



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología. Sub-área Ciencias Fisiológicas

Título:

Maduración sexual de *Alitta succinea* Leuckart 1847 (Annelida: Nereididae) en la costa uruguaya. Localización de moléculas símil-GnRH en el cerebro de individuos maduros.

Estudiante: Lic. Jimena Montagne

Orientadores: Dr. Gustavo M. Somoza y Dra. Nibia Berois

Tribunal: Dra. Estela Castillo (presidente), Dr. Pablo Muniz (vocal) y Dra. Daniella Agrati (vocal).

Fecha: 22 de marzo de 2018



CONICET



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

I I B - I N T E C H



Expreso mi agradecimiento a los laboratorios donde realizamos el trabajo:

A la Sección Biología Celular y a la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias.

Al Centro Universitario Regional Este, Sede Maldonado.

Al Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas IIB-INTECH.

Para este trabajo recibimos financiación:

Del PEDECIBA: alícuotas de estudiante y para una pasantía de corta duración.

De la ANII: Beca de posgrado.

De la Comisión Sectorial de Investigación Científica: para una pasantía en el exterior.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| I) Resumen | 1 |
| II) Introducción | 1 |
| II) I. Filo Annelida | 2 |
| II) I. i. Reproducción en la familia Nereididae | 4 |
| II) I. ii. Gametogénesis en la familia Nereididae | 4 |
| II) II. Regulación de la reproducción | 6 |
| II) II. i. Regulación de la reproducción en vertebrados | 6 |
| II) II. ii. Regulación de la reproducción en invertebrados | 7 |
| II) II. iii. GnRH en invertebrados | 8 |
| II) II. iv. Influencia del ambiente en la reproducción de los invertebrados marinos | 9 |
| III) Hipótesis | 12 |
| IV) Objetivo General | 12 |
| V) Objetivos específicos | 12 |
| VI) Materiales y métodos | 13 |
| VI) I. Metodología de estudio del proceso de maduración sexual | 13 |
| VI) I. i. Metodología de muestreo | 13 |
| VI) I. ii. Análisis morfológico | 15 |
| VI) I. iii. Análisis histológico de las células germinales | 20 |
| VI) II. Inmunohistoquímica para detección de inmuno-reactividad a GnRH en cerebro | 22 |
| VII) Resultados y discusión | 24 |
| VII) I. Análisis del tamaño de <i>A. succinea</i> | 24 |
| VII) II. Evolución de la maduración sexual en el período de análisis | 25 |
| VII) II. i. Epitoquia | 25 |

| | |
|--|-----------|
| VII) II. ii. Análisis histológico de la gametogénesis _____ | 29 |
| VII) II. iii. Ultra-estructura de los gametos maduros _____ | 40 |
| VII) III. Inmuno-reactividad para GnRH en el cerebro _____ | 44 |
| VII) III. i. Región rostral _____ | 44 |
| VII) III. ii. Región media: neuroendócrina _____ | 46 |
| VII) III. iii. Región caudal: sensorial _____ | 66 |
| VII) III. iv. Consideraciones generales sobre la ir-GnRH _____ | 51 |
| VIII) Consideraciones finales _____ | 53 |
| IX) Bibliografía _____ | 55 |

Tablas

| | |
|----------|----|
| Tabla 1. | 9 |
| Tabla 2. | 28 |
| Tabla 3. | 38 |

Figuras

| | |
|------------|----|
| Figura 1. | 3 |
| Figura 2. | 15 |
| Figura 3. | 17 |
| Figura 4. | 19 |
| Figura 5. | 25 |
| Figura 6. | 27 |
| Figura 7. | 29 |
| Figura 8. | 31 |
| Figura 9. | 33 |
| Figura 10. | 35 |
| Figura 11. | 37 |
| Figura 12. | 39 |
| Figura 13. | 41 |
| Figura 14. | 43 |
| Figura 15. | 45 |
| Figura 16. | 47 |
| Figura 17. | 50 |
| Figura 18. | 52 |

I) Resumen

En los anélidos es posible observar diversas estrategias reproductivas. Sin embargo, en la familia Nereididae las especies comparten características generales del proceso de gametogénesis, así como el proceso de epitoquia asociado a la maduración sexual. Las especies son dioicas y la gametogénesis tiene lugar directamente en la cavidad celómica. Los individuos inmaduros se denominan átocos y tienen hábitos bentónicos. Pero hacia el final del ciclo de vida ocurren cambios en la morfología de muchas estructuras somáticas (epitoquia) y los individuos modificados (epítocos) desarrollan el comportamiento reproductivo en el ambiente pelágico. La maduración sexual y el desove pueden presentar patrones estacionales y ser influenciados por las condiciones ambientales. En este trabajo realizamos un análisis de la maduración sexual de la especie *Alitta succinea* (Leuckart 1847) a partir de muestras del ambiente bentónico en la costa uruguaya. El análisis morfológico de los individuos permitió observar un aumento del tamaño medio en el período del 24 de junio al 28 de octubre de 2015, con la identificación de epítocos sólo a partir del mes de agosto. El análisis realizado de la proporción de epítocos nos permite sugerir una asociación del proceso de epitoquia con la variación del fotoperíodo. Por otro lado, no se encontró una relación con las variables temperatura o conductividad del agua. El análisis histológico y ultra-estructural de muestras de la cavidad celómica permitió identificar las células germinales y algunas características de su desarrollo, las cuales fueron utilizadas para establecer estadios del proceso de maduración sexual y observar su relación con el tamaño corporal. El cerebro (ganglio supraesofágico) es considerado el principal órgano endócrino que influye en los procesos de gametogénesis y epitoquia. Sin embargo, sólo se ha identificado una de las moléculas que participan de esta regulación, un metilfarnesoato que actúa como hormona juvenil. Para aportar al conocimiento del sistema neuroendócrino de los nereididos evaluamos la inmuno-reactividad para moléculas similares a GnRH (ir-GnRH) en el cerebro de *A. succinea*. GnRH es un péptido con variantes en vertebrados e invertebrados, con funciones bien establecidas en los vertebrados y que ha sido vinculado con la regulación de la reproducción en algunos invertebrados. El análisis realizado de la ir-GnRH en el cerebro de epítocos, apoya la hipótesis de expresión de moléculas similares a GnRH en el cerebro de los nereididos y sugiere que podrían tener funciones en la reproducción. Se realizó también un análisis preliminar de la ir-GnRH en el estadio átoco.

II) Introducción

II) I. Filo Annelida

El filo Annelida (Lamarck 1809) comprende organismos celomados con segmentos que se repiten en el eje antero-posterior del cuerpo. El cuerpo de un anélido se divide en un prostomio, un tronco segmentado y un pigidio (Figura 1). El prostomio contiene el cerebro (ganglio supraesofágico) con la excepción de los clitelados, en los cuales se ubica en segmentos siguientes. El tronco puede presentar apéndices laterales pares los cuales se denominan parapodios (Westheide 1997).

De acuerdo con análisis filogenéticos recientes los anélidos se han dividido en dos grandes grupos monofiléticos denominados Errantia y Sedentaria, aunque se mantienen los nombres utilizados históricamente para clasificar los poliquetos (Struck y col. 2011). En este nuevo esquema, Errantia incluye a los órdenes Phyllodocida, Eunicida, Amphinomida y Orbiniidae. Se trata de organismos con estrategias de vida móviles y activas, en los cuales se encuentra muy desarrollada la percepción sensorial. Sedentaria en cambio, incluye organismos más sésiles con una importante reducción de los apéndices de la cabeza y del cuerpo e incluye a los órdenes Clitellata y Echiura, así como la mayoría de Scolecida y Canipalpata (Struck y col. 2011).

En los anélidos es posible observar diversas estrategias reproductivas, aunque la mayoría de las especies son dioicas con fecundación externa y desarrollo indirecto, con una fase larval pelágica (Clark 1961). Así, muchas especies liberan sus ovocitos al agua, medio en el cual ocurre la fecundación y el desarrollo temprano, mientras que otras presentan estrategias de protección de los embriones (Franke 1999; Glasby 1986). Sin embargo, los clitelados presentan sistemas reproductivos muy diferenciados; son hermafroditas y se aparean intercambiando esperma. El clitelo es un órgano glandular que participa en la formación de una cápsula para el desarrollo de los cigotos (Brusca y Brusca 2003).

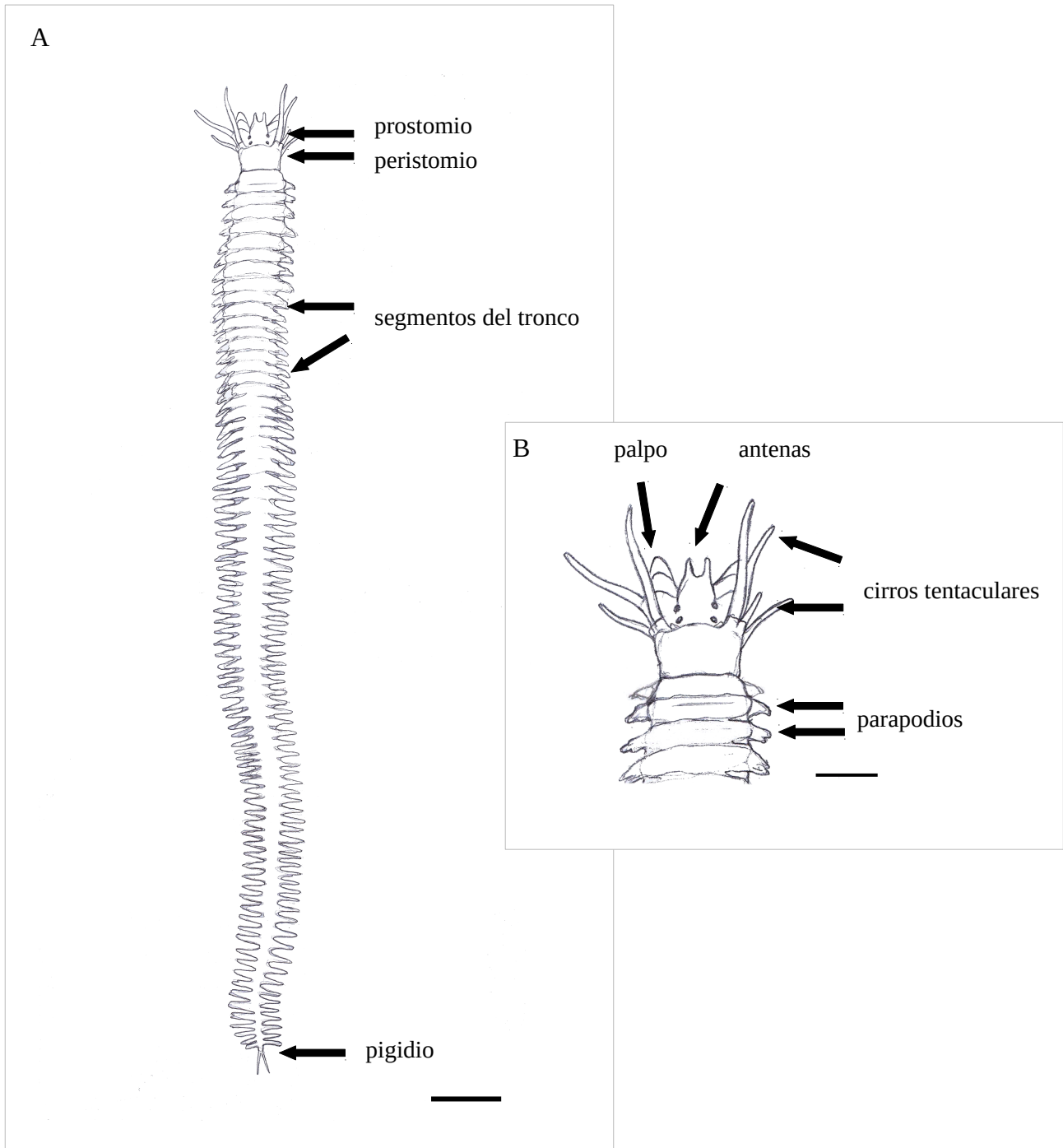


Figura 1. Características morfológicas generales de los poliquetos nereididos. Esquema basado en la observación de un átoco de *A. succinea*. A: El prostomio y el peristomio en conjunto forman la cabeza, los segmentos del tronco presentan parapodios y el pigidio, en el extremo caudal, presenta dos cirros. B: El prostomio de los nereididos es angosto en la parte anterior, con un par de antenas mediales y un par de palpos ventrales (de mayor tamaño), mientras que la región posterior es más ancha y contiene los ojos (dos pares) y los órganos nucales (un par). En la zona lateral del peristomio se encuentra el nacimiento de los cirros tentaculares (cuatro pares). La barra de escala corresponde a 2 mm para A y a 1 mm para B.

II) I. i. Reproducción en la familia Nereididae

Dentro del orden Phyllodocida (Dales 1962) la familia Nereididae comprende especies que comparten características morfológicas distintivas (Fauchald y Rouse 1997), así como el fenómeno de epitoquia que se encuentra asociado a la maduración sexual (Clark 1961).

El prostomio suele presentar una forma de T invertida en vista dorsal. En su extremo anterior se encuentran un par de antenas mediales y un par de palpos ventrales. En su región posterior, más ancha, se ubican los ojos y los órganos nucales. El siguiente segmento es el peristomio el cual presenta cuatro pares de cirros tentaculares. Todos los segmentos del tronco presentan parapodios con dos ramas bien desarrolladas y, en el extremo caudal del cuerpo, el pigidio presenta dos cirros (Figura 1, Fauchald y Rouse 1997).

Los individuos inmaduros, con hábitos bentónicos, son denominados átochos. El estadio átoco constituye un período extenso en el ciclo de vida de los nereididos e incluye un período de crecimiento somático (juvenil) seguido de una etapa de gametogénesis (Last y Olive 1999; Fischer y col. 2010). El proceso de epitoquia, al final del ciclo de vida, da como resultado individuos sexualmente maduros que se denominan építochos o heteronereis y desarrollan un comportamiento de nado en la superficie del agua (Lillie y Just 1913). Durante la epitoquia ocurren modificaciones estructurales que se han relacionado con el comportamiento reproductivo: los parapodios se modifican con el desarrollo de lamelas foliáceas, la elongación de cirros y el reemplazo de quetas, el sistema vascular se desarrolla en relación a las superficies respiratorias y los ojos aumentan de tamaño (Clark 1961). Todas estas características morfológicas diferencian claramente los individuos építochos de los átochos y serán consideradas más adelante para el caso particular de la especie en estudio.

II) I. ii. Gametogénesis en la familia Nereididae

Este grupo tiene una característica particular, la gametogénesis tiene lugar directamente en la cavidad celómica por lo que se considera como una gónada dispersa. Los grupos de gametogonias conforman un sincicio en el cual cada una de las células se encuentra conectada a las otras por puentes citoplasmáticos denominados fusosomas (Bertout 1983; Olive 1983a; Olive 1983b). Más recientemente se ha visto que los

juveniles tienen un primordio gonadal ubicado en segmentos anteriores del tronco. Una vez que alcanzan cierto tamaño (más de 20 segmentos en *Platynereis dumerilii*) las gametogonias se localizan a lo largo del cuerpo, tanto en forma individual como en grupos (Rebscher y col. 2007).

A nivel histológico durante la ovogénesis, es posible observar, agrupaciones compuestas por ovogonias u ovocitos tempranos a las cuales se asocian células somáticas especiales denominadas células en vaina. Luego, los ovocitos se separan y pierden la asociación con ese tipo de células. Los ovocitos tempranos se desarrollan asincrónicamente pero durante la vitelogénesis, éstos crecen adquiriendo un tamaño uniforme a medida que se acercan a su tamaño final (Fischer 1974). Los ovocitos vitelogénicos pueden entrar en contacto con elocitos, células celómicas que producen y secretan vitelogeninas en las hembras (Fischer y Hoeger 1993; García-Alonso y col. 2006). Los ovocitos maduros se encuentran detenidos en profase de la primera división meiótica y las divisiones del núcleo se completan sólo después del desove y la fecundación (Lillie 1911).

En el proceso de espermatogénesis, las células germinales se encuentran conectadas por puentes citoplasmáticos (Roosen-Runge 1977). Las espermatogonias o espermatocitos tempranos conforman una estructura con aspecto de mora la cual ha sido denominada mórula, cisto o roseta. Las células presentan fusosomas y procesos citoplasmáticos delgados, característicos de esta etapa (Bertout 1983; Olive 1983b). Al comenzar la meiosis, en especial al final de la profase I, las mórulas se disgregan, produciéndose la separación de los espermatocitos, que experimentan las divisiones meióticas dando como resultado espermátidas las cuales pueden encontrarse agrupadas de a cuatro (Bertout 1983; Olive 1983b). Por último, en los animales maduros, los espermatozoides se encuentran libres y en forma individual en la cavidad celómica (Fallon y Austin 1967).

II) II. Regulación de la reproducción

II) II. i. Regulación de la reproducción en vertebrados

El sistema neuroendócrino es el regulador maestro de los procesos fisiológicos y comportamentales en los vertebrados. Dicho sistema involucra a neuronas, glándulas y tejidos que funcionan de forma integrada regulando estados fisiológicos o comportamentales (Levine 2012). La reproducción en los vertebrados está regulada por el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. Un elemento clave del sistema es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). GnRH es un neuropéptido, identificado originalmente en el hipotálamo, que actúa sobre la hipófisis estimulando la liberación de las hormonas luteinizante y folículo-estimulante (Schally y col. 1971; Burgus y col. 1972). Dichas hormonas, inducen la producción de esteroides y la gametogénesis en las gónadas, y a su vez, las hormonas gonadales actúan como señales de retroalimentación sobre el cerebro y la hipófisis (Clarke y col. 2012).

La secuencia aminoacídica del GnRH originalmente descrito se encuentra conservada en los mamíferos y hoy se conoce como mGnRH (Matsuo y col. 1971; Burgus y col. 1972). Luego del descubrimiento de la secuencia de GnRH por los grupos de los Dres. Guillemin y Schally, se identificaron diferentes variantes en los vertebrados, con características comunes: su longitud (diez aminoácidos), residuos idénticos en cuatro posiciones, un piroglutamato en el extremo N-terminal y una glicina amida en el carboxilo C-terminal (Guilgur y col. 2006; Kah y col. 2007; Okubo y Nagahama 2008). Todas las variantes de vertebrados son codificadas como parte de un polipéptido precursor llamado preproGnRH que consiste en un péptido señal, el GnRH propiamente dicho, un sitio de procesamiento enzimático y un péptido asociado denominado GAP (Seeburg y Adelman 1984; Pérez-Sirkin y col. 2017).

Se ha descrito últimamente que, al menos en aves y mamíferos, las neuronas GnRHérgicas son reguladas por otro péptido al que se denominó kisspeptina (Clarke y col. 2012). Kisspeptina se ha descrito también en otros vertebrados y, aunque está relacionada con la reproducción, su relación con las neuronas productoras de GnRH no es tan clara (Kanda y Oka 2013; Tovar-Bohórquez y col. 2017).

Por otro lado, es un hecho bien conocido que muchas especies de mamíferos presentan variaciones estacionales de sus funciones reproductivas que están asociadas con cambios en la secreción de GnRH (Barrel y col. 1992). Se ha demostrado además que factores ambientales claves como el fotoperíodo o la temperatura se traducen en señales endógenas para inducir cambios en el estado reproductivo de los vertebrados (Kawamoto y col. 2000; Kriegsfeld y col. 2000; Miranda y col. 2009; Clarke y Caraty 2013; Ikegami y Yoshimura 2016). Además, las variantes de GnRH estimulan el comportamiento reproductivo en distintos vertebrados (Moss y McCann 1973; Volkoff y Peter 1999; Goodson y col. 2005; Barnett y col. 2006; Argiolas y Melis 2013).

II) II. ii. Regulación de la reproducción en invertebrados

Los sistemas neuroendócrinos han aparecido tempranamente en el proceso evolutivo de los animales con simetría bilateral y se ha demostrado la presencia de elementos estructurales característicos de estos sistemas en muchos invertebrados (Salzet 2001; Hartenstein 2006). Un ejemplo clásico es la regulación de la muda en los insectos (Ewer y col. 1997). Por otro lado, la hormona juvenil coordina una variedad de funciones relacionadas con la maduración sexual y el desarrollo de comportamientos reproductivos, con funciones importantes en la ovogénesis (Wyatt y Davey 1996). Es un sesquiterpenoide secretado por glándulas neuroendócrinas denominadas *Corpora allata* (Riddiford 1994) y reguladas por el sistema nervioso central (Li y col. 2005).

En los moluscos, también se han descrito glándulas endócrinas que controlan la maduración gonadal y son controladas por el sistema nervioso central (Wells y Wells 1959; Hartenstein 2006). En los cefalópodos, por ejemplo, son las denominadas glándulas ópticas y se encuentran inervadas por fibras conteniendo péptidos tipo FMRFamida y también GnRH (Di Cosmo y Di Cristo 1998). Años después se describió un GnRH específico en *Octopus vulgaris* denominado octGnRH que abrió el camino hacia el estudio de las variantes de GnRH en invertebrados (Iwakoshi y col. 2002). Además, en la misma especie se han visto fibras conteniendo GnRH que inervan el oviducto y la glándula oviductal sugiriendo la participación de GnRH en la reproducción (Iwakoshi-Ukena y col. 2004). Posteriormente se describió un receptor para GnRH en el

ovario de *O. vulgaris* y se vió, además, que octGnRH actúa directamente sobre las gónadas, estimulando la producción de esteroides gonadales (Kanda y col. 2006).

En los anélidos, también se ha analizado la influencia del cerebro en los procesos relacionados con la maduración sexual y se ha demostrado una influencia hormonal directa mediante experimentos de ablación y trasplante del cerebro, así como mediante ensayos en condiciones de cultivo de órganos (revisado por Golding 1972, Golding 1974 y Baskin 1976). Específicamente en los nereididos se ha considerado que la secreción del cerebro conocida como nereidina tiene un efecto principalmente inhibitorio sobre la maduración sexual, considerando etapas finales de la ovogénesis, la espermatogénesis y la epitoquia. Sin embargo en los individuos inmaduros, la influencia hormonal del cerebro promueve el crecimiento somático y es necesaria para el desarrollo normal de la ovogénesis (Golding 1972; Baskin 1976). Recientemente, se ha identificado un metilfarnesoato como la hormona inhibidora de la maduración, cuya concentración disminuye en los animales maduros (Schenk y col. 2016). Los mismos autores demostraron un efecto inhibitorio en la síntesis de vitelogenina. Por otro lado, la señalización estrogénica participa en la regulación del mismo proceso (García-Alonso y Rebscher 2005; García-Alonso y col. 2006).

II) II. iii. GnRH en invertebrados

Luego del descubrimiento de las variantes moleculares de GnRH en vertebrados, que en general cumplen alguna función relacionada con la reproducción, comenzaron a surgir evidencias acerca de la presencia de GnRH en varios invertebrados (Kelsall y col. 1990; Goldberg y col. 1993). Fue entonces que se caracterizaron dos variantes de GnRH en el protocordado *Chelyosoma productum* (Powell y col. 1996) y luego se aislaron y secuenciaron genes codificantes para seis variantes de GnRH en *Ciona intestinalis* (Adams y col. 2003). En ese mismo trabajo se verificó que todas estas variantes eran capaces de inducir el desove en la misma especie.

Posteriormente comenzaron a descubrirse nuevas variantes en invertebrados protostomados: octGnRH en *O. vulgaris* (Iwakoshi y col. 2002) y *Loligo edulis* (Onitsuka y col. 2009), y apGnRH en *Aplysia californica* (Zhang y col. 2008). Como se ha escrito más arriba, octGnRH participa en el control del eje reproductivo de los cefalópodos (Iwakoshi-Ukena y col. 2004). Sin embargo, en gasterópodos, apGnRH parecería no ser un

activador agudo de procesos reproductivos, aunque participa en la modulación de comportamientos relacionados con la alimentación y el movimiento (Tsai y col. 2010).

Mediante análisis *in silico* se han encontrado además secuencias de GnRH en anélidos: anGnRH que aparecen conservadas en *Capitella* sp. y *Alvinella* sp., así como en la sanguijuela *Hirudo* sp. (Tsai y Zhang 2008; Veenstra 2011) y en el nereidido *P. dumerilii* (Conzelmann y col. 2013). Sin embargo, la localización anatómica y el rol fisiológico de estas variantes no han sido aún objeto de investigación. En la Tabla 1 se muestra la secuencia de algunas variantes de GnRH de vertebrados e invertebrados.

Tabla 1. Estructura primaria de algunas variantes de GnRH: de vertebrados (mGnRH de mamíferos, cGnRHII, variante II de pollo, y dfGnRH de *Squalus* sp.), de protocordados (tGnRHI, variante I de *Chelyosoma*), de moluscos (octGnRH de *Octopus* y apGnRH de *Aplysia*) y de anélidos (anGnRH de *Capitella* y anGnRH* de *Platynereis*). Comparadas con las GnRH de cordados, las secuencias de GnRH de protostomados presentan una inserción de dos aminoácidos en el extremo N-terminal. Se indican con números las posiciones aminoacídicas correspondientes y se resaltan en gris los aminoácidos conservados en todas las secuencias. Los aminoácidos conservados en las secuencias de protostomados se indican en negrita.

| | 1 | - | - | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------|-------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|---------------------------|
| mGnRH | pGlu | - | - | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly-NH ₂ |
| cGnRHII | pGlu | - | - | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Tyr | Pro | Gly-NH ₂ |
| dfGnRH | pGlu | - | - | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-NH ₂ |
| tGnRHI | pGlu | - | - | His | Trp | Ser | Asp | Tyr | Phe | Lys | Pro | Gly-NH ₂ |
| octGnRH | pGlu | Asn | Tyr | His | Phe | Ser | Asn | Gly | Trp | His | Pro | Gly-NH₂ |
| apGnRH | pGlu | Asn | Tyr | His | Phe | Ser | Asn | Gly | Trp | Tyr | Ala | Gly-NH₂ |
| anGnRH | pGlu | Ala | Tyr | His | Phe | Ser | His | Gly | Trp | Phe | Pro | Gly-NH₂ |
| anGnRH* | pGlu | Ala | Tyr | His | Phe | Ser | Asn | Gly | Trp | Met | Pro | Gly-NH₂ |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

II) II. iv. Influencia del ambiente en la reproducción de los invertebrados marinos

Muchos invertebrados marinos presentan patrones de reproducción estacionales que han sido relacionados con características de su ambiente, entre las que se destaca la temperatura (revisado por Orton 1920). El desove puede tener lugar de forma continua o durante períodos largos en poblaciones de clima tropical (Sette y col. 2013; Peixoto y Santos 2016), mientras que para poblaciones que habitan zonas de clima templado, el desove tiene lugar durante períodos más cortos y sincronizados con variables del ambiente (Giese 1958; Garwood y Olive 1978; Olive y Garwood 1981). Se ha interpretado que la sincronización del desove con

ciertas condiciones ambientales podría ser favorable para la supervivencia de las larvas en las especies con estadios larvales planctónicos (Giese 1958; Olive 1995).

Por ejemplo, algunas especies de nereididos presentan sus períodos de desove asociados a la primavera como *Hediste diversicolor*, *Nereis pelagica* y *Nereis virens* en la costa este de Inglaterra (Brafield y Chapman 1967; Olive y Garwood 1981). El desove de *A. succinea* ha sido observado en los meses de verano en diferentes lugares, en el hemisferio norte (Lillie y Just 1913; Rasmussen 1973). Curiosamente, el nereidido *Perinereis anderssoni* se reproduce durante la mayor parte del año en la costa subtropical de Brasil, pero también presenta un pico estacional (Peixoto y Santos 2016).

El desove es un proceso final que tiene lugar luego del crecimiento somático y la maduración sexual, los cuales también pueden encontrarse asociados a condiciones particulares del ambiente (Garwood y Olive 1978; Olive y Garwood 1981; Olive y col. 1998). La etapa de crecimiento como individuos juveniles puede ser extensa en los poliquetos y se modifica de acuerdo con la disponibilidad de alimento, la temperatura y el fotoperíodo del ambiente (Bentley y Pacey 1992; Last y Olive 1999). Eventualmente, la tasa de crecimiento influye en la etapa de maduración sexual y, como resultado, la edad a la cual los individuos maduran es variable (Bentley y Pacey 1992). La ovogénesis también puede ser influenciada por las condiciones de temperatura o fotoperíodo (Garwood y Olive 1978; Olive y col. 1998). A modo de ejemplo, el nereidido *N. virens* desarrolla la etapa de vitelogénesis en los meses de otoño e invierno en su ambiente natural (Brafield y Chapman 1967) y el proceso responde a las condiciones de fotoperíodo características del otoño (<12 horas de luz) (Olive y col. 1998). Como otro ejemplo, la epitoquia y el desove de *A. succinea* han sido asociados con las altas temperaturas del agua en el verano (Rasmussen 1973) y ensayos de laboratorio han demostrado una influencia del aumento de la temperatura del agua en el desarrollo de la epitoquia (Hardege y col. 1990; Fong 1991). Por otro lado, se ha observado una influencia de la salinidad del agua en el mismo proceso (Fong 1991).

Uno de los candidatos para mediar las relaciones entre las condiciones ambientales y los ciclos reproductivos es el sistema neuroendócrino (Chieffi 1984). Es por este motivo que en este trabajo planteamos como

objetivo general analizar la maduración sexual de un nereidido en su ambiente natural, las variables del ambiente que podrían influir en su regulación y el sistema neuroendócrino.

La presente tesis tuvo como organismo de análisis el poliqueto nereidido *A. succinea* (Leuckart 1847). Es una especie de distribución amplia, que en la costa uruguaya se reportó por primera vez en el año 1923 con la descripción de építocos (Treadwell 1923) y más recientemente se ha mencionado su presencia sobre sustratos duros (Borthagaray y Carranza 2007). Son conocidos los cambios morfológicos que tienen lugar durante la epitoquia en las poblaciones uruguayas (Treadwell 1923; Dei-Cas y Mañé-Garzón 1973) y se ha observado el desove en primavera y verano (García-Alonso 2014).

Por estos antecedentes, consideramos que la maduración sexual de la especie en la costa uruguaya también puede estar asociada a los cambios anuales de temperatura, fotoperíodo o salinidad del agua. En este trabajo proponemos analizar la maduración sexual, en particular la gametogénesis y la epitoquia, y evaluar la asociación de alguno de estos procesos con las condiciones del ambiente en la costa uruguaya. Cabe destacar que hasta el momento los procesos de gametogénesis no han sido analizados. Por la importancia del crecimiento somático para la maduración sexual en los nereididos (Bentley y Pacey 1992) se realizará también un análisis del tamaño de los individuos.

Aunque se ha demostrado que el cerebro participa en la regulación de la gametogénesis y la epitoquia en los nereididos (Golding 1972; Baskin 1976), por el momento, sólo se ha identificado una de las moléculas que participan de esta regulación. El metilfarnesoato identificado se ha vinculado con la función inhibitoria de la maduración, importante para la etapa juvenil de los nereididos (Schenk y col. 2016). La localización anatómica y el o los rol(es) funcional(es) de las moléculas similares a GnRH no han sido analizados. Como antecedente, un análisis de la expresión de neuropéptidos en diferentes estadios del ciclo de vida, mediante transcriptómica, mostró que los transcritos para anGnRH se encuentran presentes en los individuos átochos y építocos pero con un mayor nivel de expresión en los machos építocos (Conzelmann y col. 2013).

En este trabajo se propone analizar la localización neuroanatómica de moléculas similar-GnRH, en el cerebro de individuos maduros o en maduración, porque este tipo de moléculas se han asociado con diversas

funciones relacionadas con la reproducción en otros grupos de animales. Este análisis puede además aportar al conocimiento del o de los rol(es) funcional(es) de GnRH en los invertebrados protostomados.

III) Hipótesis

1. La maduración sexual de *A. succinea* se encuentra asociada a condiciones de temperatura, fotoperíodo o salinidad de su ambiente.
2. Los individuos en estadios avanzados del proceso de maduración sexual expresan moléculas similares a GnRH en el cerebro.

IV) Objetivo General

Realizar un análisis de la maduración sexual de *A. succinea* en la costa uruguaya, las variables del ambiente que podrían influir en su regulación y el sistema neuroendócrino.

V) Objetivos específicos

1. Analizar la maduración sexual de *A. succinea* en la costa uruguaya, incluyendo los procesos de gametogénesis y epitoquia.
2. Evaluar si diferentes estadios del proceso de maduración sexual se encuentran asociados con condiciones particulares de temperatura, fotoperíodo o salinidad del ambiente.
3. Analizar la inmuno-reactividad para GnRH en el cerebro de individuos építocos (maduros) y átocos en maduración.

VI) Materiales y métodos

VI) I. Metodología de estudio del proceso de maduración sexual

VI) I. i. Metodología de muestreo

Con el objetivo de analizar la maduración sexual de *A. succinea* a partir de muestras de una población natural, realizamos muestreos entre junio y noviembre del año 2015 en Punta Ballena (-34°54'33"S, -55°2'42"O), tomando una muestra por mes. Análisis previos señalaban que el período desove de la especie ocurre entre octubre y marzo en la costa del departamento de Maldonado, con un máximo de actividad reproductiva en el mes de diciembre (García-Alonso 2014). Punta Ballena es una punta rocosa en el departamento de Maldonado, localizada en la zona estuarina del Río de la Plata (Figura 2). Se ha observado una importante riqueza de especies de invertebrados bentónicos en la zona litoral, con predominancia de mejillones (*Brachidontes rodriguezii* y *Mytilus edulis*) en la zona litoral baja (Brazeiro y col. 2006). Para este trabajo, recolectamos los mejillones y los organismos asociados que se encontraban ubicados sobre el sustrato rocoso en una profundidad menor a 2 m, correspondiendo las zonas litoral baja o sublitoral alta (Stephenson y Stephenson 1949; Borthagaray y Carranza 2007). Se utilizó una herramienta de hierro con forma de pala, con un largo mango y un canasto que permitió despegar los animales de la roca y conservarlos en el canasto para subirlos a la superficie. A continuación, se acomodaron los animales en grandes bolsas para ser transportados con vida al laboratorio donde se realizó la observación de las muestras con el objetivo de identificar los individuos de la especie *A. succinea* y se cuantificó el volumen total de los organismos capturados. Análisis previos realizados en Brasil, mostraron variaciones en la densidad de individuos de *A. succinea* en diferentes momentos del año (Sette y col. 2013). Dado que en la zona de muestreo no se ha analizado la densidad de individuos de esta especie, consideramos relevante mantener un registro su densidad relativa, en función del volumen total de la muestra obtenida.

Para la manipulación de los poliquetos se utilizó agua tomada del lugar de muestreo o agua marina preparada (30‰, Tetra Marine Salt Pro, Tetra). Los individuos de la especie en estudio se acomodaron en recipientes individuales y se mantuvieron en un bioterio con temperatura controlada a 16 ± 2 °C sólo durante el tiempo

necesario para analizar sus características morfológicas. Para evaluar la hipótesis planteada de asociación de la maduración sexual de *A succinea* con variaciones en el fotoperíodo, la temperatura o la salinidad del agua se registró la temperatura y la conductividad eléctrica del agua en cada instancia de muestreo. La conductividad eléctrica es una medida indirecta de la salinidad (Heurteaux 1988) y podría presentar variaciones espaciales o temporales en la zona de estudio (Brazeiro y col. 2006). Los datos de fotoperíodo se tomaron de la base de datos Weather Underground, con datos del Aeropuerto Internacional Laguna del Sauce (-34°51'44"S, -55°05'53"O).

Como resultado, se obtuvieron muestras entre junio y noviembre, las cuales se identificaron por la fecha de extracción: 24 de junio, 16 de julio, 20 de agosto, 21 de setiembre, 28 de octubre y 25 de noviembre. Pero, por el bajo número de animales capturados, la muestra de noviembre no será considerada para algunos análisis.

En los meses de junio y julio se obtuvieron también muestras en el Puerto de Punta del Este (Puerto, -34°57'44"S, -54°57'1"O, Figura 2) con el objetivo de analizar las características de tamaño y estadio de madurez de los individuos y realizar comparaciones con las muestras de Punta Ballena correspondientes a los mismos meses.

En el mes de diciembre resultó imposible obtener alguna muestra en Punta Ballena por condiciones locales del tiempo. Por ello, para complementar el análisis realizado en Punta Ballena y obtener información sobre la proporción de individuos maduros en el mes de diciembre, se realizó el muestreo en Punta del Chileno (-34°54' 43"S, -55°0'55"O; Figura 2). Este sitio presentó características particulares como menor profundidad y menor oleaje.

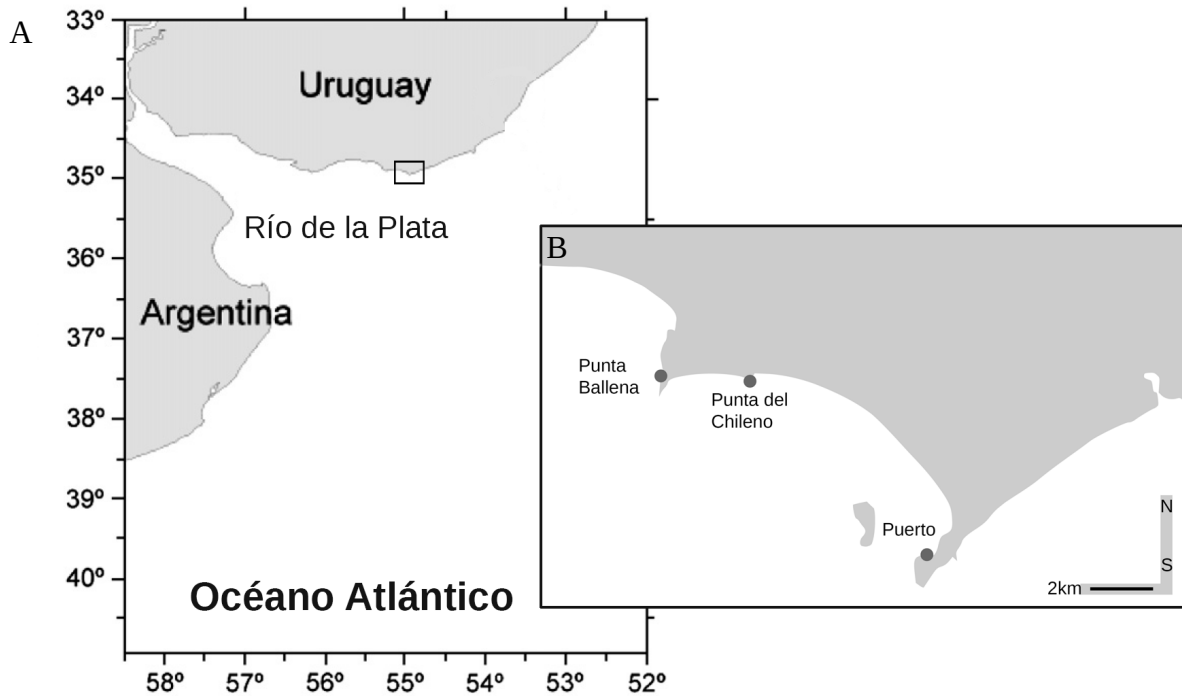


Figura 2. Mapa de la zona de muestreo en la costa uruguaya. Los sitios de muestreo se encuentran en la zona exterior del estuario del Río de la Plata, en el área indicada con el rectángulo en A, que se muestra a mayor aumento en B. Se indica la localización de: Punta Ballena (-34°54'33"S, -55°2'42"O), Punta del Chileno (-34°54' 43"S, -55°0'55"O) y el Puerto de Punta del Este (Puerto, -34°57'44"S, -54°57'1"O). Mapa modificado de (Borthagaray y Carranza 2007).

VI) I. ii. Análisis morfológico

Se realizó un análisis morfológico del proceso de epitoquia, observando las características que permiten identificar a los individuos de la especie *A. succinea* y clasificarlos como átocos o epítocos. Para ello se tuvo en cuenta la forma general del cuerpo y de los parapodios, la coloración general y la morfología de los ojos (Figura 3; Treadwell 1923; Dei Cas y Mañé-Garzón 1973). Los epítocos hembra y macho pueden ser distinguidos por la forma general del cuerpo y su coloración. Sin embargo, por la metodología de muestreo utilizada, encontramos individuos en diferentes estadios del proceso de epitoquia y en muchos casos no fue clara la diferenciación morfológica entre sexos. Análisis previos confirmaron que los epítocos pueden ser capturados del ambiente bentónico y que es posible identificar individuos en diferentes estadios del proceso de epitoquia (Rasmussen 1973; Aguiar y Gomes-Santos 2017). Para realizar la observación detallada de los

individuos se utilizó un microscopio estereoscópico y se realizó la anestesia con una mezcla de $MgCl_2$ 4% y agua marina preparada (30‰) en partes iguales.

Para cuantificar la presencia de individuos epítocos o en proceso de epitoquia en las muestras se analizó la variable que denominamos p , que representa la proporción de individuos epítocos o en proceso de epitoquia en función del número total de individuos en la muestra. El error estándar (sp), se calcula como la raíz cuadrada del producto de las proporciones p y q dividido por el número de datos menos uno (siendo q la proporción de individuos átocos).

$$p = n^{\circ} \text{ individuos epítocos} / n^{\circ} \text{ individuos total} \quad ; \quad sp = \sqrt{p * q / N - 1}$$

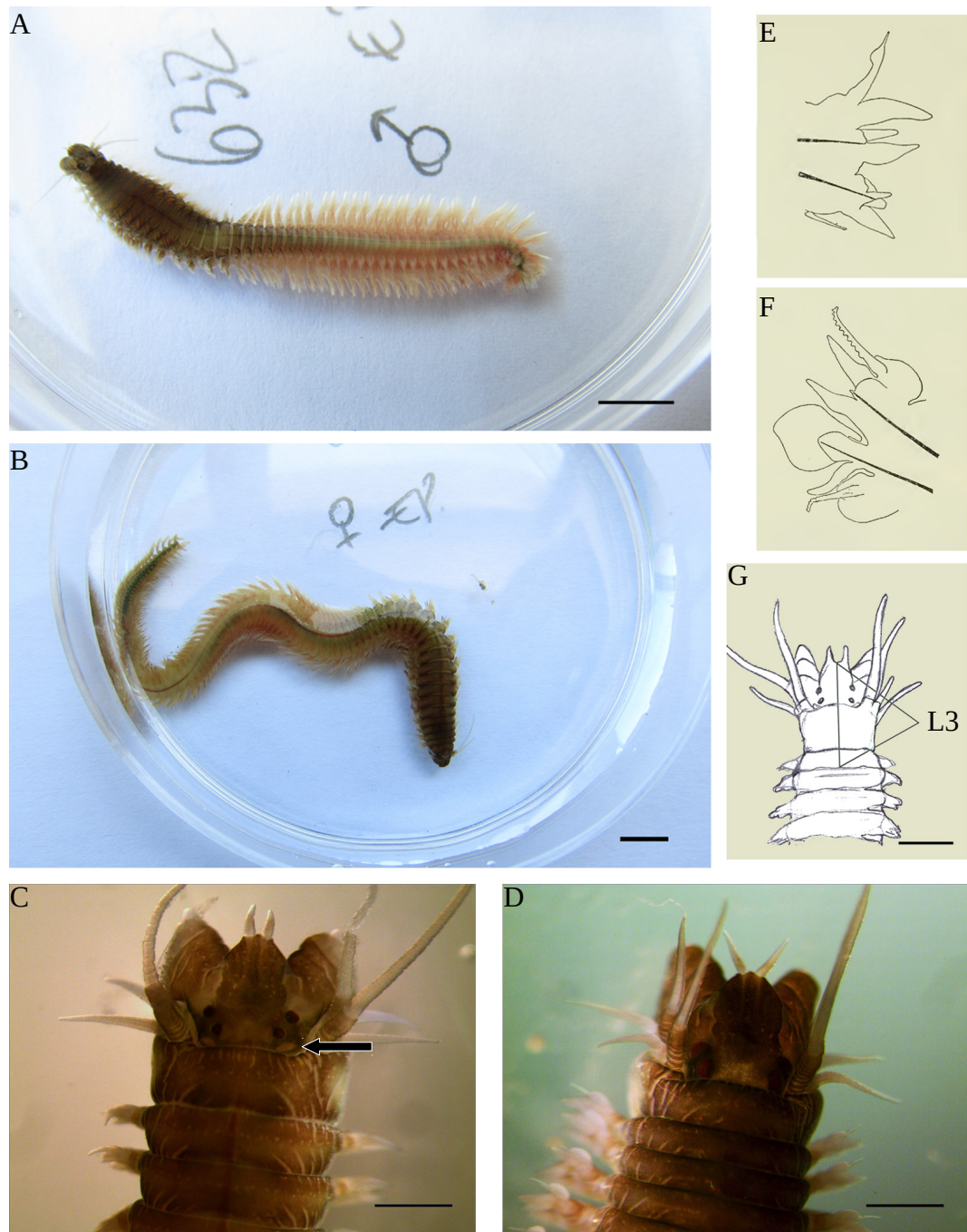


Figura 3. Identificación de las características morfológicas de los épitocos de *A. succinea*. A: Epítoco macho. B: Epítoca hembra. La porción posterior del cuerpo presenta una coloración diferencial: con tonos de rojo en los machos y verde en las hembras, mientras que la porción anterior del cuerpo presenta un color oscuro en ambos. C: Extremo anterior de un átoco, la flecha señala el par de órganos nucales que se ven como parches con menos pigmentación en el extremo caudal del prostomio. D: Extremo anterior de un épitoco. Es notoria la pigmentación dorsal, más oscura en los épitocos; además los ojos son más grandes y sobresalen abultados. E: Morfología parapodial de los átocos. F: Morfología parapodial modificada, característica de los épitocos. Esquemas de Treadwell (1923). G: La medida L3 se tomó desde el extremo anterior del prostomio, en el nacimiento de las antenas, hasta el extremo posterior del primer segmento del tronco. La barra de escala corresponde a 5 mm para A y B y a 1 mm para C, D y G.

Para analizar el tamaño de los animales y evaluar su relación con el estadio de madurez, se utilizó la medida de longitud L3. Ésta se tomó en sentido longitudinal, desde el extremo anterior del prostomio hasta el extremo posterior del primer segmento del tronco (Figura 3 G). Es decir, esta medición incluye al prostomio, al peristomio y al primer segmento del tronco, en sentido longitudinal. Para realizar las mediciones se utilizó un microscopio estereoscópico con reglilla ocular la cual fue calibrada para los diferentes aumentos utilizados, lo que permitió tomar medidas precisas hasta 0,01 mm como mínimo.

Este tipo de medición se utilizó porque la misma manipulación puede resultar en la pérdida de una porción del cuerpo de alguno de los animales, por lo cual no es conveniente analizar el largo total o el número de segmentos corporales. La medida L3 fue utilizada previamente para analizar la distribución de tamaños de *A. succinea* y otra especie de nereidido (Gillet y Torresani 2002; Gillet y col. 2011). Sin embargo, otros autores han analizado la longitud medida desde el prostomio hasta el segmento número 25 (Sette y col. 2013) o el ancho medido en el décimo segmento (Peixoto y Santos 2016). Por otro lado, la variable masa (peso fresco) también ha sido analizada en poblaciones de *A. succinea* (Neuhoff 1979; Gillet y col. 2011).

Tomamos datos de masa de los individuos capturados en junio y julio en Punta Ballena con el objetivo de establecer la relación de L3 con esta variable. Se determinó la masa de cada individuo mediante una balanza de precisión hasta 0,1 mg. Se trabajó con los individuos vivos y anestesiados, retirando el exceso de agua mediante el contacto con papel. Para este análisis contamos con 123 datos de L3 y masa de individuos átochos. Se observó una relación de tipo exponencial que pudo ser linealizada al transformar ambas variables con la función logaritmo natural (Figura 4 A y B). De acuerdo con este análisis, la masa puede ser estimada a partir de los datos de L3 para los átochos en el rango de tamaños analizado.

Para evaluar el número de animales que deberían ser capturados en cada instancia de muestreo, se analizó el número óptimo para el análisis de la variable L3. A partir de los datos obtenidos en los primeros muestreos se analizó el error estándar de la media de L3 en función del número de datos de las muestras obtenidas de forma aleatoria y sin reposición. Como resultado, las muestras de 55 o más datos presentaron valores de error estándar pequeños y similares (Figura 4 C). Considerando este análisis y la experiencia en la manipulación de los animales, proponemos que el número óptimo para el análisis de L3 es 55.

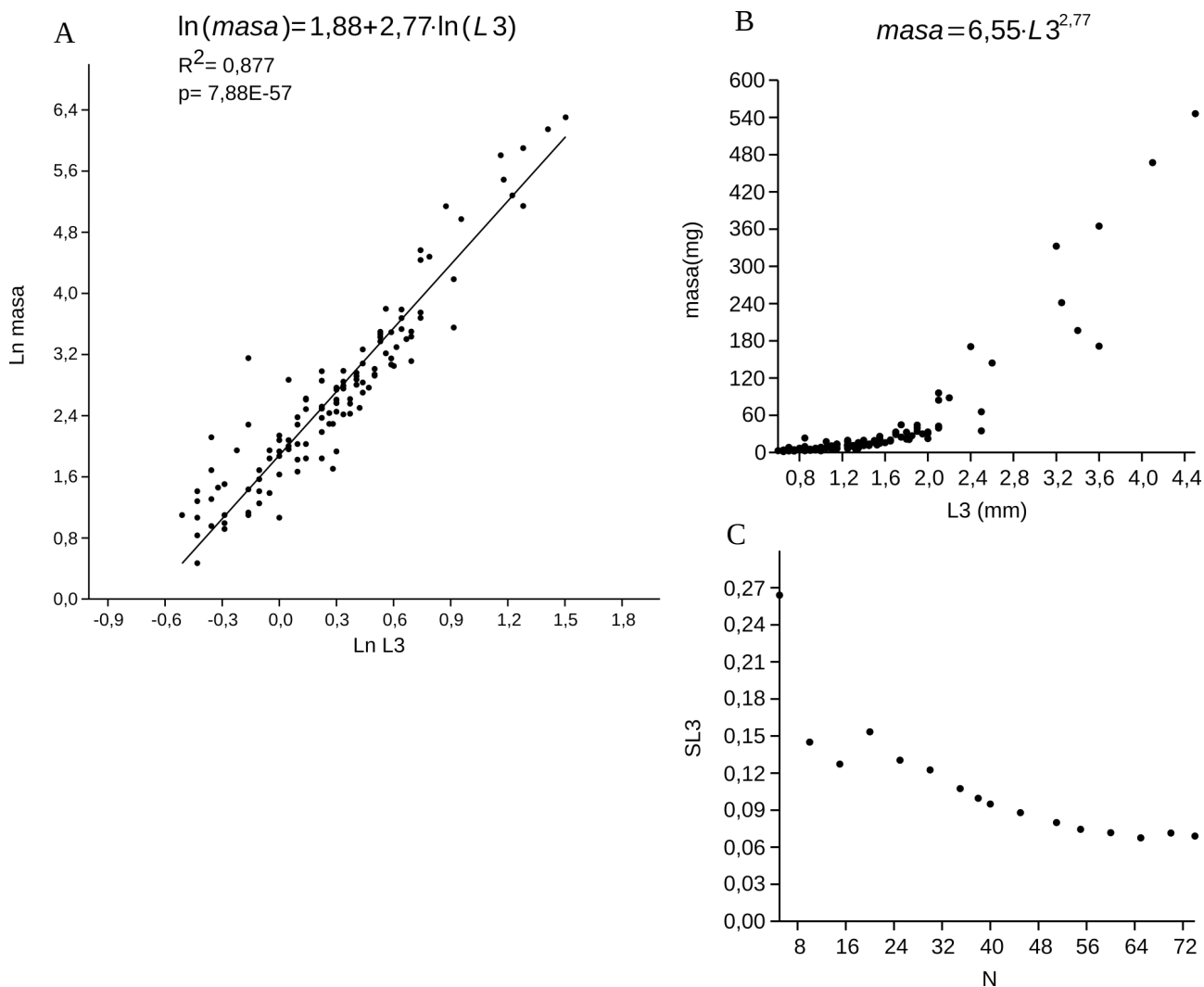


Figura 4. A y B: Análisis de la relación entre las variables L3 (mm) y masa (mg). A: El análisis de regresión con las variables transformadas por la función logaritmo natural permitió ajustar una recta cuyos parámetros se indican en la figura (N=123). De acuerdo con el análisis A, la masa puede ser estimada a partir de los datos de L3 en el rango de 0,6 a 4,5 mm mediante la ecuación de la figura B. C: Análisis del número óptimo para estimar la media de L3. Se graficó el error estándar de la media (S L3) en función del número de datos (N) de cada muestra obtenida de manera aleatoria y sin reposición de un total de 142 datos. Las muestras con $N \geq 55$ presentaron valores de error estándar similares entre sí, con valor medio de 0,07 mm (mediana, N= 5 muestras de 55 a 74 datos). Se utilizó el programa PAST (Hammer y col. 2001).

Para el análisis de la distribución de los datos de L3, se realizaron gráficos en forma de caja (*box plot*), en los cuales se muestra la mediana como medida de posición y el primer y tercer cuartil como los bordes de la caja (rango intercuartil). Las colas de distribución se extienden hasta el último punto incluido en una región definida por la extensión de una vez y media la longitud del rango intercuartil desde cada uno de los bordes de la caja, estableciendo la frontera para definir los valores extremos (Hoaglin y col. 1986). Se analizaron los

gráficos correspondientes a cada muestra y se realizaron pruebas de hipótesis para evaluar diferencias entre las mismas. Se realizaron pruebas no paramétricas porque los datos no presentaron distribución normal (Lilliefors con $\alpha=0,05$); se realizó el análisis de rangos de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones pareadas de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Las muestras que en este análisis mostraron diferencias significativas, fueron seleccionadas para estudios posteriores.

En general, para construir los gráficos y realizar las pruebas de hipótesis se utilizaron los programas PAST (Hammer y col. 2001) y Gnumeric 1.10.14.

VI) I. iii. Análisis histológico de las células germinales

A partir de los resultados de los análisis planteados en los párrafos anteriores se seleccionaron tres muestras para realizar análisis histológicos a fin de establecer el estadio de maduración sexual de algunos individuos al nivel tisular. Se tuvo en cuenta el análisis de la distribución de los datos de L3, de modo de analizar muestras que presentaron diferencias en esta variable. Además, se tuvo en cuenta la presencia de individuos epítocos en las mismas. Se seleccionaron las muestras del 24 de junio, 16 de julio y 28 de octubre en Punta Ballena porque presentaron diferencias significativas en el análisis de L3, sumado a que las dos primeras presentaron sólo individuos átochos, mientras que la última presentó tanto átochos como epítocos. Se analizaron 5 o 6 individuos de cada una de las muestras, que abarcan diferentes clases de tamaño. Las categorías de tamaño establecidas a partir del análisis de la distribución de L3 fueron: L3 mayor o igual al primer cuartil y estrictamente menor que la mediana, L3 mayor o igual que la mediana y estrictamente menor que el tercer cuartil y L3 mayor o igual al tercer cuartil. En total se analizaron 17 individuos.

Para este análisis, se realizó la fijación de los individuos enteros por inmersión en una solución de paraformaldehído 4% en buffer fosfato 0,02 M (NaCl 16 g/L+ KCl 0,4 g/L + Na₂HPO₄ 1,8 g/L + KH₂PO₄ 0,4 g/L) durante 24 hs a 4°C. Se utilizaron aproximadamente 4 mL de solución fijadora por individuo de manera de lograr una buena relación pieza/fijador. Los restantes animales, se fijaron en una solución de alcohol etílico 70%.

Se realizó la disección de diferentes porciones del cuerpo y se realizó el procesamiento de dichas porciones siguiendo las pautas generales de histología. El proceso de deshidratación se realizó con alcohol etílico de graduaciones crecientes, el aclaramiento con cloroformo y la inclusión con parafina (Histoplast, Biopack, punto de fusión 56-58 °C) en estufa a 58 °C. Se realizó el armado de bloques de parafina ubicando el material en sentido longitudinal de modo de facilitar la obtención de secciones transversales. Se obtuvieron secciones de 8 μm de espesor las cuales fueron ubicadas sobre portaobjetos para luego ser teñidas con hematoxilina de Mayer y eosina amarillenta, y realizar el montaje permanente de los tejidos con medio Entellan (Merk). Posteriormente se realizó un análisis mediante microscopía fotónica de campo claro con el objetivo de identificar las células de la línea germinal y las características que permiten establecer etapas de la gametogénesis según los lineamientos de Fischer (1974), Bertout (1983) y Olive (1983a; 1983b). Para la observación de los preparados se utilizó un microscopio Nikon Microphot FXA con una cámara Nikon D70s y el software Nikon Camera Control Pro 2.6.0 para obtener las imágenes digitales. Se analizaron una o dos porciones del cuerpo de cada individuo, correspondientes a la zona media o posterior. Se realizaron mediciones de diferentes estructuras a partir de las micrografías obtenidas por esta aproximación. Para ello, se utilizó el software Fiji (Schindelin y col. 2012). Las mediciones realizadas se expresan como media \pm desvío estándar si los datos presentaron distribución normal (Lilliefors con $\alpha=0,05$), de lo contrario se indica la mediana.

Dado que las diferentes etapas de la gametogénesis no han sido analizadas previamente para el caso particular de la especie *A. succinea*, se realizó un análisis complementario mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) a fin de conocer la ultraestructura de determinados tipos celulares. Para esto se realizó la fijación por inmersión en paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato 0,02 M durante 24h a 4°C. Se realizó luego la disección de las muestras de interés: células de la cavidad celómica y pequeñas porciones del cuerpo de cada animal. El procesamiento del material se realizó siguiendo el protocolo de rutina para MET (Hayat 2000) incluyendo post-fijación en OsO_4 1% durante 30 a 60 min, deshidratación paulatina por pasajes sucesivos en alcohol etílico de concentración creciente, seguido de acetona, embebido en la resina epoxi Araldita mediante el pasaje del material a mezclas de araldita-acetona de concentración creciente, para posteriormente ser incluido en un bloque de Araldita pura. Se obtuvieron cortes semi-finos

(250-500 nm de espesor) los cuales se tiñeron con azul de metileno borácico 1% y se analizaron primero con microscopía fotónica a fin de seleccionar el área de interés a ser analizada mediante MET. Para ello se realizaron secciones ultra-finas (de 40 a 60 nm), que fueron contrastadas con acetato de uranilo acuoso 4% (Watson 1958) y con citrato de plomo 3% (Reynolds 1963). La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL modelo JEM-1010). Se analizaron muestras de 5 individuos mediante esta aproximación: un átoco y dos hembras y dos machos epítocos.

VI) II. Inmunohistoquímica para detección de inmuno-reactividad a GnRH en cerebro

Como una primera aproximación para el análisis de la posible participación de moléculas similares a GnRH en la reproducción de los nereididos, se analizó la inmuno-reactividad para GnRH (ir-GnRH) en cerebro de *A. succinea*. Para comenzar el análisis con animales epítocos, se realizó un muestreo en noviembre, al anochecer, en el Puerto. Los epítocos fueron tomados de la superficie del agua con una herramienta tipo calderín. Luego de ser capturados, se colocaron en recipientes individuales y a baja temperatura para evitar la liberación de sus gametos (Lillie y Just 1913). Las muestras de individuos átocos en maduración corresponden a muestreos realizados en el día, del sustrato rocoso como se explicó anteriormente. Las etapas de anestesia y fijación se realizaron de igual forma para todas las muestras. Como ya se explicó más arriba, los individuos se fijaron enteros en una solución de paraformaldehído 4% en buffer fosfato 0,02 M. Por ser los animales de tamaño pequeño, se realizó el procesamiento de muestras de la cabeza (prostomio) conteniendo el cerebro y el epitelio dorsal, incluidos los ojos y los órganos nucales (Figura 3C). De esta forma, resultó posible obtener inmuno-reacción no sólo en el cerebro sino también en los órganos y tejidos cercanos, incluidos dichos órganos sensoriales. Se realizó el procesamiento de rutina para histología como se describiera anteriormente y se obtuvieron secciones transversales de 6 µm de espesor las cuales fueron ubicadas sobre vidrios portaobjetos con carga positiva para facilitar la adhesión. Se ubicaron los cortes seriados de forma alternada en dos portaobjetos para realizar un ensayo experimental y un control negativo para cada una de las muestras. Al momento de realizar la reacción, las secciones se desparafinaron utilizando

xilol y se rehidrataron con soluciones de alcohol etílico de graduación decreciente. Luego de realizar un baño con buffer fosfato 0,01 M, se realizó el bloqueo de las peroxidasas endógenas en una solución de H₂O₂ 1,5% y el bloqueo de sitios inespecíficos en una solución conteniendo BSA 0,3% y Tritón 0,3% en buffer fosfato 0,01 M. Seguidamente, se realizó la incubación con el antisuero primario por 18 horas a 22 °C. Se utilizó el antisuero AS203-2, elevado en conejos contra apGnRH y gentilmente cedido por la Dra. Pei-San Tsai (Universidad de Colorado, USA, Tsai y col. 2010), en una concentración 1:500. Luego de realizar lavados con buffer fosfato 0,01 M, se incubó la muestra con el anticuerpo secundario biotinilado. A continuación y luego de realizar lavados con buffer fosfato, se incubó con estreptavidina unida a la enzima peroxidasa (Universal HRP Kit, Dako Agilent Pathology Solutions). La siguiente etapa consistió en revelar la reacción colocando una solución de diaminobencidina (0,05%), peróxido de hidrógeno (0,05%) y buffer fosfato 0,01M sobre los tejidos, durante 10 minutos aproximadamente, observando la reacción para detenerla con agua destilada cuando resultó preciso. Como último paso, se realizó la deshidratación utilizando soluciones de alcohol etílico de concentración creciente y luego xilol para realizar el montaje permanente de los tejidos con medio Entellan (Merk). Se realizaron dos tipos de controles negativos. El primero se realizó omitiendo el uso del antisuero primario y el segundo preadsorbiendo el mismo antisuero y en la misma dilución (1:500) con dfGnRH 10 µg/mL (Tabla 1; Lovejoy y col. 1992).

Se analizaron muestras de 10 individuos incluyendo epítocos y átocos de ambos sexos: tres hembras átocas (en los estadios I y II), un macho átoco (en el estadio de mórulas), tres hembras epítocas y tres machos epítocos. Algunas muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer para revelar la ubicación de los núcleos celulares. El análisis de la localización de las células marcadas se realizó en relación con los núcleos neuronales definidos originalmente por Holmgren, que han sido analizados también por otros autores (Golding & Whittle 1974; Engelhardt y col. 1982; Heuer y Loesel 2008). La asignación de las neuronas marcadas a los núcleos numerados se realizó de forma aproximada, teniendo en cuenta que los esquemas fueron realizados originalmente para otras especies de nereididos.

VII) Resultados y discusión

VII) I. Análisis del tamaño de *A. succinea*

El análisis de los datos de las muestras obtenidas en Punta Ballena permitió observar un aumento del tamaño medio de los individuos en el período del 24 de junio al 28 de octubre. Como resultado general, se identificaron tres tipos de muestras, diferenciadas mediante el análisis estadístico (Kruskal-Wallis y Mann-Witney con $\alpha=0,05$). Primero, la muestra de junio presentó el valor medio menor y el menor rango. Segundo, la muestra de julio presentó un valor medio mayor y un rango más amplio, con diferencias significativas al compararla con la anterior. A su vez, ambas presentaron diferencias significativas al compararlas con las muestras de agosto a octubre, las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí. Estas últimas, presentaron los valores medios más altos (Figura 5). El aumento del tamaño medio de los individuos de junio a octubre sugiere que se trata de un período en el cual los individuos crecen. En particular, para esta especie ya se había registrado un aumento del tamaño medio en períodos de primavera (Neuhoff 1979; Gillet y col. 2011). Las características particulares de la muestra obtenida en junio nos llevan a pensar que sería interesante obtener más información de la población en ese momento del año, incluyendo uno o dos meses previos para observar si estas características pueden ser registradas en diferentes réplicas.

Desde julio hasta octubre se observaron valores extremos superiores, que representan los individuos de mayor tamaño de la población, los cuales se encontraron en muy bajo número (Figura 5). El amplio rango de tamaños registrado en estas muestras podría relacionarse con el período de desove extendido característico de la especie (Neuhoff 1979; Gillet y col. 2011), que podría resultar en la superposición de grupos modales como ha sido observado en una población tropical analizada recientemente (Sette y col. 2013).

El análisis comparativo de las muestras de junio y julio obtenidas en el Puerto y en Punta Ballena permitió observar diferencias significativas para el mes de junio, con un valor un medio mayor y un rango más amplio en la muestra obtenida en el Puerto. Sin embargo, las muestras de julio no presentaron diferencias significativas (Figura 5). Estos resultados nos permiten sugerir que las poblaciones del Puerto y de Punta

Ballena presentarían características similares en el mes de julio. Una característica común de todas las muestras de junio y julio es la ausencia de individuos epítocos.

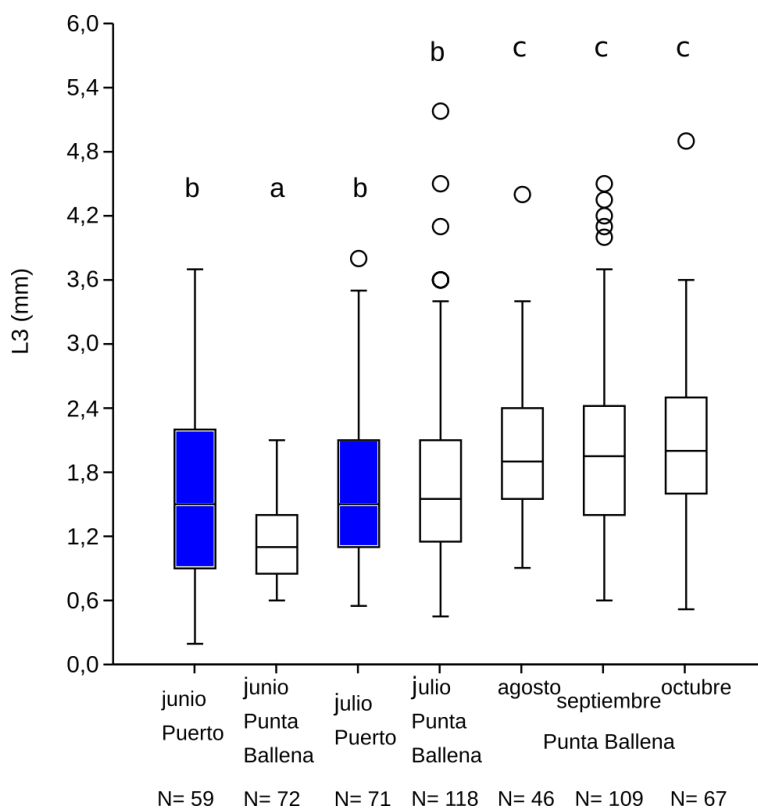


Figura 5. Análisis del tamaño de los individuos en las muestras de Punta Ballena y del Puerto, L3 en milímetros. Gráficos de caja con la mediana como medida de posición y los cuartiles 25% y 75% en los bordes de la caja. Las colas de distribución se extienden hasta una vez y media la longitud del rango intercuartil, estableciendo la frontera que define los valores extremos (círculos). En la parte superior, se señalan con letras diferentes (a-c) las muestras con diferencias significativas en el análisis estadístico: Kruskal-Wallis y Mann-Witney con $\alpha=0,05$.

VII) II. Evolución de la maduración sexual en el período de análisis

VII) II. i. Epitoquia

En los meses de agosto a octubre se identificaron individuos epítocos o en epitoquia en baja proporción en las muestras de Punta Ballena, con un valor medio de 0,06 (mediana, N= 3). Podemos interpretar que una baja proporción de los individuos de la población culminaron el proceso de maduración sexual en este período: al final del invierno y durante la primavera, que coincide con el inicio del período de desove de la

especie en la costa uruguaya (García-Alonso 2014). Es posible observar una tendencia de aumento en la proporción de epítocos, que alcanzó un valor máximo en octubre (Figura 6 A). Además, nuestros datos muestran una asociación de dicha variable con el aumento de la duración de los días (fotoperíodo). Sin embargo, el modelo lineal que representa la relación entre las variables presentó una pendiente pequeña (Figura 6 A) y consideramos que sería valioso contar con datos desde junio a diciembre para evaluar la posible asociación de la epitoquia con el fotoperíodo. Las condiciones de fotoperíodo en aumento no se han considerado esenciales para el desarrollo de la epitoquia de la especie (Hardege et al. 1990).

Análisis previos habían demostrado el desarrollo de la epitoquia entre 12 y 22°C (Hardege y col. 1990) y la temperatura media registrada entre agosto y octubre en Punta Ballena, 14,4°C, se encuentra dentro de ese rango. Pero, los datos de temperatura y conductividad del agua registrados (Tabla 2), no presentaron una relación significativa con la variable p. Consideramos que sería importante tomar más datos de estas variables para realizar el análisis con datos de temperatura y salinidad medias correspondientes al día, a la semana o al mes en el que se realiza cada muestreo.

Por otro lado, la estimación realizada de p presentó valores de error estándar grandes y podría mejorar si se trabaja con muestras de mayor número total, sin embargo el esfuerzo de muestreo realizado fue importante en este período (Tabla 2). Cabe destacar que no existen antecedentes de este tipo de estrategia para cuantificar la proporción de individuos epítocos en una población. El antecedente más reciente del análisis de la epitoquia con una población tropical de Brasil, no comunicó los datos de proporción de epítocos en función del número total de individuos muestreados (Aguiar y Gomes-Santos 2017).

Los individuos epítocos o en epitoquia presentaron tamaños mayores que los átocos capturados en el mismo período (Figura 6B), lo que sugiere una asociación del proceso de epitoquia con el tamaño corporal. Es posible interpretar que el desarrollo de la epitoquia podría ocurrir sólo en los individuos que han alcanzado un cierto grado de desarrollo mediante los procesos de crecimiento y gametogénesis. Curiosamente, los procesos de crecimiento y ovogénesis pueden ser influenciados por las condiciones de fotoperíodo (Garwood y Olive 1978; Bentley y Pacey 1992; Olive y col. 1998; Last y Olive 1999) y este tipo de influencia podría explicar en parte la asociación de la epitoquia con cierto período del año.

Por otra parte, la importante presencia de individuos inmaduros puede relacionarse con el extenso período de desove de la especie (Neuhoff 1979; Gillet y col. 2011), que ha sido confirmado recientemente para la costa uruguaya. El desove ha sido observado periódicamente entre octubre y marzo, principalmente en la fase lunar llena (García-Alonso 2014). Pero, en cada evento de enjambamiento participan epítocos nuevos, los cuales mueren luego de realizar su comportamiento reproductivo (Lillie y Just 1913). Por ello, consideramos que los epítocos capturados del ambiente bentónico en cada instancia, son individuos que han culminado la epitoquia recientemente.

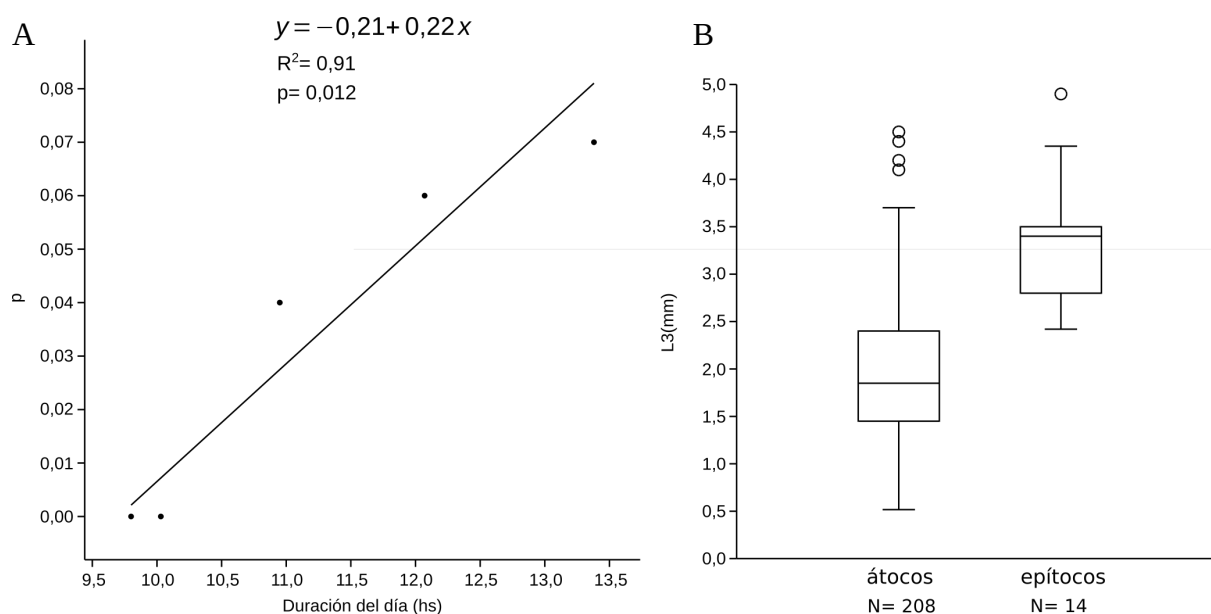


Figura 6. A: Análisis de regresión de la variable p (proporción de individuos epítocos o en epitoquia) y la duración del día (fotoperíodo). Se muestra el modelo lineal que representa la relación entre las variables, la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación (R^2) y el valor del estadístico p. Datos de junio a octubre, con distribución normal (Lilliefors con $\alpha=0,05$). B: Análisis del tamaño (L3) de los individuos átocos y epítocos capturados de agosto a octubre, con diferencias significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis con $\alpha=0,05$).

Tabla 2. Datos de los muestreos realizados de junio a octubre en Punta Ballena y en diciembre en Punta del Chileno. Se indica el número total de individuos (N), la abundancia relativa expresada por unidad de volumen (L^{-1}), la proporción de individuos epítocos o en epitoquia (p), el error estándar de p (sp), así como la temperatura y la conductividad registradas en cada caso.

| | junio | julio | agosto | septiembre | octubre | diciembre |
|---|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|
| N | 72 | 118 | 46 | 111 | 75 | 64 |
| Abundancia (L^{-1}) | 13 | 28 | 10 | 12 | 7 | 6 |
| p | 0 | 0 | 0,04 | 0,06 | 0,07 | 0,15 |
| sp | | | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,05 |
| Temperatura ($^{\circ}C$) | 12,8 | 11,6 | 14,6 | 13,8 | 14,4 | 23,2 |
| Conductividad (mS) | 31,3 | 16,3 | 23,5 | 33,3 | 36,3 | 33,3 |

Nuestros datos de abundancia relativa de *A. succinea* en las muestras, sugieren que pueden ocurrir variaciones temporales en la densidad de individuos de la especie en Punta Ballena en el período de análisis. Se registró un valor máximo en julio y un mínimo en octubre (Tabla 2). En general, variaciones en la abundancia o biomasa de la especie han sido asociadas con el ciclo reproductivo: la abundancia máxima se asocia con el reclutamiento de juveniles y el período previo a la reproducción, mientras que los mínimos se han observado durante el período reproductivo (Gillet y col. 2011; Sette y col. 2013). Este fenómeno puede relacionarse con la muerte de los individuos maduros luego de la reproducción (Gillet y col. 2011), pero también debe considerarse la capacidad de migración de los individuos, que podrían desplazarse en una escala local (Neuhoff 1979).

En el mes de diciembre, en la localidad de Punta del Chileno, se registró una mayor proporción de epítocos: $0,15 \pm 0,05$. Este sitio podría ser más adecuado para realizar futuros análisis de la epitoquia por ser accesible para realizar el muestreo en este período y porque logramos capturar un mayor número de epítocos.

VII) II. ii. Análisis histológico de la gametogénesis

De la muestra del 24 de junio, se analizaron dos individuos de tamaño mayor o igual al primer cuartil y menor que la mediana ($0,85 \leq L3 < 1,13$ mm) y tres de tamaño mayor que el tercer cuartil ($L3 \geq 1,4$ mm). Los individuos pertenecientes a la primera categoría de tamaño presentaron células germinales conformando grupos de relativa baja abundancia, en su cavidad celómica. Dichas agrupaciones presentaron, en general, forma ovoide y coloración púrpura debido a la afinidad con la hematoxilina (basofilia), con variaciones en el tamaño de las células y en la morfología general de las mismas (Figura 7). Dado que no se encontraron características distintivas de sexo o estadio de madurez, se consideró a dichas células germinales como indiferenciadas y se clasificó a los individuos en la categoría de indiferenciados (Tabla 3). Un proceso importante que puede relacionarse con este estadio es la proliferación de las células germinales (Rebscher y col. 2007).

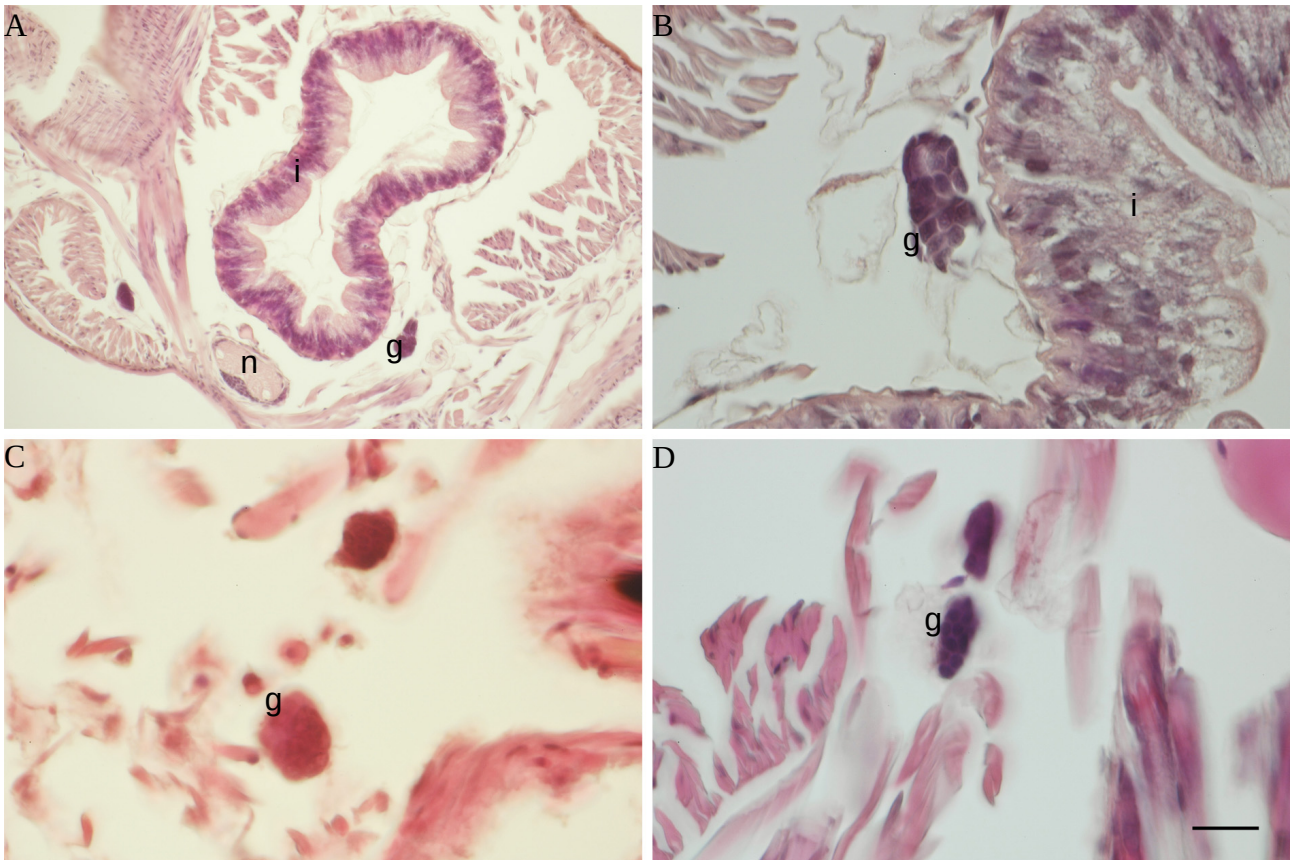


Figura 7. Células germinales de los individuos identificados como indiferenciados en la muestra de junio. No se identificaron características distintivas de sexo o estadio de madurez. Preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina. A: Imagen a bajo aumento de un corte transversal a nivel del cuerpo. Las células germinales (g) se encuentran en la cavidad celómica. i: intestino, n: cordón nervioso ventral. B a D: Imágenes a mayor aumento de las

agrupaciones de células germinales (g) de diferentes individuos. La barra de escala corresponde a 80 μm para A y 20 μm para B, C y D.

Entre los individuos pertenecientes a la categoría de mayor tamaño ($L_3 \geq 1,4 \text{ mm}$), se identificó un individuo indiferenciado, una hembra y un macho en maduración. La hembra se identificó claramente por presentar células germinales agrupadas así como ovocitos también agrupados o de forma individual en la cavidad celómica (Figura 8 A y B). Los ovocitos presentaron una forma aproximadamente circular, con diámetro medio de 8,37 μm (mediana, $n=9$), citoplasma basófilo y núcleo circular de ubicación central y coloración clara (Figura 8 B). Esta morfología se corresponde con los criterios morfológicos establecidos para los estadios 3 y 4 de la ovogénesis definidos por Fischer (1974). En el estadio 4, los ovocitos inician el proceso de vitelogénesis y es posible observar gotas vitelinas en el citoplasma (Figura 8 B). En este trabajo, se define a este estadio de la maduración de las hembras como estadio I por ser el primer estadio identificable con las metodologías utilizadas, es decir, hembras que presentan con ovocitos pequeños claramente identificables (Tabla 3). Por otro lado, el individuo macho se identificó por presentar agrupaciones compactas de células germinales, abundantes en la cavidad celómica (Figura 8 C y D; Tabla 3). Estas agrupaciones presentaron la morfología de mórula que ha sido asociada con los estadios de espermatogonias y espermatocitos (Bertout 1983; Olive 1983b), los cuales no han sido diferenciados mediante esta metodología.

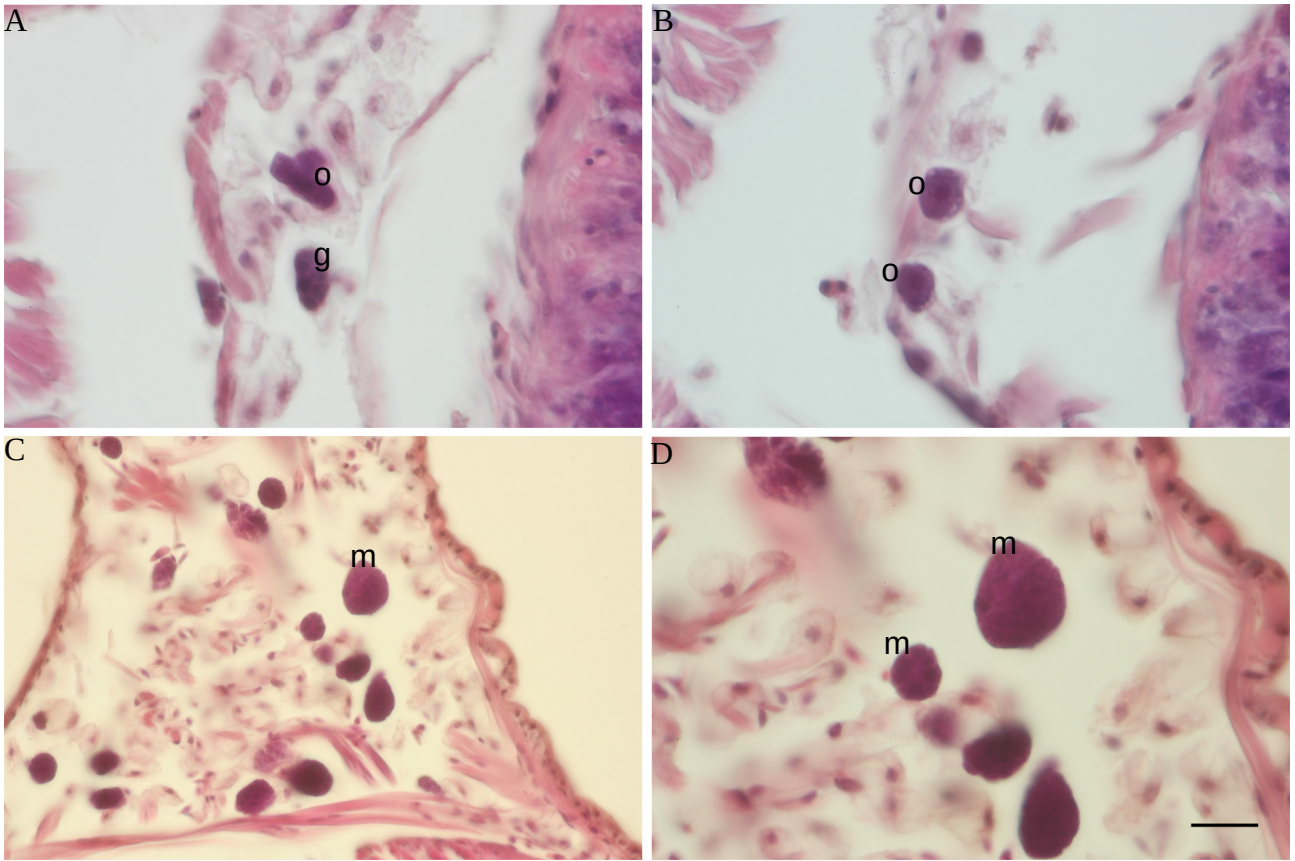


Figura 8. Identificación de una hembra y un macho, entre los individuos capturados en junio, con $L3 \geq 1,4$ mm. A y B: Hembra en el estadio I. Se observan células germinales indiferenciadas (g) y ovocitos pequeños (o) en la cavidad celómica. Es posible observar gotas claras en el citoplasma periférico de los ovocitos en B. C y D: Un macho en maduración presenta células germinales agrupadas, con la morfología de mórula (m), las cuales son abundantes en la cavidad celómica. Preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina. La barra de escala corresponde a 20 μm para A, B y D y a 40 μm para C.

El análisis por MET de una muestra de mórulas, permitió observar características subcelulares que apoyan la interpretación general como espermatogonias o espermatocitos tempranos. Las células que forman una mórula presentaron puentes (fusosomas) que las conectan entre sí, conformando una estructura sincicial (Figura 9 B). El núcleo celular es irregular, observándose secciones de forma ovalada o triangular. En el interior del núcleo, la heterocromatina es predominante, con lagunas de eucromatina de menor densidad electrónica (Figura 9 A). En el citoplasma se observaron las siguientes estructuras: mitocondrias, centriolos y complejos de Golgi. Las células presentaron proyecciones finas y largas dispuestas en espacios entre las células vecinas (Figura 9 A). En particular, las características de los núcleos difieren de las esperadas para las espermatogonias en interfase de acuerdo con Bertout (1983). La importante presencia de heterocromatina y la ausencia de nucléolo nos permiten interpretar que las células se encontraban en un estadio particular; características similares han sido observadas en los espermatocitos previamente a la meiosis (Bertout 1983). Se destaca la homogeneidad de las características de los núcleos de diferentes células y en diferentes mórulas. Los espacios importantes entre las células son característicos de los espermatocitos tempranos, aunque se encuentran conectados por fusosomas (Figura 9). Eventualmente, luego de la profase meiótica, los espermatocitos se separarían y, a continuación, tendrían lugar las dos divisiones meióticas (Bertout 1983). El análisis realizado es parcial, con muestras de un sólo individuo (átoco capturado en diciembre, con L3= 2,55 mm) y se considera importante analizar más muestras de machos en maduración mediante MET para identificar los estadios y procesos relacionados con las mórulas. Como antecedente, algunos autores han diferenciado dos estadios del proceso de proliferación de las espermatogonias (Geier y Hoeger 1997).

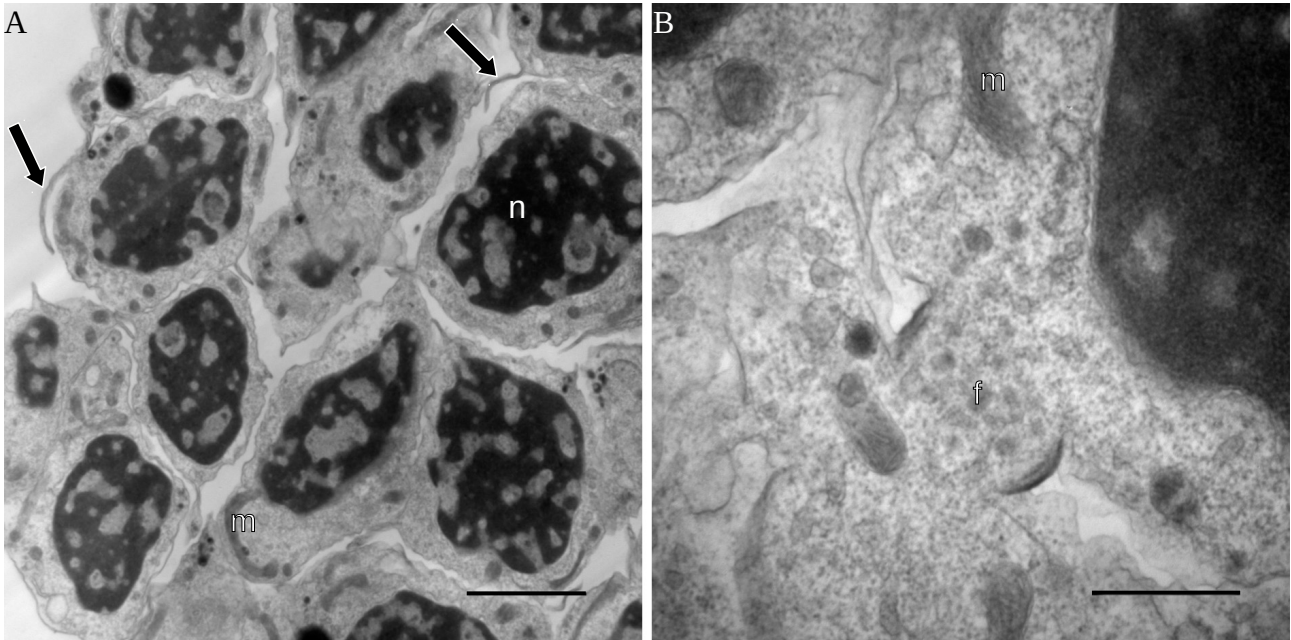


Figura 9. Características subcelulares de las células que forman una mórula e identificación del estadio de espermatocitos tempranos. A: El núcleo (n) es irregular, con abundante heterocromatina. En la periferia celular, la membrana plasmática presenta proyecciones finas y largas (flechas), además se observan espacios importantes entre las células vecinas. El citoplasma se comunica mediante fusosomas (f en B) y en él se observaron mitocondrias (m). Muestras de un átoco capturado en diciembre en Punta del Chileno, imágenes de MET. La barra de escala corresponde a 2 μm en A y a 500 nm en B.

De la muestra del 16 de julio se analizaron: dos individuos de tamaño mayor que el primer cuartil y menor que la mediana ($1,15 \leq L3 < 1,54$ mm), dos individuos de tamaño mayor que la mediana y menor que el tercer cuartil ($1,54 \leq L3 < 2,1$ mm) y dos individuos de tamaño mayor o igual que el tercer cuartil ($L3 \geq 2,1$ mm). Entre los animales de menor tamaño, se identificó un individuo indiferenciado y una hembra en maduración. La hembra presentó las características ya descritas y definitorias del estadio I: ovogonias agrupadas y ovocitos pequeños de citoplasma basófilo (Tabla 3). En la segunda categoría de tamaño se identificaron dos individuos indiferenciados con agrupaciones de células germinales en la cavidad celómica. Se destaca que las características de número y tamaño de las células que conforman dichas agrupaciones son heterogéneas (Figura 10 A y B). Sin embargo, no se encontraron características identificatorias del sexo o estadio de madurez. En la categoría de mayor tamaño se identificaron dos hembras en maduración. La primera presentó ovogonias y ovocitos pequeños (estadio I, Figura 10 C y D). Los ovocitos se encontraron dispuestos de forma individual aunque muchas veces en cercanía de otros en el mismo estadio. La otra hembra presentó, además de ovogonias y ovocitos pequeños, ovocitos de tamaño mayor. Estos últimos son de forma irregular, con un diámetro medio de $34,3 \pm 1,9$ μm (media \pm error estándar). El núcleo, ubicado centralmente, presentó un nucléolo central. El citoplasma contiene gotas, las cuales son blancas o de color rosa por afinidad con la eosina (acidofilia). Dichas características citoplasmáticas evidencian el proceso de vitelogénesis como ha sido demostrado previamente por análisis de autoradiografía y MET (Fischer 1974; Fischer y Dhainaut 1985). En este trabajo definimos dicho estadio de la maduración de las hembras como estadio II (Figura 10 E y F; Tabla 3).

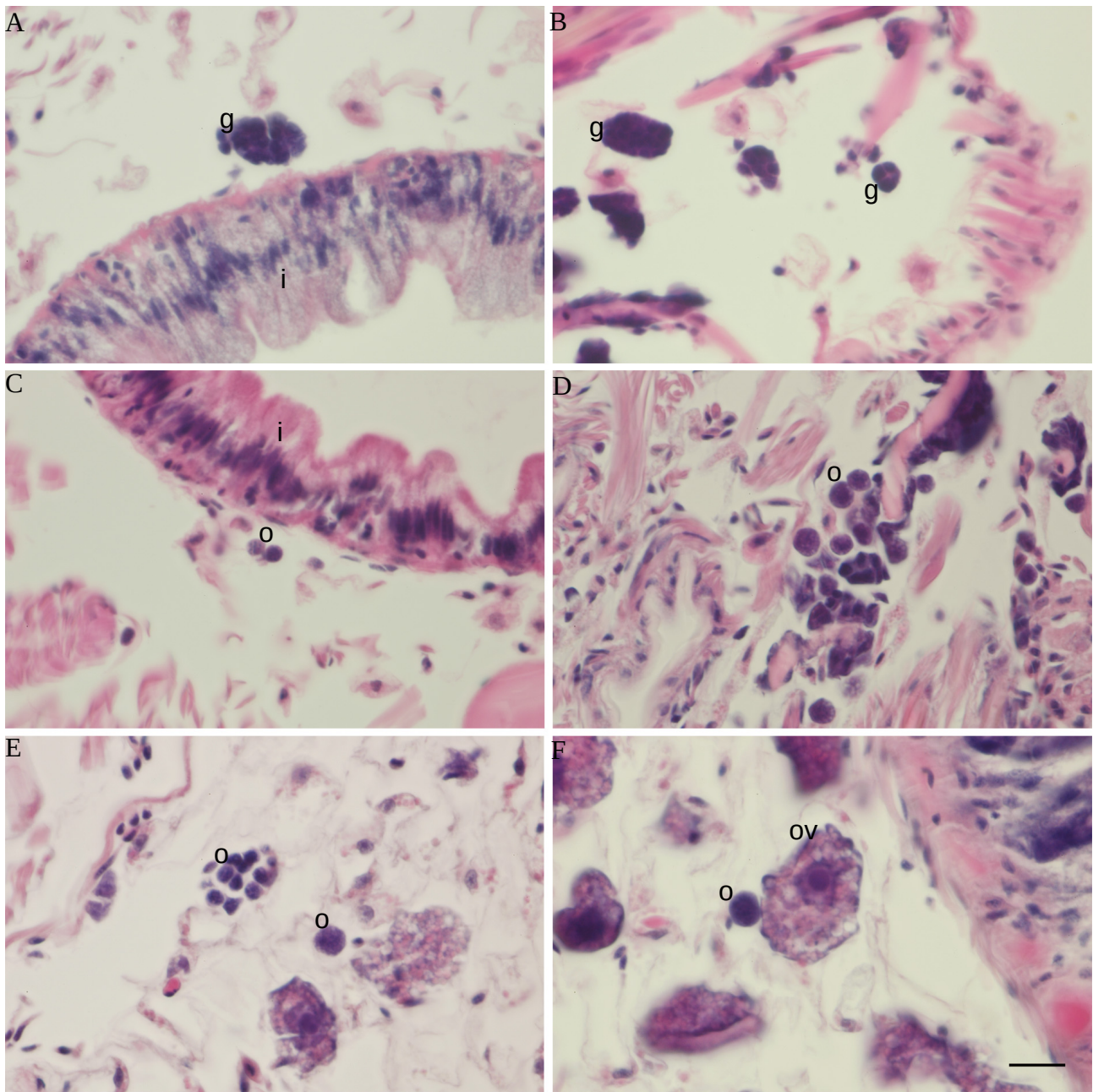


Figura 10. Estadios de la maduración sexual identificados en muestras de individuos capturados en julio. Preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina. A y B: Las células germinales (g) de individuos indiferenciados se disponen en grupos libres en la cavidad celómica. C a F: Hembras en maduración: los ovocitos pequeños (o), de citoplasma basófilo, se encuentran de forma individual o en grupos. Los ovocitos de mayor tamaño (ov) presentan gotas claras en su citoplasma y núcleo grande con un nucleolo central (F). i: intestino. La barra de escala corresponde a 20 μm para todas las imágenes.

De la muestra del 28 de octubre en Punta Ballena se analizó: un individuo de tamaño menor que el primer cuartil ($L3 < 1,6$ mm), dos individuos de tamaño mayor o igual al primer cuartil y menor que la mediana ($1,6 \leq L3 < 2$ mm) y tres individuos de tamaño mayor o igual que el tercer cuartil ($L3 \geq 2,5$ mm). El individuo de menor tamaño se identificó como un macho en maduración, conteniendo mórulas en su cavidad celómica (Olive 1983b), con las características morfológicas analizadas anteriormente (Figura 8; Tabla 3). Los individuos de la segunda categoría se clasificaron como un individuo indiferenciado y un macho en maduración. Entre los animales de mayor tamaño, se identificaron dos hembras en estadio I y una hembra calificada como madura. Las características de las células germinales de las hembras en estadio I ya han sido descritas más arriba y se ilustran en la Figura 11 para estas muestras. La hembra madura fue identificada como épitoca por su morfología externa, con parapodios modificados, ojos de gran tamaño y coloración dorsal oscura, mientras que la zona central del prostomio presentaba una coloración clara (Figura 3). Además su actividad (movimiento) se incrementaba al ser expuesta a la luz, característica típica de los individuos épitocos (Dei-Cas y Mañé-Garzón 1973). El análisis histológico permitió visualizar ovocitos maduros con inclusiones citoplasmáticas: una parte de coloración rosa debido a la acidofilia, lo cual sugiere que se trataría de vitelo proteico, y otra parte sin tinción las cuales pueden representar material lipídico que se solubilizó en las etapas de procesamiento de la muestra (Bertout y Dhainaut 1971; Fischer y Dhainaut 1985). El núcleo se ubica centralmente, con un gran nucléolo (Figura 11 C y D; Tabla 3). Se observaron ovocitos de tamaño y características homogéneas, evidenciando la sincronía en las etapas finales de la maduración de los ovocitos (Fischer 1974). El diámetro de los ovocitos presentó un valor medio de $93,6 \pm 5,8$ μm (media \pm error estándar), el cual es menor que el diámetro medio de los ovocitos, que ha sido asociado al proceso de epitoquia por Aguiar y Gomes-Santos (2017). Sin embargo, estos autores describieron variaciones del diámetro de los ovocitos en un rango de 65 a 143 μm en las hembras épitocas. Debemos tener en cuenta también que las diferencias en la metodología de fijación y procesamiento de las muestras pueden modificar las medidas. Por otro lado, nuestros datos corresponden a una sola hembra y sería necesario analizar un mayor número de hembras maduras para realizar comparaciones con los datos de esa otra población.

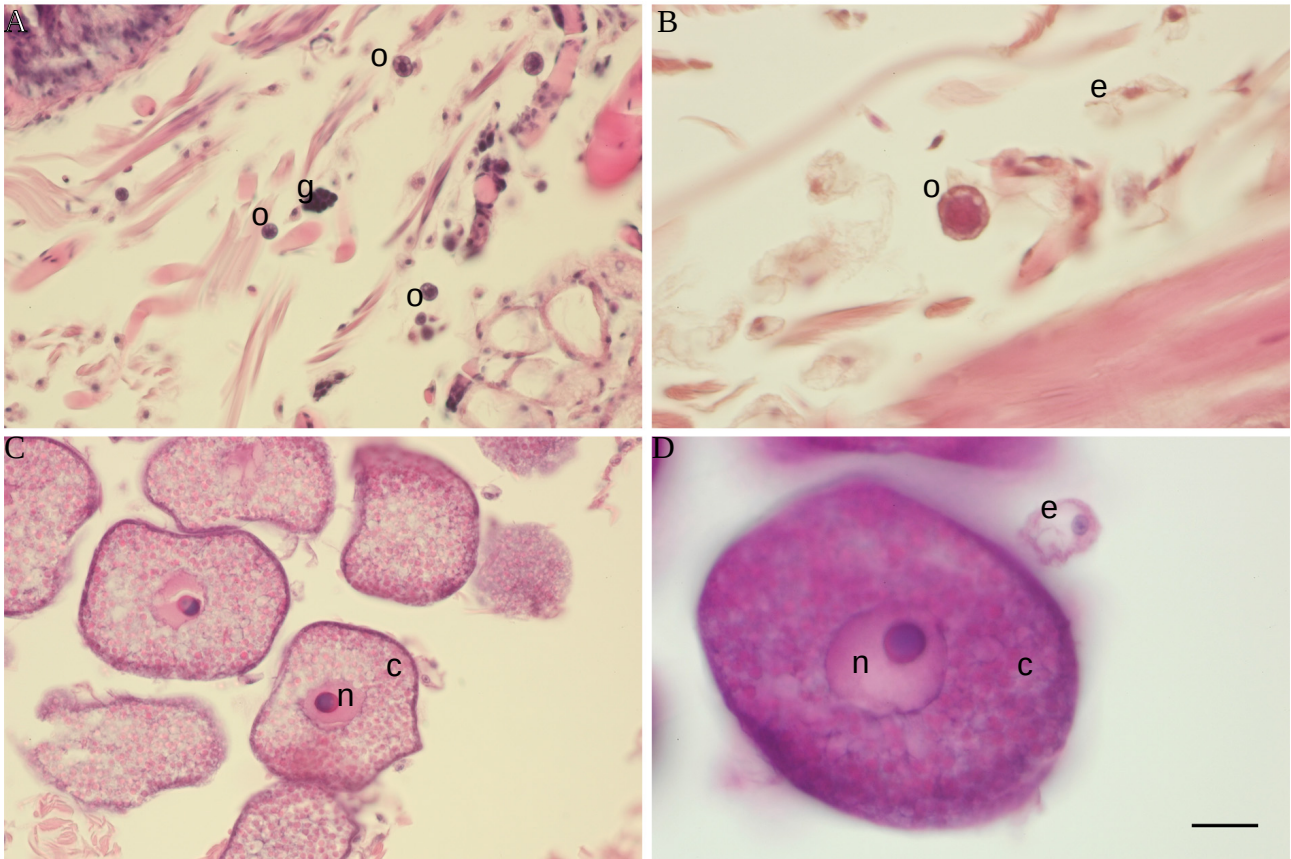


Figura 11. Identificación de diferentes estadios de la ovogénesis en las hembras capturadas en octubre: estadio I (A y B) y hembra madura (C y D). A y B: Se muestra la morfología y disposición de ovogonias (g) y ovocitos pequeños (o) en la cavidad celómica de hembras en el estadio I. C y D: Ovocitos maduros de una hembra épitoca, se puede identificar el núcleo (n) y las inclusiones citoplasmáticas (c). Es posible observar también los elocitos (e) con núcleo periférico y citoplasma claro, en B y D. Preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina. La barra de escala corresponde a 40 μm para A y C y a 20 μm para B y D.

Tabla 3. Estadios de la maduración sexual identificados mediante el análisis histológico y ultra-estructural de la gametogénesis de *Alitta succinea*. Algunos estadios de la gametogénesis que son bien conocidos para otras especies de nereididos no fueron identificados en nuestras muestras y por lo tanto no son mencionados.

| Estadio | Características de las células germinales |
|--------------------------------|---|
| Indiferenciado | Agrupaciones compactas de células germinales basófilas, sin características distintivas del sexo o estadio de madurez. |
| I (hembra) | Agrupaciones compactas de células germinales indiferenciadas, a lo que se suman ovocitos pequeños libres. Estos últimos son circulares, de citoplasma basófilo y con un diámetro medio de 7,8 μm (mediana, N= 23 ovocitos de tres individuos). Los ovocitos de mayor tamaño, con un diámetro máximo de 15 μm , presentaron gotas claras en el citoplasma. |
| II (hembra) | Agrupaciones compactas de células germinales indiferenciadas, ovocitos pequeños de citoplasma basófilo y ovocitos de tamaño mediano, libres en la cavidad celómica. Estos últimos presentaron un diámetro medio de 34,3 \pm 1,9 μm (media \pm error estándar, datos de un individuo), con núcleo central y numerosas inclusiones citoplasmáticas. |
| Madura (hembra epítoca) | Sólo ovocitos maduros, los cuales se encuentran libres en la cavidad celómica, con núcleo central y con numerosas inclusiones citoplasmáticas. El diámetro medio es 93,6 \pm 5,8 μm (media \pm error estándar, datos de un individuo). |
| Mórulas (macho) | Numerosas mórulas en la cavidad celómica. Éstas son agrupaciones compactas de espermatogonias o espermatocitos tempranos y en general de morfología ovoide. |
| Maduro (macho epítoco) | Espermatozoides libres en la cavidad celómica. |

Con base en el análisis histológico y ultraestructural realizado, se logró definir diferentes estadios de la maduración de los individuos de *Alitta succinea* que se identificaron por las características de sus células germinales como se detalla en la Tabla 3. Se debe tener en cuenta que esta lista de estadios de la maduración sexual se encuentra incompleta, porque algunos estadios de la gametogénesis que son bien conocidos para otras especies de nereididos no fueron observados en las muestras. Por ejemplo, en el desarrollo de las hembras consideramos que sería posible identificar uno o más estadios entre el estadio II y el estadio de hembra madura analizando el tamaño de los ovocitos. La identificación de los machos en maduración se realizó en base a la presencia de mórulas en su cavidad celómica, pero no logramos observar un estadio más avanzado de la maduración como espermatocitos dispersos o espermátidas en desarrollo, que se han observado previamente en otras especies de nereididos (Brafield y Chapman 1967; Bertout 1983; Olive

1983b). Sin embargo, observamos espermatozoides maduros en muestras de epítocos como se describirá más adelante (Figura 14).

Considerando las muestras analizadas (de junio, julio y octubre), los individuos identificados como indiferenciado, macho con mórulas o hembra en el estadio I se encontraron presentes en todas. Además, estos individuos presentaron diferentes tamaños, en un rango amplio (Figura 12). En particular, la variación encontrada en el tamaño de los individuos clasificados como indiferenciados y en la morfología de las agrupaciones de células germinales indiferenciadas, nos sugiere que podrían representar diferentes etapas de un proceso, las cuales no fueron evidenciadas por la técnica utilizada. Las hembras en estadio I y los machos con mórulas, representan el primer estadio de la maduración de las hembras y los machos que se identificó por esta metodología. La observación de estos estadios en las tres muestras analizadas nos permite sugerir que los procesos iniciales de la gametogénesis, como la proliferación de las células germinales en hembras y machos, así como el inicio de la etapa de vitelogénesis en las hembras tienen lugar tanto en el invierno como en la primavera. Por otro lado, los estadios más avanzados de la maduración de las hembras fueron identificados sólo en julio y octubre y en individuos de gran tamaño (Figura 12). Es posible sugerir que durante la etapa de vitelogénesis ocurre un importante aumento del tamaño corporal de las hembras.

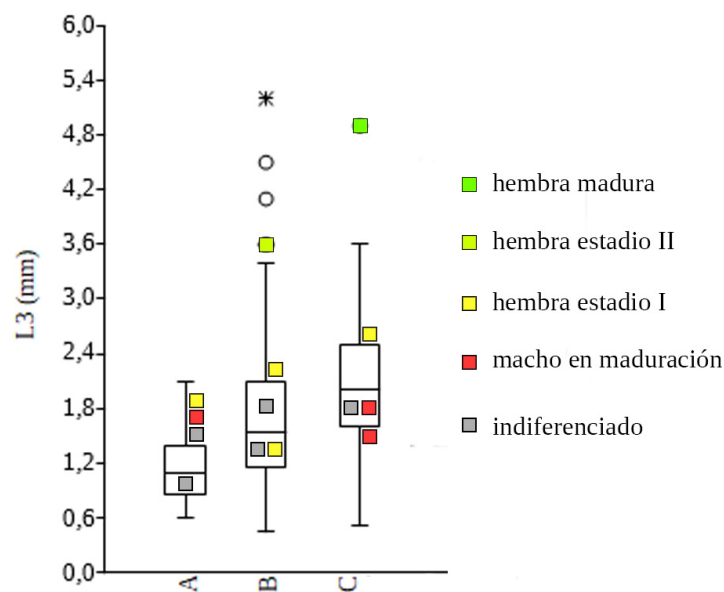


Figura 12. Análisis del tamaño y el estadio de madurez con base en el análisis histológico de 17 individuos. Se indica el estadio de la maduración identificado en relación con la distribución de los datos de tamaño (L3) para las muestras de junio (A), julio (B) y octubre (C).

VII) II. iii. Ultra-estructura de los gametos maduros

El análisis de muestras de células de la cavidad celómica de los epítocos, mediante MET, permitió analizar la morfología de los gametos maduros. En el caso de las hembras, se logró visualizar con mayor nivel de detalle el núcleo, las inclusiones citoplasmáticas ya mencionadas y la zona cortical del ovocito. El núcleo es eucromático con un gran nucléolo central y múltiples nucléolos periféricos de tamaño menor (Figura 13 A y B). Las inclusiones aparecen como gotas de densidad electrónica moderada y contenido homogéneo, con las mismas características que los cuerpos vitelinos analizados previamente por otros autores (Fischer y Dhainaut 1985). Por otra parte, el citoplasma cortical presentó gránulos los cuales son de menor tamaño y con un contenido fibrilar (Figura 13 C y D). Estos gránulos corticales contienen los precursores de la capa gelatinosa que se formará como resultado del proceso de fecundación (Lillie 1911; Fallon y Austin 1967). Las muestras analizadas presentaron un menor desarrollo de la capa de gránulos corticales al compararlas con la descripción realizada previamente por Fallon y Austin (1967) para los ovocitos maduros. A diferencia de los grandes gránulos de contorno irregular que dichos autores describieron e interpretaron como resultado de la fusión de los mismos, observamos gránulos corticales de forma aproximadamente circular y sólo algunos ejemplos de fusión de dos o más gránulos. La membrana de los ovocitos presentó microvellosidades que se extienden por todo el espesor de la envoltura extracelular, y sobresalen de la misma (Figura 13 C y D). La envoltura se encuentra compuesta por tres zonas en concordancia con la descripción realizada previamente por Fallon y Austin (1967): una capa gruesa de baja densidad electrónica, una capa fina intermedia, la cual es electrodensa, y una zona superficial fibrilar (Figura 13 D). Adicionalmente, en la superficie se observa un material fibrilar laxo que cubre las microvellosidades. En general, las características descritas coinciden con la descripción realizada previamente por Fallon y Austin (1967), pero el menor grado de desarrollo de la capa de gránulos corticales en nuestras muestras, nos permite sugerir que el proceso de formación de esta capa no se ha completado. Es posible interpretar que este proceso tiene lugar en el estadio de hembra epítoca.

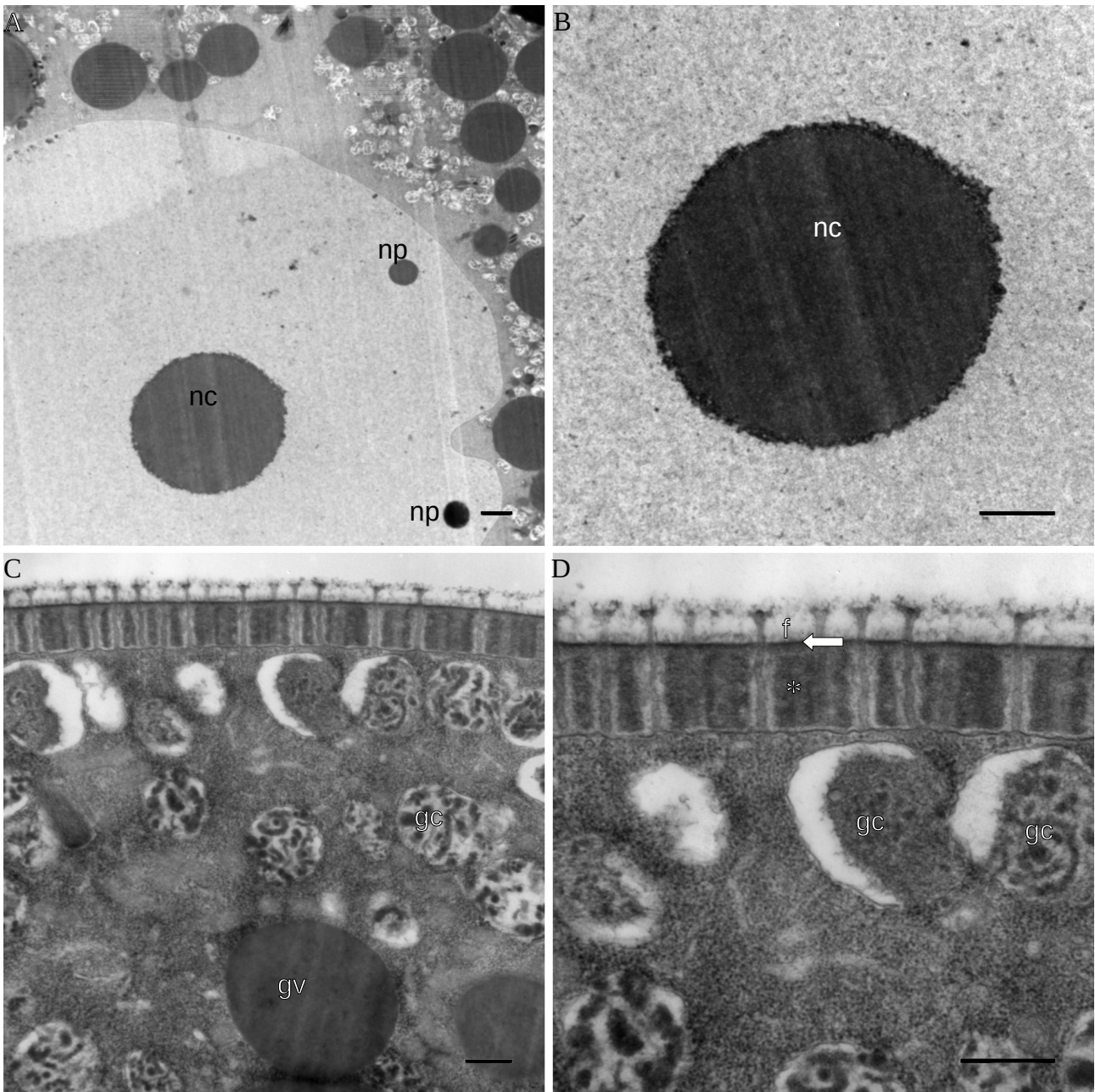


Figura 13. Características ultra-estructurales de los ovocitos maduros. Las imágenes A y B muestran la zona del núcleo. El mismo es eucromático con un gran nucléolo central (nc) y algunos nucléolos periféricos (np) de tamaño menor. En el citoplasma se encuentran gotas vitelinas (gv) con contenido homogéneo y densidad electrónica moderada, a lo que se suma la presencia de gránulos corticales (gc) con contenido heterogéneo y fibrilar (C y D). Es posible observar también las microvellosidades que se extienden por todo el espesor de la envoltura extracelular, ésta presenta una región de densidad electrónica moderada (*), una capa fina, intermedia, de mayor densidad electrónica (flecha), y una capa fibrosa superficial (f). Imágenes de MET. Las barras de escala corresponden a 2 μm en A y B, y a 500 nm en C y D. Muestras de una hembra epítoca capturada en diciembre en Punta del Chileno.

Las muestras de los machos epítocos analizadas mediante MET presentaron espermatozoides libres, sin un ordenamiento particular (Figura 14). En secuencia anteroposterior, los espermatozoides presentaron: un acrosoma con forma de cono, un núcleo ovoide y una zona de citoplasma con mitocondrias y el nacimiento del flagelo el cual es largo (Figura 14). El acrosoma presentó límites electrondensos e interior claro. Al corte fue posible visualizar que la base del acrosoma (región más próxima a la zona anterior del núcleo), presenta una invaginación profunda que finaliza próxima al extremo anterior del organelo. Como ya ha sido descrito para espermatozoides de la misma especie (Fallon y Austin 1967), así como para otras especies de nereididos (Jamieson y Rouse 1989), se observó una estructura en forma de bastón de posición axial, cuya porción anterior se ubica en la zona central de la invaginación acrosómica. La región posterior de dicho bastón se extiende hacia el interior de la porción anterior del núcleo. El núcleo, ovoide, es más largo en el corte longitudinal. La mayor parte de la cromatina se observa homogénea, con una densidad electrónica moderada e interrumpida por regiones de menor densidad electrónica y aspecto granular. En la zona posterior del núcleo, se encuentra una pequeña fosa nuclear, asociada al cuerpo basal del flagelo. El flagelo es largo, con un axonema central y dos pliegues laterales de membrana que le confieren aspecto de lámina (Figura 14 D). A los lados del nacimiento del flagelo, el citoplasma presentó mitocondrias alargadas y gránulos de alta densidad electrónica. La morfología encontrada concuerda con las descripciones realizadas por Fallon y Austin (1967) para los espermatozoides maduros de la especie.

Por otro lado, la organización en tétradas de espermatidas, que ha sido considerada como una característica general de la espermiogénesis en los nereididos (Olive 1983b) no fue observada en nuestras muestras. Observaciones realizadas en otra especie de nereidido, sugieren que la transición por los estadios de espermatocitos y espermatidas ocurre rápidamente (Geier y Hoeger 1997). Pero dado que los análisis realizados de la espermatogénesis no hacen referencia a la epitoquia, consideramos relevante analizar más muestras de machos para evaluar si los estadios de espermatocitos y espermatidas se asocian con la epitoquia o tienen lugar en el estadio átoco.

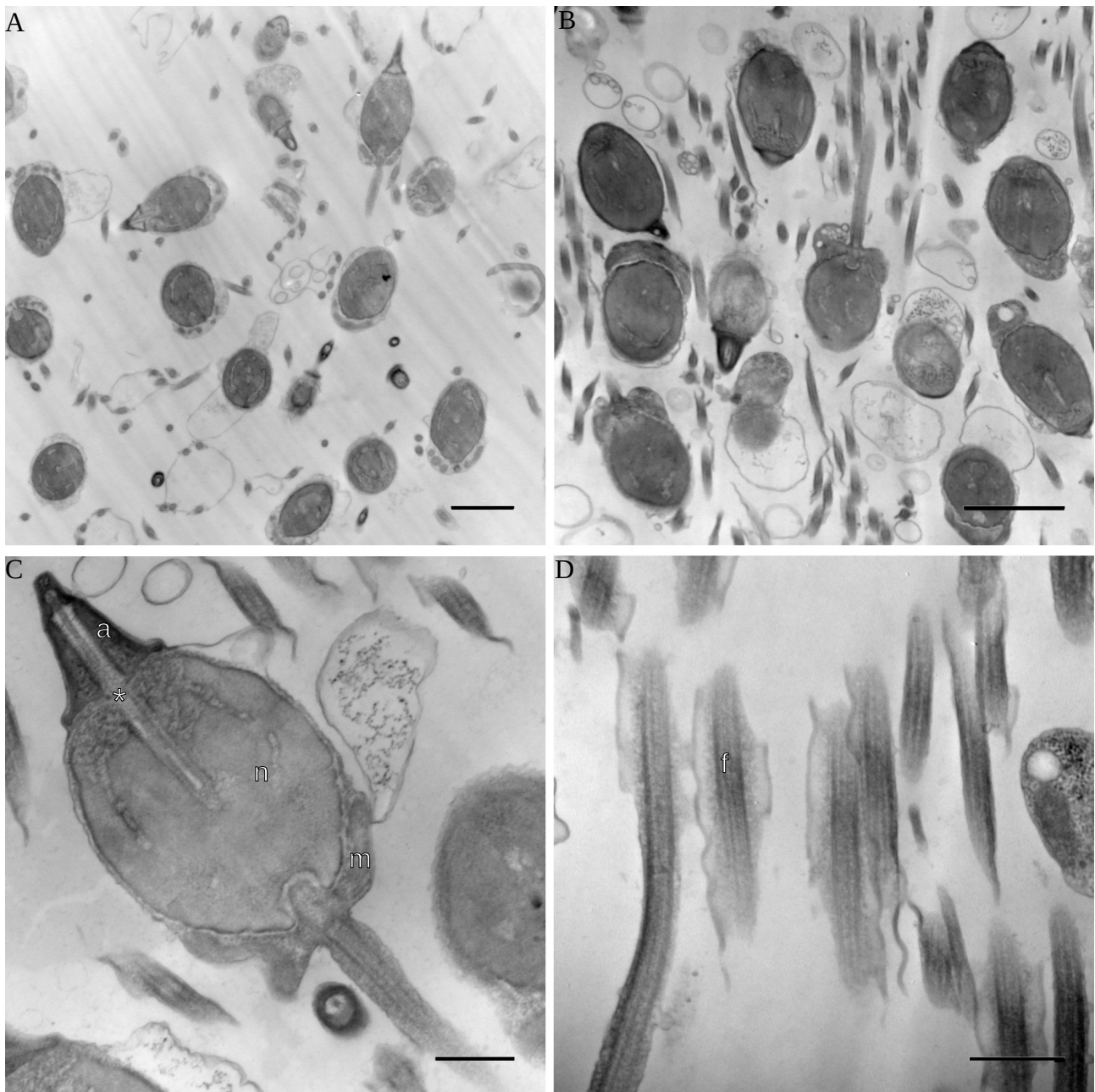


Figura 14. Características ultra-estructurales de los espermatozoides de *A. succinea*. Las imágenes A y B muestran la morfología general de los espermatozoides. Es posible observar el acrosoma, el núcleo de forma ovoide y el flagelo que nace en la zona posterior. En C se observan más claramente dichas estructuras en un corte longitudinal, a las que se suma el bastón axial (*) que se extiende por toda la longitud del acrosoma (a) y llega hasta la zona media del núcleo (n). En el citoplasma posterior se observan mitocondrias alargadas (m). En D se muestran flagelos (f) cortados longitudinalmente, mostrando el axonema central y la membrana que se proyecta lateralmente. Imágenes de MET. Las barras de escala corresponden a 2 µm en A y B, y a 500 nm en C y D. Muestras de dos machos épitocos capturados en diciembre.

VII) III. Inmuno-reactividad para GnRH en el cerebro

Se detectó ir-GnRH en el cerebro de *A. succinea* utilizando el antisuero AS203-2, con la observación de inmuno-reacción en el citoplasma de células localizadas en las porciones media y posterior del cerebro. Por otra parte, se observó también inmuno-marca en algunas otras estructuras asociadas al segundo par de ojos y a los órganos nucleares. En primer lugar, se describirá la localización de las células marcadas en el cerebro y, en segundo lugar se mencionarán las otras estructuras marcadas.

VII) III. i. Región rostral

El cerebro de los nereididos presenta una organización bilateral, con cuerpos neuronales y fibras en la región central, mientras que las células de soporte (células gliales) se encuentran en la periferia, y una cápsula fibrosa recubre todo el órgano (Golding 1992). La región rostral del cerebro se ha asociado con las funciones de procesamiento e integración de la información sensorial y da origen a los nervios ópticos anteriores, los nervios de los palpos y antenas, así como a los nervios conectivos circumesofágicos (Müller 2006; Heuer y Loesel 2008). Comenzando el análisis de cortes transversales del cerebro por esta región, se observaron neuronas marcadas, ir-GnRH a partir de la región rostral-media que se caracteriza por la presencia del primer par de ojos en los cortes. El tejido nervioso presentó una organización diferencial en las zonas lateral y medial, con neuronas marcadas en ambas localizaciones. Los cuerpos neuronales marcados en la zona lateral pueden asociarse con el núcleo 7 y los de la zona medial a los núcleos 8 y 9 (Figura 15). Los ensayos realizados sin el uso de antisuero primario, con resultado negativo, permiten interpretar que la marca es específica para el antisuero AS203-2 (Figura 15 E). Este patrón de marca se obtuvo en muestras de epítocos (hembras y machos) y hembras átoacas, con resultados negativos en los ensayos realizados para esta región del cerebro de un macho átoco. La organización de la zona medial se ve modificada en los cortes sucesivos. En la zona más rostral, los cuerpos neuronales se encontraron localizados central y ventralmente (Figura 15 A), pero avanzando hacia la región medial, los cuerpos neuronales se encontraron restringidos a la zona dorsal, con fibras en la zona central (Figura 15 B y C).

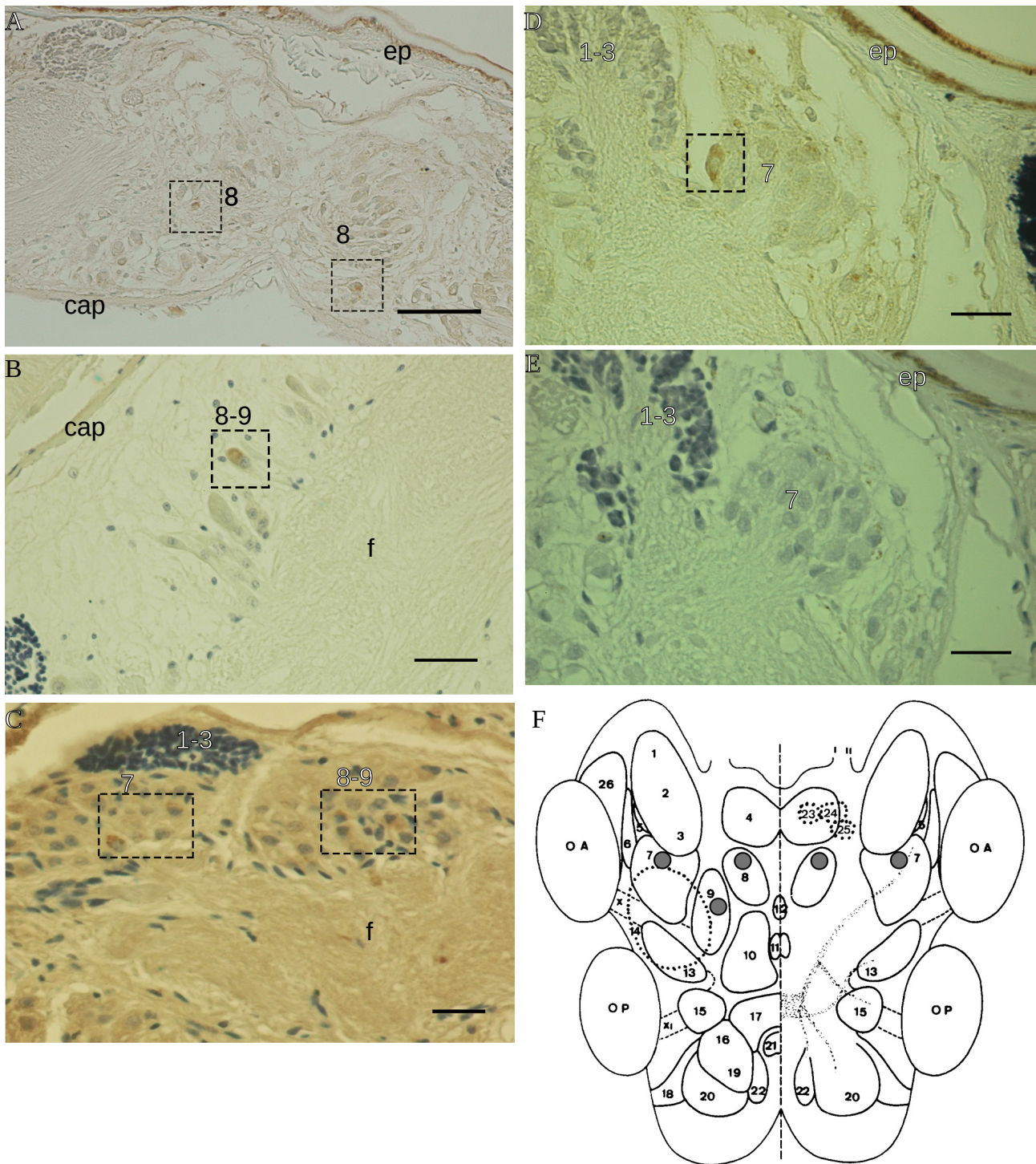


Figura 15. Ir-GnRH en la región rostral-media del cerebro: zonas medial y lateral. A-E: Micrografías de los preparados, en corte transversal. Ensayos de inmunohistoquímica con el antisuero AS203-2. Se indica la localización de las neuronas marcadas (recuadros) y se identifican los núcleos con números. A: Ir-GnRH en la zona medial ventral (zona ventral del núcleo 8). B: Neurona marcada en la zona medial dorsal (núcleos 8 o 9), por encima de la zona de fibras (f). C: Ir-GnRH en las zonas medial (núcleos 8 o 9) y lateral (núcleo 7). D: Neurona marcada en la zona lateral (núcleo 7). E: Control negativo sin el uso de antisuero primario. En general, no se observó marca en los núcleos 1-3. A, B, D y E: Muestras de epítocos hembras y machos. C: Muestra de hembra átoica. La barra de escala corresponde a 80 μm en A, a 40 μm en B y a 20 μm en C, D y E. cap: cápsula fibrosa. ep: epidermis dorsal; f: fibras. F: Representación esquemática

de los núcleos definidos previamente para el cerebro de los nereididos los cuales se identifican con números. La mitad izquierda es una vista dorsal y la mitad derecha una vista ventral. Se indica con círculos grises las zonas con neuronas ir- GnRH. OA: ojo anterior, OP: ojo posterior. Adaptado de (Engelhardt y col. 1982).

VII) III. ii. Región media: neuroendócrina

En la región media del cerebro, con el segundo par de ojos presente en los cortes, se observaron fibras en la zona central y cuerpos neuronales en las zonas dorsal y lateral. Además se observaron los nervios ópticos posteriores, que se dirigen hacia afuera del cerebro por la zona lateral y llegan al segundo par de ojos, lo que pudo ser confirmado mediante el análisis de cortes seriados. Se observó marca en neuronas localizadas en la zona lateral del cerebro, en muestras de epítocos (de ambos sexos) y de un macho átoco (Figuras 16 A y B). Las neuronas marcadas, localizadas en la zona de nacimiento de los nervios ópticos, parecen corresponder a los núcleos 13 o 15 como se indica en el esquema de la Figura 16. En particular, el núcleo 13 fue analizado previamente por Golding y Whittle (1974) con la descripción de neuronas unipolares, cuyos axones se extienden hacia la zona ventral, llegando a la base del cerebro. Ya se había observado una variedad de haces de axones que se dirigen hacia la base del cerebro en esta región, que se considera una zona de secreción neuroendócrina (Golding 1972; Golding 1974; Tessmar-Raible 2007). Sin embargo, no logramos identificar fibras marcadas en esta región. Adicionalmente, los machos epítocos, presentaron neuronas marcadas en la zona dorso-medial (Figura 16 C y D). Éstas presentaron un tamaño grande y por su ubicación, fueron identificadas como pertenecientes a los núcleos 10 o 17. No se observó marca en los ensayos realizados para esta región del cerebro de las hembras átoacas.

Utilizando cortes adyacentes, se realizó el ensayo de incubación con el antisuero AS203-2 preadsorbido con dfGnRH (Tabla 1). Como resultado general, no se observó una disminución de la coloración debida a la reacción, la cual se localizó en las mismas neuronas de la zona dorso-medial (núcleos 10 o 17), que se marcaron con el antisuero AS203-2 sin agregados (Figura 16 C y D). Este resultado es similar al obtenido por la Dra. Tsai y colaboradores (2010) cuando observaron que la preadsorción de AS203-2 con cGnRHII no afectó el resultado de la reacción, sin embargo, realizando la preadsorción con octGnRH o apGnRH se logró eliminar la marca. En nuestro caso no pudimos realizar ensayos con esos péptidos y consideramos que

deberían ser realizados en el futuro, para verificar que la marca obtenida se debe a la reacción con moléculas similares a GnRH de moluscos, presentes en el cerebro de *A. succinea*. Sin embargo, la marca pudo ser eliminada cuando se realizó el control sin la incubación con el antisuero AS203-2 como se indicó anteriormente (Figura 15 E).

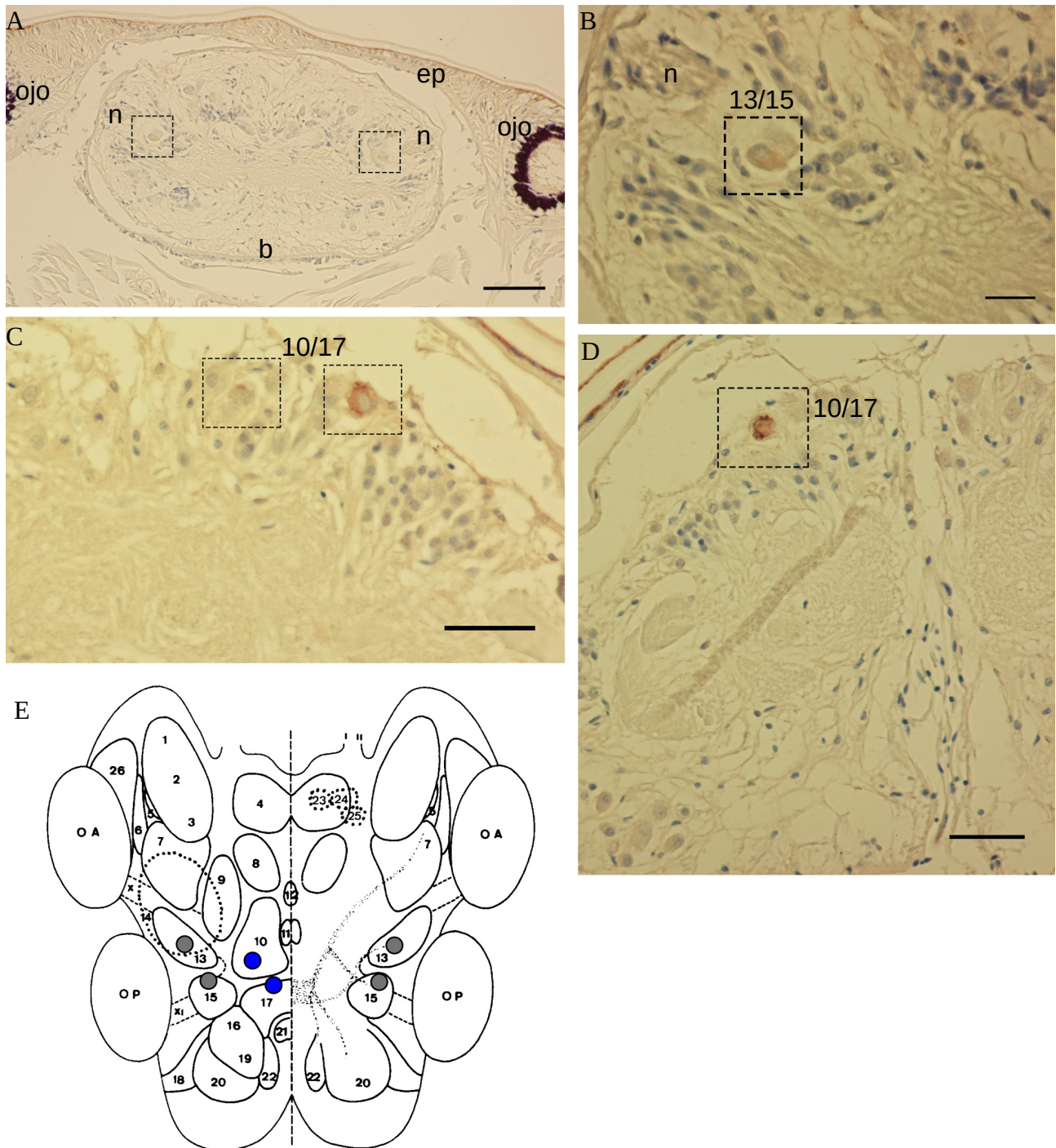


Figura 16. Ir-GnRH en la región media del cerebro. A-D: Micrografías de los preparados histológicos en corte transversal. Inmunohistoquímica con el antisuero AS203-2. Se indica la localización de las neuronas marcadas (recuadros) y se identifican los núcleos con números. A y B: Ir-GnRH en neuronas de la zona lateral (núcleos 13 o 15),

cerca del nacimiento de los nervios ópticos (n). Se indica la localización de los ojos, la epidermis dorsal (ep) y la base del cerebro (b). En B se muestra a mayor aumento una neurona marcada. C: Ir-GnRH en la zona dorso-medial (núcleos 10 o 17). D: Ensayo de incubación con el antisuero AS203-2 preadsorbido con dfGnRH, sin disminución de la marca. La barra de escala corresponde a 80 μm en A, a 20 μm en B y a 40 μm en C y D. E: Representación esquemática de los núcleos definidos previamente para el cerebro de los nereididos los cuales se identifican con números. La mitad izquierda es una vista dorsal y la mitad derecha una vista ventral. Se indica con círculos grises la localización de las neuronas ir- GnRH en los epítocos (hembras y machos), así como en un átoco macho; mientras que con círculos azules se indica la localización de las neuronas marcadas únicamente en los machos epítocos. OA: ojo anterior, OP: ojo posterior. Adaptado de (Engelhardt y col. 1982).

VII) III. iii. Región caudal: sensorial

En el extremo caudal del cerebro, que en general se ha asociado con funciones sensoriales (Engelhardt y col. 1982), los cuerpos neuronales se encontraron organizados en núcleos circulares en la zona medio-lateral. Se observaron neuronas marcadas en los núcleos 15, 20 y 22, en muestras de epítocos (hembras y machos, Figura 17). Análisis previos habían identificado diferentes morfologías neuronales en el núcleo 20, así como inmuno-reactividad para diferentes péptidos como CCK-8 (Engelhardt y col. 1982), angiotensina, oxitocina (Fewou y Dhainaut-Courtois 1995) y dinorfinas (Golding 1992). Hay evidencias claras de la liberación de dinorfinas en la base del cerebro a partir de este núcleo (Golding 1992) y es posible considerar que las neuronas del mismo participan también del sistema neuroendócrino.

Uno de los núcleos de esta región caudal, identificado con el número 19, da origen a un haz de fibras que proyecta hacia la epidermis dorsal, posterior al segundo par de ojos (Figura 17 B). A su vez, otro haz de fibras se origina en la zona lateral ventral (núcleo 18) y proyecta lateralmente hacia los órganos nucales (Figura 17 B-D). Los órganos nucales son quimio-receptores que han sido relacionados con las funciones de detección del alimento o el comportamiento reproductivo, aunque haría falta realizar estudios fisiológicos para conocer las funciones precisas (Purschke 1997). Son estructuras compuestas por células epiteliales multi-ciliadas y neuronas sensoriales primarias (Verger-Boquet 1992). Las neuronas sensoriales presentan somas pequeños que se ubican en el cerebro, mientras que sus dendritas conforman el nervio nocal, que también puede incluir prolongaciones eferentes (Whittle y Zahid 1974; Schmidtberg y Dorresteyjn 2010). Se encontraron elementos fibrilares marcados con el antisuero AS203-2 en la epidermis adyacente al segundo

par de ojos y a los órganos nucales y es posible interpretar que se trate de prolongaciones neuronales (Figura 17 C). Se observaron también algunas neuronas pequeñas marcadas en la zona del núcleo 18 (Figura 17 D). Estos resultados sugieren que las neuronas y fibras ir-GnRH podrían participar en la regulación de las funciones sensoriales relacionadas con los ojos y los órganos nucales. De forma similar, la ir-angiotensina ha sido localizada en los órganos nucales (Fewou y Dhainaut-Courtois 1995). Ya se había observado la presencia de fibras y productos de secreción acumulados en la epidermis de la zona posterior del prostomio, y es posible sugerir que al ser secretados hacia el exterior puedan actuar como feromonas (Clark 1961). Por otro lado, se ha considerado la acción de GnRH como feromona sexual en el ambiente acuático (Gorbman y col. 2003).

Sin embargo, no se analizó en detalle el extremo caudal del cerebro de los átocos y no se logró observar sus órganos nucales. En particular, el tamaño pequeño del prostomio de los átocos representó una dificultad para la etapa de obtención de los cortes histológicos. Igualmente, dado que se observaron fibras marcadas asociadas a los órganos nucales en los epítocos, nos parece interesante realizar un análisis de los órganos nucales de los individuos átocos y observar si estas fibras marcadas se encuentran igualmente desarrolladas.

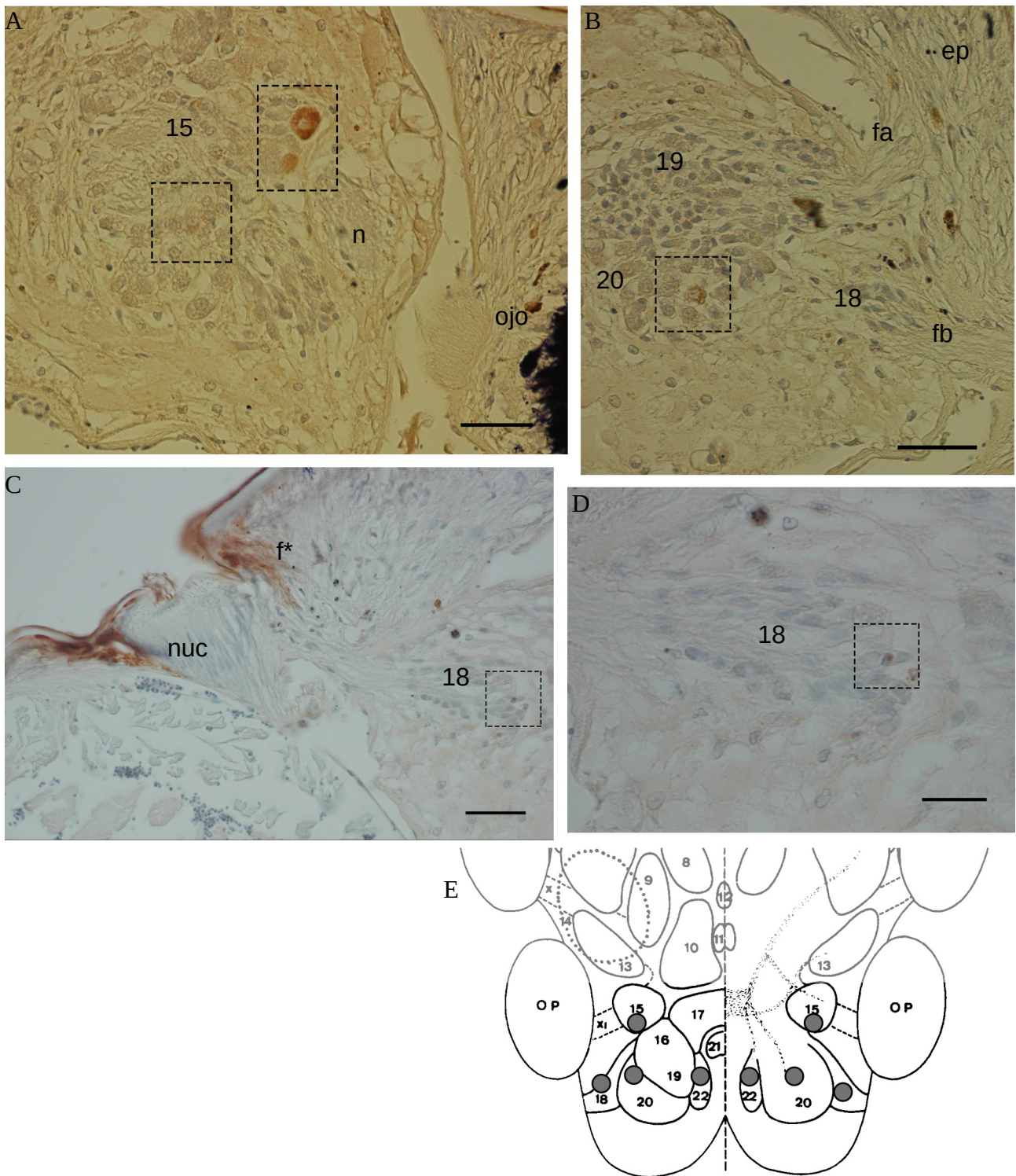


Figura 17. Ir-GnRH en la región caudal del cerebro. A-D: Micrografías de los preparados histológicos en corte transversal. Inmunohistoquímica con el antisuero AS203-2. Se indica la localización de las neuronas marcadas (recuadros) y se identifican los núcleos con números. A: Ir-GnRH en neuronas del núcleo 15, asociado al nacimiento del nervio óptico posterior (n). B: Corte más caudal con una neurona marcada en el núcleo 20. Se observa el nacimiento de fibras que se proyectan hacia la epidermis dorsal a partir del núcleo 19 (fa, ep) o hacia el órgano nucal (fb) a partir del núcleo 18. C: Ir-GnRH en la epidermis lateral a los órganos nucleares. f*: fibras marcadas. Se observaron neuronas pequeñas marcadas en la zona del núcleo 18, que se muestra a mayor aumento en D. La barra de escala corresponde a

40 μm en A, B y C, y a 20 μm en D. E: Representación esquemática de la porción caudal del cerebro; los núcleos correspondientes se identifican con números. La mitad izquierda es una vista dorsal y la mitad derecha una vista ventral. Se indica con círculos grises la localización de las neuronas ir-GnRH en los epítocos (hembra y macho). OP: ojo posterior. Adaptado de (Engelhardt y col. 1982).

VII) III. iv. Consideraciones generales sobre la ir-GnRH

En general, las neuronas marcadas con el antisuero AS203-2 son grandes, con núcleo eucromático y citoplasma expandido, morfología que ha sido asociada con la función de secreción de péptidos mediante análisis histológicos y ultra-estructurales. Sin embargo, los gránulos con contenido electrondenso, asociados a la secreción de péptidos son comunes en el cerebro de los nereididos, lo que ha impulsado a proponer que la mayoría de las neuronas secretan péptidos, los cuales pueden funcionar como neurotransmisores, neuromoduladores u hormonas (Golding 1992). Además, los análisis previos realizados con diferentes variantes de GnRH de invertebrados han considerado funciones y modos de acción diversos (Terakado 2001; Gorbman y col. 2003; Gorbman y Sower 2003; Tsai y col. 2010). La ir-GnRH encontrada en diferentes núcleos del cerebro de *A. succinea* es compatible con la interpretación de su función como neurotransmisor o neuromodulador. Por otro lado, es posible sugerir una participación en la función endócrina del cerebro por su localización en las regiones media y caudal del órgano, las cuales han sido asociadas con dicha función (núcleos 10, 13, 15 y 20; Golding 1972; Golding 1974; Golding 1992; Tessmar-Raible 2007). Sin embargo, dado que no se identificaron fibras ir-GnRH en la base del cerebro, podemos sugerir que las moléculas similares a GnRH no se encuentran en grandes cantidades en esta zona. En comparación, la ir-GnRH con apariencia fibrilar fue muy notable en la epidermis en cercanía de los ojos y los órganos nucleares. De acuerdo con esta observación, podemos sugerir una función de moléculas similares a GnRH en la regulación de funciones sensoriales. Por otra parte, es posible interpretar que moléculas similares a GnRH sean liberadas al medio externo en esta región caudal del prostomio. En esta línea, otros autores ya han considerado la función de este tipo de moléculas como feromona sexual en el ambiente acuático (Gorbman y col. 2003).

Las muestras de los individuos átocos presentaron marca en algunas de las zonas analizadas pero se obtuvieron resultados negativos en varios ensayos. Por un lado, las hembras átocas sólo presentaron

neuronas marcadas en la región rostral-media del cerebro. Por el otro lado, la muestra de macho átoco analizada presentó neuronas marcadas sólo en la zona lateral de la región media del cerebro (Figura 18). Estos resultados nos permiten sugerir que los niveles de expresión de las moléculas similares a GnRH podrían ser menores en estas muestras, lo que explicaría la dificultad para detectarlas por inmunohistoquímica.

En general, la presencia de neuronas ir-GnRH en el cerebro de los epítocos (de ambos sexos) nos permite sugerir que podrían participar en la regulación de alguno de los procesos vinculados con este estadio como: la maduración final de los gametos o el comportamiento reproductivo. Por otra parte, la ir-GnRH detectada en las neuronas de los núcleos 10 o 17 sólo en los machos epítocos sugiere que podrían existir diferencias en la distribución o el número de neuronas ir-GnRH al comparar machos y hembras epítocos (Figura 18). Esta observación, concuerda con la observación previa realizada en el nivel de transcritos para moléculas similares a GnRH en un nereidido y apoya la hipótesis de regulación neuroendócrina diferencial entre hembras y machos (Conzelmann y col. 2013).

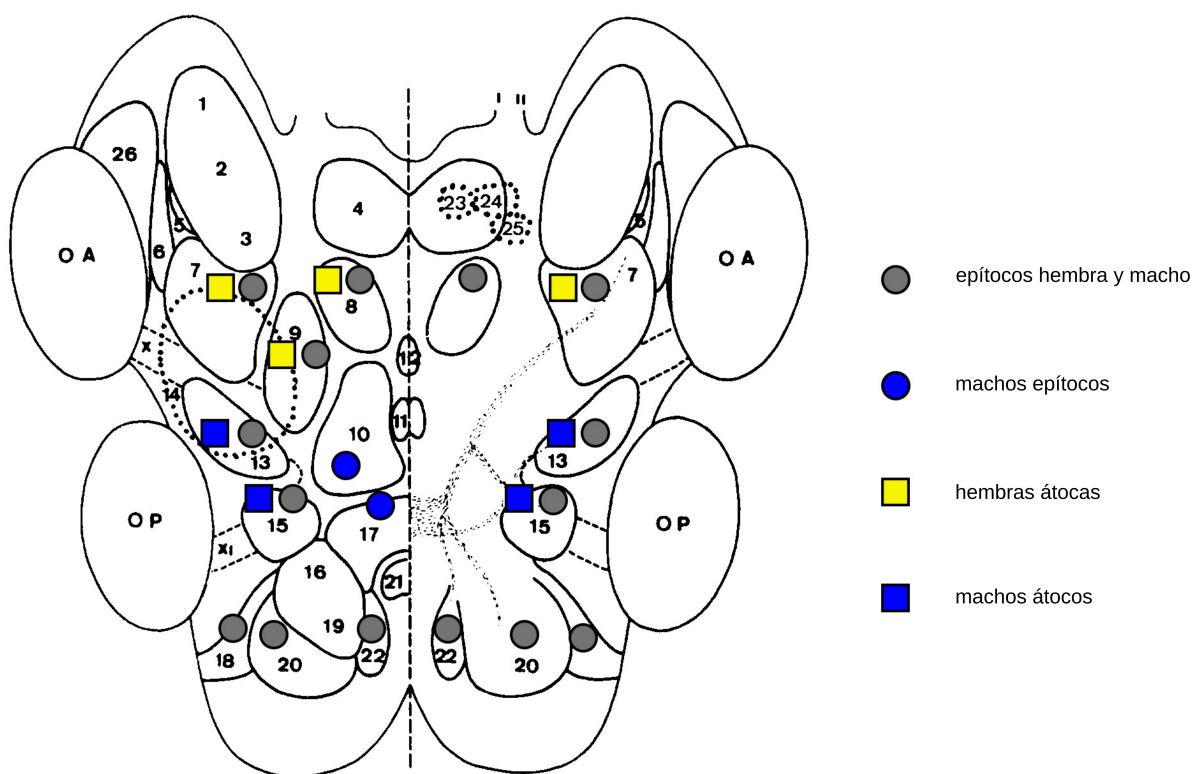


Figura 18. Localización de las células ir-GnRH en el cerebro (código de formas y colores a la derecha). Los números indican los núcleos definidos previamente por Holmgren. OA: ojo anterior; OP: ojo posterior; x: nervio óptico anterior;

xi: nervio óptico posterior. La mitad izquierda es una vista dorsal y la mitad derecha una vista ventral. Adaptado de (Engelhardt y col. 1982).

VIII) Consideraciones finales

El análisis de L3 permitió observar un aumento del tamaño medio de los individuos de *A. succinea* en el período del 24 de junio al 28 de octubre de 2015. Es posible interpretar que durante este período tuvieron lugar procesos de crecimiento de los individuos.

El análisis morfológico de la epitoquia permitió identificar individuos epítocos o en proceso de epitoquia en las muestras obtenidas del sustrato en los meses de agosto a octubre. Pero, se destaca que la proporción de epítocos fue baja, a pesar de haber realizado un importante esfuerzo de muestreo. El análisis realizado de la proporción de epítocos en las muestras nos permite sugerir una asociación del proceso de epitoquia con el aumento de la duración de los días en el período del 20 de agosto al 28 de octubre de 2015 en Punta Ballena. Por otro lado, no se encontró una relación con las variables temperatura o conductividad del agua medidas puntualmente en cada instancia de muestreo. Dado que otros autores han asociado la epitoquia de *A. succinea* con la temperatura del agua (Rasmussen 1973; Hardege y col. 1990; Fong 1991), consideramos que sería necesario realizar un análisis más completo de esta variable en el sitio de muestreo. Por otro lado, los individuos epítocos o en epitoquia presentaron tamaños mayores que los átocos. Interpretamos que la epitoquia tiene lugar en los individuos que ya han alcanzado cierto estadio avanzado de los procesos de crecimiento y gametogénesis.

El análisis histológico de muestras de la cavidad celómica permitió identificar las células germinales y algunas características de su desarrollo, las cuales fueron utilizadas para definir estadios del proceso de maduración sexual de los individuos. Realizamos observaciones que nos permiten sugerir que exista una relación de los estadios de la maduración sexual con el tamaño corporal. Consideramos que realizamos un análisis preliminar de los procesos de gametogénesis y epitoquia e identificamos algunos aspectos que podrían ser profundizados en el futuro. Encontramos interesante la identificación de los estadios de la

gametogénesis y su asociación con la morfología átoca o épitoca. En particular, identificamos un proceso de la maduración de los ovocitos, el desarrollo de la capa de alvéolos corticales, que podría tener lugar en el estadio epítoco. Por otro lado, haría falta analizar más muestras de machos para evaluar cuáles etapas de la gametogénesis se encuentran asociadas con los cambios morfológicos de la epitoquia. También observamos que los individuos indiferenciados presentaron características diversas, por lo que consideramos que podrían evidenciarse diferentes estadios o características mediante el análisis morfológico ultra-estructural (MET) de muestras de estos individuos. Por otro lado, sería necesario identificar y analizar posibles marcadores moleculares para la identificación de diferentes estadios o el sexo de los individuos en la categoría de indiferenciados.

La detección de ir-GnRH en el cerebro de *A. succinea* apoya la hipótesis de presencia de moléculas similares a GnRH en el cerebro de los nereididos. El patrón de marca observado en el cerebro de los epítocos es compatible con la interpretación de la función de este tipo de moléculas como neurotransmisores o neuromoduladores. Es posible sugerir una participación de las células y fibras ir-GnRH en los sistemas: neuroendócrino de del cerebro medio y sensorial de la región caudal. No detectamos ir-GnRH en la base del cerebro que es considerada la región de liberación de hormonas. Por otro lado, la ir-GnRH detectada en la epidermis dorsal de la región caudal del prostomio nos permite sugerir que moléculas similares a GnRH pueden ser liberadas al medio externo. Consideramos que las neuronas ir-GnRH detectadas consistentemente en el cerebro de los epítocos podrían participar en la regulación de alguno de los procesos vinculados con este estadio como la maduración final de los gametos o el desarrollo del comportamiento reproductivo. Esta hipótesis debería ser evaluada mediante ensayos experimentales en el laboratorio, los cuales podrían ser realizados con individuos capturados de la naturaleza. Por último, se realizó un análisis preliminar de la ir-GnRH en el cerebro de *A. succinea* en el estadio átoco, el cual debería ser profundizado para lograr realizar comparaciones del patrón de marca en el cerebro de átocos y epítocos.

IX) Bibliografía

- Adams, B.A., J.A. Tello, J. Erchegyi, C. Warby, D.J. Hong, K.O. Akinsanya, G.O. Mackie, W. Vale, J.E. Rivier y N.M. Sherwood. 2003. "Six novel Gonadotropin-Releasing Hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*." *Endocrinology* 144 (5): 1907–19. doi:10.1210/en.2002-0216.
- Aguiar, T.M. y C.S. Gomes-Santos. 2017. "Reproductive biology of *Alitta succinea* (Annelida: Nereididae) in a Brazilian tropical lagoon." *Invertebrate Biology* x (x): 1–12. doi:10.1111/ivb.12200.
- Argiolas, A. y M.R. Melis. 2013. "Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present : a review." *Progress in Neurobiology* 108: 80–107. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.06.006.
- Barnett, D.K., T.M. Bunnell, R.P. Millar y D.H. Abbott. 2006. "Gonadotropin-Releasing Hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys." *Endocrinology* 147 (1): 615–23. doi:10.1210/en.2005-0662.
- Barrel, G.K., S.M. Moenter, A. Caraty y F.J. Karsch. 1992. "Changes of Gonadotropin-Releasing Hormone secretion in the ewe." *Biology of Reproduction* 46 (6): 1130–35. doi:10.1095/biolreprod46.6.1130.
- Baskin, D.G. 1976. "Neurosecretion and the endocrinology of nereid polychaetes." *Amer. Zool.* 16: 107–24. doi:10.1093/icb/16.2.107.
- Bentley, M.G. y A.A. Pacey. 1992. "Physiological and environmental control of reproduction in polychaetes." *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 30: 443–81. ISSN 0078-3218.
- Bertout, M. y A. Dhainaut. 1971. "Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenese de *Nereis diversicolor* O. F. Müller (Annélide Polychete), Dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale." *General and Comparative Endocrinology* 17: 371–87. doi:10.1016/0016-6480(71)90147-X.
- Bertout, M. 1983. "Endocrine regulation of spermatogenesis in *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta): experimental study of the control of meiotic differentiation." *The Journal of Experimental Zoology* 226: 151–61. doi:10.1002/jez.1402260118.
- Blainville, H. 1818. "Mémoire sur la classe des sétipodes, partie des vers a sang rouge de M. Cuvier, et des annélides de M. Lamarck." *Bulletin Des Sciences, Par La Société Philomatique de Paris*, 78–85.
- Borthagaray, A.I. y A. Carranza. 2007. "Mussels as ecosystem engineers: their contribution to species richness in a rocky littoral community." *Acta Oecologica* 31 (3): 243–50. doi:10.1016/j.actao.2006.10.008.
- Brafield, A.E. y G. Chapman. 1967. "Gametogenesis and breeding in a natural population of *Nereis virens*." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47 (2): 619–27. doi:10.1017/S0025315400035232.
- Brazeiro, A., A.I. Borthagaray y L. Gimenez. 2006. "Patrones geográficos de diversidad bentónica en el litoral rocoso de Uruguay." En *Bases Para La Conservación Y El Manejo de La Costa Uruguaya*, editado por R. Menafrá, L. Rodríguez-Gallego, F. Scarabino y D. Conde, 171–78. Vida Silvestre Uruguay.

- Brusca, G.J. y R.C. Brusca. 2003. "Phylum Annelida: the segmented worms." En *Invertebrates*, editado por G.J. Brusca y R.C. Brusca, Segunda, 387–440. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Burgus, R., M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale y R. Guillemin. 1972. "Primary structure of the ovine hypothalamic Luteinizing Hormone-Releasing Factor (LRF)." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69 (1): 278–82. doi:10.1073/pnas.69.1.278.
- Chieffi, G. 1984. "Control of reproductive cycles in metazoa: exogenous and endogenous factors." *Bolletino Di Zoologia* 51 (1–2): 205–22. doi:10.1080/11250008409439460.
- Clark, R.B. 1961. "The origin and formation of the heteronereis." *Biological Reviews* 36 (2): 199–236. doi:10.1111/j.1469-185X.1961.tb01584.x.
- Clarke, I.J., R. Campbell, J.T. Smith, V. Prevot y S. Wray. 2012. "Neuroendocrine control of reproduction." In *Handbook of Neuroendocrinology*, edited by J. Fink, G; Pfaff, D. & Levine, 198–227. Elsevier.
- Clarke, I.J. y A. Caraty. 2013. "Kisspeptin and seasonality of reproduction." En *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*, editado por A.S. Kauffman y J.T. Smith, 411–30. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9.
- Conzelmann, M., E.A. Williams, K. Krug, M. Franz-Wachtel, B. Macek, y G. Jékely. 2013. "The Neuropeptide Complement of the Marine Annelid *Platynereis Dumerilii*." *BMC Genomics* 14 (January): 906. doi:10.1186/1471-2164-14-906.
- Dales, R.P. 1962. "The polychaete stomodeum and the inter-relationships of the families of Polychaeta." *Proceedings of the Zoological Society of London* 139 (3): 389–428. doi:10.1111/j.1469-7998.1962.tb01837.x.
- Dei Cas, E.V. y F. Mañé Garzón. 1973. "Heteronereidización en *Nereis (Neanthes) succinea* (Leuckart) en el Río de la Plata." *Trabajos Del V Congreso Latino-Americano de Zoología* tomo 1: 72–84.
- Di Cosmo, A. y C. Di Cristo. 1998. "Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF- amide and GnRH immunoreactivity." *Journal of Comparative Neurology* 398 (1): 1–12. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980817)398:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-5.
- Engelhardt, R.P., N Dhainaut-Courtois y G. Tramu. 1982. "Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm , *Nereis diversicolor* O. F. Muller." *Cell and Tissue Research* 227: 401–11. doi:10.1007/BF00210894.
- Ewer, J., S.C. Gammie y J.W. Truman. 1997. "Control of insect ecdysis by a positive-feedback endocrine system: roles of eclosion hormone and ecdysis triggering hormone." *The Journal of Experimental Biology* 200 (5): 869–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100362>.
- Fallon, J.F. y C.R. Austin. 1967. "Fine structure of gametes of *Nereis limbata* (Annelida) before and after interaction." *J. Exp. Zool.* 166: 225–42. doi:10.1002/jez.1401660205.
- Fauchald, K. y G. Rouse. 1997. "Polychaete systematics: past and present." *Zoologica Scripta* 26 (2): 71–138. doi:10.1111/j.1463-6409.1997.tb00411.x.
- Fewou, J. y N. Dhainaut-Courtois. 1995. "Research on polychaete annelid osmoregulatory peptide(s) by immunocytochemical and physiological approaches. Computer reconstruction of the brain and evidence for a role of angiotensin-like molecules in *Nereis (Hediste) diversicolor* OF Müller." *Biology of the Cell* 85 (1): 21–33. doi:10.1016/0248-4900(96)89124-6.

- Fischer, A. y A. Dhainaut. 1985. "The origin of yolk in the oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta)." *Cell and Tissue Research* 240 (1): 67–76. doi:10.1007/BF00217559.
- Fischer, A. 1974. "Stages and stage distribution in early oogenesis in the annelid, *Platynereis dumerilii*." *Cell and Tissue Research* 156 (1): 35–45. doi:10.1007/BF00220100.
- Fischer, A. y U. Hoeger. 1993. "Metabolic links between somatic sexual maturation and oogenesis in nereidid annelids—a brief review." *Invertebrate Reproduction & Development* 23 (2–3): 131–38. doi:10.1080/07924259.1993.9672304.
- Fischer, A., T. Henrich y D. Arendt. 2010. "The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida)." *Frontiers in Zoology* 7 (1): 31–39. doi:10.1186/1742-9994-7-31.
- Fong, P.P. 1991. "The effects of salinity, temperature, and photoperiod on epitokal metamorphosis in *Neanthes succinea* (Frey et Leuckart) from San Francisco Bay." *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 149: 177–90. doi:10.1016/0022-0981(91)90044-W.
- Franke, H.D. 1999. "Reproduction of the Syllidae (Annelida: Polychaeta)." *Hydrobiologia* 402 (0): 39–55. doi:88/10.1023/A:1003732307286.
- García-Alonso, J., U. Hoeger, y N. Rebscher. 2006. "Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): effect of estradiol-17beta on eleocytes." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 143 (1): 55–61. doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.022.
- García-Alonso, J. y N. Rebscher. 2005. "Estradiol signalling in *Nereis virens* reproduction." *Invertebrate Reproduction and Development* 48 (1–3): 95–100. doi:10.1080/07924259.2005.9652175.
- García-Alonso, J. 2014. "Bailando bajo la luna: zeitgeber y reproducción en poblaciones de *Alitta succinea* (Leuckart, 1847) (Polychaeta) de Uruguay." In *III Congreso Uruguayo de Zoología "Prof. Dr. Raúl Vaz Ferreira,"* 106.
- Garwood, P.R. y P.J.W. Olive, 1978. "Environmental control of reproduction in the polychaetes *Eulalia viridis* and *Harmothoe imbricata*." En *Physiology and Behaviour of Marine Organisms. Proceedings of the 12th European Symposium on Marine Biology*, editado por D.S. Mc Lusky y A.J. Berry, 331–39. Stirling, Scotland. doi:88/10.1016/B978-0-08-021548-8.50045-0.
- Geier, G.F. y U. Hoeger. 1997. "Nucleoside uptake in male germ cells of the polychaete *Nereis virens*." *Invertebrate Reproduction and Development* 31 (1–3): 75–85. doi:10.1080/07924259.1997.9672566.
- Giese, A.C. 1958. "Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates." *Annual Review in Physiology* 21 (123): 547–76. doi:10.1146/annurev.ph.21.030159.002555.
- Gillet, P. y S. Torresani. 2002. "Structure of the population and secondary production of *Hediste diversicolor* (O. F. Müller, 1776), (Polychaeta, Nereidae) in the Loire Estuary, Atlantic Coast, France." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 1–8. doi:10.1016/j.ecss.2007.07.004.
- Gillet, P., V. Surugiu, R. Vasile, I. Metais, M. Mouloud, y P. Simo. 2011. "Preliminary data on population dynamics and genetics of *Alitta succinea* (Polychaeta: Nereididae) from the Romanian Coast of the Black Sea." *Italian Journal of Zoology* 78 (October): 1–13. doi:10.1080/11250003.2011.593347.
- Glasby, C. J. 1986. "Population structure and reproductive biology of *Ceratonereis limnetica* (Polychaeta: Nereididae) at Lower Portland, Hawkesbury River, Australia." *Marine Biology* 90 (4): 589–95. doi:88/10.1007/BF00409279.

- Goldberg, J.I., R. Garofalo, C.J. Price, y J.P. Chang. 1993. "Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivoluis*." *Journal of Comparative Neurology* 336 (4): 571–82. doi:10.1002/cne.903360409.
- Golding, D.W. y A.C. Whittle. 1974. "Neurons with secretory end-feet. A probable neuroendocrine complex in *Nereis*." *Tissue & Cell* 6 (4): 599–611.
- Golding, D.W. 1992. "Polychaeta: nervous system." En *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 7 Annelida*, editado por F.W. Harrison y S.L. Gardiner, 153–79. New York.
- Golding, DW. 1972. "Studies in the comparative neuroendocrinology of polychaete reproduction." *General and Comparative Endocrinology* 3: 580–90. doi:10.1016/0016-6480(72)90189-X.
- Golding, D.W. 1974. "A survey of neuroendocrine phenomena in non-arthropod invertebrates." *Biological Reviews* 49 (2): 161–224. doi:10.1111/j.1469-185X.1974.tb01573.x.
- Goodson, J.L., C.J. Saldanha, T.P. Hahn y K.K Soma. 2005. "Recent advances in behavioral neuroendocrinology: insights from studies on birds." *Hormones and Behavior* 48 (4): 461–73. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.04.005.
- Gorbman, A, y S.A. Sower. 2003. "Evolution of the role of GnRH in animal (metazoan) biology." *General and Comparative Endocrinology* 134 (3): 207–13. doi:10.1016/j.ygcen.2003.09.018.
- Gorbman, A., A. Whiteley, y S. Kavanaugh. 2003. "Pheromonal stimulation of spawning release of gametes by Gonadotropin Releasing Hormone in the chiton, *Mopalia* sp." *General and Comparative Endocrinology* 131 (1): 62–65. doi:10.1016/S0016-6480(02)00647-0.
- Guilgur, L.G., N.P. Moncaut, A.V.M. Canário y G.M. Somoza. 2006. "Evolution of GnRH ligands and receptors in Gnathostomata." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 144 (3): 272–83. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.016.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper y P.D. Ryan. 2001. "PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis." *Palaeontologia Electronica*. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hardege, J.D., E. Zeeck y F.T. Grimm. 1990. "Induction of swarming of *Nereis succinea*." *Marine Biology* 104: 291–95. doi:10.1007/BF01313270.
- Hartenstein, V. 2006. "The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective." *Journal of Endocrinology* 190 (3): 555–70. doi:10.1677/joe.1.06964.
- Hayat, M.A. 2000. *Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications*. Edited by M.A. Hayat. Cuarta. New York: Cambridge University Press.
- Heuer, C.M. y R. Loesel. 2008. "Immunofluorescence analysis of the internal brain anatomy of *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Annelida)." *Cell and Tissue Research* 331 (3): 713–24. doi:10.1007/s00441-007-0535-y.
- Heurteaux, P. 1988. "Mesure de la salinité des eaux naturelles en hydrologie et en hydrobiologie." *Ecologia Mediterranea* XIV (3–4): 149–66.
- Ikegami, K. y T. Yoshimura. 2016. "Comparative analysis reveals the underlying mechanism of vertebrate seasonal reproduction." *General and Comparative Endocrinology* 227. Elsevier: 64–68. doi:10.1016/j.ygcen.2015.05.009.

- Iwakoshi, E., K. Takuwa-Kuroda, Y. Fujisawa, M. Hisada, K. Ukena, K. Tsutsui, y H. Minakata. 2002. "Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291 (5): 1187–93. doi:10.1006/bbrc.2002.6594.
- Iwakoshi-Ukena, E., K. Ukena, K. Takuwa-Kuroda, A. Kanda, K. Tsutsui y Minakata, H. 2004. "Expression and distribution of *Octopus* Gonadotropin-Releasing Hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by *in situ* hybridization and immunohistochemistry." *Journal of Comparative Neurology* 477 (3): 310–23. doi:10.1002/cne.20260.
- Jamieson, B.G.M. y G.W. Rouse, 1989. "The spermatozoa of the polychaeta (Annelida): an ultrastructural review." *Biological Reviews* 64: 93–157. doi:10.1111/j.1469-185X.1989.tb00673.x.
- Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L.G. Guilgur, C. Vaillant y J.J. Lareyre. 2007. "GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective." *General and Comparative Endocrinology* 153 (1–3): 346–64. doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.030.
- Kanda, S. y Y. Oka. 2013. "Structure, synthesis and phylogeny of kisspeptin and its receptor." En *Kisspeptin signaling in reproductive biology*, editado por A.S. Kauffman y J.T. Smith, 9–26. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9.
- Kanda, A., T. Takahashi, H. Satake y H. Minakata. 2006. "Molecular and functional characterization of a novel Gonadotropin-Releasing-Hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*)." *Biochemical Journal* 395 (1): 125–35. doi:10.1042/BJ20051615.
- Kawamoto, K., S. Tanaka, M. Kawano, T. Hayashi y K. Tsuchiya. 2000. "Effects of photoperiod and ambient temperature on the Gonadotropin-Releasing Hormone neuronal system in the gray hamster, *Tscherskia triton*." *Neuroendocrinology* 72: 284–92. doi:10.1016/j.ygcen.2015.05.009.
- Kelsall, R., I.R. Coe y N.M. Sherwood. 1990. "Phylogeny and ontogeny of Gonadotropin-Releasing Hormone: comparison of guinea pig, rat and protochordate." *General and Comparative Endocrinology* 78 (3): 479–94. doi:10.1016/0016-6480(90)90037-M.
- Kriegsfeld, L.J., A.G. Trasy y R.J. Nelson. 2000. "Temperature and photoperiod interact to affect reproduction and GnRH synthesis in male prairie voles." *Journal of Neuroendocrinology* 12 (6): 553–58. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00485.x.
- Last, K.S. y P.J.W. Olive. 1999. "Photoperiodic control of growth and segmentation by *Nereis* (*Neathes*) *virens* in relation to state of maturity and season." *Marine Biology* 134 (1): 191–99. doi:88/10.1007/s002270050537.
- Leuckart, R. 1847. "Verzeichniss der zur fauna Helgoland's Gehörenden Wirbellosen Seethiere." En *Beiträge Zur Kenntniss Wirbelloser Thiere*, editado por H. Frey y R. Leuckart, 136–68. Braunschweig, Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und sohn.
- Levine, J.E. 2012. "An introduction to neuroendocrine systems." En *Handbook of Neuroendocrinology*, editado por G. Fink, D. Pfaff y J.E. Levine, Primera, 3–18. Elsevier.
- Li, S., Y.C. Ouyang, E. Ostrowski, y D.W. Borst. 2005. "Allatotropin regulation of juvenile hormone synthesis by the corpora allata from the lubber grasshopper, *Romalea microptera*." *Peptides* 26 (1): 63–72. doi:10.1016/j.peptides.2004.08.023.
- Lillie, F.R. y E.E. Just. 1913. "Breeding habits of the heteronereis from of *Nereis limbata* at Woods Hole, Mass." *Biological Bulletin* 24: 147–60. doi:10.1086/BBLv24n3p147.

- Lillie, F.R. 1911. "Studies of fertilization in *Nereis*. I. The cortical changes in the egg; II. Partial fertilization." *Journal of Morphology* 22 (2): 362–93. doi:10.1002/jmor.1050220208.
- Lovejoy, D.S., W.H. Fischer, S. Ngamvongchon, A.G. Craig, C.S. Nahorniak, R.E. Peter, J.E. Rivier y N.M. Sherwood. 1992. "Distinct sequence of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 6373–77. doi:10.1073/pnas.89.14.6373.
- Matsuo, H., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura, y A.V. Schally. 1971. "Structure of the porcine LH- and FSH-Releasing Hormone. I. The proposed amino acid sequence." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43 (6): 1334–39. doi:10.1016/S0006-291X(71)80019-0.
- Miranda, L.A., C.A. Strüssmann y Somoza, G.M. 2009. "Effects of light and temperature conditions on the expression of GnRH and GtH genes and levels of plasma steroids in *Odontesthes bonariensis* females." *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 101–8. doi:10.1007/s10695-008-9232-3.
- Moss, R.L. y S.M. Mc Cann. 1973. "Induction of mating behavior in rats by Luteinizing Hormone-Release Factor." *Science* 181: 177–79. doi:10.1126/science.181.4095.177.
- Müller, M.C.M. 2006. "Polychaete nervous systems: ground pattern and variations - cLS microscopy and the importance of novel characteristics in phylogenetic analysis." *Integrative and Comparative Biology* 46 (2): 125–33. doi:10.1093/icb/icj017.
- Neuhoff, H.G. 1979. "Effects of seasonally varying factors on a *Nereis succinea* population (Polychaeta, Annelida)." *Marine Ecology Progress Series* 1: 263–68. doi:10.3354/meps001263.
- Okubo, K. y Y. Nagahama. 2008. "Structural and functional evolution of Gonadotropin-Releasing Hormone in vertebrates." *Acta Physiologica* 193 (1): 3–15. doi:10.1111/j.1748-1716.2008.01832.x.
- Olive, P.J.W., S.W. Rees y A. Djunaendi. 1998. "Influence of photoperiod and temperature on oocyte growth in the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens*." *Mar Ecol Prog Ser* 172: 169–83.
- Olive, P.J.W., y P R. Garwood. 1981. "Gametogenic cycle and population structure of *Nereis (Hediste) diversicolor* and *Nereis (Nereis) pelagica* from northeast England." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 61 (1): 193–213. doi:10.1017/S0025315400046014.
- Olive, P.J.W. 1983a. "Annelida-Polychaeta." En *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I: Oogenesis, Oviposition and Oosorption*, editado por K.G Adiyodi y R.G. Adiyodi, 357–422. John Wiley & Sons Ltd.
- . 1983b. "Annelida-Polychaeta." En *Reproductive Biology of Invertebrates. Volume II: Spermatogenesis and Sperm Function*, editado por K.G Adiyodi y R.G. Adiyodi, 321–42. John Wiley & Sons Ltd.
- . 1995. "Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony." *Journal of Thermal Biology* 20 (1–2): 79–90. doi:10.1016/0306-4565(94)00030-M.
- Onitsuka, C., A. Yamaguchi, H. Kanamaru, S. Oikawa, T. Takeda y M. Matsuyama. 2009. "Molecular cloning and expression analysis of a GnRH-like dodecapeptide in the swordtip squid, *Loligo edulis*." *Zoological Science* 26 (3): 203–8. doi:10.2108/zsj.26.203.

- Orton, J.H. 1920. "Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 12 (2): 339–66. doi:10.1017/S0025315400000102.
- Peixoto, A.J.M. y C.S.G. Santos. 2016. "Reproductive biology of *Perinereis anderssoni* (Polychaeta: Nereididae) in a subtropical Atlantic Beach." *Invertebrate reproduction & Development* 60 (3): 201–11. doi:10.1080/07924259.2016.1194333.
- Pérez-Sirkin, D.I., A.G. Lafont, N. Kamech, G.M. Somoza, P.G. Vissio y S. Dufour. 2017. "Conservation of three-dimensional helix-loop-helix structure through the vertebrate lineage reopens the cold case of Gonadotropin-Releasing Hormone-Associated Peptide." *Frontiers in Endocrinology* 8 (207): 1–12. doi:10.3389/fendo.2017.00207.
- Powell, J.F., S.M. Reska-Skinner, M.O. Prakash, W.H. Fischer, M. Park, J.E. Rivier, A.G. Craig, G.O. Mackie y N.M. Sherwood. 1996. "Two new forms of Gonadotropin-Releasing Hormone in a protochordate and the evolutionary implications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 (19): 10461–64. doi:10.1073/pnas.93.19.10461.
- Purschke, G. 1997. "Ultrastructure of nuchal organs in polychaetes (Annelida) - new results and review." *Acta Zoologica* 78 (2): 123–43. doi:10.1111/j.1463-6395.1997.tb01133.x.
- Rasmussen, E. 1973. "Systematics and ecology of the Isefjord marine fauna (Denmark)." *Ophelia* 11 (1): 1–507. doi:10.1080/00785326.1973.10430115.
- Rebscher, N., F. Zelada-González, T.U. Banisch, F. Raible y D. Arendt. 2007. "Vasa unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*." *Developmental Biology* 306 (2): 599–611. doi:10.1016/j.ydbio.2007.03.521.
- Reynolds, E.S. 1963. "The use of lead citrate stain at high pH in electron microscopy." *Journal of Cell Biology* 17: 208. doi:10.1083/jcb.17.1.208.
- Riddiford, L.M. 1994. "Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone I. General considerations and premetamorphic actions." *Advances in Insect Physiology* 24: 213–74. doi:10.1016/S0065-2806(08)60084-3.
- Roosen-Runge, E.C. 1977. "Various invertebrate phyla." En *The Process of Spermatogenesis in Animals*, 83–101. Cambridge University Press.
- Salzet, M. 2001. "The neuroendocrine system of annelids." *Can. J. Zool.* 79: 175–91. doi:10.1139/cjz-79-2-175.
- Schally, A.V., A. Arimura, Y. Baba, R.M.G. Nair, H. Matsuo, T.W. Redding, L. Debeljuk, y W.F. White. 1971. "Isolation and properties of the FSH and LH-Releasing Hormone." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43 (2): 393–99. doi:10.1016/0006-291X(71)90766-2.
- Schenk, S., C. Krauditsch, P. Frühauf, C. Gerner y F. Raible. 2016. "Discovery of methylfarnesoate as the annelid brain hormone reveals an ancient role of sesquiterpenoids in reproduction." *eLife* 5: 1–23. doi:10.7554/eLife.17126.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch y col. 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.

- Schmidtberg, H. y A.W.C. Dorresteijn. 2010. "Ultrastructure of the nuchal organs in the polychaete *Platynereis dumerilii* (Annelida, Nereididae)." *Invertebrate Biology* 129 (3): 252–65. doi:10.1111/j.1744-7410.2010.00201.x.
- Sette, C.S.C., R.A. Shinozaki-Mendes, T.L. Barros y J.R.B. Souza. 2013. "Age and growth of *Alitta succinea* (Polychaeta; Nereididae) in a tropical estuary of Brazil." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93 (8): 2123–28. doi:10.1017/S0025315413000854.
- Seeburg, P.H. y J.P. Adelman. 1984. "Characterization of cDNA for Precursor of Human Lutenizing Hormone Releasing Hormone." *Nature* 311 (18): 666–68. doi:10.1038/311666a0.
- Stephenson, T.A. y A. Stephenson. 1949. "The universal features of zonation between tide-marks on rocky coasts." *Journal of Ecology* 37 (2): 289–305. doi:10.2307/2256610.
- Struck, T.H., C. Paul, N. Hill, S. Hartmann, C. Hösel, M. Kube, B. Lieb y col. 2011. "Phylogenomic analyses unravel annelid evolution." *Nature* 471 (7336): 95–98. doi:10.1038/nature09864.
- Terakado, K. 2001. "Induction of camete release by Gonadotropin-Releasing Hormone in a protochordate, *Ciona intestinalis*." *General and Comparative Endocrinology* 124 (3): 277–84. doi:10.1006/gcen.2001.7728.
- Tessmar-Raible, K. 2007. "The evolution of neurosecretory centers in bilaterian forebrains: insights from protostomes." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18 (4): 492–501. doi:10.1016/j.semcdb.2007.04.007.
- Tovar-Bohórquez, M.O., A.S. Mechaly, M. Elisio, T. Chalde, L. F. Canosa, L.A. Miranda, y G.M. Somoza. 2017. "Kisspeptins and their receptors in the brain-pituitary-gonadal axis of *Odonthestes bonariensis*: Their relationship with gametogenesis along the reproductive cycle." *General and Comparative Endocrinology* 252: 209–18. doi:10.1016/j.ygcen.2017.06.028.
- Treadwell, A.L. 1923. "The heteroneris phase of a new species of a polychaetous annelid from Uruguay." *Proceedings U.S. National Museum* 64 (2499): 1–4.
- Tsai, P.S. y L. Zhang. 2008. "The emergence and loss of Gonadotropin-Releasing Hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure and function." *Biology of Reproduction* 79 (5): 798–805. doi:10.1095/biolreprod.108.070185.
- Tsai, P.S., B. Sun, J.R. Rochester y N.L. Wayne. 2010. "Gonadotropin-Releasing Hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*." *General and Comparative Endocrinology* 166 (2): 280–88. doi:10.1016/j.ygcen.2009.09.009.
- Veenstra, J.A. 2011. "Neuropeptide evolution: neurohormones and neuropeptides predicted from the genomes of *Capitella teleta* and *Helobdella robusta*." *General and Comparative Endocrinology* 171 (2). Elsevier Inc.: 160–75. doi:10.1016/j.ygcen.2011.01.005.
- Verger-Boquet, M. 1992. "Polychaeta: sensory structures." En *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 7 Annelida*, editado por F.W. Harrison y S.L. Gardiner, 181–96. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Volkoff, H. y R.E. Peter. 1999. "Actions of two forms of Gonadotropin Releasing Hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*." *Gen. Comp. Endocrinol.* 116: 347–55. doi:10.1006/gcen.1999.7377.

- Watson, M.L. 1958. "Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4 (4): 475–78. doi:10.1083/jcb.4.4.475.
- Wells, M.J. y J.Wells. 1959. "Hormonal control of sexual maturity in *Octopus*." *Exp. Biol.* 36 (1): 1–33. ISSN 1477-9145.
- Westheide, W. 1997. "The direction of evolution within the Polychaeta." *Journal of Natural History* 31: 1–15. doi:10.1080/00222939700770011.
- Whittle, A.C. y Z.R. Zahid. 1974. "Fine structure of nuchal organs in some errant polychaetous annelids." *Journal of Morphology* 144 (2): 167–84. doi:10.1002/jmor.1051440204.
- Wyatt, G.R. y K.G. Davey. 1996. "Cellular and molecular actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in adult insects." *Advances in Insect Physiology* 26: 1–155. doi:10.1016/S0065-2806(08)60030-2.
- Zhang, L., J.A. Tello, W. Zhang y P.S. Tsai. 2008. "Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a Gonadotropin-Releasing Hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*." *General and Comparative Endocrinology* 156 (2): 201–9. doi:10.1016/j.ygcen.2007.11.015.