2001) aportó evidencia de que un posible mecanismo para el establecimiento de estas diferencias es una neurogénesis adulta o migración diferencial hacia el bulbo olfatorio accesorio, ya que observaron mayor densidad y cantidad de células proliferativas en machos que en hembras.

Los peces teleósteos

Los peces teleósteos, el mayor grupo de peces actinopterygios, se han convertido en un importante modelo para el estudio de la neurogénesis (Lindsey and Tropepe, 2006; Torres-Pérez et al., 2017). Numerosas investigaciones han demostrado que en peces adultos, persiste una gran capacidad proliferativa en múltiples regiones a lo largo de todo el encéfalo, desde el telencéfalo hasta la médula espinal (Fernández et al., 2011; Mouriec et al., 2008; Zupanc and Sîrbulescu, 2011). Estas regiones proliferativas se encuentran en las paredes ventriculares o zonas subventriculares (Zupanc, 2001b). Los peces teleósteos presentarían entonces, una capacidad proliferativa notoriamente mayor que otros vertebrados, posiblemente debido a que estos peces continúan creciendo durante toda su vida (Mouriec et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, las hormonas esteroideas podrían subyacer a la aparición y mantenimiento de dimorfismos sexuales en el sistema nervioso, a través de la acción de la enzima aromatasa. Si bien se ha reportado la expresión de la enzima aromatasa en el cerebro de todos los grupos de vertebrados, los peces poseen algunas particularidades frente a mamíferos y aves. En el genoma de peces teleósteos existen dos genes codificantes para la aromatasa, que habrían surgido como genes parálogos luego de la tercera duplicación completa del genoma (3R), propia de estos teleósteos (Ohno, 1970). Cada uno de estos genes es regulado de forma diferente, generando así dos formas enzimáticas funcional y estructuralmente diferentes, que presentan especificidad de tejido: la aromatasa A (del gen *cyp19a*), expresada predominantemente en las gónadas, y aromatasa B (del gen *cyp19b*), que se expresa en el cerebro. A diferencia de lo reportado en mamíferos y aves, en teleósteos la aromatasa B (AroB) del sistema nervioso se expresa únicamente en las glías radiales. Numerosos estudios han planteado que las glías radiales AroB-positivas actuarían como células progenitoras capaces de dividirse y generar nuevas neuronas. Además, la aromatasa es la única enzima capaz de producir estrógenos, y es posible que estos actúen de forma local regulando la proliferación. Algunos autores han planteado que las grandes capacidades proliferativas mantenidas a lo largo de toda la vida de peces teleósteos podrían relacionarse con la importante capacidad de producir estrógenos, mediada por la alta expresión de la aromatasa en las células de la glía radial, es decir de las células progenitoras (Revisado en Mouriec et al., 2008; y en Pellegrini et al., 2016).

Se ha observado una fuerte expresión de mensajeros para la enzima AroB en las zonas ventriculares de bulbos olfatorios, telencéfalo y área preóptica, (Pellegrini et al., 2005) áreas clave en el establecimiento de comportamientos sociales y reproductivos.

La alta capacidad proliferativa y la importante expresión de AroB convierten a los peces teleósteos en interesantes modelos para el estudio de la proliferación, el establecimiento de dimorfismos sexuales del sistema nervioso y su modulación por hormonas esteroideas. Con esto en mente, numerosos trabajos han abordado esta temática en teleósteos.

En el pez *Salmo trutta*, Kolm et al. (2009) encontraron mayores volúmenes del encéfalo en machos que en hembras. Además, los bulbos olfatorios mostraron tendencias similares, siendo sus volúmenes mayores en machos. Los autores plantean que las altas demandas cognitivas, asociadas a la reproducción y la selección sexual podrían ser una de las fuerzas que han moldeado las diferencias dimórficas de estas áreas. Es posible que la mayor complejidad comportamental de los machos frente a la competencia intrasexual y la búsqueda de pareja sean fuertes presiones selectivas, que determinen un mayor volumen de las estructuras implicadas.

Grober et al. (1991) observaron que en el pez *Thalassoma bifasciatum* existen dimorfismos en el número de neuronas productoras de hormona liberadora de gonadotropinas (por su sigla en inglés GnRH) en el área preóptica (POA) -con un mayor número en machos totalmente diferenciados, que en hembras- y demostraron que estas diferencias podían ser establecidas experimentalmente mediante tratamientos hormonales con 11-ketotestosterona (andrógeno C19).

Además de las diferencias mencionadas en el párrafo anterior, se han apreciado dimorfismos en el POA y otras áreas hipotalámicas en el pez medaka (*Oryzias latipes*). Melo y Ramsdell (2001) demostraron que el POA de machos presentaba niveles de actividad de la enzima AroB significativamente mayores. Estos autores plantean que, teniendo en cuenta la estrecha relación entre el POA y la hipófisis, esta diferencia podría jugar un importante rol en la modulación -específica para cada sexo- de la acción y liberación de factores hipofisarios.

Los peces anuales como modelo de estudio

Los peces anuales son teleósteos de agua dulce que, debido a las particularidades en su desarrollo, ecología, fisiología y evolución, se han vuelto interesantes modelos de estudio en muchas áreas. En relación a lo observado en otros vertebrados, poseen un ciclo de vida muy corto (menor a un año), ya que habitan charcos temporales que desaparecen en el verano de la región Neotropical y en África (Berois et al., 2014; Loureiro and Sa, 2015). La supervivencia de la especie depende de la generación de embriones resistentes a la desecación, que permanecen enterrados en el sustrato durante la estación seca, para luego eclosionar una vez que el charco vuelve a inundarse al año siguiente (Berois et al., 2012, 2014; Wourms, 1972). Es así que estos peces han desarrollado adaptaciones para la supervivencia de la especie, a pesar de tener un ciclo de vida tan corto: un rápido crecimiento y maduración sexual, alcanzando la madurez en pocas semanas (Berois et al., 2014).

El género *Austrolebias* de peces anuales pertenece a la Familia Rivulidae. Presenta aproximadamente 42 especies distribuidas extensamente en las cuencas La Plata-Paraná y Patos-Merín (Revisado en Loureiro et al., 2015).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) poseen una activa proliferación neural y neurogénesis en numerosas zonas a lo largo de todo el encéfalo (Fernández et al., 2011; Rosillo et al., 2016, 2010; Torres-Pérez et al., 2017), pudiendo incluso identificarse 20 zonas proliferativas (Torres-Pérez, en preparación). Fernández et al. (2011) encontraron altas tasas proliferativas en el bulbo olfatorio, torus longitudinalis y cerebelo en tres especies de *Austrolebias*. Torres-Pérez et al. (2017) observaron proliferación a lo largo de todo el encéfalo, incluyendo importantes áreas comprendidas en la red del cerebro social, como el área preóptica, el telencéfalo y los bulbos olfatorios. Rosillo et al. (2016) y Torres-Pérez et al. (2017) han caracterizado una importante presencia de poblaciones heterogéneas de células de la glía radial en las zonas ventriculares y proliferativas del cerebro de *Austrolebias charrua*, sugiriendo un rol de estas células como células progenitoras neurales. Su alto

potencial proliferativo convierte, entonces, a estos peces en buenos modelos para el estudio de la neurogénesis posnatal.

Las *Austrolebias* constituyen también un buen modelo para el estudio de diferencias entre sexos, tanto las comportamentales, como las proliferativas. Importantes dimorfismos sexuales han sido reportados en la mayoría de los peces anuales neotropicales. En *Austrolebias*, los machos suelen ser de mayor tamaño y poseer una coloración más llamativa que las hembras (Berois et al., 2014; García et al., 2008). Estos peces presentan un complejo cortejo, en el que los machos generan un despliegue de varios comportamientos para atraer a las hembras que, en cambio, podrían presentar un rol de evaluación y selección del macho. Se ha demostrado que estas pueden responder a claves visuales y olfativas de los machos, y posiblemente utilicen también información de otras modalidades sensoriales, por ejemplo, táctiles (García et al., 2008; Passos et al., 2013a, 2013b). Como se mencionó anteriormente, la mayor complejidad de los comportamientos reproductivos y la selección sexual actuando sobre los machos podrían responder a dimorfismos de las estructuras relacionadas con estas conductas (Kolm et al., 2009).

Por lo expuesto, se han seleccionado para el presente trabajo a los peces anuales *Austrolebias charrua*. En estos peces, se investigó la existencia de dimorfismos sexuales anatómicos y proliferativos en el cerebro, como posibles actores en el establecimiento de las diferencias comportamentales y fisiológicas. Los investigadores de nuestro laboratorio han observado diferencias anatómicas entre cerebros de machos y hembras (Fernández, comunicación personal). Se ha decidido utilizar peces de una edad que no ha sido investigada hasta el momento en nuestro laboratorio (adultos jóvenes de entre cuatro y cinco meses de edad), teniendo en cuenta que las diferencias de edad en *Austrolebias* suelen ser muy significativas debido a su rápido desarrollo, corto ciclo de vida y constante proliferación celular.

Hipótesis

Dadas las diferencias corporales y comportamentales entre sexos descritas en *Austrolebias charrua*, sumadas a la observación preliminar de dimorfismos en la anatomía de sus encéfalos, se propone que áreas cerebrales vinculadas a aspectos comportamentales básicos para la reproducción presenten dimorfismos en estos peces anuales. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que diferencias anatómicas entre machos y hembras de *A. charrua* podrían encontrarse sustentadas por diferencias, tanto en la localización de las células progenitoras, como en la presencia de tasas proliferativas diferenciales entre ambos sexos. Las glías radiales que expresan aromatasa B podrían ser progenitores neurales altamente proliferativos y estar vinculadas a la generación de esta proliferación diferencial.

Objetivos

Objetivo General

Analizar comparativamente entre machos y hembras tres regiones cerebrales anteriores (bulbo olfatorio, lóbulos telencefálicos y región preóptica), en peces *Austrolebias charrua* de entre cuatro y cinco meses de edad.

Objetivos Específicos

- Obtener ejemplares de los peces anuales *A. charrua* de una edad aproximada de entre cuatro y cinco meses. Para esto se recolectaron del campo y se criaron ejemplares en el laboratorio.
- Estudiar la neuroanatomía del encéfalo de machos y hembras de *A. charrua* a través de la reconstrucción tridimensional por programas informáticos.
- Determinar la presencia de células proliferantes mediante un pulso de bromodesoxiuridina (un marcador celular, BrdU) y su detección por técnicas inmunohistoquímicas.
- Cuantificar los núcleos proliferativos.
- Determinar estadísticamente si existen dimorfismos en las tasas proliferativas de las tres regiones del cerebro anterior seleccionadas (bulbo olfatorio, telencéfalo y región preóptica)
- Detectar si la glía radial de machos y hembras de *A. charrua* expresan la enzima aromatasa B, mediante técnicas de inmunohistoquímica y la técnica histoquímica NADPH diaforasa.

METODOLOGÍA

Cría y recolección de los peces anuales

Con el fin de obtener ejemplares de peces anuales *A.charrua* de aproximadamente entre cuatro y cinco meses de edad, se criaron peces en condiciones de laboratorio a partir de turbas y se recolectaron en el campo.

La recolección de peces en el campo y la eclosión de embriones conservados en turbas se realizaron de acuerdo al método propuesto por Papa, et al. (2015).

La eclosión de embriones fue guiada por Nicolás Papa en el acuario de Facultad de Ciencias, UdelaR, y se hizo a partir de turbas generadas en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) en el año 2017. Para esto, las turbas fueron humedecidas gradualmente en peceras por al menos 30 minutos. Luego se adicionó agua hasta una altura de aproximadamente 2cm, con una temperatura mantenida de alrededor de 20°C y aireación. La mayor parte de los embriones suele eclosionar en las siguientes 24hs. Los alevines fueron alimentados con nauplios de *Artemia sp* o microgusanos *Panagrellus redivivus* y la pecera fue completada con agua. Luego los alevines recibieron un cambio de agua y alimentación dos veces al día por aproximadamente 30 días.

Cuando los alevines alcanzaron un mes de edad fueron alimentados diariamente con *Daphnia sp.* y gusanos *Tubifex sp.* por aproximadamente cuatro meses y se transportaron y acondicionaron en el bioterio de poiquiloterms del IIBCE. Se mantuvieron en peceras con aireación, temperatura de 19°C, conductividad del agua alrededor de los 300mS y alimentados diariamente con *Tubifex sp.* y *Daphnia sp.* Estos ejemplares fueron utilizados para la obtención de resultados preliminares y para el entrenamiento y puesta a punto de las diferentes técnicas que se utilizaron.

Los peces del campo fueron recolectados a fines de agosto del charco anual “El Podrido”, ubicado en la entrada principal de La Coronilla, Rocha, Uruguay (33°53'46.8"S,53°30'56.1"W), mediante el uso de calderines y golpeando el fondo barroso. Para este trabajo se pescaron individuos con una edad aproximada de cuatro a cinco meses. Los peces capturados fueron transportados al bioterio del Instituto Clemente Estable y acondicionados gradualmente (una semana de aclimatación) para mantenerlos en condiciones de laboratorio (temperatura de 19°C, conductividad del agua de aproximadamente 300mS) y se alimentaron diariamente con *Daphnia sp.* y gusanos *Tubifex sp.*

Se seleccionaron doce peces recolectados en el campo (seis hembras y seis machos) para este trabajo, de los cuales diez (cinco hembras y cinco machos) fueron utilizados en experimentos de tratamiento de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) y los dos restantes (un macho y una hembra) fueron utilizados para los experimentos de NADPH diaforasa.

Los procedimientos se realizaron utilizando como guía los métodos planteados por Fernández, et al. (2011) y se encuentran aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE y Facultad de Ciencias (CEUA).

Tratamiento con BrdU

La determinación de células proliferantes en el encéfalo de *A. charrua* fue realizada proliferantes mediante un pulso de bromodesoxirudina (un marcador de proliferación celular, BrdU) y su detección fue hecha a través de técnicas inmunohistoquímicas.

Para esto, diez peces fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única (100 mg/kg de peso corporal) de BrdU (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) disuelto en solución salina 0.6% de cloruro de sodio. La aplicación de marcadores, como es el caso de los análogos de timidina (como el BrdU), permiten la detección de células proliferativas en diferentes tejidos. El BrdU se incorpora en la fase S del ciclo celular, es decir, cuando las células se encuentran en división y, por lo tanto, su detección por inmunohistoquímica permite determinar células en proliferación (Gratzner, 1982).

Fijación, disección y obtención de secciones histológicas

Una semana luego de la inyección de BrdU, los diez peces inyectados con BrdU se anestesiaron profundamente agregando Eugenol 10% en una dilución 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO, USA) al agua de la pecera hasta el cese del movimiento opercular y hasta que no se registró reflejo de escape. Los individuos anestesiados fueron entubados por vía oral con un flujo constante de agua durante la perfusión. Se expuso la cavidad ventral, se introdujo una aguja intracardiaca para la transfusión inicial de solución salina con anticoagulante (citrato de sodio 1%) y vasodilatador (2%) para lavar el sistema vascular de sangre. A continuación, se perfundió la solución fijadora de paraformaldehído (PAF) 10% (preparado en buffer fosfato (PB) 0,1M, pH 7,2-7,4).

Luego de la perfusión los peces fueron medidos en su longitud total (desde el extremo rostral de la cabeza hasta el extremo caudal de la aleta caudal).

Los encéfalos fueron disecados y mantenidos por 2hs en una solución fijadora con PAF a 4°C y luego fueron transferidos a PB por una noche para lavar el fijador. Los encéfalos fueron mantenidos a 4°C hasta su procesamiento en PB. Luego fueron encastrados en bloques de gelatina-albúmina 1:2 (1,5 y 45 % respectivamente, disueltas en solución salina de Cloruro de Sodio 0,9%) y cortados a Vibrátomo S100 (Leica Buffalo Grone, IL, USA) de forma transversal y seriada con un grosor de 50µm.

Un macho y una hembra fueron perfundidos y disecados con el mismo protocolo antes mencionado y procesados en el mismo día para el tratamiento con NADPH diaforasa.

Reconstrucción tridimensional

Con el propósito de estudiar la neuroanatomía del encéfalo de machos y hembras de *A. charrua*, se estimaron los volúmenes del encéfalo y de las áreas seleccionadas mediante reconstrucciones tridimensionales. Para esto los cortes provenientes de cuatro peces (dos machos y dos hembras) fueron fotografiados de forma seriada en microscopio de luz Nikon Eclipse E200. Las imágenes obtenidas fueron utilizadas para la generación de una reconstrucción tridimensional mediante el programa informático Biovis3D (Montevideo, Uruguay). En este programa se marcó el contorno de cada corte y se superpusieron para generar un modelo tridimensional de cada encéfalo, lo que permitió obtener una estimación de su volumen.

Se decidió seleccionar un criterio para establecer los límites anteriores y posteriores de los encéfalos reconstruidos. Para esto se decidió utilizar, como límite anterior, el corte más rostral que presentara tejido

del bulbo olfatorio, mientras que el límite posterior se estableció como el primer corte caudal en el que ya no se observó el cuarto ventrículo.

Una vez generado el modelo para el encéfalo completo, se marcaron los contornos de las áreas de interés para la determinación de su volumen. Las áreas seleccionadas fueron el bulbo olfatorio (BO), lóbulos telencefálicos (TEL) y región preóptica (POA). Estas fueron identificadas utilizando como guía un atlas topológico del cerebro de pez cebrá *Danio rerio* (Wulliman et al., 2012), del pez anual *Notobranchius furzeri* (D'angelo, 2013) y de *Austrolebias charrua* (Torres-Pérez, en preparación). En el caso de los lóbulos telencefálicos se seleccionaron cortes que presentaran telencéfalo ventral y dorsal.

Inmunohistoquímica

Los cortes destinados a inmunohistoquímica para la visualización del BrdU incorporado fueron incubados por 45 min con HCl 2N y Tritón X-100 0,3% disuelto en PB para desnaturalizar el ADN, exponer los antígenos del BrdU y otorgar una mayor permeabilidad de la membrana celular para favorecer la penetrabilidad de anticuerpos. Luego se hicieron tres lavados con PB (10 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente) y se incubaron los cortes con anticuerpos anti-BrdU por 24 a 48hs a 4°C. A continuación se hicieron otros tres lavados con PB y los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios (Tabla 1).

Se seleccionaron cortes de dos encéfalos (un macho y una hembra) para combinar la marca de la proliferación celular brindada por el BrdU con anticuerpos para determinar estirpe glial o neuronal. Para la determinación de la expresión de la enzima aromatasa B en la glía radial de ambos sexos, se utilizaron anticuerpos anti aromatasa B (AroB) y vimentina (Vim), mientras que el marcaje para detectar nuevas neuronas se realizó con anticuerpos anti HuC.

Los cortes destinados a la inmunohistoquímica con los marcadores antes mencionados fueron lavados una vez con PB durante 5 a 10 minutos y luego incubados por 48 hs con anticuerpos primarios. Finalizado este tratamiento, los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios por 1h (Tabla 1).

Tabla 1: Anticuerpos primarios (AC1) y secundarios (AC2) con sus respectivas diluciones para inmunohistoquímica.

Detección	AC 1	Marca y código	Dilución	AC 2	marca	Dilución
HuC	Anti-HuC	Abcam, ab78467, Conejo, Policlonal	1:100	Alexa 488, Anti Conejo	Abcam	1:1000
BrdU	Anti-BrdU G3G4	Hybridoma Bank, G3G4, Ratón, monoclonal	1:80	Alexa 488 Alexa 546 Anti Ratón	Abcam	1:1000
AroB	Anti AroB	Abcam, ab106168, Conejo policlonal	1:500	Alexa 633, Anti Conejo	Abcam	1:1000
Vim	Anti Vim	Hybridoma Bank, 40E-C, Ratón monoclonal	1:50	Alexa 488, Anti Ratón	Abcam	1:200

Luego de ser incubados con los anticuerpos correspondientes, los cortes se montaron en portaobjetos con Glicerol-DAPI (coloración nuclear) para su visualización en el microscopio confocal.

Los cortes de inmunohistoquímica fueron visualizados y fotografiados mediante los microscopios confocales Olympus FV300 y Zeiss LSM 800 del IIBCE. Para la cuantificación se seleccionaron cuatro cortes de las regiones de interés (BO, TEL y POA) y se fotografió uno de los hemisferios de cada corte. Estas áreas fueron identificadas mediante tinción por DAPI utilizando también como guía los atlas topológicos.

Controles

Como control positivo de los anticuerpos para la AroB se perfundieron peces cebra *Danio rerio* (homólogo del anticuerpo) y *Austrolebias charrua* (heterólogo del anticuerpo). Los cortes del encéfalo de ambas especies fueron incubados con el anticuerpo primario y secundario. En los cortes de pez cebra se localizó la señal positiva restringida a las regiones descritas previamente en la bibliografía (Tong et al., 2009), mientras que en *A. charrua* también se constató la señal positiva en el encéfalo en forma localizada a estas regiones.

Como control negativo de la inyección de BrdU se procesaron los cortes de cerebros de *A. charrua* que no fueron inyectados. Como control positivo del revelado por inmunofluorescencia del BrdU, se utilizaron muestras de tejido intestinal de rata y *A. charrua*, por ser tejidos con alta capacidad proliferativa.

Como control negativo de los anticuerpos de BrdU y AroB, a algunos cortes de encéfalo no se les realizó incubación con el anticuerpo primario, pero sí con el secundario, y viceversa. Para el resto de los anticuerpos se siguieron los mismos procedimientos de controles positivos y negativos, utilizando muestras de tejido extraídas de *A. charrua* y de la especie utilizada por el fabricante para validar dichos anticuerpos.

Cuantificación de núcleos marcados con BrdU

Para cuantificar los núcleos proliferativos marcados con BrdU, usando el microscopio confocal, se realizó un apilado de imágenes de 20 μm del espesor total de los cortes seleccionados, tomando imágenes cada 2 μm . La herramienta FluoView (Olympus, Tokio, Japón) permite el apilado de todos los planos, sobre este apilado se cuantificaron los núcleos marcados con BrdU.

Cuando la superficie del corte era mayor que el campo del microscopio con el aumento utilizado, se tomaron varias fotografías, empleando los mismos parámetros para cada una, y luego se utilizó el programa informático Photoshop (Adobe Systems; Mountain View, CA) para componer la imagen completa.

Los núcleos BrdU positivos de cada corte fueron cuantificados manualmente mediante el programa informático de libre acceso FIJI (Schindelin et al., 2012; <https://fiji.sc/>). Este programa permitió también la estimación del área de cada corte utilizado para la cuantificación, y a partir de esa área pudo calcularse una estimación del volumen cuantificado (con 20 μm de profundidad).

Análisis estadístico de los datos

Para la determinación estadística de posibles diferencias en las tasas proliferativas de machos y hembras en las regiones seleccionadas se realizaron los siguientes análisis. Se realizó una suma de los núcleos cuantificados para cada individuo (cinco machos y cinco hembras) en los cuatro cortes utilizados para cada región. A continuación, se realizó un promedio con estos datos para cada sexo. Estos fueron comparados

mediante un test de Mann-Whitney y graficados en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software v6, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

El número total de núcleos BrdU positivos para cada corte fue dividido por el volumen del corte para estimar las tasas proliferativas. Los valores obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante los programas informáticos GraphPad Prism y PAST (Hammer et al., 2001; <https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

En primer lugar, se testeó la normalidad de los datos mediante el test de D'Agostino y Pearson y Shapiro-Wilk de ambos programas. Además, se realizó un test de Levene para determinar si los desvíos estándar (SD) de los datos eran significativamente diferentes.

Según lo obtenido en estas pruebas estadísticas, se utilizaron los siguientes tests de t no pareados:

- Cuando los datos podían ser considerados normales y su desvío estándar (SD) no era significativamente diferente, se utilizó un test de t paramétrico. Este fue el caso para las tasas proliferativas del BO y POA.
- Cuando los datos no se ajustaban a la normalidad, pero sus SD no eran significativamente diferentes, como en el caso del TEL, se utilizó un test de Mann-Whitney.

NADPH diaforasa

Para la detección de la expresión de la enzima AroB en ambos sexos, se utilizó también la técnica de NADPH diaforasa. Para esto, los encéfalos de dos peces (un macho y una hembra) fueron utilizados para la visualización de la actividad NADPH diaforasa. El complejo aromatasa se encuentra formado por la citocromo P450 aromatasa, producto del gen *CYP19b*, y la NADPH-citocromo 450 reductasa. (Diotel et al., 2010; Forlano et al., 2006; Lephart, 1996). La presencia del dominio NADPH reductasa permite que la enzima AroB sea detectada mediante la técnica de NADPH diaforasa. Asimismo, se ha detectado la colocalización de AroB por inmunohistoquímica y marcaje por NADPH-diaforasa (Torres-Pérez, en preparación).

Para esto, los encéfalos destinados a esta técnica fueron procesados de la forma antes mencionada el mismo día de su perfusión, con la diferencia de que el lavado con PB luego de su fijación se realizó durante una hora. Una vez obtenidos los cortes, se siguió el protocolo planteado por Valtschanoff et al. (1992). Los cortes se incubaron con una solución compuesta de: 5ml Buffer Tris con 12µL de Tritón X-100 (0,3%), luego se adicionó una mezcla de Nitro Azul de Tetrazolio (2mg) y beta-NADPH (5mg) en agua bidestilada. Estos cortes fueron finalmente mantenidos en estufa a 37°C de 2 a 18 hs. Los cortes fueron observados en lupa para determinar el momento en el que el marcado era el esperado. Luego los cortes fueron retirados de la solución y lavados varias veces con PB. A continuación, los cortes se montaron en portaobjetos con glicerol y se observaron y fotografiaron en microscopio de luz Nikon Eclipse E200.

Esquematación

La reconstrucción tridimensional y los cortes transversales se utilizaron también para realizar esquemas generales del encéfalo y de las áreas seleccionadas.

Además, de forma esquemática, en estos cortes se representaron las áreas en donde se observó mayor cantidad de núcleos proliferativos marcados con BrdU y células de la glía radial marcadas con la técnica de NADPH diaforasa.

RESULTADOS

Reconstrucción tridimensional

Con el propósito de estimar los volúmenes del encéfalo y de las áreas seleccionadas, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de cuatro encéfalos (dos machos y dos hembras de la misma edad). En la Fig. 1 se muestran dos de los encéfalos reconstruidos (uno de cada sexo).

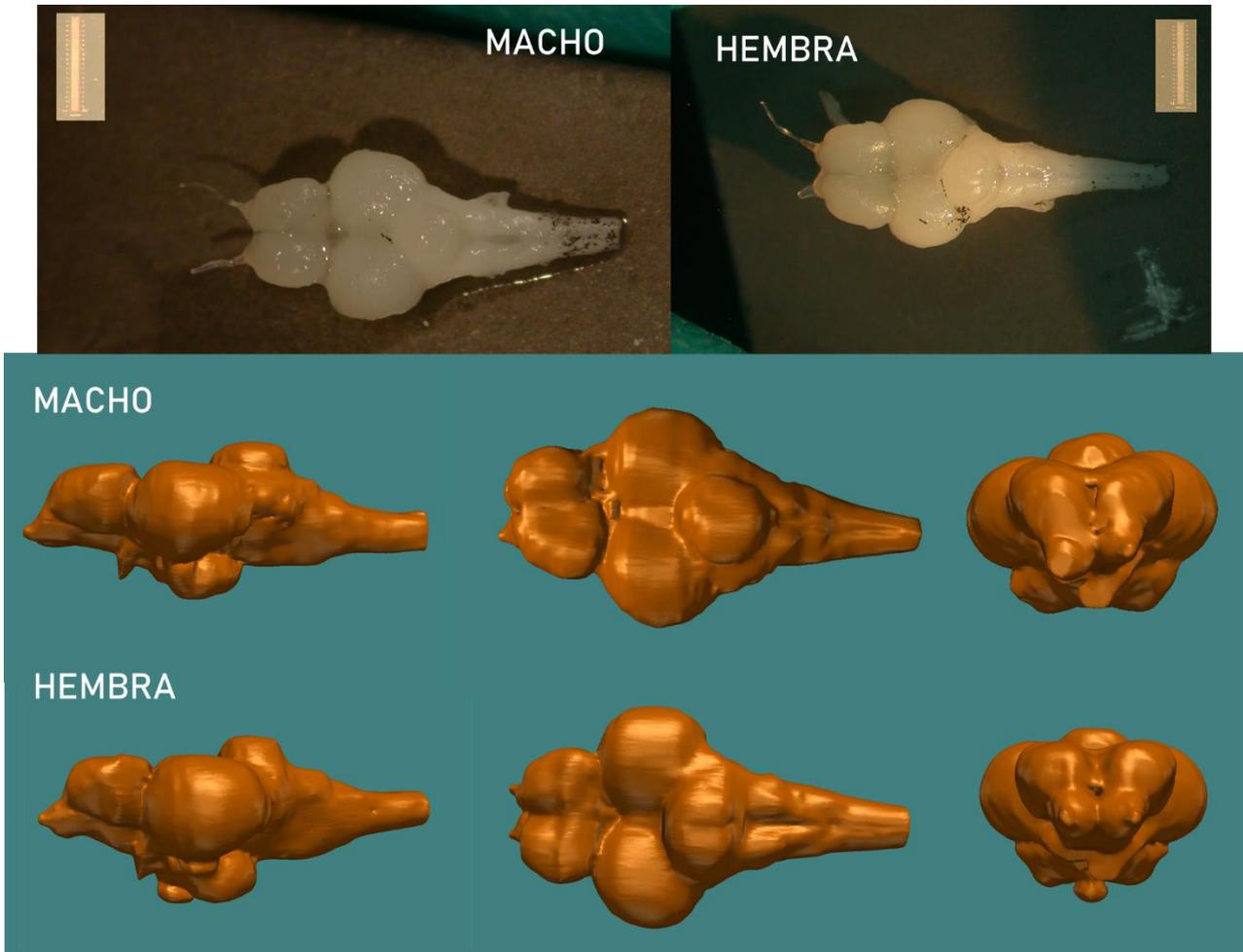


Fig. 1: Arriba: Se muestran las fotografías de dos encéfalos de *A. charrua* de cada sexo (Barra de calibración=2mm). Abajo: Se muestran las reconstrucciones tridimensionales de los encéfalos completos de *A. charrua* en el programa Biovis3D a partir de fotos tomadas de cortes transversales para cada sexo. Se muestran las vistas desde los tres planos (Izquierda: lateral, centro: superior, derecha: frontal).

Se decidió seleccionar un criterio para establecer los límites anteriores y posteriores de los encéfalos reconstruidos para la aproximación de los volúmenes totales. Una vez establecidos estos criterios, se estimó el volumen del encéfalo completo para dos machos y dos hembras mediante las reconstrucciones (Fig. 2B). Los cerebros de los machos presentaron volúmenes mayores que los de las hembras, con un promedio de 5.62 mm^3 , mientras que las hembras presentaron un promedio de 4.02 mm^3 (Tabla 2; Fig. 3A y B).

Este programa, además, permitió realizar las reconstrucciones de las áreas seleccionadas (BO, TEL y POA; Fig. 2) y estimar sus volúmenes. El análisis comparativo de los volúmenes promedio, mostró mayores valores en

las tres regiones en los machos, con respecto a las hembras. En machos, se observaron volúmenes promedio para el BO, TEL y POA de 0.098 mm³, 0.554 mm³ y 0.046 mm³, respectivamente, mientras que en las hembras, estos fueron de 0.081 mm³, 0.423 mm³ y 0.028 mm³ (Tabla 2; Fig. 3C y D).

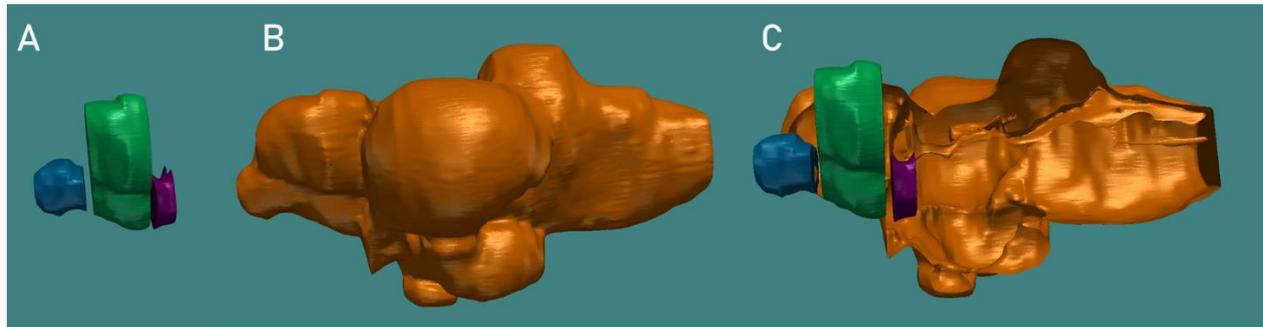


Fig. 2: A) Reconstrucción tridimensional mediante el programa Biovis3D de las áreas seleccionadas en un encéfalo como ejemplo (Azul: bulbo olfatorio, verde: lóbulos telencefálicos, violeta: región preóptica). B) Reconstrucción tridimensional mediante el programa Biovis3D del encéfalo completo. C) Corte longitudinal de la reconstrucción del encéfalo completo superpuesto con las áreas seleccionadas (Azul: bulbo olfatorio, verde: lóbulos telencefálicos, violeta: región preóptica, naranja: encéfalo completo)

Tabla 2: Se indica para cada encéfalo reconstruido el sexo (M: macho, H: hembra), el tamaño corporal del animal (medida del pez del extremo anterior de la cabeza al extremo más caudal de la cola en el momento de la perfusión) y los volúmenes estimados mediante el programa Biovis3D de las áreas seleccionadas (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica) y del encéfalo completo. Además, se indica el promedio para cada sexo de las medidas presentadas.

Sexo	Tamaño corporal (mm)	Volumen BO (mm ³)	Volumen TEL (mm ³)	Volumen POA (mm ³)	Volumen encéfalo (mm ³)
M	41	0.112	0.610	0.052	5.608
M	39	0.084	0.498	0.039	5.634
Promedio	40	0.098	0.554	0.046	5.621
H	41	0.092	0.485	0.030	4.234
H	38	0.071	0.361	0.025	3.810
Promedio	39	0.081	0.423	0.028	4.022

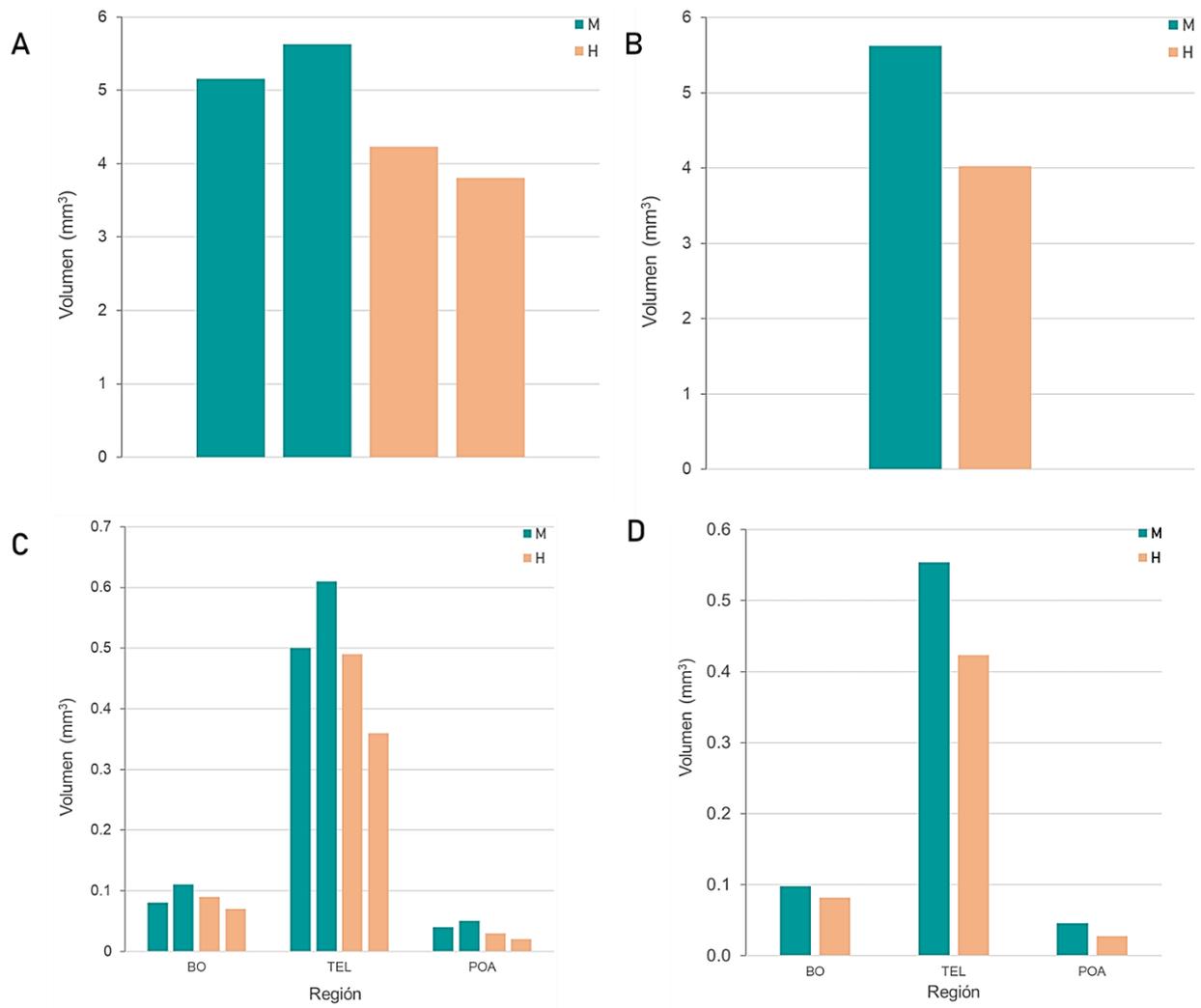


Fig. 3: Volúmenes estimados mediante la reconstrucción tridimensional en el programa Biovis3D de cuatro individuos de ambos sexos. (M: macho, H: hembra). A) Volúmenes del encéfalo completo de cada pez. B) Volúmenes promedio del encéfalo completo para cada sexo. C) Volúmenes de las regiones seleccionadas de cada pez (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica). D) Volúmenes promedio de las regiones seleccionadas para cada sexo

Teniendo en cuenta que no se observaron importantes diferencias en los tamaños corporales de los peces (Tabla 2), pero sí en los volúmenes de los encéfalos, se decidió estudiar si existían diferencias en las relaciones del volumen del encefálo respecto al tamaño corporal. Se graficó el volumen total del encéfalo con respecto a su longitud corporal. Se observó que en el caso de los machos, los volúmenes totales eran mayores en relación a sus longitudes corporales que en las hembras (Fig. 4). Este resultado muestra que el crecimiento del encéfalo de los machos sería mayor en relación al tamaño corporal que el de las hembras.

Considerando el resultado anterior, se buscaron también si existían diferencias en la relación entre el tamaño de cada región de interés y el tamaño total del encéfalo. Para esto, se realizó una división del volumen de cada área del cerebro por el volumen total. En este caso, no se observaron grandes variaciones en las relaciones. En el caso del BO y TEL, el tamaño relativo promedio es ligeramente mayor en hembras, mientras que en el POA, es ligeramente mayor en machos (Fig. 5).

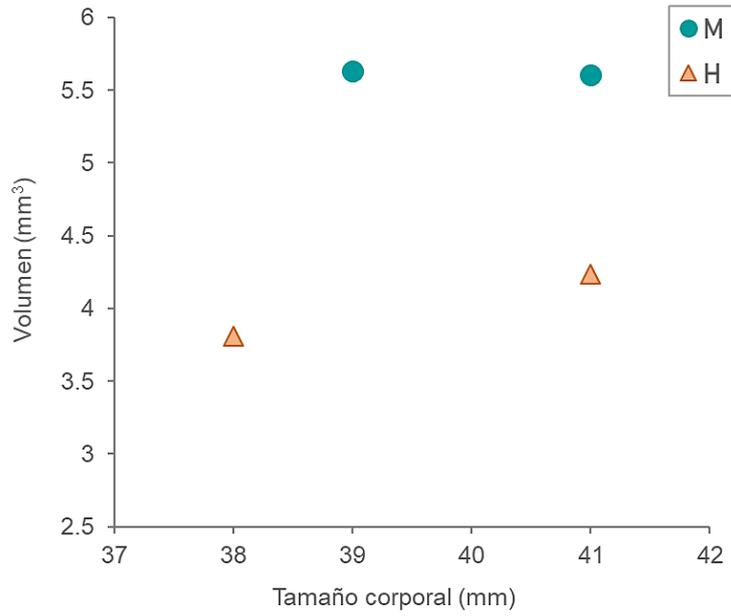


Fig. 4: Se indica el volumen total del encéfalo de cuatro peces de ambos sexos en función del tamaño corporal de cada uno (longitud total). (M: macho, H: hembra).

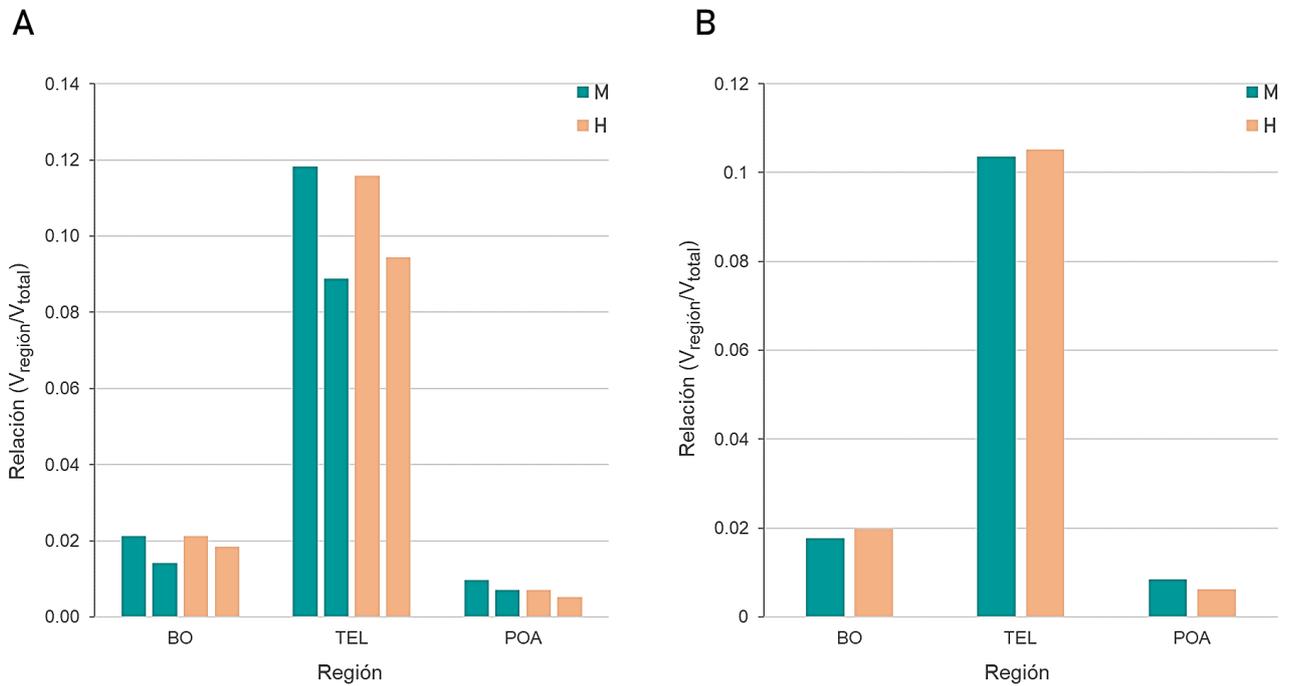


Fig. 5: Se muestran los volúmenes relativos de las áreas de estudio para cuatro peces de ambos sexos (M: macho, H: hembra). A) Volúmenes relativos para cada pez. B) Volúmenes relativos promedio para cada sexo. ($V_{\text{región}}$: Volumen de cada región de interés, V_{total} : Volumen total del encéfalo, BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica).

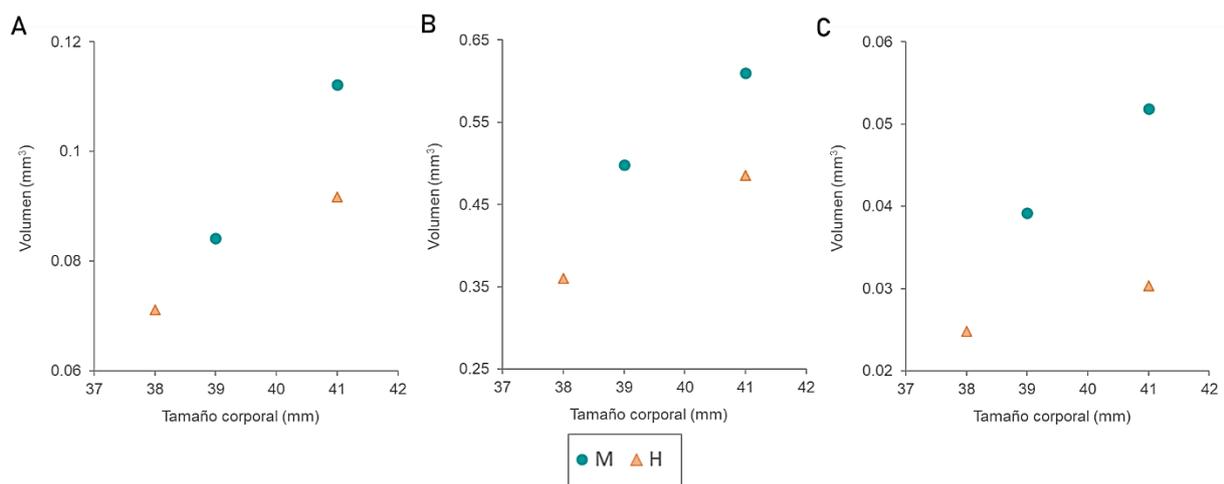


Fig. 6: Se indica el volumen de las áreas de estudio para dos peces de cada sexo en función del tamaño corporal de cada uno (longitud total). (M: macho, H: hembra). A) Volumen del bulbo olfatorio en función del tamaño corporal. B) Volumen de los lóbulos telencefálicos en función del tamaño corporal. C) Volumen de la región preóptica en función del tamaño corporal.

Si bien no se encontraron diferencias del volumen de cada región analizada en relación al tamaño del encéfalo entre sexos, se buscó estudiar si estas áreas habrían crecido de forma alométrica en cada sexo. Para esto se comparó la relación del tamaño corporal, pero en este caso, con el volumen de cada región de interés (BO, TEL y POA). En este caso, se observó, al igual que en el caso del encéfalo completo, que los machos presentan un mayor volumen de las tres regiones en relación a su longitud total.

Análisis de la proliferación celular en el cerebro de machos y hembras

Cuantificación de núcleos BrdU positivos

Para esto, se realizaron los controles positivos y negativos de la técnica de inmunohistoquímica. Los controles para el anticuerpo anti AroB mostraron que no existían falsos positivos debido a la interacción inespecífica del anticuerpo secundario con otras estructuras o epítopes. Los controles realizados para los demás anticuerpos utilizados, mostraron la distribución específica descrita en la bibliografía y en ningún caso los anticuerpos secundarios presentaron reacciones cruzadas con epítopes en los tejidos analizados, visibles con los láseres específicos para cada fluoróforo.

Mediante la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica se logró detectar la presencia de células proliferativas BrdU+ a lo largo de todo el encéfalo de *A. charrua* de ambos sexos de entre cuatro y cinco meses de edad. La cuantificación de los núcleos permitió el cálculo de las tasas proliferativas para cada región. Los núcleos BrdU+ fueron identificados por fluorescencia en el microscopio confocal. El análisis comparativo de dichas imágenes con las fotografías tomadas con luz transmitida permitió discriminar los núcleos BrdU+ de los eritrocitos (por su morfología y posición).

Los valores presentados en la Tabla 3 muestran que existe una diferencia en la cantidad de núcleos proliferativos BrdU+ presentes en ambos sexos: los machos presentaron una cantidad promedio significativamente mayor que las hembras en las tres regiones analizadas (Fig. 7), con un número promedio aproximado de 118, 225 y 76 núcleos en el BO, TEL y POA, respectivamente, mientras que las hembras presentaron 61, 127 y 42 para las mismas zonas. Además, de acuerdo con lo observado anteriormente en las reconstrucciones tridimensionales (Tabla 2), los volúmenes de los cortes seleccionados en machos fueron

mayores que los de hembras. En el caso de los machos, existió una gran variación de la cantidad de núcleos cuantificados.

Tabla 3: Se muestran los valores promedio de núcleos proliferativos BrdU+ para cada región (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica) separado por cada sexo (M: macho, H: hembra), su desvío estándar (SD), error estándar (SEM) y el volumen total de los cortes cuantificados

Región	Número de núcleos	SD	SEM	Volumen (mm ³)
BO M	118.4	66.05	29.54	0.010
BO H	61.2	19.34	8.65	0.008
TEL M	224.8	47.28	21.15	0.042
TEL H	126.8	19.20	8.59	0.036
POA M	76.0	21.18	9.47	0.009
POA H	42.0	13.93	6.23	0.008

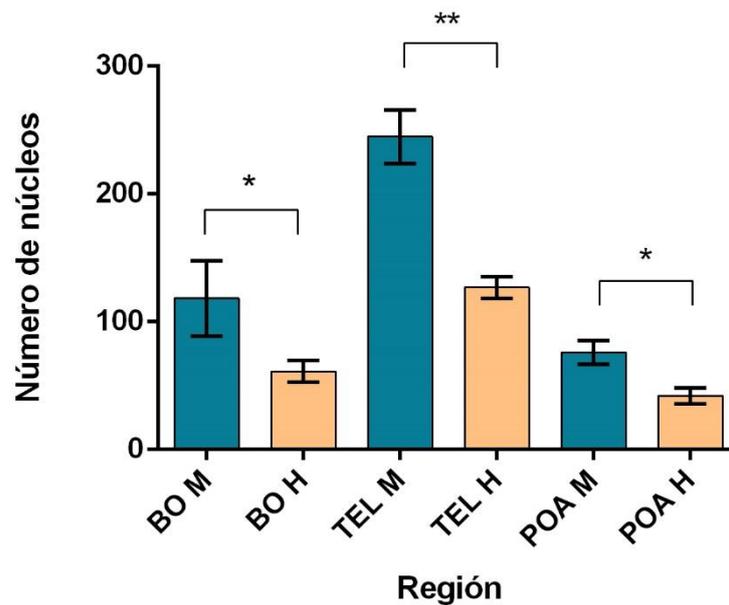


Fig. 7: Gráfica del promedio \pm SEM de núcleos proliferativos BrdU+ para cada región (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica) y sexo (M: macho, H: hembra). Se indican las diferencias significativas (BO H vs BO M: $p=0.0317$; TEL H vs TEL M: $p=0.0079$; POA H vs POA M: $p=0.0317$, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$).

Los datos de las tasas proliferativas de cada corte analizados estadísticamente y se calcularon sus promedios, SD y SEM (Tabla 4). Se observó que los machos presentaron una tasa proliferativa significativamente mayor que las hembras en todas las regiones estudiadas. En ambos sexos, las mayores tasas proliferativas fueron detectadas en el BO, seguidas de las calculadas en el POA y finalmente la del TEL (Fig. 8).

Tabla 4: Promedio (núcleos/mm³), desvío estándar (SD) y Error estándar de la media (SEM) de las tasas proliferativas para cada región (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica) y sexo (M: macho, H: hembra).

Región	Promedio (núcleos/mm ³)	SD	SEM
BO M	11394	6811	1523
BO H	7760	3942	881.4
TEL M	5732	2599	581.1
TEL H	3616	1412	315.7
POA M	8375	3322	742.8
POA H	5522	3300	738

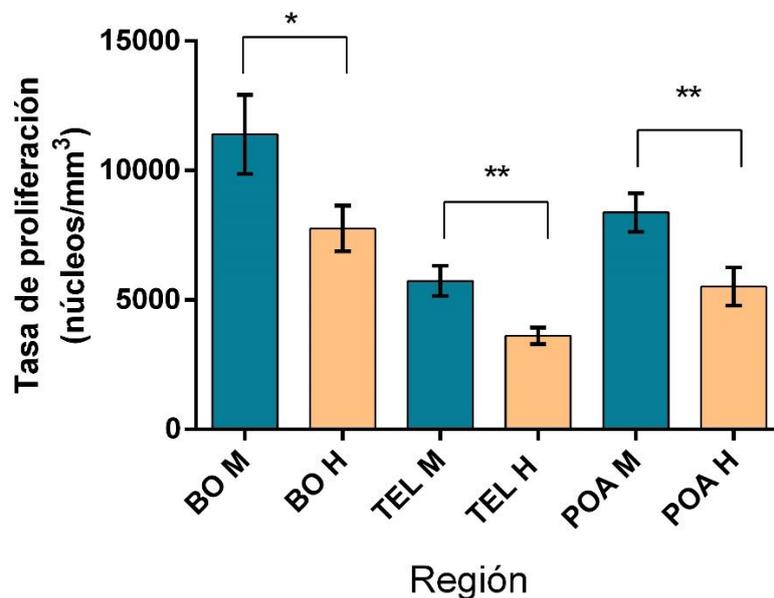


Fig. 8: Gráfica del promedio \pm SEM de las tasas proliferativas (núcleos/mm³) para cada región (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica) y sexo (M: macho, H: hembra). Se indican las diferencias significativas (BO H vs BO M: $p=0.0458$; TEL H vs TEL M: $p=0.0024$; POA H vs POA M: $p=0.0097$, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$).

Teniendo en cuenta las diferencias observadas, se analizó la proporción que representa cada región en el total de las tasas proliferativas obtenidas. Utilizando las tasas proliferativas promedio para cada región (Tabla 4) no se observan prácticamente diferencias entre ambos sexos (Fig. 9). El BO constituyó en machos y hembras, el 45% y 46%, respectivamente. Mientras que, en el caso del TEL, su proliferación correspondió al 22% en machos y 21% en hembras y el POA, en ambos sexos, el 33%. Es decir, que las proporciones entre las

tasas proliferativas entre regiones en ambos sexos son muy similares, que se ajusta a lo observado en la Fig. 5.

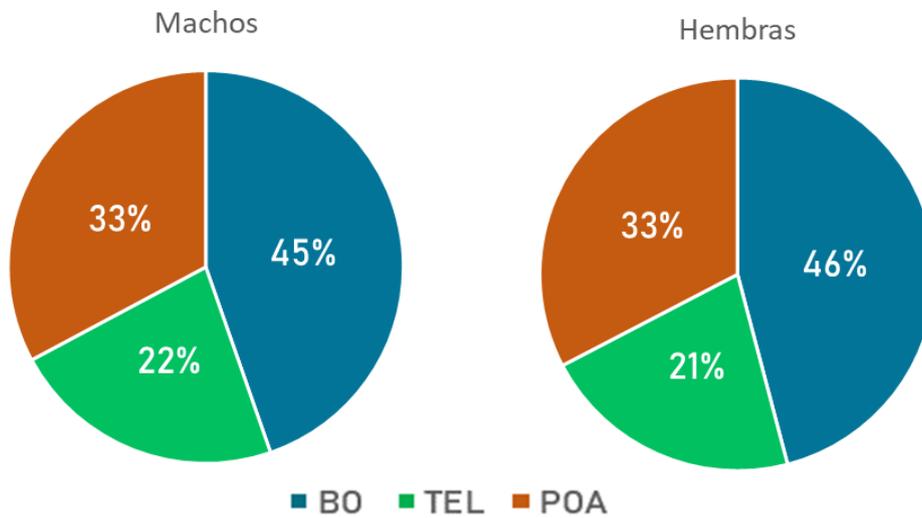


Fig. 9: Se muestra la proporción entre las tasas proliferativas de cada región para cada sexo (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica).

Localización de los núcleos BrdU+

Los núcleos proliferativos marcados con BrdU se localizaron ampliamente a lo largo de todo el encéfalo de *A. charrua* de ambos sexos. Estos núcleos se ubicaron en su gran mayoría sobre la superficie ventricular o muy cercanamente con una pequeña cantidad de núcleos BrdU+ en el parénquima.

En el BO, se observó que la mayoría de los núcleos BrdU+ se encontraban en la zona ventricular. En las secciones más rostrales del BO, los núcleos se encontraron en una menor densidad. En algunos casos se encontraron núcleos distribuidos de forma más espaciada en las zonas más rostrales. Pero en todos los casos, la mayor concentración de núcleos se observó en las zonas ventriculares de la capa celular interna (ICL) y en la zona de la transición entre el BO y el TEL, con una menor cantidad de núcleos en la zona de la capa glomerular (GL) y en la capa celular externa (ECL) (Fig. 10).

También en el TEL la mayoría de los núcleos BrdU+ se ubicaron en la zona ventricular, con una mayor concentración en la zona ventral dorsal (Vd) de la pared ventricular. En esta zona en particular, incluso se observan núcleos que se han alejado de la pared ventricular, siendo estos posiblemente correspondientes a neuroblastos migratorios. También se observó que en la superficie pial del telencéfalo dorsal existía una presencia de núcleos marcados, pero en menor cantidad y de forma claramente más espaciada que en la zona ventral, en la zona dorso medial (Dm), posterior (Dp) y dorsolateral (DI). Sólo un pequeño número de núcleos BrdU+ se observaron en el parénquima (Fig. 11).

En el caso de la POA, también se observó algo similar: la mayoría de los núcleos BrdU+ se encontraban distribuidos en toda la zona ventricular rostrocaudal, desde la zona anterior del núcleo parvocelular preóptico (PPa) hasta el núcleo magnocelular (PM) de la región dorsal, y también el núcleo supraquiasmático de la región ventral. Además, se observó un menor número de núcleos en el parénquima (Fig. 12).

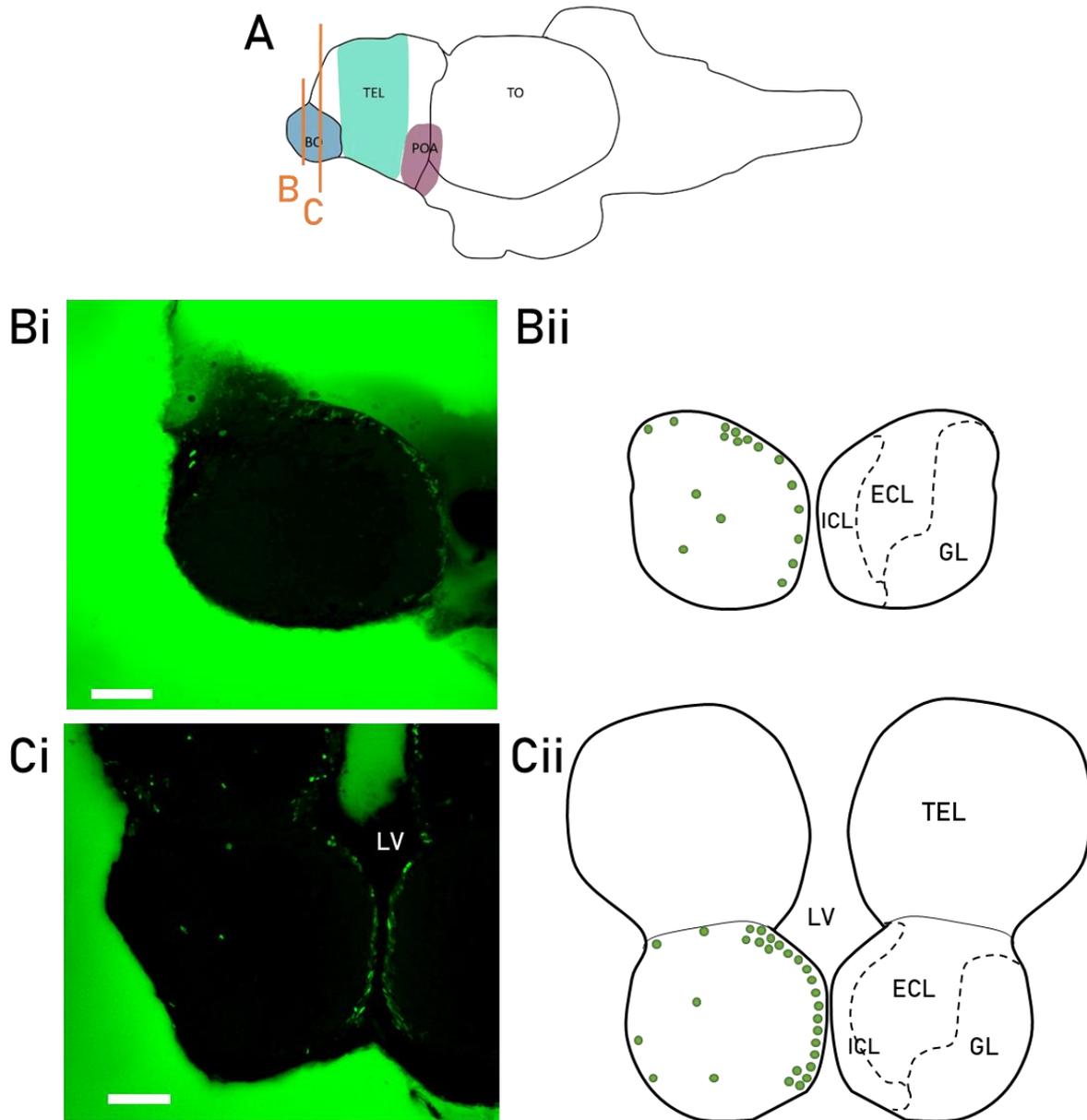


Fig. 10: A) Esquema lateral del cerebro de *A. charrua*. Se indican las zonas de interés en color). En naranja se indican las posiciones aproximadas a las que corresponden los cortes mostrados en B y C. Bi y Ci) Ejemplos de corte transversal representativos del bulbo olfatorio fotografiados mediante microscopía confocal. En verde se observan los núcleos marcados BrdU+. Bii y Cii) Esquema de los cortes presentados en Bi y Ci, respectivamente. Se indica en verde de forma esquemática las zonas en donde se observaron la mayoría de los núcleos en la mayoría de los peces (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica, TO: Tectum óptico, LV: luz ventricular, ICL: capa celular interna, ECL: capa celular externa, GL: capa glomerular). Barra de calibración = 100µm.

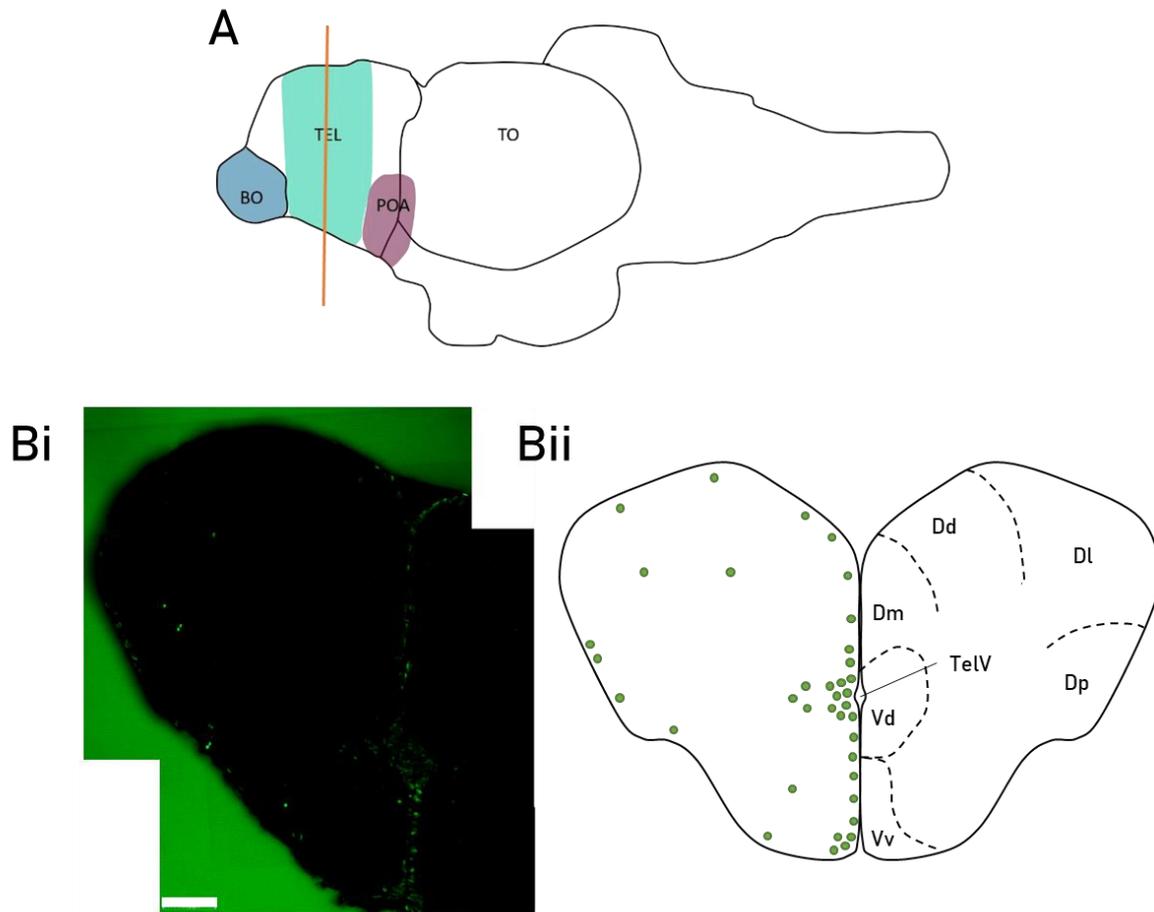


Fig. 11: A) Esquema lateral del cerebro de *A. charrua*. Se indican las zonas de interés en color). En naranja se indican las posiciones aproximadas a las que corresponden los cortes mostrados en B. Bi) Corte transversal representativo de los lóbulos telencefálicos fotografiado mediante microscopía confocal. En verde se observan los núcleos marcados BrdU+. Bii) Esquema del corte presentados en B. Se indica en verde de forma esquemática las zonas en donde se observaron la mayoría de los núcleos en la mayoría de los peces (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica, TO: Tectum óptico, TelV: ventrículo telencefálico, Vv: Región ventral del telencéfalo ventral, Vd: Región dorsal del telencéfalo ventral, Dm: Región medial del telencéfalo dorsal, Dd: Región dorsal del telencéfalo dorsal, Dl: Región lateral del telencéfalo dorsal, Dp: Región posterior del telencéfalo dorsal). Barra de calibración = 100µm.

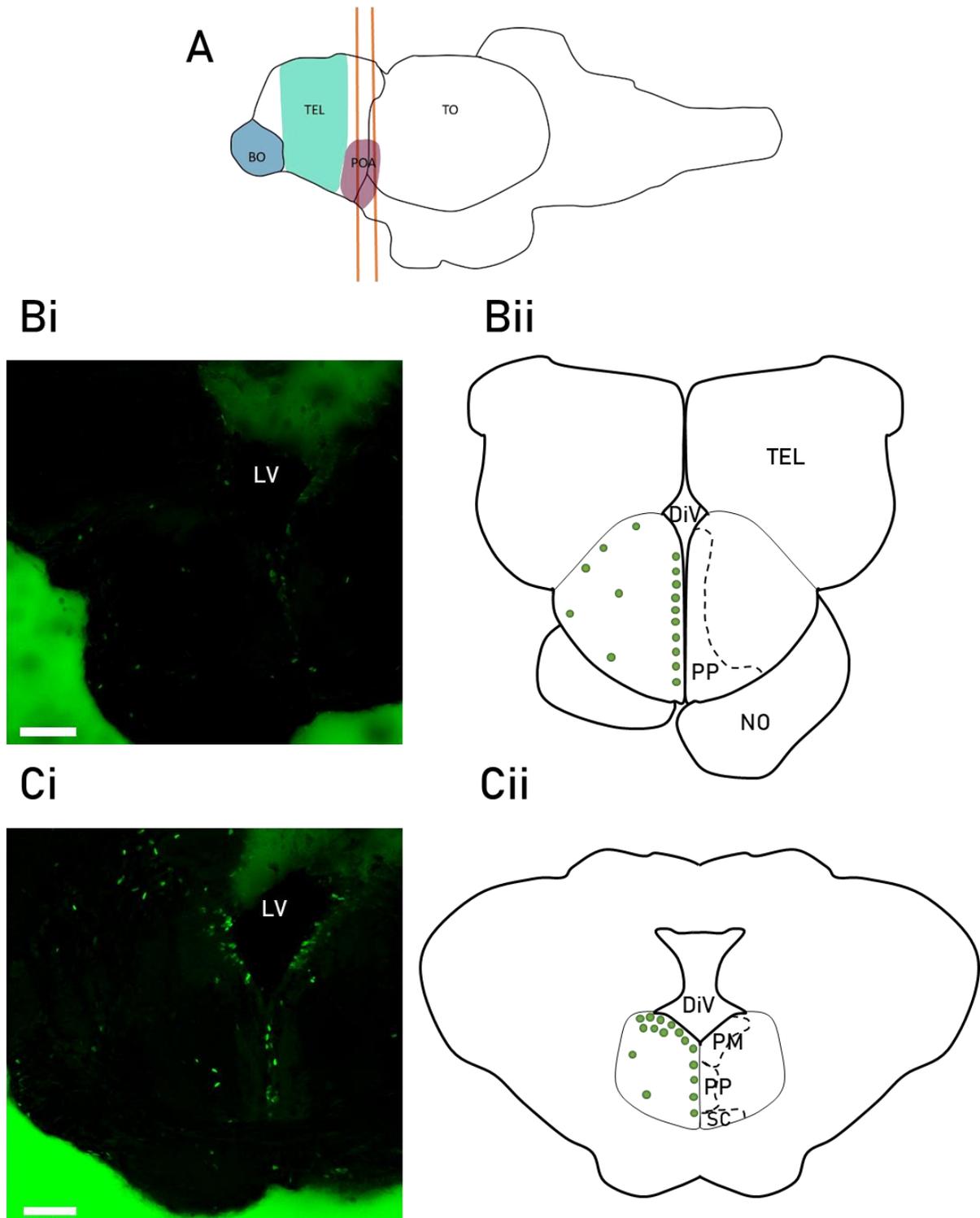


Fig. 12: A) Esquema lateral del cerebro de *A. charrua*. Se indican las zonas de interés en color). En naranja se indican las posiciones aproximadas a las que corresponden los cortes mostrados en B y C. Bi y Ci) Cortes transversales de la región preóptica fotografiada mediante microscopía confocal. En verde se observan los núcleos marcados BrdU+. Bii y Cii) Esquema de los cortes presentados en Bi y Ci, respectivamente. Se indica en verde de forma esquemática las zonas en donde se observaron la mayoría de los núcleos en la mayoría de los peces (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica, TO: Tectum óptico, NO: nervio óptico, PP: núcleo parvocelular, PM; núcleo magnocelular, SC: núcleo supraquiasmático, DiV: ventrículo diencefálico). Barra de calibración = 100 μ m.

Detección de la glía radial AroB+

La ubicación de los núcleos proliferativos en las zonas ventriculares, sugiere la presencia de células progenitoras, siendo posibles candidatas, las glías radiales que expresan la enzima AroB. Estas células, han sido relacionadas con la proliferación en numerosos estudios, por lo que se analizó su localización en *A. charrua* mediante técnicas histoquímicas (NADPH-diaforasa) e inmunohistoquímicas.

Tinción por NADPH-diaforasa

La tinción por NADPH-diaforasa ha sido utilizada clásicamente para la detección de neuronas óxido nítrico positivas. Sin embargo, en este trabajo se ha utilizado esta técnica para la detección del complejo enzimático AroB en glías radiales, ya que se encuentra formado por la citocromo P450 aromatasasa y la NADPH-citocromo P450 reductasa. La presencia del dominio NADPH reductasa permite que la enzima AroB sea detectada mediante la técnica de NADPH diaforasa. Asimismo, se ha detectado la colocalización de AroB por inmunohistoquímica y marcaje por NADPH-diaforasa.

Mediante esta la técnica se identificó la presencia de glías radiales en el encéfalo de estos peces. Las células de la glía radial fueron identificadas además por su localización en las paredes de los ventrículos y por su morfología. Utilizando como guía la bibliografía, se identificaron como glías radiales aquellas células marcadas con NADPH-diaforasa que presentaron un núcleo pequeño localizado en la pared ventricular (o de forma muy cercana) con un largo proceso citoplásmico que se extiende radialmente hacia la pía madre (Tong et al., 2009).

En el BO, se observó un marcado prominente de posibles glías radiales con su soma en la superficie ventricular de la ICL, sobre todo en la zona de transición entre el BO-TEL. Estas células extendían sus procesos de forma aproximadamente paralela a la transición BO-TEL y hacia el centro del BO, atravesando la ECL y alcanzando la GL (Fig. 13)

En el TEL, se observó la presencia de glías radiales marcadas con la técnica de NADPH diaforasa a lo largo de toda la superficie ventricular. La mayor densidad de estas se encontró en la zona ventricular Vd. También se observó la presencia de glía radial en la superficie ventricular posterior y lateral del telencéfalo dorsal, pero estas no se encontraron distribuidas de forma uniforme a lo largo de la superficie ventricular evertida, sino que agrupadas en pequeños números (Fig. 14).

En el caso de la POA también se observó que la glía radial NADPH diaforasa+ se ubicó únicamente en la superficie ventricular, también en algunos casos de forma discontinua, principalmente en los núcleos PP y PM (Fig. 15).

Al comparar la localización de los núcleos BrdU+ con la localización de la glía radial NADPH diaforasa + (Fig. 16) se observó que ambas zonas estas coinciden, sugiriendo una posible relación de estas glías radiales en la proliferación celular.

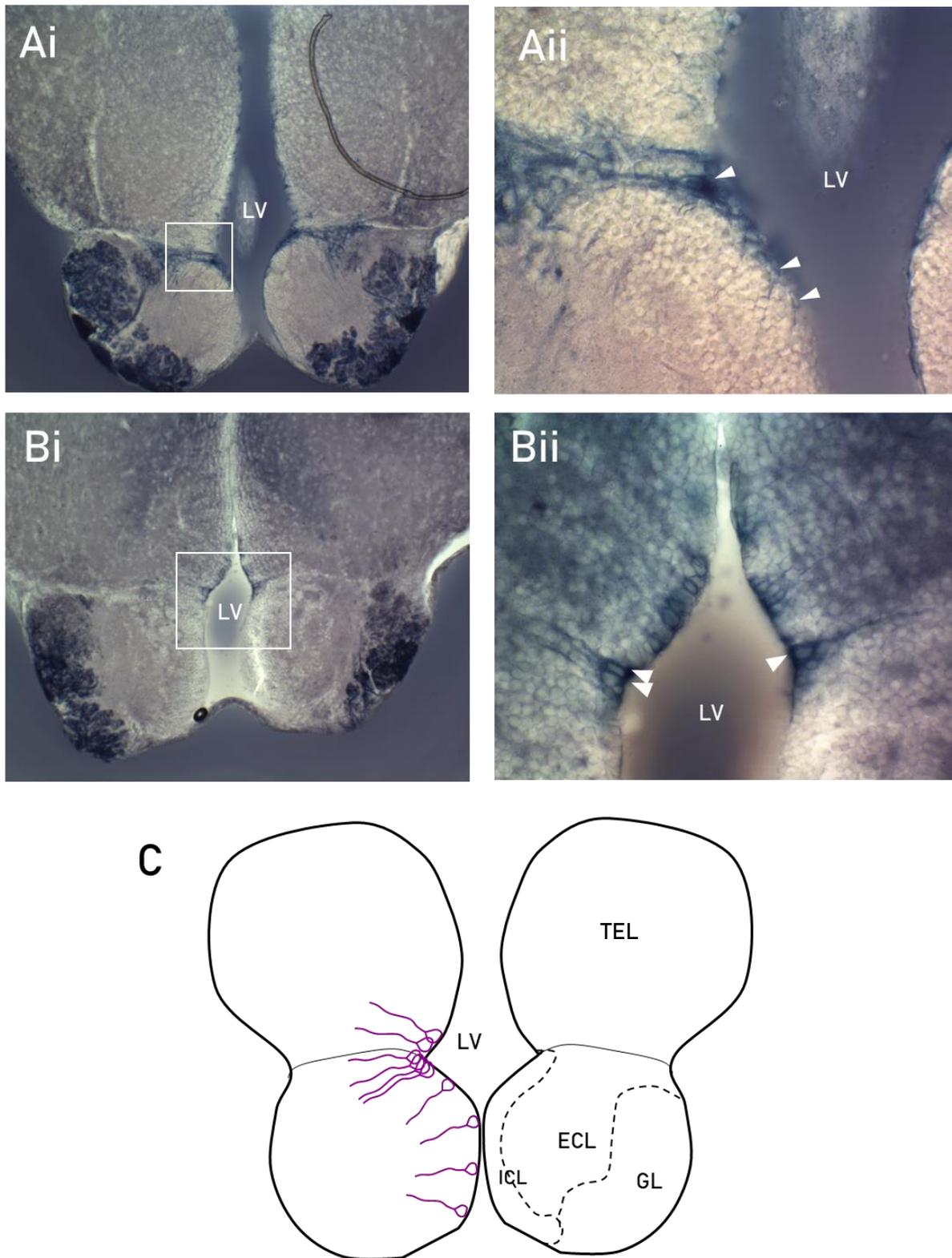


Fig. 13: A y B) Corte transversal representativo del bulbo olfatorio de *A. charrua* con tinción de NADPH-diaforasa. i) Se indica con un recuadro la zona fotografiada con mayor aumento en ii. La punta de flecha señala las células marcadas con esta técnica, que presentan una morfología y localización consistente con las células de la glía radial. C) Esquematación de los cortes transversales presentados en A y B. Se indica en violeta de forma esquemática las zonas en donde se observó mayormente el marcaje de posibles células de la glía radial. (LV: luz ventricular, ICL: capa celular interna, ECL: capa celular externa, GL: capa glomerular).

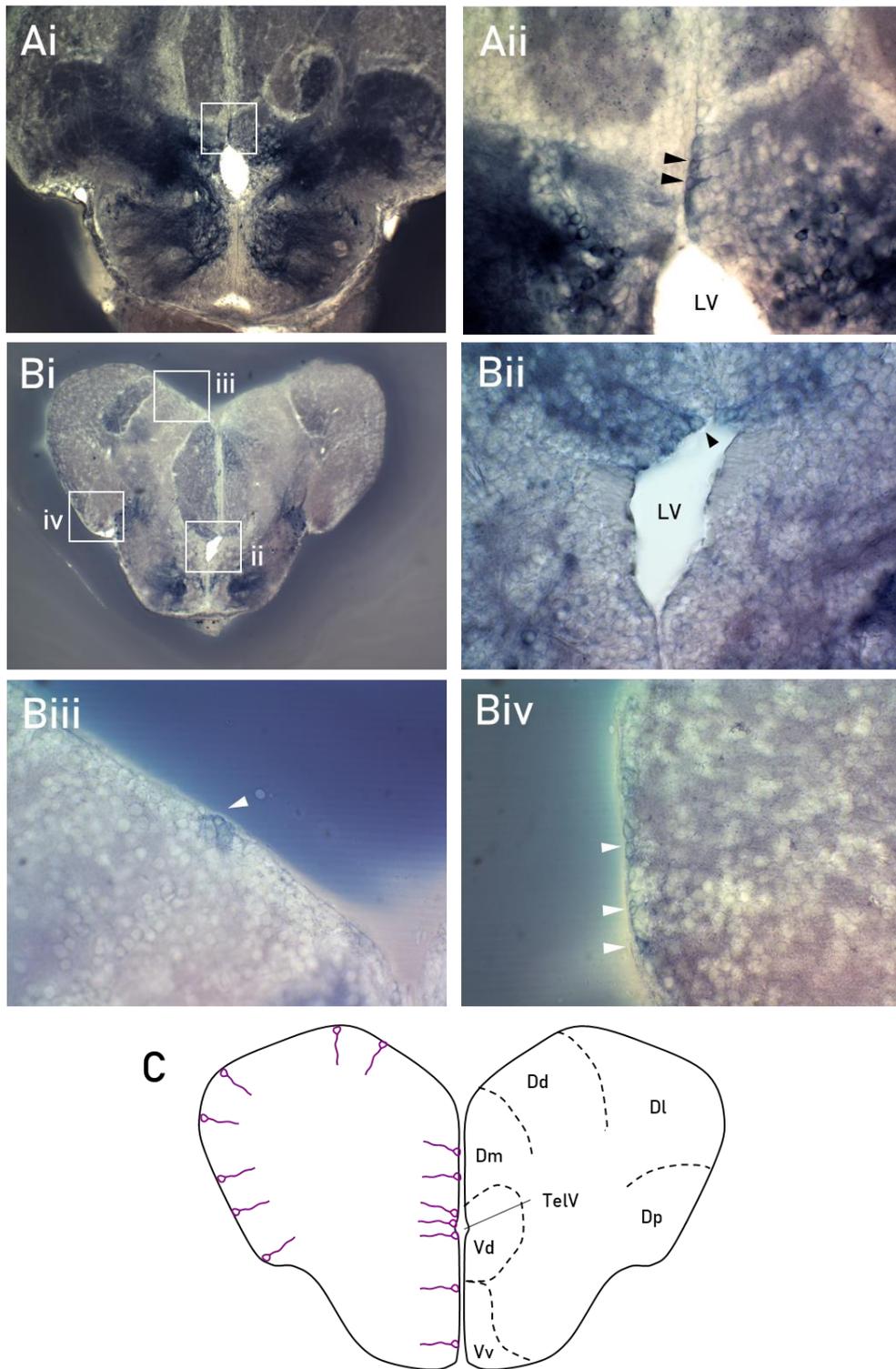


Fig. 14: A y B) Corte transversal representativo de los lóbulos telencefálicos de *A. charrua* con tinción de NADPH-diaforasa. i) Se indica con un recuadro la zona fotografiada con mayor aumento en ii, iii y iv. Se indica con una punta de flecha células marcadas con esta técnica, que presentan una morfología y localización consistente con las células de la glía radial. C) Esquematzación de los cortes transversales presentados en A y B. Se indica en violeta de forma esquemática las zonas en donde se observó mayormente el marcaje de posibles células de la glía radial. (TelV: ventrículo telencefálico, Vv: Región ventral del telencéfalo ventral, Vd: Región dorsal del telencéfalo ventral, Dm: Región medial del telencéfalo dorsal, Dd: Región dorsal del telencéfalo dorsal, Dl: Región lateral del telencéfalo dorsal, Dp: Región posterior del telencéfalo dorsal).

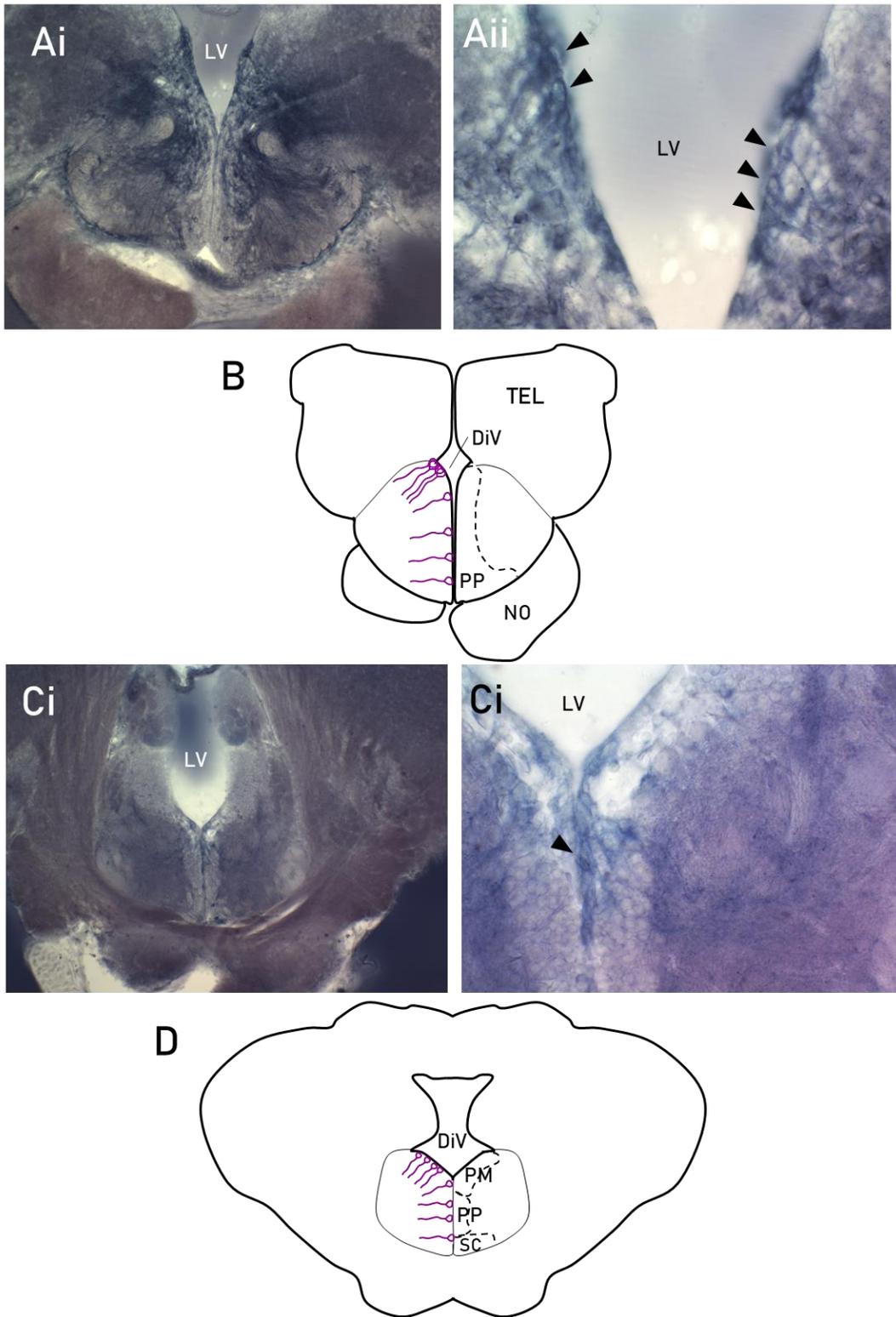


Fig. 15: A y C) Corte transversal representativo de la región preóptica de *A. charrua* con tinción de NADPH-diaforasa. i) Se indica con un recuadro la zona fotografiada con mayor aumento en ii. Se indica con una punta de flecha células marcadas con esta técnica, que presentan una morfología y localización consistente con las células de la glía radial. B y D) Esquemización de los cortes transversales presentados en A y C respectivamente. Se indica en violeta de forma esquemática las zonas en donde se observó mayormente el marcaje de posibles células de la glía radial. (NO: nervio óptico, PP: núcleo parvocelular, PM: núcleo magnocelular, SC: núcleo supraquiasmático, DiV: ventrículo diencefálico).

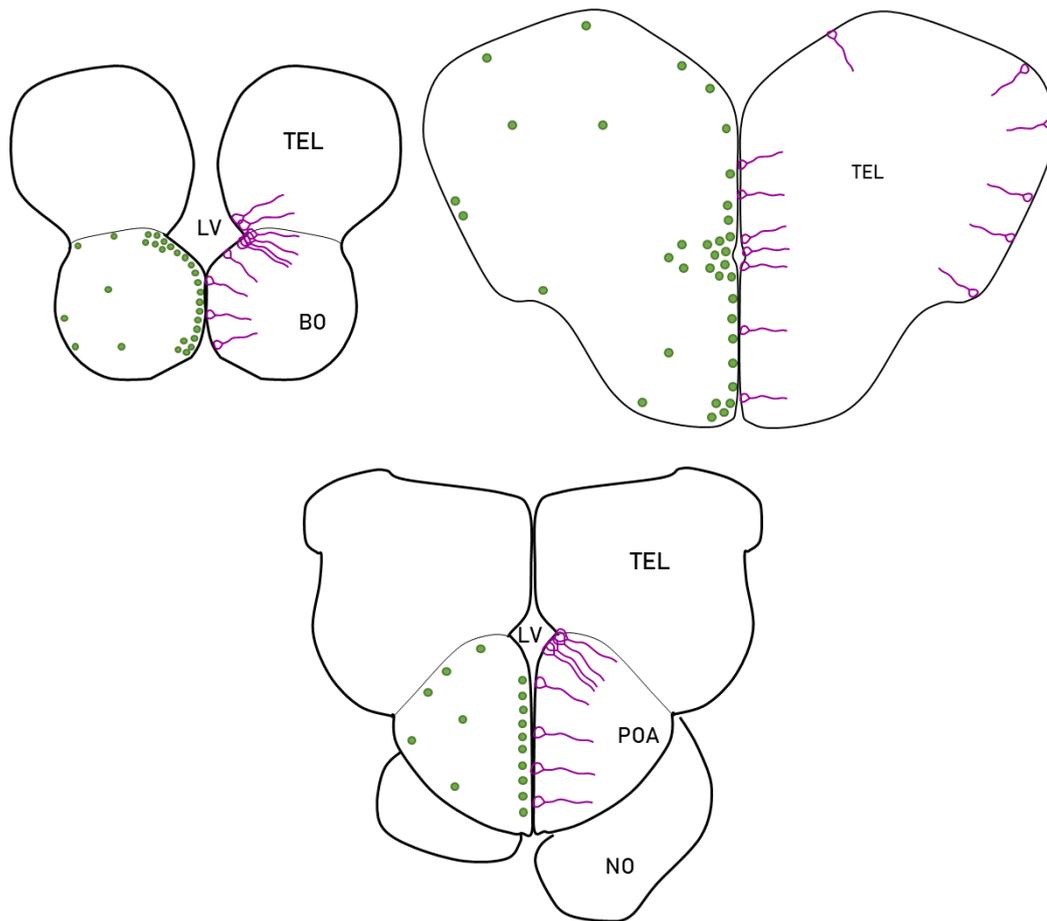


Fig. 16: Esquemas de los cortes transversales presentados en las figuras anteriores, de cada una de las tres regiones seleccionadas. A la izquierda de cada esquema se indica en verde de forma esquemática las zonas en donde se observaron la mayoría de los núcleos en la mayoría de los peces. A la derecha de cada esquema se indica en violeta las zonas en donde se observó mayormente el marcaje de posibles células de la glía radial (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, POA: región preóptica, NO: Nervio óptico LV: luz ventricular).

Tinción por inmunohistoquímica de marcadores gliales y neuronales

Mediante inmunohistoquímica, se analizó la colocalización de los núcleos BrdU+ con marcadores de glías radiales y de estirpe neuronal, y, además, de las glías radiales AroB +.

Mediante el marcado con anticuerpos anti vimentina, un marcador de glías radiales, se observó una colocalización con la AroB, confirmándose así por primera la presencia de este complejo enzimático en las glías radiales de *Austrolebias charrua* (junto con los resultados obtenidos por Torres-Pérez, en preparación), de acuerdo a lo previamente observado en la literatura para otras especies (Fig. 17).

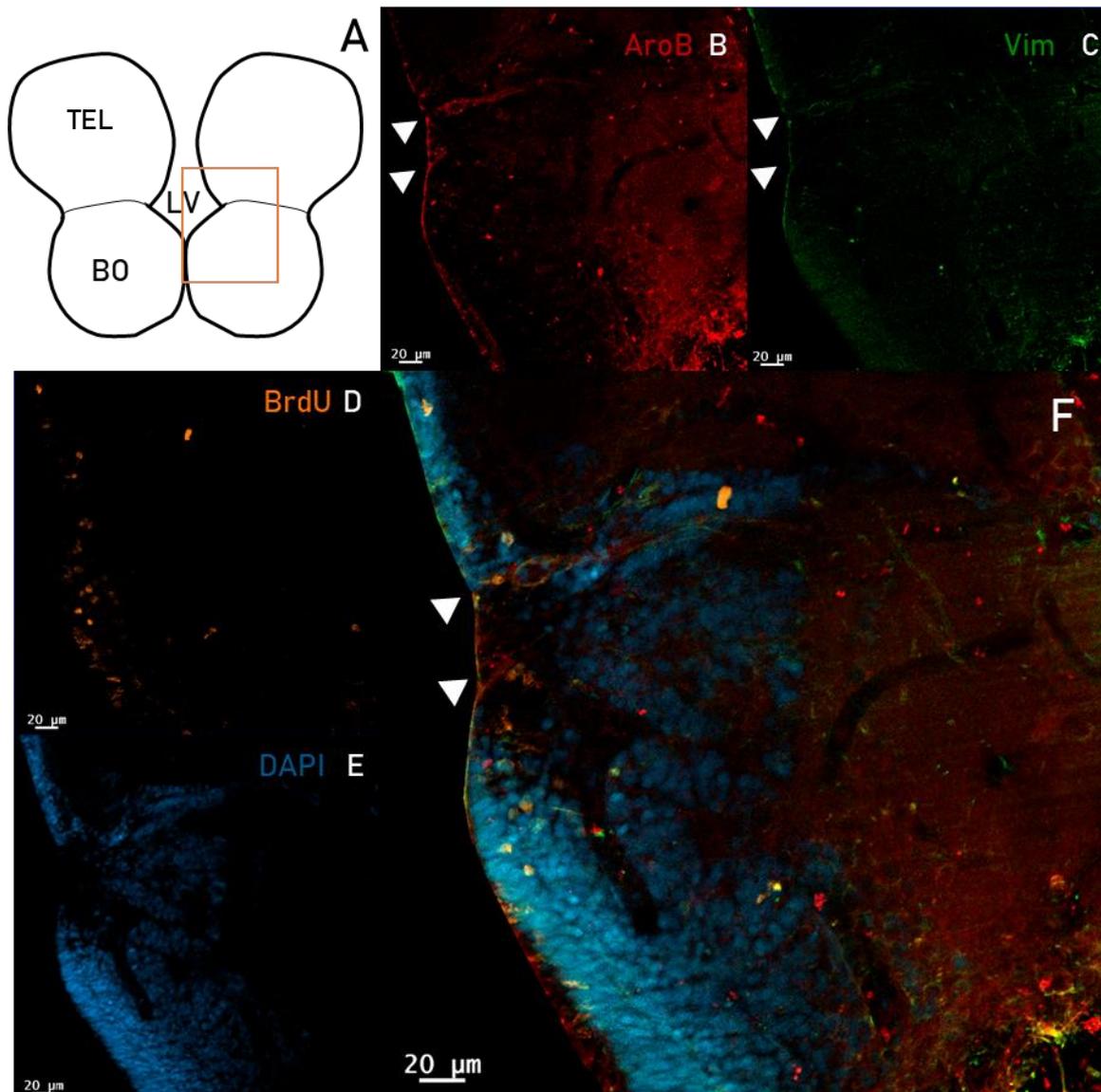


Fig. 17: A) Esquema del corte transversal presentado de BO. Se indica en un recuadro naranja la localización de las imágenes presentadas en B-F. B-F) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de un corte transversal donde se aprecia la transición BO-TEL, tratado con anticuerpos para diferentes marcadores. B) Imagen confocal para el marcador AroB. Se indica con una punta de flecha la presencia de células marcadas con la morfología y localización ventricular (en la transición BO-TEL), correspondientes a glías radiales. C) Imagen confocal para el marcador Vim. Se indica con una punta de flecha las mismas células que en B, también con la misma morfología y localización ventricular correspondiente a glías radiales. D) Imagen confocal para el marcador de proliferación BrdU, que se localizó principalmente en la zona ventricular o subventricular. E) Imagen confocal del marcador nuclear DAPI. F) Imagen confocal superpuesta de los marcadores antes mencionados. Se observa la colocalización de AroB y Vim. Además, los núcleos BrdU se encuentran distribuidos en la vecindad de las zonas AroB+ (BO: bulbo olfatorio, TEL: lóbulos telencefálicos, LV: luz ventricular)

Además, mediante la detección con anticuerpos anti AroB y anti marcadores de estirpe neuronal (HuC) se observó que existía una clara diferenciación entre las zonas positivas para cada marcaje en las tres regiones seleccionadas del encéfalo. Las zonas AroB+ se ubicaron en la superficie ventricular o de forma muy cercana. En el caso del telencefalo, las zonas AroB+ también se ubicaron en la zona dorsal -correspondiente a una zona de características ventriculares generadas en el desarrollo por la eversión ventricular en teleosteos. Se observó que las posibles GR AroB+ solían encontrarse, al igual que en el caso de la tinción por NADPH

diaforasa, de forma agrupada y discontinua a lo largo de la pared ventricular. Por otro lado, el marcado con HuC comienza a observarse principalmente al alejarse de la zona ventricular hacia la zona subventricular y el parénquima, encontrándose claramente expresado en zonas AroB negativas. Mediante estos marcados, además, se observó que los núcleos BrdU+ se ubicaban sobre todo en la zona ventricular y muchas veces en las zonas AroB+, donde se ha descrito la proliferación, pero también en la zona marcada con marcadores neuronales, indicando que, en la ventana temporal de estudio, las células que han proliferado, posiblemente hayan migrado, e incluso podrían haberse diferenciado a neuronas, demostrando la presencia de neurogénesis (Fig. 18, Fig. 19).

En el caso del BO, se observaron células marcadas con anticuerpos para AroB de gran tamaño sobre todo en la transición BO-TEL, cuyos procesos se extendían de forma paralela a la transición o hacia el interior del BO, y a lo largo de la zona ventricular (Fig. 17).

En el caso del telencéfalo, las GR AroB+ se ubicaron en la zona ventricular dorsal, agrupadas en pequeño número, extendiendo sus procesos hacia el parénquima (Fig. 20). También se observó una importante expresión de AroB en la zona ventricular ventral (Fig. 19)

En el caso del POA, las glías AroB+ se ubican claramente en la zona ventricular, de una forma, similar a la observada en el BO y TEL, extendiendo sus procesos hacia el parénquima del tejido (Fig. 18).

Finalmente, mediante este marcado por inmunohistoquímica, se logró detectar la colocalización de AroB y BrdU (Fig. 21).

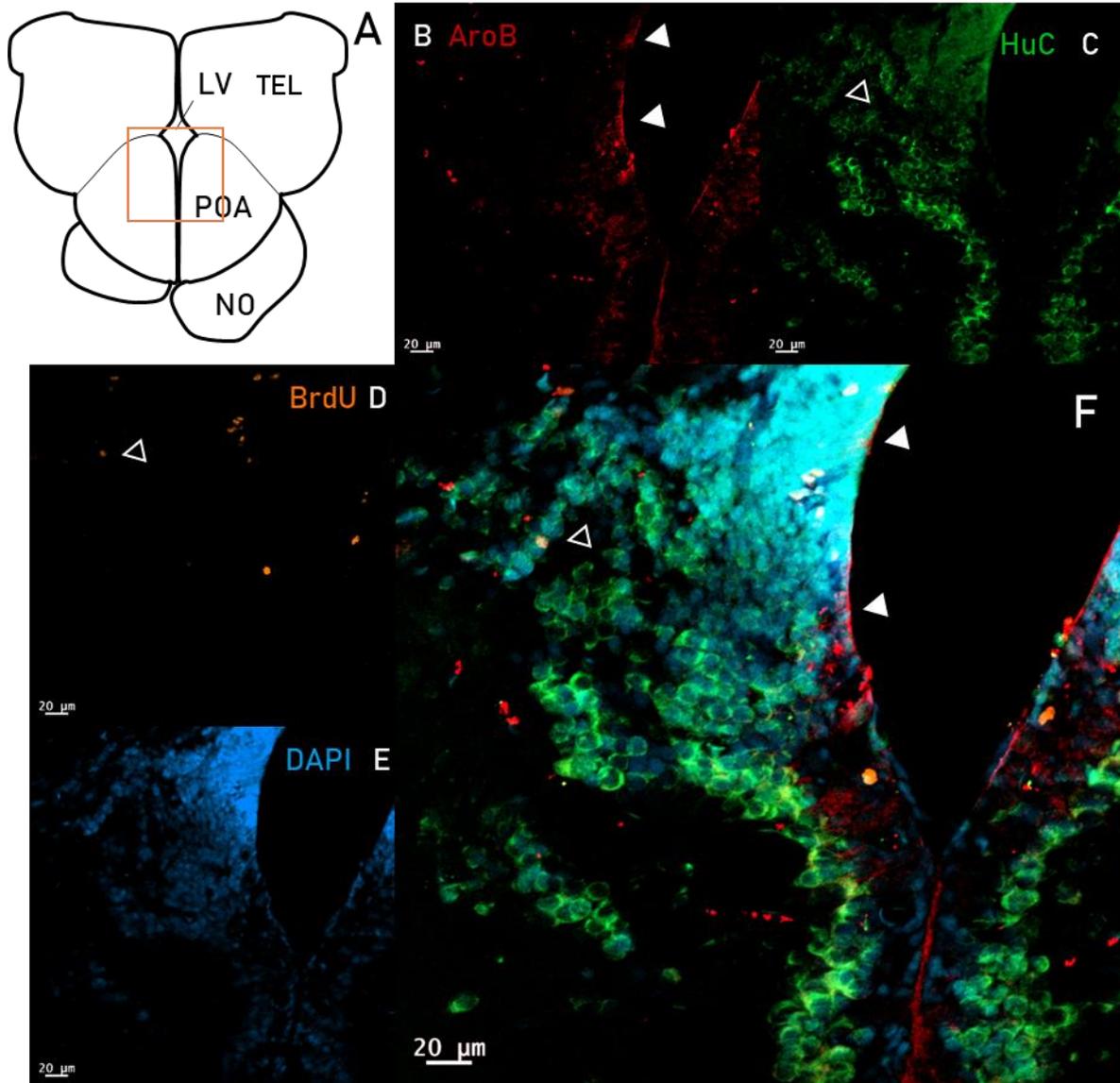


Fig. 18: A) Esquema del corte transversal presentado de la POA. Se indica en un recuadro naranja la localización de las imágenes presentadas en B-F. B-F) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de un corte transversal donde se aprecia la POA, tratado con anticuerpos para diferentes marcadores. B) Imagen confocal para el marcador AroB. Se indica con una punta de flecha la presencia de células marcadas con la morfología y localización ventricular correspondientes a glías radiales. C) Imagen confocal para el marcador HuC. Se indica con una punta de flecha hueca la zona de localización de células HuC+ con un núcleo marcado con BrdU en el parénquima. D) Imagen confocal para el marcador de proliferación BrdU, que se localizó principalmente en la zona ventricular o subventricular, con algunos núcleos marcados en el parénquima E) Imagen confocal del marcador nuclear DAPI. F) Imagen confocal superpuesta de los marcadores antes mencionados. Se observa la presencia de núcleos BrdU+ en la cercanía de la pared ventricular, donde se ubicaron las células AroB+ (Nótese que se encuentran en en una zona de gran densidad celular, donde la señal es difícil de discernir en la imagen superpuesta). Además, se observa la presencia de un núcleo BrdU+ en la zona de expresión del marcador neuronal HuC (POA: región preóptica, NO: nervio óptico, LV: luz ventricular, TEL: lóbulos telencefálicos)

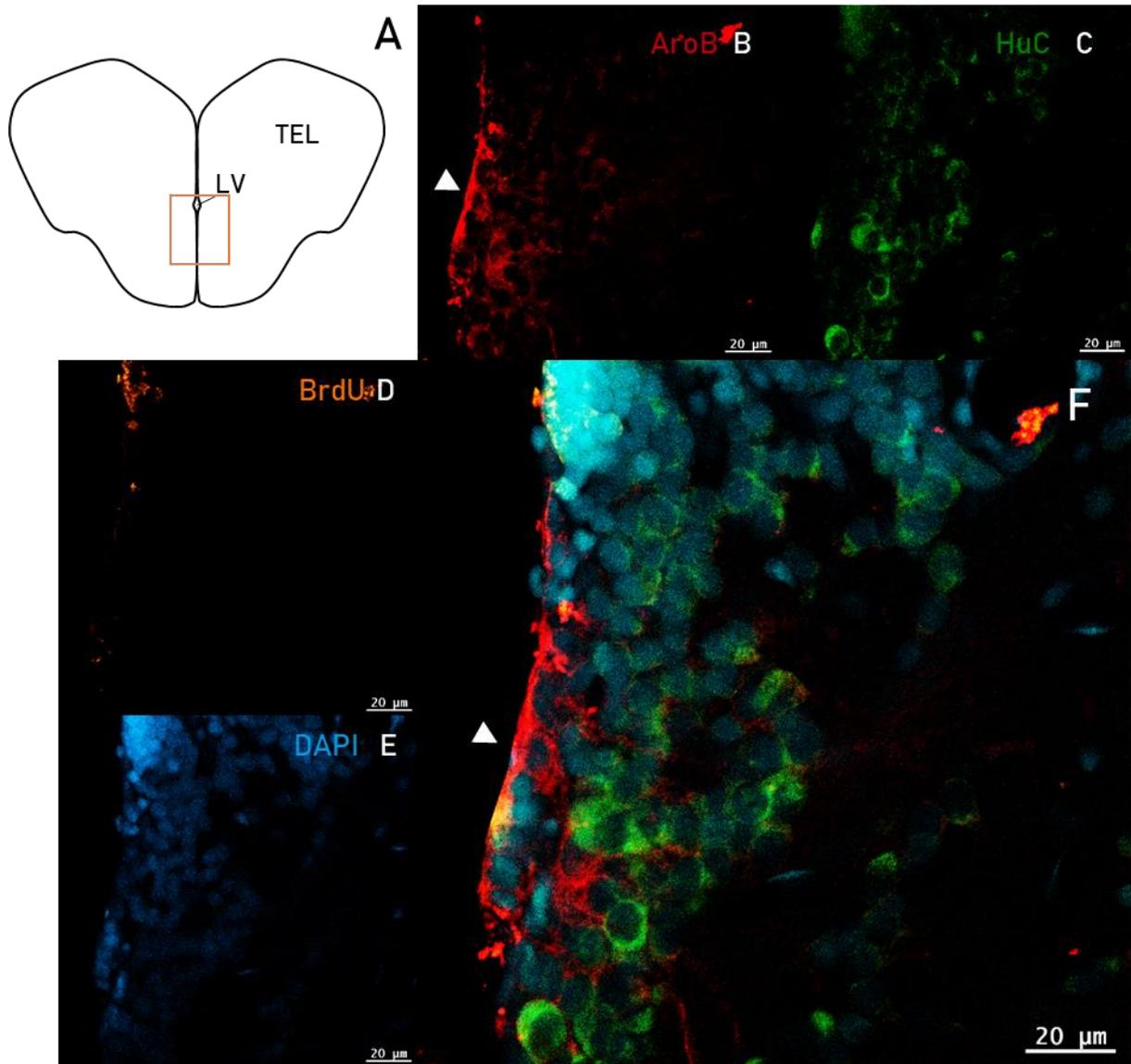


Fig. 19: A) Esquema del corte transversal presentado del TEL ventral. Se indica en un recuadro naranja la localización de las imágenes presentadas en B-F. B-F) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de un corte transversal donde se aprecia el TEL, tratado con anticuerpos para diferentes marcadores. B) Imagen confocal para el marcador AroB. Se indica con una punta de flecha la presencia de una célula marcada con la morfología y localización ventricular correspondiente a glías radiales. C) Imagen confocal para el marcador HuC. D) Imagen confocal para el marcador de proliferación BrdU, que se localizó principalmente en la zona ventricular. E) Imagen confocal del marcador nuclear DAPI. F) Imagen confocal superpuesta de los marcadores antes mencionados. Se observa la presencia de núcleos BrdU+ en la cercanía de la pared ventricular, donde se ubicaron las células AroB+. (TEL: lóbulos telencefálicos, LV: luz ventricular)

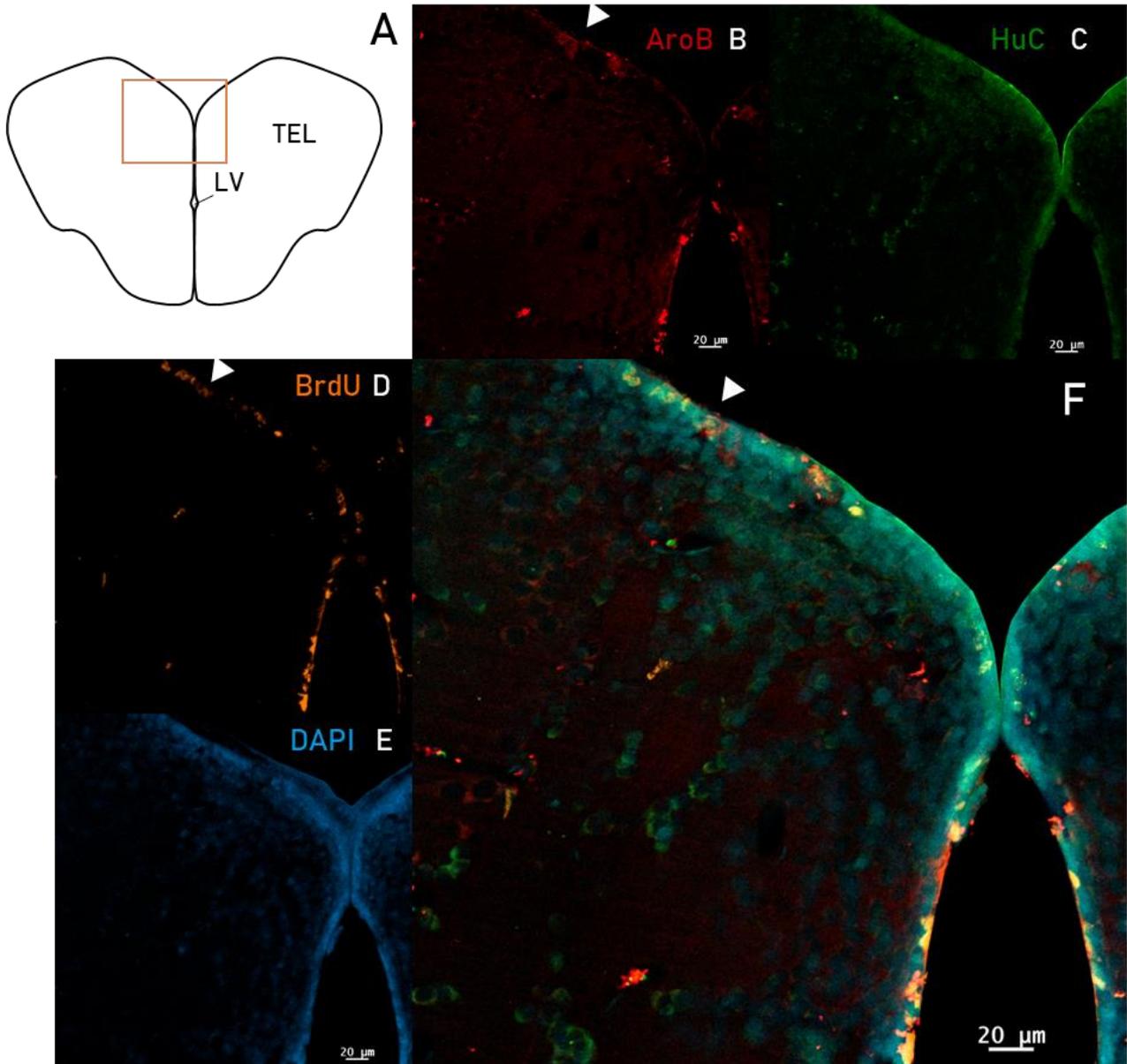


Fig. 20: A) Esquema del corte transversal presentado del TEL dorsal. Se indica en un recuadro naranja la localización de las imágenes presentadas en B-F. B-F) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de un corte transversal donde se aprecia el TEL, tratado con anticuerpos para diferentes marcadores. B) Imagen confocal para el marcador AroB. Se indica con una punta de flecha la presencia de células marcadas con la morfología y localización ventricular correspondientes a glías radiales. C) Imagen confocal para el marcador HuC. D) Imagen confocal para el marcador de proliferación BrdU, que se localizó principalmente en la zona ventricular. Se marca con una punta de flecha la localización de núcleos proliferativos en la cercanía de células AroB+. E) Imagen confocal del marcador nuclear DAPI. F) Imagen confocal superpuesta de los marcadores antes mencionados. Se observa la presencia de núcleos BrdU+ en la cercanía de la pared ventricular, donde se ubicaron las células AroB+. (TEL: lóbulos telencefálicos, LV: luz ventricular).

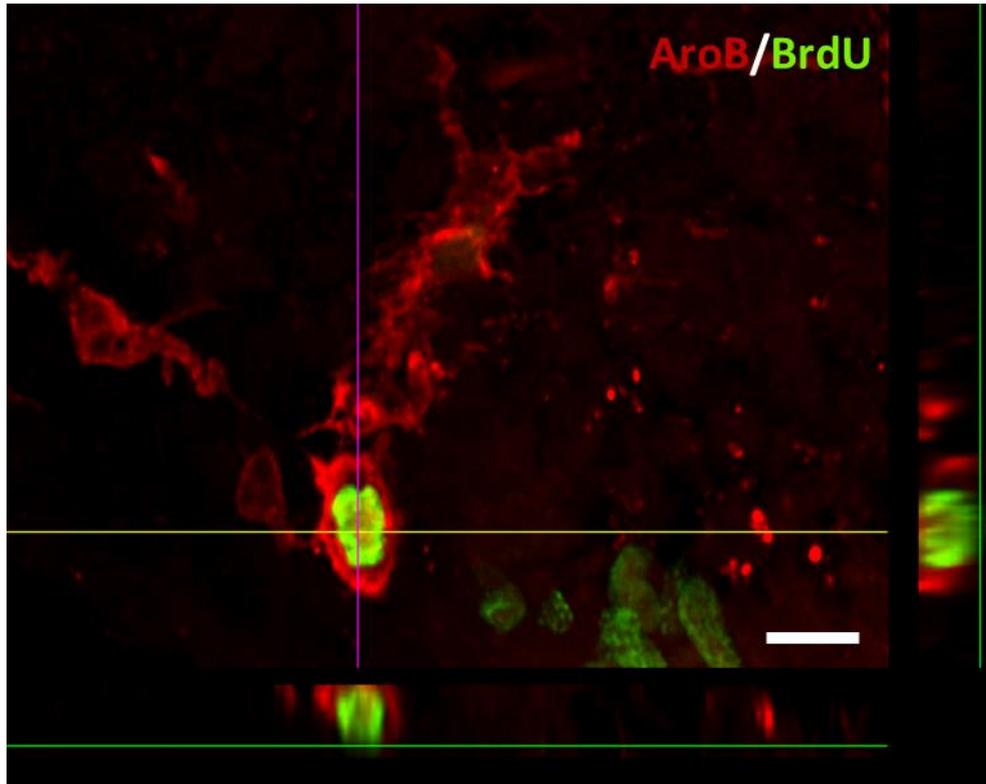


Fig. 21: Demostración de la colocalización de AroB (rojo) y BrdU (verde). Imagen obtenida mediante microscopía confocal de la zona ventral del bulbo olfatorio caudal. Se muestran en la parte inferior y derecha de la figura los planos ortogonales que demuestran la colocalización de ambas señales. Barra de calibración: 20µm

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Dimorfismos anatómicos y proliferativos

Algunos autores han postulado que los dimorfismos a nivel neural podrían explicarse, tanto por la acción de hormonas gonadales, como también por la influencia de factores genéticos, información sensorial y diferentes presiones selectivas (Dulac and Kimchi, 2007).

Con esto en mente, se propuso estudiar la existencia de dimorfismos anatómicos en los encéfalos de *Austrolebias charrua*. Se constató así una diferencia de los volúmenes promedio entre sexos, donde los machos presentaron mayores volúmenes promedio del encéfalo completo y de las tres áreas de interés que las hembras. Cabe destacar que el número comparado (dos animales de cada sexo) no fue suficiente para análisis estadísticos de los datos. Estos resultados se ajustan a lo observado por otros autores, por lo que se plantea que estos datos preliminares sean confirmados por el estudio de un mayor número de individuos, para así tener una mayor certeza sobre las diferencias observadas

En concordancia con los resultados de este trabajo, Kotrschal et al. (2012) observaron un importante dimorfismo sexual en el tamaño total de los encéfalos de los peces *Gasterosteus aculeatus*, siendo el cerebro de los machos más pesado que el de las hembras. Los tamaños de los encéfalos de *A. charrua* se analizaron con una aproximación similar, en donde el volumen obtenido del encéfalo completo se relacionó con el tamaño corporal de cada pez (utilizando en este caso la longitud total), obteniéndose así que los machos presentaron un mayor volumen del encéfalo en relación a su tamaño corporal. Se sugiere que en futuros trabajos se utilicen además otras medidas alternativas, como ser el peso corporal del animal, para mejores aproximaciones del tamaño corporal.

Kotrschal et al. (2012) plantean que la divergencia en el tamaño del encéfalo podría deberse a presiones de selección natural o sexual y, en particular, a las altas demandas cognitivas del cortejo y cuidado parental que deben enfrentar los machos de la especie *G. aculeatus*. Es así que una mayor masa cerebral podría ser **adaptativa** al permitir una mayor capacidad de procesamiento de la información y de esta forma, permitiría también sustentar los comportamientos complejos. Estos autores también atribuyen el menor tamaño del encéfalo de hembras a un posible compromiso energético entre el tejido nervioso y la fecundidad.

Los importantes dimorfismos sexuales en peces anuales, podrían apuntar hacia una posible similitud entre las presiones selectivas postuladas en el trabajo de Kotrschal et al. (2012). Los machos de la mayoría de las especies de estos peces presentan mayores tamaños corporales, coloración llamativa del cuerpo y una elaborada secuencia comportamental de cortejo y competencia con otros machos para el acceso a pareja y establecimiento de jerarquías. En contraste, las hembras son más pequeñas, crípticas y no presentarían un rol activo en el cortejo, sino que se limitarían a observar el cortejo de los machos y seguir las claves para el desove (Passos et al., 2015). Por consiguiente, las diferencias en el tamaño total del encéfalo, y de las regiones seleccionadas en este trabajo, entre machos y hembras de *A. charrua*, podrían deberse en parte a una diferencia en las presiones evolutivas sufridas por cada sexo. El mayor volumen del encéfalo de los machos de *A. charrua* podría facilitar el establecimiento de las complejas interacciones sociales enfrentadas en su ambiente natural. Es posible que estas presiones sean especialmente importantes en peces anuales, ya que, dado su ciclo de vida anual, la reproducción y generación de embriones resistentes a la desecación en una única temporada son cruciales para la supervivencia de la especie (Berois et al., 2012; Papa et al., 2015). Las hembras podrían haber generado compromisos para maximizar su reproducción, priorizándose la

energía destinada a su fecundidad y producción de ovocitos en detrimento de la otorgada al crecimiento y mantenimiento de su encéfalo, explicándose así también el menor volumen de su cerebro.

La neurogénesis adulta puede considerarse como un mecanismo adaptativo presente a lo largo de toda la vida, que permite la adaptación de los circuitos neurales de cada individuo de acuerdo al ambiente, siguiendo una tendencia en la que mayores experiencias requieren más capacidades cognitivas, que a su vez requieren mayor plasticidad y por lo tanto mayor neurogénesis adulta. La adición de nuevas neuronas en el cerebro se encuentra regulada por una compleja red de interacciones entre claves internas y externas que pueden cambiar las capacidades proliferativas (Revisado en Lledo et al., 2006; Peretto et al., 2014). Es así, que en este trabajo se ha hipotetizado que los dimorfismos neuroanatómicos podrían encontrarse sustentados, al menos en parte, por diferencias en las tasas proliferativas entre sexos.

Teniendo esto en cuenta, se estudiaron los volúmenes y las tasas proliferativas de tres importantes áreas relacionadas a los comportamientos sociales y reproductivos (Revisado en O'Connell and Hofmann, 2011): el bulbo olfatorio, lóbulos telencefálicos y región preóptica. En cuanto a las diferencias anatómicas, los volúmenes promedio de cada región seleccionada fueron mayores en machos que en hembras. Cuando estos fueron divididos por el volumen del encéfalo total, se observaron únicamente pequeñas diferencias, que fueron consideradas insignificantes. Estos resultados sugerirían que el volumen de estas áreas en relación al tamaño total del encéfalo es constante y no representa dimorfismo entre sexos. Esto se ajusta al estudio de Kotrschal et al. (2017), quienes reportaron que las áreas estudiadas bajo selección direccional no mostraron cambios en sus tamaños relativos al tamaño total del encéfalo en *Poecilia reticulata*, sugiriendo que escalaron de forma conjunta.

Al analizar la relación de los volúmenes de cada área en *A. charrua* con la longitud total, los machos presentaron mayores valores en relación a su tamaño corporal que las hembras para las tres regiones. Considerando los anteriores resultados, es posible que mayores tamaños absolutos de estas regiones hayan sido seleccionados por diferentes presiones selectivas de forma diferencial en cada sexo.

En peces teleósteos, algunos trabajos también han reportado mayores volúmenes del BO y TEL en machos, donde se ha planteado que las altas demandas cognitivas asociadas a la reproducción y selección sexual podrían ser determinantes de mayores volúmenes de estas estructuras (Kolm et al., 2009; Park and Bell, 2010). El telencéfalo de teleósteos ha sido asociado a muchas funciones importantes para el desarrollo de comportamientos sociales y reproductivos, desde la función olfativa y gustatoria, el aprendizaje espacial y memoria, hasta en la modulación en machos de la complejidad de los comportamientos de cortejo, de desove y agonísticos (Revisado en de Bruin, 1980; y Savage, 1980). Tanto en mamíferos como en peces cíclidos, se ha observado que el tamaño del telencéfalo se correlaciona positivamente con la complejidad del hábitat y de factores sociales (Shumway, 2008).

En consideración a esto, es posible que en el caso de *A. charrua*, los machos presenten también mayores demandas cognitivas en relación a su ambiente físico. La vegetación y fondo barroso de los charcos en los que habitan podrían constituir un hábitat complejo que requiera aprendizaje y memoria espacial. Además, el mayor tamaño del telencéfalo podría también encontrarse relacionado, con la posible importancia en machos de la modalidad olfativa, ya que el telencéfalo recibe conexiones del BO e integra esta información (Hara, 1986).

En vertebrados, y particularmente en los peces, la comunicación química, muchas veces a través de feromonas, ha sido reconocida como un mediador de muchas conductas sociales. Múltiples evidencias indican que cumple un rol crucial en la reproducción, desde la elección y reconocimiento de pareja y el

cortejo, hasta en la territorialidad, organización social y especiación (Revisado en Hara, 1986; Keller-Costa et al., 2015; Stacey, 2003). Si bien no forma parte de las regiones principales que integran el “cerebro social”, el BO cumple un importante rol en estos comportamientos, a través de sus proyecciones hacia diversas áreas que sí forman parte de esta red (O’Connell and Hofmann, 2011).

En el caso de los peces de la especie *P.reticulata*, las hembras presentaron BOs de mayor tamaño que los machos. Los autores explican estos resultados al plantear la posibilidad de que la olfacción presente un rol más prominente en la ecología de las hembras de esta especie y que la selección haya favorecido una mejor percepción olfatoria, y, por lo tanto, mayor tamaño del BO (Kotrschal et al., 2017).

Estudios en *Austrolebias reicherti* han demostrado la existencia de comunicación química en el comportamiento reproductivo de las hembras (Passos et al., 2013a). El análisis proliferativo realizado en esta tesina mostró tasas proliferativas (en ambos sexos) mayores en el BO que en el POA y hasta incluso dos veces más grandes que la observada en el TEL. Estos resultados resaltan el importante rol de la modalidad olfativa en los peces anuales y en particular en *A. charrua*. Las diferencias entre sexos, podrían apuntar hacia un rol más prominente de la olfacción en la ecología de los machos, por lo que las presiones evolutivas podrían haber moldeado y seleccionado en ellos un mayor tamaño del BO, que a su vez permita una capacidad de procesamiento de la información olfativa más elevada, posiblemente, aquella relacionada con la reproducción.

La actividad olfatoria puede regular los niveles de neurogénesis adulta, siendo las claves químicas relacionadas con el comportamiento sexual fuertes estímulos que pueden afectar este proceso. En roedores, múltiples estudios sugieren que la neurogénesis es importante para el despliegue de los comportamientos sociales, sexuales y la reproducción (Feierstein, 2012; Revisado en Lau and So, 2012). Asimismo, se ha observado una relación positiva entre la neurogénesis y la capacidad de discriminar olores en roedores (Bragado Alonso et al., 2019).

Claves olfativas particulares, como las feromonas, han sido también ligadas a la neurogénesis en áreas vinculadas a la reproducción en teleósteos. Chung-Davidson et al.(2008) encontraron diferencias neuroendócrinas, de expresión génica y de proliferación entre machos y hembras del pez *Carassius auratus*, sugiriendo que la comunicación química en estos peces sería sexualmente dimórfica. El tratamiento con feromonas femeninas generó una mayor neurogénesis en el diencéfalo en los machos tratados con respecto al control. Estos autores plantean, entonces, que un ambiente enriquecido en claves químicas podría promover la neurogénesis adulta. Se observó también que estas feromonas generaban en machos una mayor concentración de andrógenos en sangre. Es posible que estos mecanismos también se encuentren actuando en los machos de *A. charrua*. La respuesta de los machos de peces anuales a feromonas femeninas podría generar también un aumento de los andrógenos circulantes, que podrían servir como sustrato para la producción local de estrógenos por parte de la AroB, generando a su vez una mayor proliferación neural. Teniendo en cuenta el rol de los machos de estos peces en el cortejo, una mayor neurogénesis del BO, de las áreas de procesamiento (como el TEL) y de las áreas relacionadas con la regulación de estos comportamientos (TEL y POA) podrían haberse seleccionado a lo largo de la evolución.

Diferencias dimórficas en el BO han sido previamente descritas también en otros vertebrados, incluso en humanos. En un estudio realizado en el BO de humanos, se reportó un mayor volumen en hombres que en mujeres, pero además, se correlacionó positivamente la capacidad olfativa con el volumen de esta estructura (Buschhüter et al., 2008), sugiriendo una relación entre el volumen y su funcionalidad. Sin embargo, existen otros trabajos en los que las diferencias radican únicamente en la cantidad de glías y neuronas presentes, siendo las mujeres quienes presentaron el mayor número (Oliveira-Pinto et al., 2014). Es así, que, en el

modelo de estudio de los peces anuales, se propone para el futuro estudiar las diferencias dimórficas también en otros rasgos, como ser la densidad y cantidad celular de las diferentes áreas.

Por otra parte, existen evidencias de que el cerebro percibe el mundo externo mediante la integración intermodal de estímulos a través de vías centrífugas de inervación, que permiten relacionar las diferentes modalidades, como por ejemplo el nervio terminal (Banerjee et al., 2019).

En vertebrados, la GnRH se ha identificado como una hormona producida en el POA, que facilita la liberación de las gonadotropinas y, por lo tanto, de esteroides gonadales. Pero también se ha planteado la existencia de neuromodulación por neuronas GnRH extrahipotalámicas, como aquellas presentes en el complejo del nervio terminal (Banerjee et al., 2019). En *A. charrua*, se han descrito proyecciones del complejo del nervio terminal al BO, a la transición BO-TEL y al POA, donde se detectó además inmunorreactividad para GnRH (Rosillo et al., 2013). Posteriormente, Rosillo et al. (2016) plantean una relación entre la neurogénesis y la vía olfato-retinal del nervio terminal. Debido a los continuos desafíos ambientales y sociales a los que se encuentran expuestos en su corto ciclo de vida los peces anuales *Austrolebias sp.*, existiría una alta demanda de nuevas neuronas, especialmente en las regiones relacionadas a la olfacción (Fernández et al., 2011; Rosillo et al., 2016, 2013). Como se mencionaba anteriormente, es posible que dicha demanda sea mayor en machos, por lo que una mayor proliferación y adición de neuronas relacionadas a la olfacción y producción de GnRH permitiría el correcto desempeño de las funciones reproductivas.

El POA de los teleósteos es similar al POA de los mamíferos, tanto neuroquímica como funcionalmente. Esta área juega importantes roles, posiblemente altamente conservados en la evolución, en la regulación de los comportamientos sexuales y la agresión (Revisado en O'Connell and Hofmann, 2011). Por lo tanto, los tamaños mayores del TEL y el POA podrían estar relacionados con las presiones ejercidas por las interacciones sociales. En *Austrolebias*, en la competencia intrasexual de machos se establecen jerarquías estables a lo largo del tiempo. Los subordinados exhiben cambios físicos, pero también comportamentales, de sumisión. Se ha planteado incluso, que en las interacciones de dominancia a corto y largo plazo, las claves olfativas juegan importantes roles (Passos et al., 2015), presentando así, presiones selectivas diferenciales que puedan también determinar mayores tamaños del TEL, POA y BO de machos

Las tasas proliferativas del BO y TEL de machos de *A. charrua* han sido previamente investigadas por el equipo del laboratorio donde se desarrolló esta tesina. Fernández et al. reportaron valores notoriamente menores que las encontradas en la presente tesina: en el BO fueron de aproximadamente 600 núcleos/mm³, mientras que para los lóbulos telencefálicos, el valor fue extremadamente pequeño (Fernández et al., 2011). En esta tesina, se obtuvieron valores de proliferación promedio para machos en el BO de 11394 núcleos/mm³, mientras que los valores para el TEL fueron de 5732 núcleos/mm³. Estas diferencias podrían explicarse por múltiples factores. En primer lugar, la metodología utilizada para ambos trabajos fue diferente, en un caso se realizaron tratamientos de BrdU de 24h y en esta tesina fueron de siete días. Es posible que esta diferencia en la duración del tratamiento permitiera una detección de la proliferación mayor. Además, se utilizaron diferentes técnicas de revelado del BrdU que también podrían influenciar los resultados. Otro factor, posiblemente central, podría ser la edad de los individuos utilizados. Se ha demostrado que a mayores edades, la proliferación disminuye de forma pronunciada (Arias-Carrión et al., 2007). Por lo tanto, los individuos de este estudio, de una edad aproximada de cuatro o cinco meses, podrían tener una proliferación mayor debido a su menor edad, que los peces utilizados en el trabajo de Fernández et al. (de entre seis y ocho meses). Estas diferencias de edades, podrían constituir grandes cambios para estos peces, considerando la corta duración de su ciclo de vida.

Se destaca, además, que en la presente tesina se utilizaron cuatro cortes para realizar estimaciones de las tasas proliferativas, lo que permitió la obtención de resultados preliminares. En el futuro, se plantea que se continúe dicha línea de investigación siguiendo la metodología planteada en el trabajo de Fernández et al. (2011), donde se analizó la totalidad de la región seleccionada.

Los resultados observados en el nivel anatómico y proliferativo, sugerirían que una mayor proliferación en los machos podría actuar como un factor en el mantenimiento o establecimiento de dimorfismos anatómicos, que a su vez podrían sustentar las diferencias conductuales observadas en *A. charrua*.

A futuro se plantea, que se continúe esta línea de estudios en un mayor número de peces y que también se estudien con más detalle las regiones aquí seleccionadas, teniendo en cuenta sus diferentes núcleos. Además, se sugiere el estudio de la proliferación en relación a la cantidad total de células de cada estructura, para así poder estimar la fracción de células proliferativas de forma más precisa y en vistas de su posible funcionalidad.

Localización de los núcleos BrdU+ y glías radiales AroB+

Para determinar un posible rol de la glía radial que expresa AroB, se buscó estudiar su localización en el cerebro anterior de *A. charrua* en relación a los núcleos proliferativos. De esta forma, se observó que los núcleos positivos para el marcador de proliferación celular BrdU se encontraron en su gran mayoría en la zona ventricular o subventricular, con un pequeño número en el parénquima de las zonas seleccionadas. Debido a la extensión del tratamiento con BrdU, es posible que aquellos núcleos localizados en la zona subventricular o en el parénquima pertenezcan a células que se han producido en la zona ventricular y posteriormente migrado hacia su posición más alejada.

La distribución de los núcleos proliferativos se correspondió con lo reportado en la bibliografía, ajustándose a las zonas proliferativas descritas previamente para *Danio rerio* y *Austrolebias* (Fernández et al., 2011; Grandel et al., 2006; von Krogh et al., 2010).

En el estudio de Grandel et al., en pez cebra las células proliferativas se localizaron a lo largo de todo el BO. Las células ciclantes en las porciones más anteriores se encontraban más dispersas, pero se acumulaban dorsalmente, en la zona de transición con el TEL (Grandel et al., 2006). En el caso de *A. charrua*, con un tiempo mayor de tratamiento con BrdU, no se observó tan claramente una distribución más espaciada de los núcleos en las zonas más anteriores del BO, sino que las células BrdU+ se encontraron ampliamente concentradas en las zonas ventriculares y en la transición BO-TEL.

En el caso del TEL, estos investigadores observaron dos zonas proliferativas claramente diferenciables entre las regiones dorsales y ventrales. En la zona rostral, en las cercanías del BO, existió una gran proliferación en las zonas ventriculares ventrales, que disminuyó en dirección caudal, mientras que la proliferación dorsal se distribuyó a lo largo de la totalidad de los lóbulos telencefálicos. Debido a la naturaleza evertida del telencéfalo de teleosteos (Nieuwenhuys, 2009), esta zona proliferativa se encontró localizada a lo largo de la superficie dorsal. En la zona dorsal, los núcleos marcados se encontraron de forma más espaciada que en la zona ventral, concentrados mayormente en la zona lateral. En el caso de *A. charrua*, se observó un patrón muy similar: la mayor densidad de núcleos proliferativos se encontró a lo largo de la zona ventricular ventral, principalmente en la zona dorsal del telencéfalo ventral. En cambio, en el telencéfalo dorsal, los núcleos se encontraban con una mayor distancia entre ellos y en mayor cantidad sobre la superficie lateral y dorsal.

Los resultados aquí obtenidos también se ajustan a lo observado en el estudio de Torres-Pérez et al. (2017), en el que se analizaron las diferentes poblaciones proliferativas en el encéfalo de *A. charrua*. Estos autores caracterizaron tres poblaciones de células ciclantes: (1) las células ciclantes rápidas, predominantemente confinadas a las paredes ventriculares, (2) células migrantes y (3) células de ciclo lento y no migrantes, que podrían corresponder a células madre. Es posible que las células proliferativas detectadas en la presente tesina correspondan a estos tres tipos celulares. Muchas de las células marcadas se encontraron en los límites entre estructuras anatómicas, con la mayoría de las células de ciclo rápido localizadas en la transición BO-TEL. En el caso del TEL, Torres-Pérez et al. encontraron células de ciclo rápido a lo largo de toda la superficie ventricular. Estas células, y también las migratorias, se observaron sobre todo en el telencéfalo ventral. Es en estas zonas donde también se encontraron la mayoría de los núcleos BrdU+ del TEL en esta tesina. Con una aproximación similar, Grandel et al. detectaron también que las células proliferativas del telencéfalo ventral migraron de forma radial de la zona proliferativa ventricular, mientras que las células proliferativas de la zona del telencéfalo dorsal migraron también en menor medida (Grandel et al., 2006).

Al igual que lo observado en el trabajo de Pellegrini et al. (2007), las zonas con expresión de AroB en *A. charrua*, no coincidieron con las zonas de expresión de marcadores neuronales (HuC). Las células proliferativas se localizaron ampliamente en la zona ventricular donde existió una importante expresión de glías radiales AroB+. Al igual que para Tong et al. (2009), se detectó la expresión de este complejo enzimático principalmente en las zonas dorsales del BO, en la transición BO-TEL, a lo largo de la zona ventricular del TEL y en el TEL dorsal (en este último las GR AroB+ se encontraron de forma más dispersa), coincidiendo ampliamente y colocalizando con los núcleos proliferativos. En menor medida, las células BrdU+ se detectaron en el parénquima donde existía una fuerte presencia de expresión de marcadores neuronales. Esto podría apoyar la idea de que la proliferación ocurre en las zonas ventriculares donde se ubican las glías radiales progenitoras AroB+, y que, en la ventana temporal utilizada, existió migración de las células y una posible diferenciación hacia una estirpe neuronal, indicando la presencia de neurogénesis. En el futuro, se plantea la posibilidad de continuar la caracterización de la expresión de la enzima aromatasa B en el encéfalo de *Austrolebias charrua* mediante su análisis por técnicas moleculares y bioquímicas.

Numerosos estudios han caracterizado a las glías radiales como progenitores neurales y también como importantes reguladores y moduladores en los nichos neurogénicos (García-Verdugo et al., 2002; Pellegrini et al., 2016; Sullivan et al., 2007). Algunos autores, han demostrado, además, que las glías radiales que expresan AroB podrían actuar como progenitores neuronales en la vida adulta de teleósteos y permitir que estas nuevas células migren a lo largo de sus procesos radiales, actuando así en el recambio celular y en la plasticidad (Pellegrini et al., 2007). Creciente evidencia apunta hacia un rol de este complejo enzimático en el establecimiento de dimorfismos sexuales en el encéfalo de teleósteos, donde se ha reportado una mayor expresión de esta enzima en machos, postulándose así que la masculinización de su cerebro se vea mediada por esta enzima (Revisado en Diotel et al., 2010). El proceso de la neurogénesis incluye la proliferación, maduración y migración de nuevas neuronas que se integran posteriormente en los circuitos neurales, y tiene una relación muy estrecha con las dinámicas de supervivencia de estas células. Se ha postulado que mayores números de neuronas en machos, podrían ser una consecuencia de la acción preventiva de la testosterona, y de sus derivados aromatizados, en la muerte celular (Pellegrini et al., 2016; Revisado Segovia et al., 1999).

Potencialmente entonces, en peces anuales, podría existir un efecto clave de los andrógenos (aromatizados por la AroB) que generen una mayor proliferación en machos, que permita a su vez sustentar mayores tamaños de las estructuras encefálicas estudiadas, aportando así una mayor cantidad de células, y posiblemente de neuronas, que en hembras.

CONCLUSIONES

1. Los peces anuales *A. charrua* de entre cuatro y cinco meses de edad presentan dimorfismos sexuales anatómicos en el volumen total de su encéfalo y en las tres regiones seleccionadas para el estudio: los machos presentaron mayores volúmenes que las hembras.
2. Asimismo, se detectaron diferencias en la proliferación celular en cada una de estas regiones y por primera vez se estimaron las tasas proliferativas de *A. charrua* de entre cuatro y cinco meses de edad en una ventana temporal de siete días. Esto permitió detectar que los machos presentaron tasas proliferativas significativamente mayores que en las hembras en las tres áreas.
3. Para ambos sexos la zona de mayor proliferación fue el bulbo olfatorio, con tasas proliferativas más altas que en la región preóptica y el doble que en los lóbulos telencefálicos.
4. En este trabajo, se ha observado que las zonas de expresión de aromatasa B en glías radiales (detectadas tanto mediante inmunohistoquímica, como por NADPH diaforasa) coincide con la zona periventricular donde se localizó la mayoría de los núcleos proliferativos y donde se ha descrito previamente la proliferación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, E.I., Zehr, J.L., Schulz, K.M., Lorenz, B.H., DonCarlos, L.L., Sisk, C.L., 2008. Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat. Neurosci.* 11, 995–997. <https://doi.org/10.1038/nn.2178>
- Altman, J., 1962. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science* 135, 1127–1128. <https://doi.org/10.1126/science.135.3509.1127>
- Ampatzis, K., Makantasi, P., Dermon, C.R., 2012. Cell proliferation pattern in adult zebrafish forebrain is sexually dimorphic. *Neuroscience* 226, 367–381. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.022>
- Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., Drucker-Colín, R., 2007. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol* 44, 541–550.
- Banerjee, S., Scheirer, W.J., Li, L., 2019. An Extreme Value Theory Model of Cross-Modal Sensory Information Integration in Modulation of Vertebrate Visual System Functions. *Front. Comput. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fncom.2019.00003>
- Berois, N., Arezo, M., Papa, N., Clivio, G., 2012. Annual fish: developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 595–602. <https://doi.org/10.1002/wdev.39>
- Berois, N., Arezo, M., Sa, R.O. de, 2014. The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell Dev. Biol.* 03. <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000136>
- Bragado Alonso, S., Reinert, J.K., Marichal, N., Massalini, S., Berninger, B., Kuner, T., Calegari, F., 2019. An increase in neural stem cells and olfactory bulb adult neurogenesis improves discrimination of highly similar odorants. *EMBO J.* 38, e98791. <https://doi.org/10.15252/embj.201798791>
- Buschhüter, D., Smitka, M., Puschmann, S., Gerber, J.C., Witt, M., Abolmaali, N.D., Hummel, T., 2008. Correlation between olfactory bulb volume and olfactory function. *NeuroImage* 42, 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.004>
- Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C., Strambi, A., 2002. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 132, 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00525-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00525-5)
- Chung-Davidson, Y.-W., Rees, C.B., Bryan, M.B., Li, W., 2008. Neurogenic and Neuroendocrine Effects of Goldfish Pheromones. *J. Neurosci.* 28, 14492–14499. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3589-08.2008>
- Cooke, B., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S., Breedlove, S.M., 1998. Sexual Differentiation of the Vertebrate Brain: Principles and Mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 19, 323–362. <https://doi.org/10.1006/frne.1998.0171>
- D'angelo, L., 2013. Brain Atlas of an Emerging Teleostean Model: *Nothobranchius furzeri*. *Anat. Rec.* 296, 681–691. <https://doi.org/10.1002/ar.22668>
- de Bruin, J.P.C., 1980. Telencephalon and Behavior in Teleost Fish, in: Ebbesson, S.O.E. (Ed.), *Comparative Neurology of the Telencephalon*. Springer US, Boston, MA, pp. 175–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2988-6_7
- Diotel, N., Page, Y.L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 172–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003>
- Dulac, C., Kimchi, T., 2007. Neural mechanisms underlying sex-specific behaviors in vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol., Motor systems / Neurobiology of behaviour* 17, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.009>
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Feierstein, C.E., 2012. Linking adult olfactory neurogenesis to social behavior. *Front. Neurosci.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00173>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.063>
- Forlano, P.M., Schlinger, B.A., Bass, A.H., 2006. Brain aromatase: New lessons from non-mammalian model systems. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 247–274. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.05.002>
- García, D., Loureiro, M., Tassino, B., 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyol.* 6, 243–248. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200012>
- García-Segura, L.M., 2008. Aromatase in the Brain: Not Just for Reproduction Anymore. *J. Neuroendocrinol.* 20, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01713.x>
- García-Verdugo, J.M., Ferrón, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., Font, E., 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull., The impact of stem cell research on neural transplantation* 57, 765–775. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00769-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00769-9)
- 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, 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040>
- Gratzner, H.G., 1982. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science* 218, 474–475.
- Grober, M.S., Jackson, I.M.D., Bass, A.H., 1991. Gonadal steroids affect LHRH preoptic cell number in a sex/role changing fish. *J. Neurobiol.* 22, 734–741. <https://doi.org/10.1002/neu.480220708>
- Gross, C.G., 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 67–73. <https://doi.org/10.1038/35036235>
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontol. Electron.* 4, 10.
- Hara, T.J., 1986. Role of Olfaction in Fish Behaviour, in: Pitcher, T.J. (Ed.), *The Behaviour of Teleost Fishes*. Springer US, Boston, MA, pp. 152–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8261-4_6
- Harding, C.F., 2004. Learning from Bird Brains: How the Study of Songbird Brains Revolutionized Neuroscience. *Lab Anim.* 33, 28–33. <https://doi.org/10.1038/labani0504-28>
- Jacobs, L.F., 1996. Sexual selection and the brain. *Trends Ecol. Evol.* 11, 82–86. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81048-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81048-2)
- Kaplan, M.S., Hinds, J.W., 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092–1094. <https://doi.org/10.1126/science.887941>
- Keller-Costa, T., Canário, A.V.M., Hubbard, P.C., 2015. Chemical communication in cichlids: A mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol., Expanding the knowledge base of reproductive success: from genes to the environment* 221, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.001>
- Kolm, N., Gonzalez-Voyer, A., Brelin, D., Winberg, S., 2009. Evidence for small scale variation in the vertebrate brain: mating strategy and sex affect brain size and structure in wild brown trout (*Salmo trutta*). *J. Evol. Biol.* 22, 2524–2531. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01875.x>
- Kotrschal, A., Räsänen, K., Kristjánsson, B.K., Senn, M., Kolm, N., 2012. Extreme Sexual Brain Size Dimorphism in Sticklebacks: A Consequence of the Cognitive Challenges of Sex and Parenting? *PLOS ONE* 7, e30055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030055>
- Kotrschal, A., Zeng, H.-L., Bijl, W. van der, Öhman-Mägi, C., Kotrschal, K., Pelckmans, K., Kolm, N., 2017. Evolution of brain region volumes during artificial selection for relative brain size. *Evolution* 71, 2942–2951. <https://doi.org/10.1111/evo.13373>
- Lau, W.-M. (Benson), So, K.-F., 2012. Neurogenesis and Reproduction, in: Hayat, M.A. (Ed.), *Tumors of the Central Nervous System, Volume 9: Lymphoma, Supratentorial Tumors, Glioneuronal Tumors, Gangliogliomas, Neuroblastoma in Adults, Astrocytomas, Ependymomas, Hemangiomas, and Craniopharyngiomas, Tumors of the Central Nervous System*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 281–288. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5488-1_31

- Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Rev.* 22, 1–26.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(96\)00002-1](https://doi.org/10.1016/0165-0173(96)00002-1)
- Lindsey, B.W., Tropepe, V., 2006. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80, 281–307.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.007>
- Lledo, P.-M., Alonso, M., Grubb, M.S., 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179–193. <https://doi.org/10.1038/nrn1867>
- Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., Arim, M., 2015. Austrolebias in space: scaling from ponds to biogeographical regions, in: Berois, N., Garcia, G., Sa, R.O. de (Eds.), *Annual Fishes : Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, pp. 111–132.
<https://doi.org/10.1201/b19016>
- Loureiro, M., Sa, R.O. de, 2015. Diversity of Aplocheiloidei, in: Berois, N., Garcia, G., Sa, R.O. de (Eds.), *Annual Fishes : Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, pp. 3–31.
<https://doi.org/10.1201/b19016>
- Melo, A.C., Ramsdell, J.S., 2001. Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. *Environ. Health Perspect.* 109, 257–264.
<https://doi.org/10.1289/ehp.01109257>
- Mouriec, K., Pellegrini, E., Anglade, I., Menuet, A., Adrio, F., Thieulant, M.L., Pakdel, F., Kah, O., 2008. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Res. Bull., Evolution and the Generation of Novelty in the Nervous System Proceedings of the 5th European Conference on Comparative Neurobiology: April 25-28, 2007, Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris 75*, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.030>
- Nieuwenhuys, R., 2009. The Forebrain of Actinopterygians Revisited. *Brain. Behav. Evol.* 73, 229–252.
<https://doi.org/10.1159/000225622>
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R., 2002. Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *J. Neurosci.* 22, 3161–3173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03161.2002>
- O’Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011. The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.* 519, 3599–3639.
<https://doi.org/10.1002/cne.22735>
- Ohno, S., 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer Science & Business Media.
- Oliveira-Pinto, A.V., Santos, R.M., Coutinho, R.A., Oliveira, L.M., Santos, G.B., Alho, A.T.L., Leite, R.E.P., Farfel, J.M., Suemoto, C.K., Grinberg, L.T., Pasqualucci, C.A., Jacob-Filho, W., Lent, R., 2014. Sexual Dimorphism in the Human Olfactory Bulb: Females Have More Neurons and Glial Cells than Males. *PLOS ONE* 9, e111733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111733>
- Papa, N.G., Clivio, G.A., Montagne, J., 2015. Husbandry, Reproduction, and Embryo Culture of Annual Fishes under Laboratory Conditions, in: Berois, N., Garcia, G., Sa, R.O. de (Eds.), *Annual Fishes : Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, pp. 99–107. <https://doi.org/10.1201/b19016>
- Park, P.J., Bell, M.A., 2010. Variation of telencephalon morphology of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in relation to inferred ecology: Threespine stickleback telencephalon evolution. *J. Evol. Biol.* 23, 1261–1277. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.01987.x>
- Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G.G., González, A., 2013a. Female Annual Killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) Attend to Male Chemical Cues. *Ethology* 119, 891–897.
<https://doi.org/10.1111/eth.12129>
- Passos, C., Tassinio, B., Loureiro, M., Rosenthal, G.G., 2013b. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behav. Processes* 96, 20–26.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.01.008>
- Passos, C., Tassinio, B., Rosenthal, G.G., Reichard, M., 2015. Reproductive Behaviour and Sexual Selection in Annual Fishes, in: Berois, N., Garcia, G., Sa, R.O. de (Eds.), *Annual Fishes : Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, pp. 207–229. <https://doi.org/10.1201/b19016>

- Pellegrini, E., Diotel, N., Vaillant-Capitaine, C., Pérez Maria, R., Gueguen, M.-M., Nasri, A., Cano Nicolau, J., Kah, O., 2016. Steroid modulation of neurogenesis: Focus on radial glial cells in zebrafish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., SI: Steroids & Nervous System* 160, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.011>
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol., 5th International Symposium on Fish Endocrinology* 142, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.003>
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Page, Y.L., 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, 150–167. <https://doi.org/10.1002/cne.21222>
- Peretto, P., Giachino, C., Panzica, G., Fasolo, A., 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res.* 306, 385–389. <https://doi.org/10.1007/s00441-001-0471-1>
- Peretto, P., Schellino, R., De Marchis, S., Fasolo, A., 2014. The Interplay between Reproductive Social Stimuli and Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Neural Plast.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/497657>
- Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., Fernández, A.S., 2010. Cell Heterogeneity of the telencephalic ventricular zone: A neurogenic brain region of *Austrolebias charrua*. *Acta Microsc.* 19, 152–159.
- Rosillo, J.C., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2013. Olfacto-retinalis pathway in *Austrolebias charrua* fishes: A neuronal tracer study. *Neuroscience* 253, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.047>
- Rosillo, J.C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2016. Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: Cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience* 336, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.045>
- Savage, G.E., 1980. The Fish Telencephalon and Its Relation to Learning, in: Ebbesson, S.O.E. (Ed.), *Comparative Neurology of the Telencephalon*. Springer US, Boston, MA, pp. 129–174. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2988-6_6
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Segovia, S., Guillamón, A., del Cerro, M.C.R., Ortega, E., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Beyer, C., 1999. The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav. Brain Res.* 105, 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00083-2)
- Shumway, C.A., 2008. Habitat Complexity, Brain, and Behavior. *Brain. Behav. Evol.* 72, 123–134. <https://doi.org/10.1159/000151472>
- Stacey, N., 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 229–235. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030540.99732.2c>
- 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. <https://doi.org/10.1002/cne.21187>
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., Kah, O., Chung, B., 2009. A *cyp19a1b-gfp* (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *genesis* 47, 67–73. <https://doi.org/10.1002/dvg.20459>
- Torres-Pérez, M., Rosillo, J.C., Berrosteguieta, I., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2017. Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain Res.* 1673, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.003>
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J., Rustioni, A., 1992. NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.* 321, 209–222. <https://doi.org/10.1002/cne.903210204>

- von Krogh, K., Sørensen, C., Nilsson, G.E., Øverli, Ø., 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol. Behav.* 101, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.003>
- Wourms, J.P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182, 389–414. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820310>
- Wulliman, M.F., Rupp, B., Reichert, H., 2012. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*. Birkhäuser.
- Zupanc, G.K.H., 2001a. A Comparative Approach towards the Understanding of Adult Neurogenesis. *Brain. Behav. Evol.* 58, 246–249. <https://doi.org/10.1159/000057568>
- Zupanc, G.K.H., 2001b. Adult Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Central Nervous System of Teleost Fish. *Brain. Behav. Evol.* 58, 250–275. <https://doi.org/10.1159/000057569>
- Zupanc, G.K.H., Sîrbulescu, R.F., 2011. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Eur. J. Neurosci.* 34, 917–929. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07854.x>