

PEDECIBA BIOLOGÍA – NEUROCIENCIA
TESIS DE MAESTRÍA

Estudio de la neuroplasticidad en peces del género
Austrolebias frente a cambios en la luminosidad



Inés Berrosteguieta

Orientadora: Dra. Anabel Fernández

Co-orientador: Dr. Carlos Passos

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Diciembre 2020

Agradecimientos

A mi orientadora Anabel, que desde el 2013 me viene guiando en este camino sin fin que es el aprendizaje y la creación de la ciencia. A mi cotutor Caco que me introdujo al mundo de la etología y me enseñó mucho.

A mis compañeros de Laboratorio del IIBCE que siempre están ahí ya sea para cambiar el agua de una pecera, sostener un pez mientras lo inyecto o recordarme por décima vez la concentración de la gelatina-albúmina, Maxito, Laurita y JC. También a los compas de mi segundo lab en Ciencias, Fede, Andrés y Nicolás.

A mi familia, que siempre me apoya para seguir avanzando, especialmente a mi madre. Finalmente, a mis amigos que me bancaron mil canceladas de planes porque “estoy con la tesis” y me aguantaron la cabeza en varias ocasiones.

Resumen

El género *Austrolebias* presenta un ciclo de vida anual, enfrentándose a cambios ambientales extremos a lo largo de su vida, siendo uno de ellos la disminución de la luminosidad, producto del aumento de la turbidez en el charco en plena época reproductiva. Esta tesis se propone responder si los cambios lumínicos propios de su hábitat, generan modificaciones que desencadenan una plasticidad adaptativa. Los antecedentes sobre neurogénesis en estructuras sensoriales como el bulbo olfatorio (BO), tectum óptico (TO), *torus longitudinalis* (TL) y retina, sumado a la utilización de pistas químicas y olfativas para distinguir al homoespecífico, convierten a las *Austrolebias* en un excelente modelo para estudiar la plasticidad frente a cambios en la luminosidad.

Con el fin de comprender si los cambios lumínicos generan procesos plásticos tanto en estructuras sensoriales relacionadas con la visión y olfacción, así como cambios comportamentales, se realizaron dos abordajes variando las condiciones de luminosidad: 1. un análisis en la proliferación celular mediante marcadores como BrdU (Bromo-desoxiuridina), CldU (cloro-desoxiuridina) e IdU (Iodo-desoxiuridina), en estructuras sensoriales como retina, BO, TO y TL; 2. ensayos comportamentales que evalúan la capacidad de las hembras de distinguir al homoespecífico utilizando el sentido de la visión u olfacción. Este trabajo fue realizado en adultos de dos especies: *Austrolebias reicherti* y *charrua*.

La cuantificación y análisis estadístico de los núcleos proliferantes en *A. reicherti* mostró que: los peces mantenidos en oscuridad presentaron mayor proliferación en el BO y menor proliferación en el TO y TL, respecto a los criados en luz natural. La retina de *A. charrua* mostró un mayor número de células proliferantes en la zona marginal ciliar (ZMC) y su zona contigua, en aquellos peces criados en oscuridad.

Así mismo en *A. reicherti*, en un ensayo para testear la visión, las hembras criadas en condiciones de luz natural fueron más acertadas distinguiendo al homoespecífico que aquellas criadas en condiciones de oscuridad. De igual forma, en un ensayo para testear la olfacción, las hembras criadas en condiciones de oscuridad fueron más acertadas que aquellas criadas en luz natural, en distinguir al homoespecífico.

Los resultados de esta tesis ponen en evidencia una capacidad adaptativa que produce modificaciones en la proliferación celular, indicando una compensación sensorial acompañada de cambios en la actividad comportamental. Estos datos sugieren la existencia de un fenómeno plástico adaptativo que podría aumentar la sobrevivencia de la especie, así como disminuir procesos de hibridación.

Índice

Abreviaturas.....	6
Introducción.....	8
Hipótesis y objetivos.....	23
Capítulo 1: Proliferación celular en retina de <i>A. charrua</i> criados en diferentes condiciones lumínicas.....	26
Materiales y métodos.....	27
Resultados.....	34
Discusión.....	40
Capítulo 2: Proliferación celular en TO, TL y BO de <i>A. reicherti</i> criadas en diferentes condiciones lumínicas.....	44
Materiales y métodos.....	45
Resultados.....	50
Discusión.....	57
Capítulo 3: Ensayos comportamentales de agudeza sensitiva en hembras <i>A. reicherti</i> criadas en condiciones lumínicas diferentes.....	60
Materiales y métodos.....	61
Resultados.....	65
Discusión.....	69
Discusión y conclusiones generales	73
Conclusiones.....	75
Perspectivas.....	76
Bibliografía.....	77
Contribuciones.....	92

Abreviaturas

BF: buffer fosfato

BFT: buffer fosfato tritón

BMR: banda migratoria rostral

BO: bulbo olfatorio

BOzv: zona ventricular del bulbo olfatorio

BrdU: bromodesoxiuridina

CldU: clorodesoxiuridina

CCE: capa celular externa

CCI: capa celular interna

ECL: capa celular externa

GL: capa glomerular

ICL: capa celular interna

IdU: iododesoxiuridina

LV: luz ventricular

NT: nervio terminal

MOT: tracto olfatorio medial

PAF: paraformaldehído

Tel: telencéfalo

TeV: ventrículo tectal

TL: *torus longitudinalis*

TO: tectum óptico

ZMC: zona marginal ciliar

ZMT: zona marginal tectal

Estudio de la neuroplasticidad en peces del género *Austrolebias* frente a cambios en la luminosidad

ZMTd: zona marginal tectal dorsal

ZMTv: zona marginal tectal ventral

ZSG: zona subgranular

ZSV: zona subventricular

Introducción

Diversidad en teleósteos

El encéfalo de los vertebrados puede variar en tamaño desde unos pocos miligramos hasta más de 10kg. La variación de los encéfalos es de gran interés por su potencial relación funcional con la performance comportamental y cognitiva, esto además se cree permite diversificación adaptativa que genera que las poblaciones colonicen hábitats novedosos (Striedter, 2005). Los peces teleósteos aparecen a mediados de la era Mesozoica y para el final de la misma, ya eran el tipo de pez dominante (Romer, 1959). En la actualidad presentan más de 26000 especies, lo que los convierte en el linaje más grande de todos los grupos vertebrados. Se propone que la generación de tal diversidad en un período relativamente corto de tiempo se debe a dos factores desencadenantes. El primero consiste en un cambio en el programa genético de desarrollo en un ancestro común, en donde ocurrió una duplicación entera del genoma (Furutani-Seikia & Wittbrodr, 2004; Ohno, 2013). El segundo desencadenante son los cambios ambientales que generan hábitats favorables para las especies emergentes, nuevos nichos ecológicos y oportunidades para los descendientes, lo que puede haber provocado una radiación importante. La combinación de estas causas, extrínseca e intrínseca, parecerían ser cruciales para esta diversificación (Ito et al., 2007). Esta enorme variedad de nichos ecológicos habitados por los teleósteos implica y conlleva a una gran capacidad de adaptabilidad por su parte, esto se ve reflejado en las características anatómicas y fisiológicas de las especies, pudiendo desarrollar estructuras muy distintas. Su capacidad de adaptarse está íntimamente relacionada con el abanico de sentidos que han desarrollado los teleósteos.

Generalidades del encéfalo en teleósteos

El encéfalo en teleósteos comparte las tres subdivisiones generales con los demás vertebrados, el 1. prosencéfalo: compuesto por el telencéfalo (bulbos olfatorios (BO) y lóbulos telencefálicos) y el diencéfalo (tálamo e hipotálamo); el 2. mesencéfalo (tectum óptico (TO)) y el 3. rombencéfalo: compuesto por el metencéfalo (cerebelo y la protuberancia) y el mielencéfalo (médula espinal) (Figura 1).

Áreas específicas o combinaciones de áreas, procesan distintos tipos de información. Estudios en donde se lesionan distintas partes del encéfalo en peces, contribuyen a la comprensión de los aspectos funcionales de las distintas regiones (Salas et al., 1996; Portavella et al., 2002; Folgueira et al., 2004a y 2004b; Broglio et al., 2005; Rodríguez et al., 2005; Salas et al., 2006; Broglio et al., 2010). El tamaño relativo de algunas regiones del encéfalo es generalmente asociado a condiciones ambientales que requieren habilidades sensoriales particulares (Clutton-Brock & Harvey, 1980; Kotrschal & Junger, 1988; Schellart, 1991; Kotrschal & Palzenberger, 1992; Van Staaden et al., 1994).

Esta tesis centra su estudio en estructuras del sistema nervioso específicas relacionadas con la visión: el TO, *torus longitudinalis* (TL), retina y la olfacción: el BO. Tales estructuras, así como su relación, serán explicadas más adelante.

Variedad encefálica en teleósteos en relación a condiciones ecológicas

Una forma de evidenciar cómo los diferentes hábitats moldean las características de las especies es estudiar sus estructuras encefálicas. Como mencionan Ito y colaboradores (2007), distintos nichos ecológicos tienen la capacidad de moldear las estructuras encefálicas, en donde como resultado evolutivo se obtienen estructuras más o menos desarrolladas. En la Figura 1 se observan distintos niveles de desarrollo de las estructuras encefálicas según los hábitos de vida determinados por las condiciones ecológicas, de diferentes especies. La especie *Gymnothorax kidako*, de hábitos nocturnos utiliza la olfacción para capturar sus presas, esto se refleja en un bulbo olfatorio (BO) extremadamente desarrollado (Figura 1.A). La especie *Stephanolepis cirrhifer*, habita en fondos arenosos de costas poco profundas y los individuos se comunican entre sí cambiando la posición de la primera aleta dorsal y el patrón de colores de su cuerpo, para alcanzar dicha agudeza visual la especie tiene un TO de gran tamaño (Figura 1.B). La especie *Prionurus scalprum* vive en arrecifes en cardúmenes de cientos de peces y presenta patrones comportamentales complejos, para lograr el nado sincrónico y los patrones ha desarrollado los músculos del tronco, esto se refleja en un *corpus cerebelli* complejo y voluminoso (Figura 1.C).

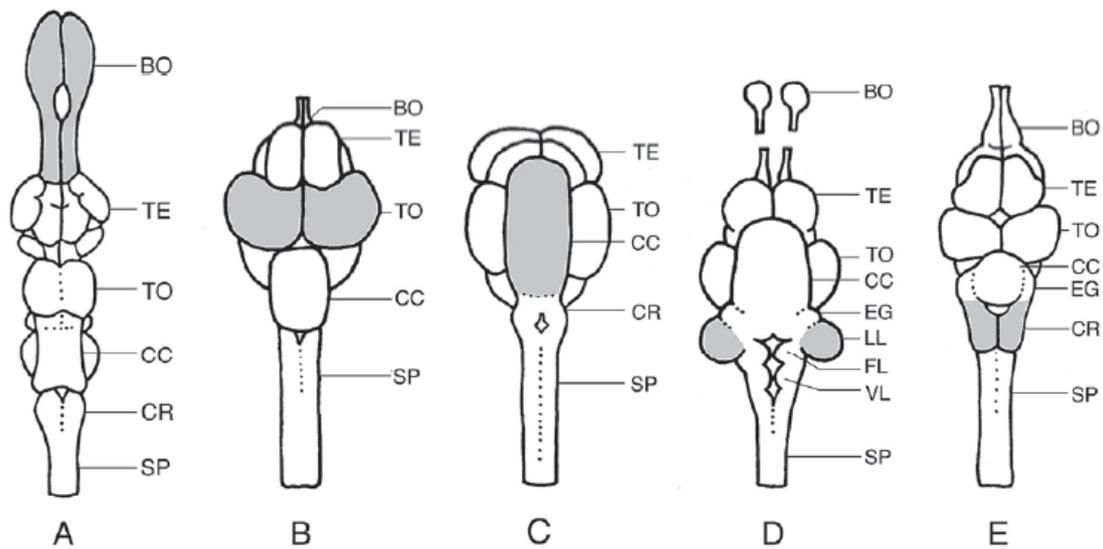


Figura 1. Variedad de encéfalos de teleósteos que presentan distintos hábitats y características ecológicas. BO: bulbo olfatorio; TE: telencéfalo; TO: tectum óptico; CC: corpus cerebelli; CR: crista cerebelli; EG: eminencia granularis; LL: lóbulo de la línea lateral; FL: lóbulo facial; VL: lóbulo vagal; SP: médula espinal. Tomada de Ito et al., 2007

Silurus asotus posee grupos neuronales (núcleos) receptivos (mecanosensitivo, vestibular y electrosensitivo) asociados a la crista cerebelli formando el lóbulo de la línea lateral (LL), esta estructura es de gran tamaño y prominente dorsolateralmente (Figura 1.D). Finger (1986) sugiere que esto puede tener funcionalidad significativa en la navegación, orientación, detección de presas e interacción social. La corvina *Argyrosomus argentatus* es nocturna y habita en aguas de gran oleaje, por esta razón el sistema vestibular está bien desarrollado; los núcleos vestibulares son grandes y elevan a la crista cerebelli dorsalmente (Figura 1.E).

Además de la diversidad interespecífica, se ha observado variabilidad del encéfalo dentro de las especies. Por ejemplo, en Medaka (*Oryzias latipes*), la morfología del encéfalo varía entre cepas, con diferencias en el volumen de distintas estructuras (TO, cerebelo, etc) (Yuji Ishikawa, 1999). Estas diferencias a nivel anatómico entre cepas diferentes, se relacionan con características comportamentales: a mayor tamaño del TO aumenta la agudeza visual de los individuos (Hyodo-Taguchi, 1991). También se han realizado estudios en dos fenotipos (ecotipos) diferentes de la especie *Lepomis gibbosus*, con preferencias ecológicas marcadas, en donde se evidenció que el ecotipo pelágico tiene un encéfalo mayor que el bentónico, pudiendo relacionarse con una mayor complejidad espacial y requerimientos de forrajeo (Axelrod et al., 2018).

Plasticidad fenotípica

La diversidad biológica, como se mencionó ocurre a distintas escalas y tanto a nivel inter como intraespecífico. Esta diversidad puede verse como el resultado de una plasticidad adaptativa a lo largo de la evolución. Los procesos plásticos pueden generar que un mismo individuo manifieste distintos fenotipos. Los fenotipos emergen de interacciones complejas entre los genes y el ambiente (Gilbert & Epel, 2008), la plasticidad fenotípica es la capacidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a variaciones en el ambiente (Fordyce, 2006). Por lo tanto, el ambiente que el pez habita, ya sea natural o artificial, provee estímulos que moldean e influyen la plasticidad neural, así como el comportamiento (Salvanes et al., 2013).

Plasticidad neural

La plasticidad neural hace referencia a modificaciones dentro del sistema nervioso que están asociadas a cambios en la fisiología debido a estímulos sociales y ambientales, en este sentido la experiencia puede cambiar la estructura física y la organización funcional del encéfalo (Knudson, 2004; Ebbesson, 2012). Los cambios estructurales de la plasticidad neuronal incluyen variaciones en el tamaño de la población celular (neurogénesis o apoptosis), cambios en la conectividad entre diferentes núcleos a través del crecimiento axonal o conexiones sinápticas (Zupanc & Heiligenberg, 1989; Cline, 2001; Shors, 2012). La eficacia de esta plasticidad y la capacidad de respuesta de los circuitos depende de la permanencia en el tiempo de estos cambios, así como de la ubicación y composición de unidades moleculares como canales iónicos, neurotransmisores, receptores y neuromoduladores (Oliveira, 2009). Al mismo tiempo la plasticidad se potencia con la actividad: cuánto más se usa un sistema, incrementa el desarrollo de la estructura que es demandada (a nivel neurogénico y de conectividad) (Cline, 2001; Ohno, 2013). Desde una perspectiva evolutiva, como se mencionó inicialmente, cuanto más importante es un sistema neuronal para los peces, mayor es la proporción de la región del cerebro asociada con ese sistema (Kotrschal et al., 1998; Ito et al., 2007).

La neurogénesis adulta es un proceso que se define como la generación de nuevas neuronas a partir de una célula madre neural. La neurogénesis puede clasificarse en constitutiva/fisiológica y regenerativa, siendo la primera la encargada del mantenimiento

de la organización histológica y funcional de los circuitos nerviosos del sistema y la segunda activándose frente a daños en los tejidos (Chapouton et al., 2007; Kaslin et al., 2007; Alunni & Bally-Cuif, 2016). La neurogénesis construye el encéfalo durante la vida embrionaria y disminuye luego del nacimiento, volviéndose más limitada a medida que avanzamos en la escala zoológica (Nottebohm, 1985; Polenov & Chetverukhin, 1993; Font et al., 2001;; Rakic, 2002; Taupin & Gage, 2002; Zupanc & Sîrbulescu, 2011). En contraste con los mamíferos, donde la neurogénesis es restringida durante adultez, en los peces este proceso se mantiene durante toda la vida (Zupanc et al., 2005; Torres-Pérez et al., 2017; Fernández et al., 2020). Por ejemplo, la neurogénesis adulta en el encéfalo de los mamíferos se limita a dos regiones principales: zona subventricular (ZSV) del sistema olfativo y la zona subgranular (ZSG) del hipocampo (Gould, 1999; Gould & Gross, 2002), mientras que la proliferación y la neurogénesis están muy extendidas en el encéfalo y retina de peces adultos (Zupanc et al., 1996; Ekstrom, 2001; Zupanc, 2001; Candal et al., 2005; Kaslin, 2007;).

Efectos ambientales y plasticidad neural

Existen varios estudios que muestran los efectos del ambiente en estructuras del sistema nervioso. Un efecto que modifica el tamaño de una estructura puede ser la complejidad del ambiente, Kihslinger y Nevitt (2006) mostraron que en *Oncorhynchus tshawytscha*, mientras más complejo era el ambiente durante el desarrollo temprano, mayor era el tamaño del cerebelo. Un estudio en *Danio rerio* evidenció que el enriquecimiento del ambiente en peces de cautiverio aumenta las células PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positivas en todo el cerebro anterior (Von Krogh et al., 2010). Este aumento en la proliferación también se registró en el pez eléctrico *Brachyhypopomus gauderio*, cuando se comparaban ambientes naturales complejos versus situaciones de cautiverio (Dunlap et al., 2011). De estos estudios se desprende que existen diferencias en la proliferación en el encéfalo asociadas a la complejidad física del ambiente, esto puede asociarse a distintos inputs sensoriales.

Se ha reportado que cambios ambientales específicos, como la luminosidad, pueden tener efectos en estructuras del sistema nervioso relacionadas con la visión como el TO y la retina. En mamíferos, se observó que la privación de luz genera reducción o deformación en las espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza visual en conejos y ratones, (Globua & Scheibel, 1967; Valverde, 1967). En aves, se evidenció una correlación entre el

tamaño del núcleo involucrado con el sistema de canto y el fotoperiodo, en donde en los machos aumentaba el tamaño de dicho núcleo a medida que aumentaban las horas de luz diarias, relacionado con la época reproductiva y de mayor demanda de vocalizaciones (Kirn et al., 1989). En peces, G. Jeserich y H. Rahmann (1979) describen los efectos de la oscuridad permanente durante el primer mes posteclosión (período de vital importancia para la sinaptogénesis) de *Salmo gairdneri*. Observaron que en el TO ocurrió una reducción en: el número de sinapsis por unidad de área, el tamaño de las zonas de contacto sináptico y en el número de vesículas sinápticas por terminal nerviosa. Fenómenos similares han sido estudiados en la retina. En *Danio rerio* se observó que, en experimentos de oscuridad, aumentaba la proliferación celular de precursores de bastones (Lahne et al., 2018). Se ha reportado que, cuando las condiciones de cautiverio son de oscuridad, se aprecia una modificación en el tamaño y forma del ojo, así como un aumento en la generación de neuronas retinianas en varias especies (Gottlieb et al., 1987; Tian & Copenhagen, 2001; Akimov & Renteria, 2014; Kannan et al., 2016).

Modificaciones en el enriquecimiento en aromas del ambiente también genera cambios en estructuras relacionadas con el procesamiento olfatorio como el BO. Se observó que el BO de ratones adultos criados en un ambiente más enriquecido en aromas presentaba mayor proliferación, neurogénesis y sobrevivencia de neuronas recientemente generadas, en comparación con aquellos en ambientes aromáticos más simples (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002; Rochefort et al., 2002; Mandairon et al., 2006). Por otro lado, la privación olfatoria disminuye la sobrevivencia de neuronas recientemente generadas en la ZSV, la banda migratoria rostral (BMR) y las células grano en ratones adultos (Mandairon et al., 2003; Yamaguchi & Mori, 2005).

Visión y olfacción

Los animales obtienen información del ambiente que los rodea mediante distintos sentidos, dicha información sensorial es crítica para localizar alimento, encontrar pareja y evitar ser depredados. Los peces cuentan con una gran variedad de sentidos, pudiendo ser estos la visión, quimiorrecepción (gusto y olfato), audición, ultrasonido, mecanorrecepción y electrorrecepción (Emde et al., 2004). La visión y la olfacción son de gran relevancia en los peces y permiten una adaptación exitosa a los diversos hábitats (Ledo et al., 2006; Zupanc,

2006). Se ha documentado además que las claves químicas y visuales tienen un papel importante en el reconocimiento de homospecíficos, pudiendo funcionar como un poderoso mecanismo de aislamiento reproductivo (Rafferty & Boughman, 2006; Berois et al., 2016).

Como fue mencionado, ambas modalidades pueden ser modulables por el entorno, reflejándose en procesos plásticos que involucran proliferación y neurogénesis. La neurogénesis adulta en BO y TO se ha evidenciado en géneros de teleósteos como *Danio*, *Gasterosteus*, *Carassius*, *Gymnotus*, *Medaka* y más recientemente en *Austrolebias* (Fernández et al., 2011; Olivera- Pasillio et al., 2014; Rahmann, 1968; Torres-Pérez et al., 2017; Zupanc & Horschke, 1995). El BO recibe además neuronas generadas en la zona subventricular que migran a lo largo de la BMR hasta alcanzar su posición final (Luskin et al., 1991; Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Estudios realizados en *Danio rerio* mostraron que la entrada olfatoria está implicada en la modulación de la sensibilidad visual (Maaswinkel & Li, 2003). Se ha reportado que existe un vínculo anatómico entre la visión y la olfacción, el par craneal 0 o nervio terminal (NT) (Rosillo et al., 2013.) La vía centrifuga descrita del NT está formada por cuerpos neuronales localizados en el BO a modo de ganglios, cuyos axones vía central y a través del nervio óptico, alcanzan la capa plexiforme interna de la retina donde establecen sinapsis (Figura 2) (Whitlock, 2011).

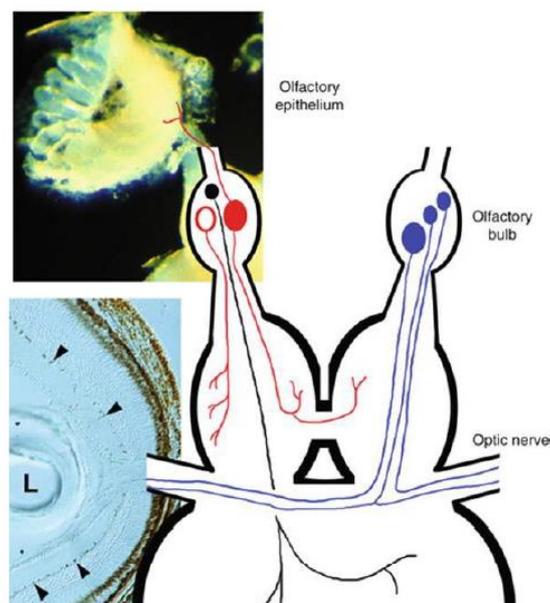


Figura 2. Esquema que representa el complejo del nervio terminal en el pez cebra. Un grupo de neuronas localizadas en los BO cuyos axones terminan en la capa nuclear interna de la retina. Tomada de Whitlock, 2011.

Efectos ambientales y plasticidad comportamental

Existen varios estudios que evidencian los efectos del ambiente en los sentidos y su repercusión en el comportamiento. Un ejemplo, es el estudio del efecto de la turbidez en diversidad de conductas de *Gasterosteus aculeatus*. Se observó que en aguas turbias los machos *G. aculeatus* son generalmente más activos en los comportamientos de cortejo (Engström–Öst & Candolin, 2007), las hembras necesitan más tiempo y energía en encontrar pareja (Candolin et al., 2007), la realización de los nidos toma más tiempo y los territorios de los machos son más densos (Candolin, 2004; Candolin & Salesto, 2006). Wong et al. (2007) encontraron que los machos en malas condiciones físicas cortejaban menos, por lo que el cortejo era un indicador honesto del estado del macho. En agua clara esta diferencia entre el esfuerzo del cortejo era mucho mayor que en el agua turbia, la honestidad de la clave fue, por lo tanto, reducida en el agua turbia. Hay evidencia que demuestra que cuando la elección por parte de las hembras utilizando claves visuales se ve comprometida, aumenta la importancia de las claves olfativas (Heuschele & Candolin, 2007).

Se ha reportado también que alteraciones en el medio químico pueden modificar procesos de selección sexual, como es el caso de *Xiphophorus birchmanni*. Las hembras *X. birchmanni* exhiben una fuerte preferencia por las claves químicas del macho homoespecífico, sin embargo, en la naturaleza hibridiza con *Xiphophorus malinche*. Un estudio con hembras provenientes de la naturaleza utilizando una prueba de preferencia entre un macho coespecífico y otro de *X. malinche* mostró que, si la prueba se realiza en agua limpia, las hembras prefieren al macho coespecífico. Sin embargo, si la prueba se realiza en aguas residuales o de escorrentía agrícola, las hembras no exhiben ninguna preferencia frente a los machos estímulo (Fisher et al., 2006). Esto es debido al aumento en la concentración de ácido húmico que impide identificar las señales químicas del coespecífico, generando que las hembras pierdan selectividad al inhibirse la señal que determina la elección.

Compensación sensorial

Una gran cantidad de estudios ha documentado efectos sorprendentes en la privación sensorial en una modalidad sobre el desarrollo de las modalidades restantes. Estos indican que los cambios ocurren no solo a nivel del comportamiento sino en la reorganización de las estructuras del sistema nervioso de las otras modalidades (Bavelier & Neville, 2002). La

plasticidad fenotípica compensatoria permite que los organismos respondan eficazmente a cambios ambientales.

Un estudio en ratas reveló que, frente a la enucleación ocular o la remoción de las vibrisas, se genera un aumento en la densidad neuronal y el número de espinas dendríticas en la corteza auditiva (Ryugo et al., 1975). De forma similar, en ratones criados en oscuridad desde el nacimiento hasta los 3 meses, ocurre un aumento en el tamaño de los núcleos de células de la corteza auditiva (Toldi et al., 1994). Otro estudio mostró que el área 19, que es predominantemente visual en monos videntes, es reclutada por inputs táctiles en monos que son privados de luz durante su primer año de vida (Hyvarinen et al., 1978a).

Experimentos con distintos niveles de luminosidad realizados en guppys (*Poecilia reticulata*) son un ejemplo de cómo el ambiente puede moldear el comportamiento. Chapman et. al (2010) observaron que los guppys criados en condiciones de baja luminosidad tenían una respuesta mucho mayor frente a claves químicas de alimento, respecto a aquellos criados en condiciones de mayor luminosidad. Cuando fueron puestos a prueba para claves visuales, los guppys criados en condiciones de mayor luminosidad exhibieron una mayor respuesta.

Modelo biológico y antecedentes

***Austrolebias*: ecología y ciclo de vida**

Los peces del género *Austrolebias* viven en charcos temporales, un hábitat particular y cambiante, lo que conlleva a un ciclo de vida anual. Su ciclo de vida comienza en marzo-abril, época en la que la temperatura permite que disminuya la evaporación y se formen los charcos y los huevos eclosionan, y finaliza por el mes de noviembre cuando el aumento de la temperatura hace que los charcos se sequen, para volver a formarse la temporada siguiente (Berois et al., 2016). El género *Austrolebias* posee 42 especies distribuidas en los ambientes temporales de las cuencas del Río Paraná medio y bajo, el Río Uruguay y el sistema Laguna de los Patos-Laguna Merín (Costa, 2006; Loureiro et al., 2011). *Austrolebias reicherti* y *A. charrua* son especies hermanas con divergencia reciente que tienen distribuciones parapátricas a lo largo de la Laguna Merín, en los humedales del este de Uruguay, con un área superpuesta en la cuenca baja del río Cebollatí (Loureiro et al., 2008; García et al., 2009) (Figura 3).

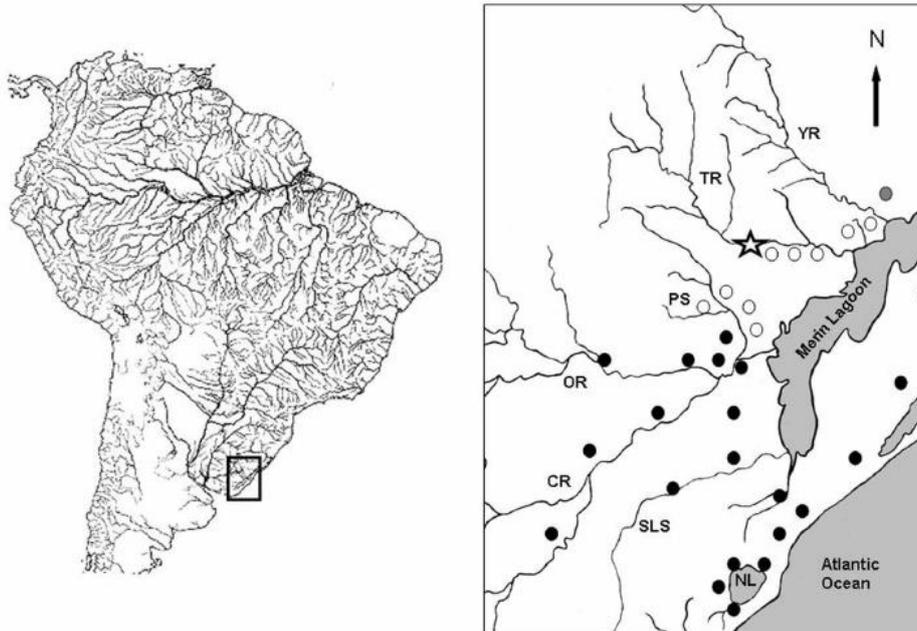


Figura 3. Mapa de distribución de *A. charrua* (círculos negros), y *A. reicherti* (puntos blancos). Los cuerpos de agua se indican con las siglas: YR: Río Yaguarión, TR: Río Tacuarí, PS: Corriente del Parao, OR: Río Olimar, CR: Río Cebollatí, SLR: Río San Luis, NL: Laguna Negra, CL: Laguna de Castillos. Barra de escala: 20km. Tomado de Loureiro & García, 2008.

Neuroanatomía de *Austrolebias*

A continuación, se detalla la neuroanatomía de las estructuras a estudiar, en el género *Austrolebias*, todas ellas relacionadas con la visión y olfacción.

En la Figura 4 se observa un encéfalo de *A. charrua*, en donde pueden verse las estructuras encefálicas encargadas del procesamiento de la visión y la olfacción, el TO y BO respectivamente.

Los BO, son estructuras pares ubicadas en el prosencéfalo, adyacentes a los lóbulos telencefálicos en posición rostro ventral, son prominentes y sésiles. Presentan capas celulares dispuestas de forma alineada con la luz ventricular, estas se denominan: capa celular interna (ICL), siendo esta la más interna, contiene las células grano; capa celular externa (ECL), ubicada más alejada de la luz ventricular, contiene las células mitrales; por último, la capa glomerular (GL), donde se encuentran los glomérulos sinápticos (Figura 4). Existe también una línea de células entre la ICL y el líquido cefalorraquídeo, que constituye una región de proliferación celular denominada zona ventricular del BO (BOzv) (Torres-Pérez, 2016; Rosillo, 2017).

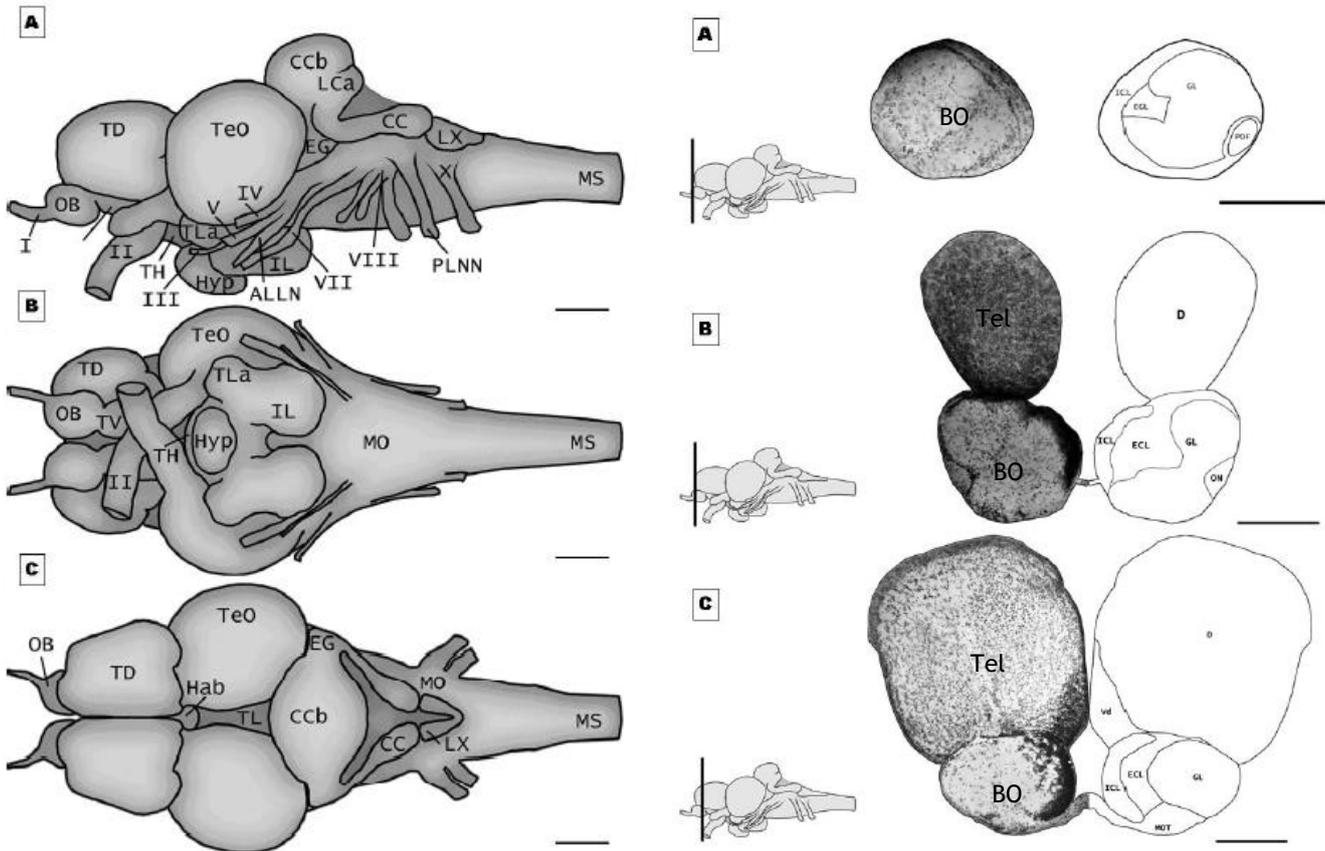


Figura 4 Izquierda: esquema de vista lateral, ventral y dorsal del encéfalo adulto de *A. charrua*. OB: bulbo olfatorio TD: área dorsal del telencéfalo; TLa: *torus lateralis*; TO: tectum óptico; LCa: lóbulo caudal; EG: eminencia granular; CCb: *corpus cerebelli*; CC: crista cerebellaris; LX: lóbulo vagal; MS: médula espinal; TV: área ventral del telencéfalo; TH: hipotálamo; Hyp: hipófisis; IL: lóbulo inferior del hipotálamo; MO: médula oblonga; Hab: habénula; TL: *torus longitudinalis*; barra de calibración 1mm. Derecha: cortes transversales del cerebro anterior con la técnica de Nissl. Tel: telencéfalo; barra de calibración 200µm. Tomado de Torres-Pérez 2019.

El TO es una estructura que forma parte del mesencéfalo, compuesto por dos cascos en el dorso del encéfalo, en su parte media e internamente se encuentra el TL (Figura 5). El TO posee una compleja estructura de siete capas dispuestas desde el ventrículo hacia la superficie pial: SPV-L1 (estrato periventricular), SAC-L2 (estrato olbo central), SGC L3-L4 (estrato gris central), SFGS-L5 (estrato fibroso y gris superficial), SO (estrato óptico) y SM (estrato marginal). Dorsalmente uniendo ambos cascos se encuentra el TL, que es una eminencia medial de células granulares. En la zona dorsal del TL discurre la comisura intertectal (Ctec), que se presenta como múltiples cordones de fibras que atraviesan el TL contactando ambos casquetes tectales siendo más grueso en la región rostral y va disminuyendo su grosor caudalmente.

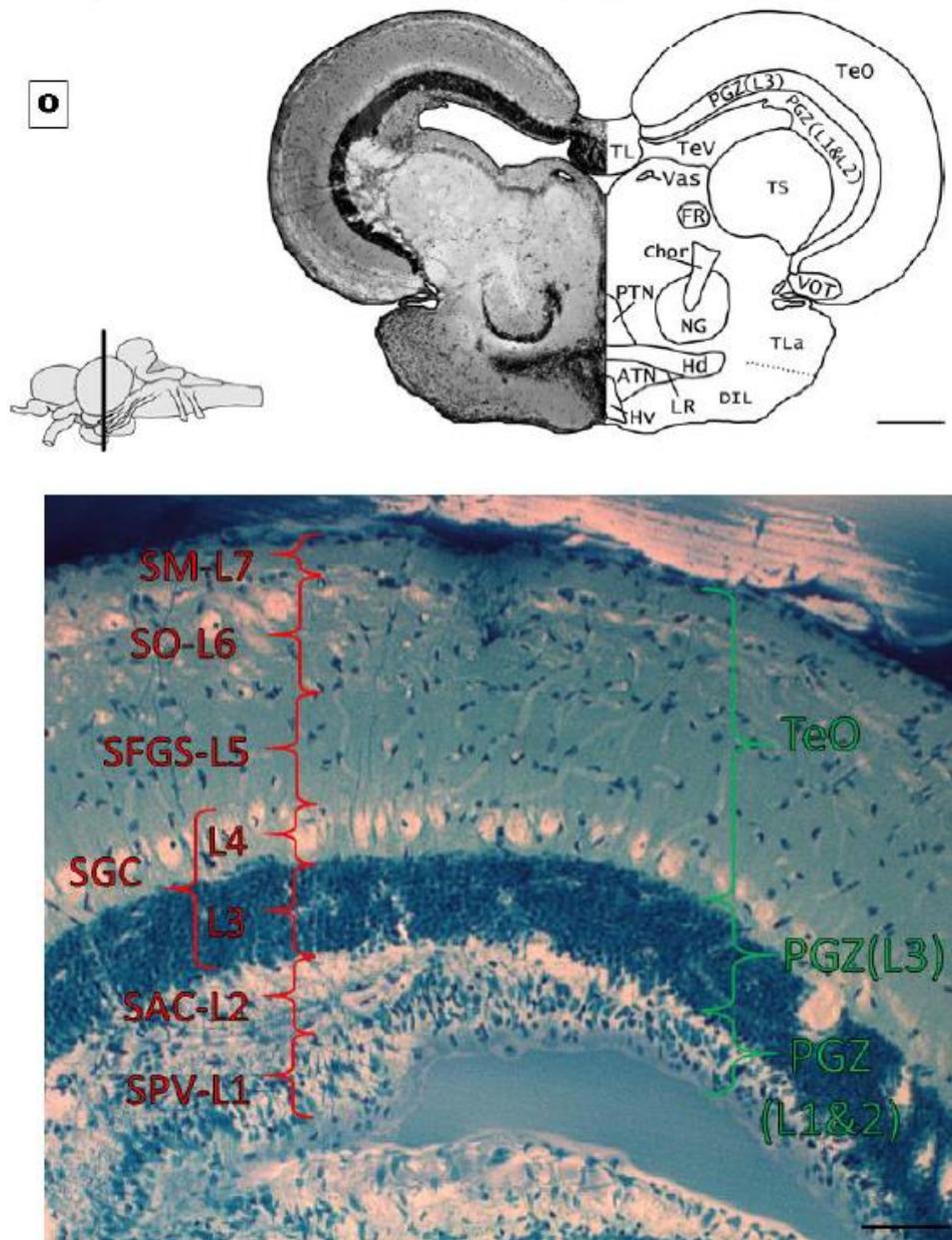


Figura 5. Superior: corte transversal de encéfalo *A. charrua* adulto a nivel del mesencéfalo con la técnica de Nissl, barra de calibración 200μm. Inferior: corte transversal de encéfalo de *A. charrua* adulto donde se observa con la técnica de azul de metileno, las 7 capas que constituyen al tectum óptico, de ventrículo a superficie pial: SPV-L1: estrato periventricular, SAC-L2: estrato olbo central, SGC (L3-L4): estrato gris central, SFGS-L5: estrato fibroso y gris superficial, SO: estrato óptico, SM: estrato marginal. PGZ: zona gris periventricular. TO: Tectum óptico. Barra de calibración 50μm. Tomado de Torres-Pérez, 2019.

La retina, conjunto de capas celulares más interna del ojo, es la encargada de recibir los estímulos visuales del ambiente y la estructura sensitiva que determinará la información que llega al TO para ser procesada (Figura 6). Su estructura en *A. charrua* ha sido previamente descrita, y se ha determinado su nicho neurogénico en la zona marginal ciliar (Berrostequieta, 2016). Esta zona periférica de la retina se encuentra en un proceso continuo y secuencial de proliferación celular, y constituye una región histológicamente distintiva, en la cual se encuentran células multipotentes que poseen la capacidad de

generar todos los tipos celulares retinianos excepto los bastones (Johns & Fernald, 1981). Los bastones son generados por la glía de Müller, presente en la capa nuclear interna de toda la retina (Lahne et al., 2018). La zona marginal ciliar se divide en tres: la zona central, media y periférica (Figura 6).

En *A. charrua* se ha evidenciado la presencia del nervio terminal, conexión anatómica y funcional entre las aferencias sensitivas de la visión y olfacción, formada por cuerpos neuronales en el BO, cuyos axones llegan a través del nervio óptico a la retina (Rosillo et al., 2013).

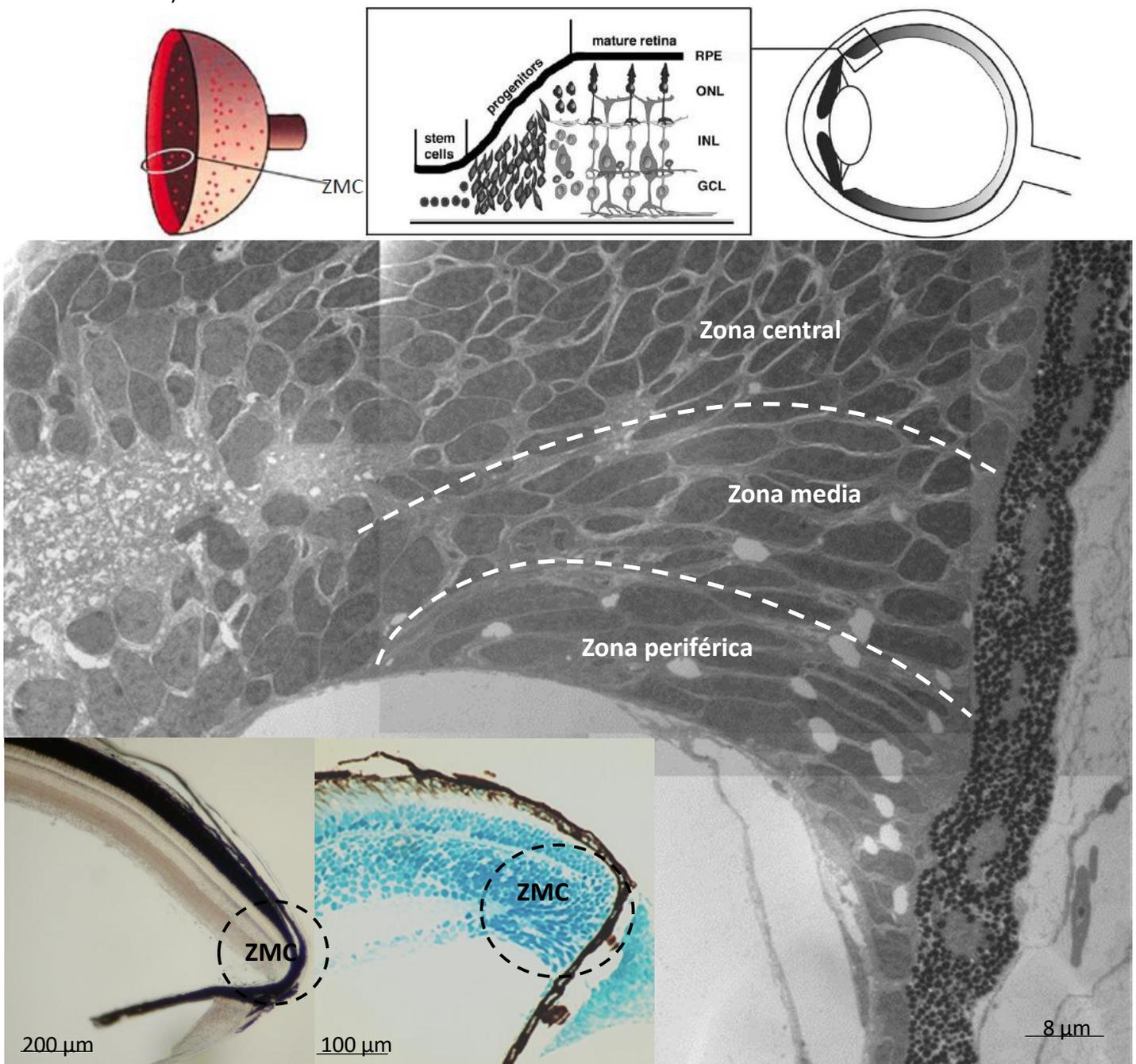


Figura 6. Superior: esquema de la zona marginal ciliar en la retina de vertebrados. Imágenes tomadas de Otteson & Hitchcock, 2003 (izquierda) y Hitckcock et al., 2004 (medio y derecha). ZMC: zona marginal ciliar; RPE: epitelio pigmentario de la retina; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares. Inferior: imágenes de microscopía electrónica de transmisión, óptica y azul de metileno de la retina y la ZMC (zona marginal ciliar).

Aspectos comportamentales y ecológicos



Figura 7. Coloración característica de *A. charrua* (izquierda) y *A. reicherti* (derecha) adultos, las hembras en la posición superior y los machos en la inferior. Tomado de Rivas, 2018.

Como un rasgo característico del género, las dos especies presentan dimorfismo sexual (Figura 7), las hembras tienen una apariencia críptica mientras que los machos presentan un patrón de coloración y bandeo que permite identificar la especie. Los machos de ambas especies presentan un patrón de bandas verticales claras y oscuras alternadas a lo largo del cuerpo: en *A. charrua* las bandas oscuras son más anchas y poseen puntos claros en la base de las aletas dorsal, caudal y anal, mientras que en *A. reicherti* las bandas claras son de mayor grosor y no presentan puntos claros (García et al., 2009). Este patrón distintivo, sumado a cambios en la intensidad de la coloración asociados al estatus social producto del comportamiento agonístico y elaboradas pautas comportamentales durante el cortejo, (Passos et al., 2013, 2016, 2019), sugieren que las claves visuales son de gran importancia y que seguramente jueguen un rol en el reconocimiento de especies por parte de la hembra.

El olfato también juega un rol importante, Passos y colaboradores (2013b) documentaron que los machos *A. reicherti* producen claves químicas durante el cortejo que generan cambios comportamentales en las hembras homoespecíficas. Además, las hembras *A. reicherti* son capaces de distinguir los machos de su especie utilizando solo claves químicas (Reyes et al., 2017).

El hábitat presenta grandes variaciones temporales en distintos parámetros ecológicos, particularmente en la turbidez del agua. Los charcos son poco profundos y con abundante

vegetación, y se vuelven más turbios a medida que avanza la temporada y comienzan a secarse gradualmente (Passos et al., 2014; Berrostequieta et al., 2019) (Figura 8). En este contexto, es probable que la importancia de ambas modalidades sensoriales puede cambiar a lo largo de la estación en función de las condiciones del ambiente. Por otro lado, se ha documentado que las preferencias de apareamiento de las hembras muestran variación estacional: mientras al inicio de la estación las hembras prefieren a los machos de mayor tamaño, al final de la estación esta preferencia disminuye. Una posibilidad es que la plasticidad en la preferencia de las hembras pueda estar asociada a cambios en la importancia relativa de las modalidades sensoriales (Passos et al., 2014).

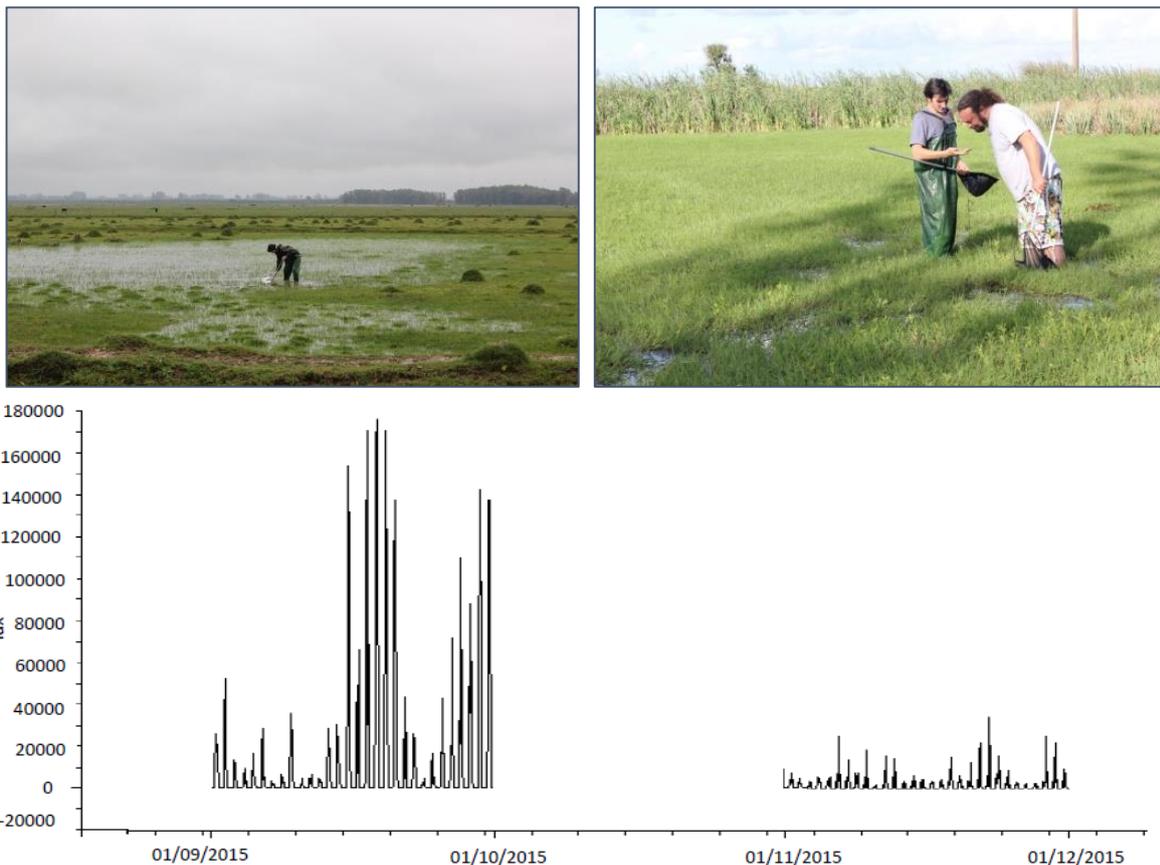


Figura 8. Fotos superiores: charco al inicio (izquierda) y al final (derecha) de la temporada. La gráfica muestra cómo disminuye la luminosidad en el charco a lo largo de la temporada (Tomado de Berrostequieta et al., 2019).

Si bien *A. reicherti* y *A. charrua* hibridan en cautiverio y en poblaciones naturales (Passos 2013, García et al 2019), la elección de pareja homoespecífica por parte de las hembras favorece el aislamiento reproductivo (Passos 2013), enfatizando la importancia de las modalidades sensoriales y su posible variación en función de las características ambientales.

Hipótesis y objetivos

Los cambios drásticos en las condiciones ambientales, particularmente en la turbidez del agua, los antecedentes sobre neurogénesis en estructuras sensoriales como BO, TO y retina, sumado a las particularidades del par de especies *A. reicherti*-*A. charrua* y a los antecedentes sobre el uso de la visión y el olfato durante el comportamiento reproductivo, convierten a las *Austrolebias* en un excelente modelo para estudiar la plasticidad frente a cambios en la luminosidad. Esta tesis se propone estudiar si existen cambios en la proliferación celular en estructuras encargadas de procesar la información visual y olfativa, así como cambios comportamentales en la capacidad de detectar machos homoespecíficos utilizando una modalidad sensorial o la otra, en grupos de hembras criados en distintas condiciones lumínicas.

Hipótesis:

H1: Los machos *A. charrua* criados en condiciones de oscuridad diferirán cualitativamente en la tasa de proliferación de los distintos tipos celulares de la retina respecto a aquellos criados en condiciones de luz natural. Estos cambios estarán vinculados a la generación de mayor cantidad de bastones.

H2: En pruebas comportamentales de elección dual en base a pistas químicas solamente, las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de oscuridad, serán más acertadas en distinguir al homoespecífico que aquellas criadas en condiciones lumínicas naturales.

H3: En pruebas comportamentales de elección dual en base a pistas visuales solamente, las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones lumínicas naturales, serán más acertadas en distinguir al homoespecífico que aquellas criadas en condiciones de oscuridad.

H4: Las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de oscuridad tendrán un aumento en la proliferación celular del bulbo olfatorio, respecto a aquellas criadas en condiciones de luz natural.

H5: Las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de luz natural tendrán un aumento en la proliferación celular en el tectum óptico y *torus longitudinalis*, respecto a aquellas criadas en condiciones de oscuridad.

Objetivo general

Evaluar la proliferación celular en BO, TO, TL y retina y el uso de pistas visuales y olfativas como mecanismo de aislamiento reproductivo en hembras mantenidas en distintas condiciones de luminosidad durante períodos prolongados.

Objetivos específicos:

Obj. 1: Detectar las células proliferantes mediante el uso combinado de pulsos cortos (1 día CIdU) y largos (30 días IdU) en grupos criados en luz natural y oscuridad total, en *A. charrua*.

Obj. 2: Determinar mediante cuantificación de núcleos marcados con IdU, CIdU e IdU/CIdU las diferentes poblaciones proliferantes de la ZMC y retina adyacente, en grupos criados en luz natural y oscuridad total. Este objetivo nos permitirá valorar modificaciones en las poblaciones celulares proliferantes en respuesta a cambios en la luminosidad.

Obj. 3: Indagar la población de células bastones en la retina de *A. charrua* mediante la utilización de un marcador específico, en grupos criados en condiciones de luz natural y oscuridad total.

Obj. 4: Por medio de pruebas comportamentales de elección dual, evaluar la capacidad de las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de luz natural y oscuridad, de distinguir al homoespecífico a través de pistas químicas.

Obj. 5: Por medio de pruebas comportamentales de elección dual, evaluar la capacidad de las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de luz natural y oscuridad de distinguir al homoespecífico utilizando claves visuales.

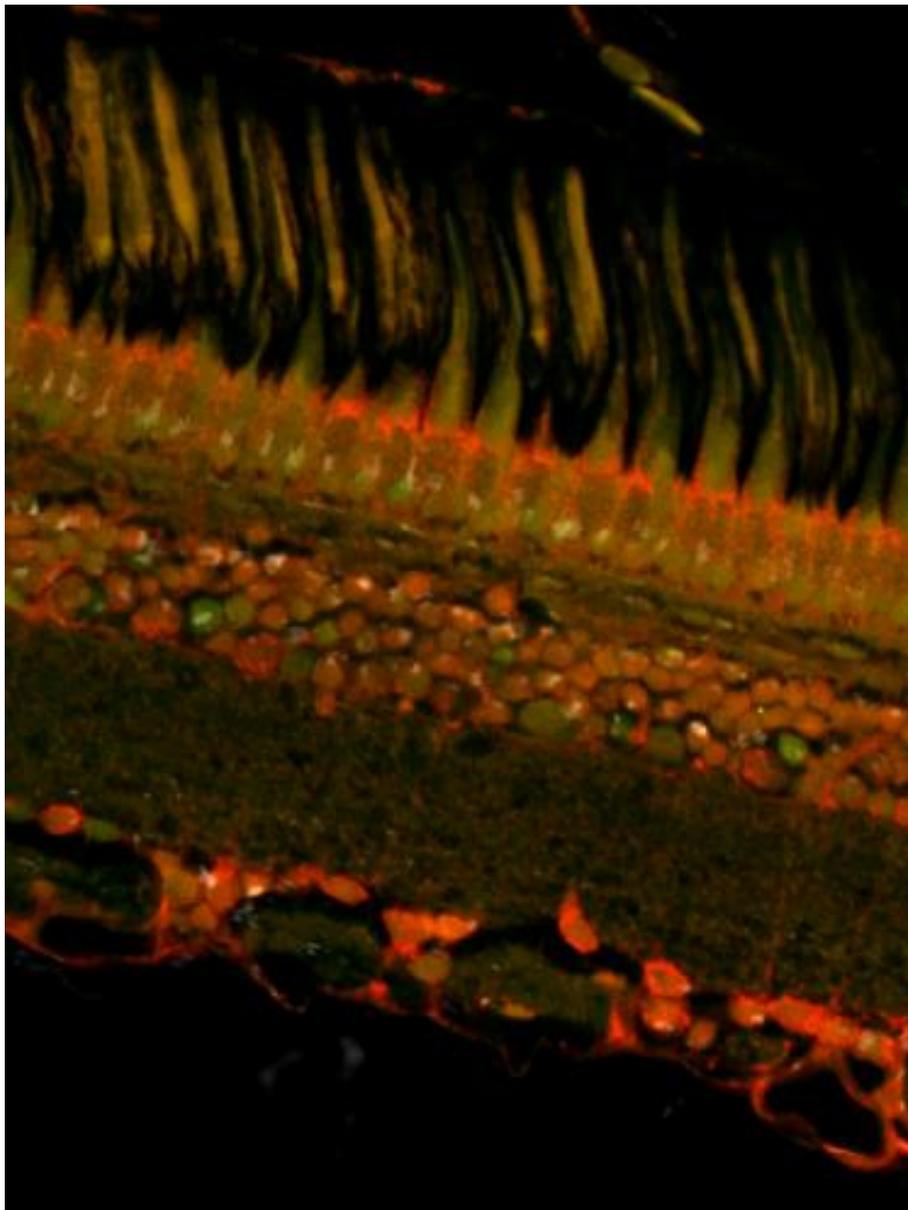
Estudio de la neuroplasticidad en peces del género *Austrolebias* frente a cambios en la luminosidad

Obj. 6: Mediante aplicación de un pulso corto de BrdU (bromodesoxiuridina), y revelado por inmunohistoquímica evidenciar las células proliferantes en ambos grupos criados en luz natural y oscuridad en las zonas de interés para su cuantificación en *A. reicherti*.

Obj. 7: Cuantificación de núcleos marcados con BrdU en ambos grupos experimentales para determinar si la población celular proliferante del BO, TO y TL, varía en respuesta al cambio en la luminosidad.

CAPÍTULO 1

Proliferación celular en retina de *A. charrua* criados en diferentes condiciones lumínicas



Materiales y métodos

Con el objetivo de determinar si las condiciones de luminosidad modifican la proliferación celular en la retina de *A. charrua*, se realiza la administración de 2 pulsos de marcadores proliferativos. Además, se utiliza un marcador específico de bastones, con el fin de evaluar si la luminosidad influye en su cantidad.

Obtención y mantenimiento de animales

Machos de *A. charrua* fueron obtenidos por colecta en La Coronilla, Rocha, Uruguay en el mes de julio. Estos fueron mantenidos en el acuario del IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable) a una temperatura constante de 19°C, alojados en peceras (14 x 22 x 30 cm) con oxigenación y recambio parcial de agua cada 2 días y alimentados diariamente con Tubifex (*Tubifex rivolorum*).

Tratamientos

Los especímenes se dividieron en dos grupos experimentales. Un grupo permaneció en condiciones de luz y oscuridad naturales (tratamiento luz, n=3 machos, originalmente fueron 6 pero 3 inyecciones fallaron), y el otro en condiciones de oscuridad constante (tratamiento oscuridad, n=6 machos). Para crear las condiciones de oscuridad, las peceras fueron colocadas en una estantería forrada con doble nylon negro en su totalidad.

Administración de marcadores de proliferación celular

Marcadores de proliferación celular

El BrdU es un nucleósido sintético análogo a la timidina que puede ser incorporado en la fase S del ciclo celular, sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. Esta sustancia es administrada a los especímenes, pudiéndose realizar pulsos de diferentes ventanas temporales. La detección de la sustancia a nivel de los núcleos celulares se realiza mediante inmunohistoquímica. El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen al BrdU (Gratzner, 1982), ofrece la posibilidad de identificar las células proliferantes de

forma simple y relativamente rápida, además de proveer una alta fidelidad en la marcación de los núcleos que es clara y bien definida (Carbajo et al., 1994). Además, se han desarrollado diferentes compuestos halogenados análogos a la timidina, donde el grupo bromo es sustituido por yodo o cloro, formando así IdU y CldU, conservando todas las ventajas propias del método. Este avance proporciona la posibilidad de marcar dos poblaciones celulares que proliferan en diferentes tiempos. Administrando pulsos de ambos marcadores en el mismo animal a diferentes tiempos, se pueden identificar dos poblaciones celulares proliferantes, sin que presenten reacciones cruzadas (Vega & Peterson, 2005). En este capítulo el IdU y CldU fueron utilizados en diferentes ventanas temporales para estudiar la proliferación en la retina en *A. charrua*, mientras que en el siguiente capítulo se muestra la proliferación en el encéfalo de *A. reicherti* mediante la aplicación de BrdU.

Para distinguir dos poblaciones proliferantes distintas se realizó la administración intraperitoneal de dos marcadores proliferativos con una ventana temporal de 29 días (Figura 9). A los 5 días de haber iniciado el tratamiento se realizó la inyección del primer marcador de proliferación: IdU (concentración de 57,5 mg/Kg), pasados 29 días se inyectó el segundo marcador: CldU (concentración de 42,5 mg/Kg). La sobrevida fue de 24 horas y luego se procedió a realizar la fijación y perfusión.

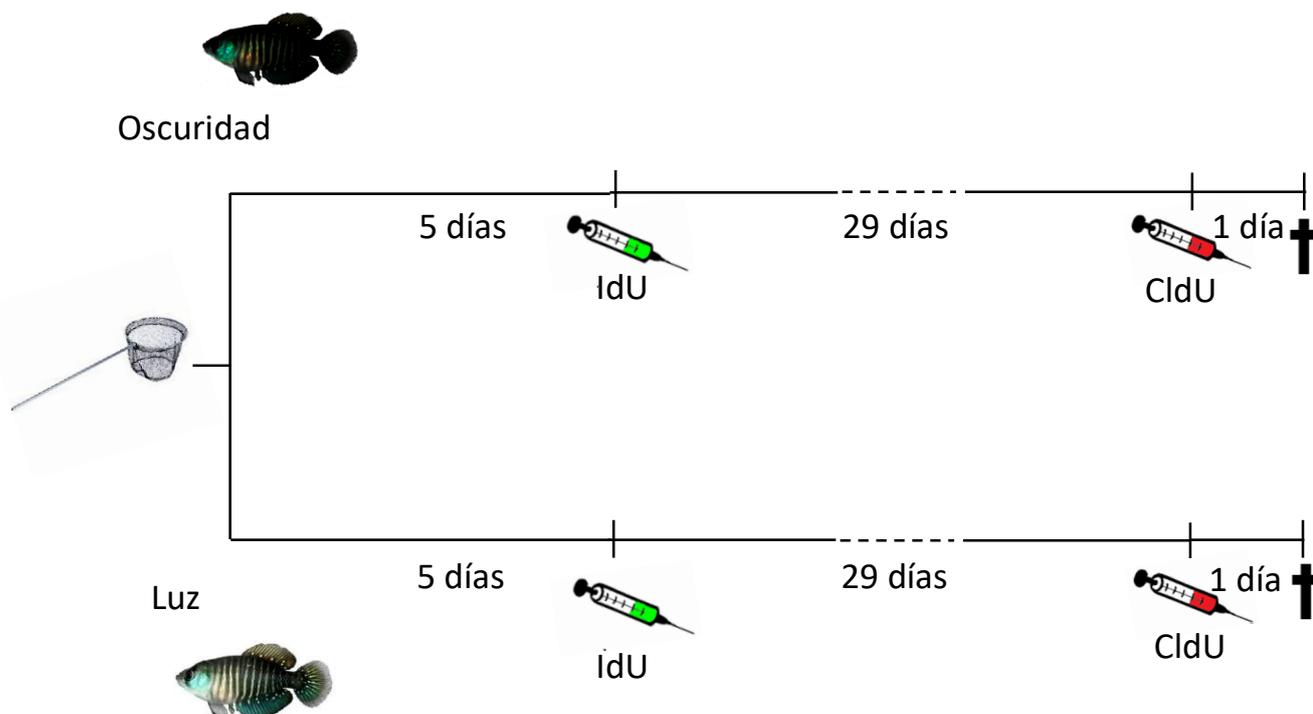


Figura 9. Esquema metodológico para estudio de la retina de *A. charrua* adultos. Luego de la pesca, los animales se separan en 2 tratamientos (luz y oscuridad), a los 5 días se inyecta el primer marcador proliferativo IdU, a los 29 el segundo, CldU, al día se realiza la perfusión.

Fijación y perfusión

Transcurridas las 24 horas luego de la administración del marcador CldU, los peces fueron anestesiados con Eugenol (Eugenol 10% en etanol 96%) en concentración 1:1000. Como plano anestésico profundo se consideró la disminución del movimiento opercular, pérdida del reflejo de escape y su flotabilidad. Una vez anestesiados se realizó la perfusión intracardiaca. Para esto, se removió la sangre del aparato circulatorio realizando un lavado con solución salina, la cual tiene un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO_2 al 1%) para facilitar el paso de las soluciones y evitar el colapso de los vasos; y un anticoagulante (Citrato de sodio, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ al 2%), para evitar que se generen trombos al contactar el fijador con la sangre. Una vez realizado el lavado cada pez fue perfundido con paraformaldehído (PAF) al 10% en buffer fosfato (BF) 0.1 M pH=7.2. Luego se realizó una postfijación por inmersión de 24 horas (en el mismo PAF al 10%).

Técnica de disección, encastre y realización de los cortes

Finalmente se realizó la disección de los ojos bajo lupa (NIKON, SMZ800) y se encastraron en una mezcla de gelatina (1.5%)-albúmina (45%) disuelta en solución salina de cloruro de sodio (0.9%) con glutaraldehído (0,25%), obteniendo un bloque cuya consistencia permitió realizar los cortes. Cada bloque se colocó, fijó y cortó en un vibrátomo (LEICA VT100S). Los cortes fueron seriados de 60 μm de grosor en planos de corte sagitales.

Detección de inmunohistoquímica

Los anticuerpos encargados de detectar el CldU e Idu (Tabla 1) reconocen estas sustancias en el ADN monocatenario. Para lograr esto los cortes deben ser previamente tratados mediante la incubación en HCl diluido en buffer fosfato tritón (BFT) al 0,3% (HCl 2N - BFT 85%). El BFT desorganiza la estructura lipídica y genera agujeros en las membranas biológicas, permitiendo que el HCl ingrese a las células y desnaturalice el ADN doble cadena, exponiendo los antígenos donde están unidos el Idu y CldU a los anticuerpos específicos. Una vez que los antígenos fueron expuestos, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario y luego con el secundario conjugado a un fluoróforo para su detección mediante inmunofluorescencia, utilizando microscopía láser confocal.

Tabla 1. Descripción de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, marca comercial y dilución recomendada.

Anticuerpos primarios	Marca	Dilución
Rata anti-BrdU(CIdU)	Accurate	1/500
Ratón anti-BrdU (IdU)	Becton Dickenson	1/500
Anti-rod XAP-2	Hybridoma Bank	1/20
Anticuerpos secundarios	Marca	Dilución
Biotilnado, burro anti-rata	Jackson	1/500
Burro anti-ratón Alexa 488	Molecular probes	1/1000
Estreptavidina de unión a la biotina Cy3	Jackson	1/500

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo:

- 1- Se lavaron tres veces los cortes en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 2- Se incubaron los cortes en la solución de BFT-HCl, durante 40 minutos.
- 3- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 4- Se incubaron los cortes en los anticuerpos primarios toda la noche en BFT.
- 5- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 6- Previo a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados se realizó una incubación con un anticuerpo secundario biotilnado.
- 7- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 8- Se incubaron los cortes en anticuerpos secundarios conjugados con flourocromos, en BFT durante una hora y media en oscuridad.
- 9- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.

Una vez aplicado el protocolo, los cortes fueron montados y mantenidos en heladera evitando procesos de crecimiento de microorganismos, y en cajas opacas para que los conjugados fluorescentes no se vieran excitados por la luz, evitando así la pérdida de la intensidad de la señal.

Para evaluar la situación de los bastones en los peces de ambas condiciones lumínicas, se utilizó un anticuerpo específico que reconoce el segmento externo de los bastones (Harrys & Messersmith, 1991) (Tabla 1). Su revelado se realizó en conjunto con los marcadores de proliferación. No se realizó cuantificación.

Controles del marcador de proliferación

Durante la puesta a punto de la técnica de reconocimiento del CldU e IdU se utilizaron secciones histológicas de intestino de pez (que presenta gran proliferación celular) como controles positivos. En otros casos, se incubaron simultáneamente cortes de retina de pez sin anticuerpos primario o sin anticuerpo secundario como control negativo. También se realizaron controles con cortes histológicos que no recibieron los marcadores de proliferación.

Observación y fotografiado de los cortes

Los preparados histológicos, fueron observados y analizados con un Microscopio Confocal Olympus FluoView™300 asistido por el software para Windows® FluoView™300. Para la visualización de los preparados se utilizó el láser apropiado para cada fluorocromo conjugado al anticuerpo secundario:

-Láser de argón azul, de 488 nm de longitud de onda, que excita al conjugado Alexa-fluor 488, de esta forma se obtiene una señal de color verde, que corresponde a las moléculas de ADN que portan al IdU. Los datos obtenidos por este láser se visualizan en el canal 1.

-Láser de helio-neón verde, de 543 nm de longitud de onda, que excita el conjugado Cy3, de esta forma se obtiene una señal de color rojo, que corresponde a las moléculas de ADN que portan al CldU. Los datos obtenidos por este láser se visualizan en el canal 2.

Las fotografías se realizaron individualmente en cada canal, es decir que se obtuvieron 31 fotografías del canal 1 (488 color verde, se observan núcleos IdU positivos), 31 del canal 2 (543 color rojo, núcleos CldU positivos) y 31 de la superposición de las imágenes de ambos canales. Gracias al método de apilamiento brindado por el software del microscopio, también se pudieron apilar las 31 imágenes de cada grupo, obteniendo así una imagen de cada uno de los tres grupos, en donde las 31 imágenes individuales se encuentran superpuestas. En estas imágenes se visualiza la información de los núcleos marcados en la

ventana indicada en canales por separado y unidos. Las fotografías son de la ZMC dorsal y ventral de cada corte.

Para la visualización de los cortes revelados con el anticuerpo específico de bastones se utilizó el láser de diodo 405nm con color azul. De igual forma que en el caso de los marcadores proliferativos, se realizaron apilados de 31 cortes.

Cuantificación celular

Una vez obtenidas las imágenes de las superposiciones, se cargaron estas imágenes en el programa ImageJ. Para cada trío de imágenes de cada corte, en la imagen del canal 1 se realizó la cuantificación de los núcleos IdU+, en la imagen del canal 2 se realizó la cuantificación de los núcleos CldU+ y en la imagen de ambos canales se realizó la cuantificación de doble marcados IdU+/CldU+. La cuantificación se realizó sobre las imágenes apiladas de las tres opciones (canal 1, canal 2 y ambos), recurriendo al desglose de las 31 imágenes por separado de ser necesario. Otra herramienta utilizada para confirmar la veracidad del doble marcado, fue la utilización de los planos ortogonales que proporciona el programa para analizar la imagen apilada. La zona de interés fue la ZMC y las 200µm contiguas (Figura 10).

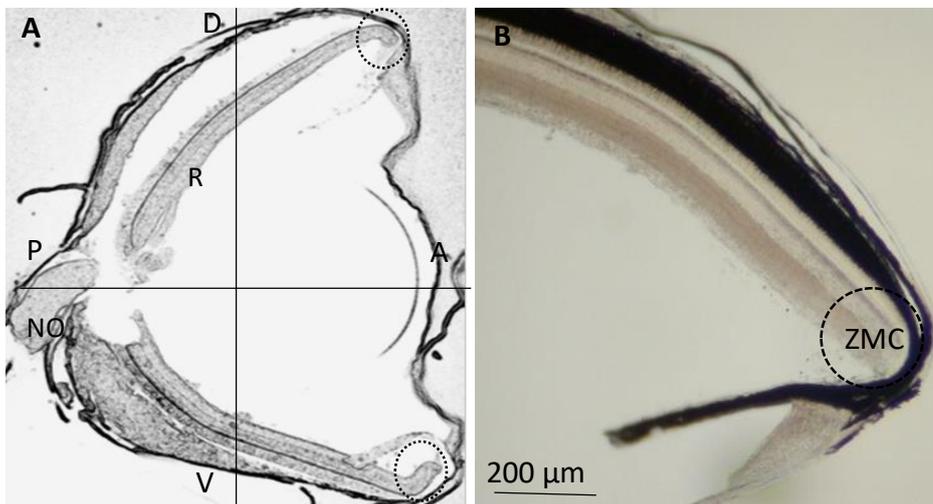


Figura 10. A. Imagen panorámica de un corte sagital de un ojo de *A. charrua*. B. Corte sagital de un ojo de *A. charrua* donde se observa la zona de estudio: zona marginal ciliar de la retina (ZMC) y las 200µm contiguas. R: retina, NO: nervio óptico, A: anterior; P: posterior; D: dorsal. V: ventral.

Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Past de libre acceso. Se utilizaron test no paramétricos por el valor bajo del n, utilizándose el test de Mann Whitney para comparar el porcentaje de las 3 poblaciones proliferantes (IdU, CIdU, IdU/CIdU) y el test de Kruskal Wallis para comparar el total de células proliferantes entre los tratamientos y el promedio de células por corte para cada población de cada tratamiento.

Resultados

Se estudiaron las características histológicas y proliferativas de dos grupos de machos *A. charrua*, que permanecieron 35 días en luz natural (tratamiento luz, n=3) u oscuridad permanente (tratamiento oscuridad, n=6). Esto se realizó con 2 pulsos de marcadores nucleares proliferativos: un pulso con un período de sobrevida largo (30 días, IdU) y un pulso con un período de sobrevida corto (1 día, CIdU) (Figura 9).

Mediante el revelado inmunohistoquímico pudieron identificarse los núcleos que incorporaron los marcadores proliferativos IdU (verde) y CIdU (rojo) (Figuras 11 y 13). Esto permitió visualizar tres poblaciones celulares:

-**Población 1:** compuesta por células que incorporaron IdU en el día 0 (5 días de iniciados los tratamientos, 30 días de sobrevida de IdU).

-**Población 2:** compuesta por células que incorporaron CIdU en el día 29 (34 días de iniciado el tratamiento, 1 día de sobrevida de CIdU).

-**Población 3:** compuesta por células que incorporaron IdU y CIdU (amarillas), es decir que se encontraban en la fase S del ciclo celular en el día 0 y el día 29.

Las zonas de estudio fueron la ZMC y las 200 micras contiguas (Figuras 11 y 13).

Localización y análisis estadísticos de las poblaciones celulares proliferantes de los peces en tratamiento de luz

Los experimentos del tratamiento de luz mostraron una discriminación temporal y espacial de las células proliferantes en la retina, cada población presentó las siguientes características:

-**Población 1:** células IdU positivas, estas estaban presentes en las tres regiones de la ZMC (zona central, media y periférica), así como en el epitelio ciliar no pigmentario. También se encontraron en la capa nuclear externa, disminuyendo a medida que se alejaban de la ZMC (Figura 11).

-**Población 2:** células CldU positivas, estas también se encontraron en las tres regiones de la ZMC. A diferencia de las células IdU positivas, su presencia en la CNE fue menor (Figura 11). No se encontraron células CldU positivas en el epitelio ciliar no pigmentario.

-**Población 3:** células doble marcadas IdU/CldU positivas, estas se encontraron casi únicamente en la ZMC preferencialmente distribuidas en la región medial. (Figura 11).

El análisis muestra una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones (test de Kruskal Wallis, $N_{luz}=5$, $p=0.004$) siendo el porcentaje mayor en la población 1 (IdU), seguido por la población 3 (IdU/CldU) y por último la población 2 (CldU) (Figura 12).

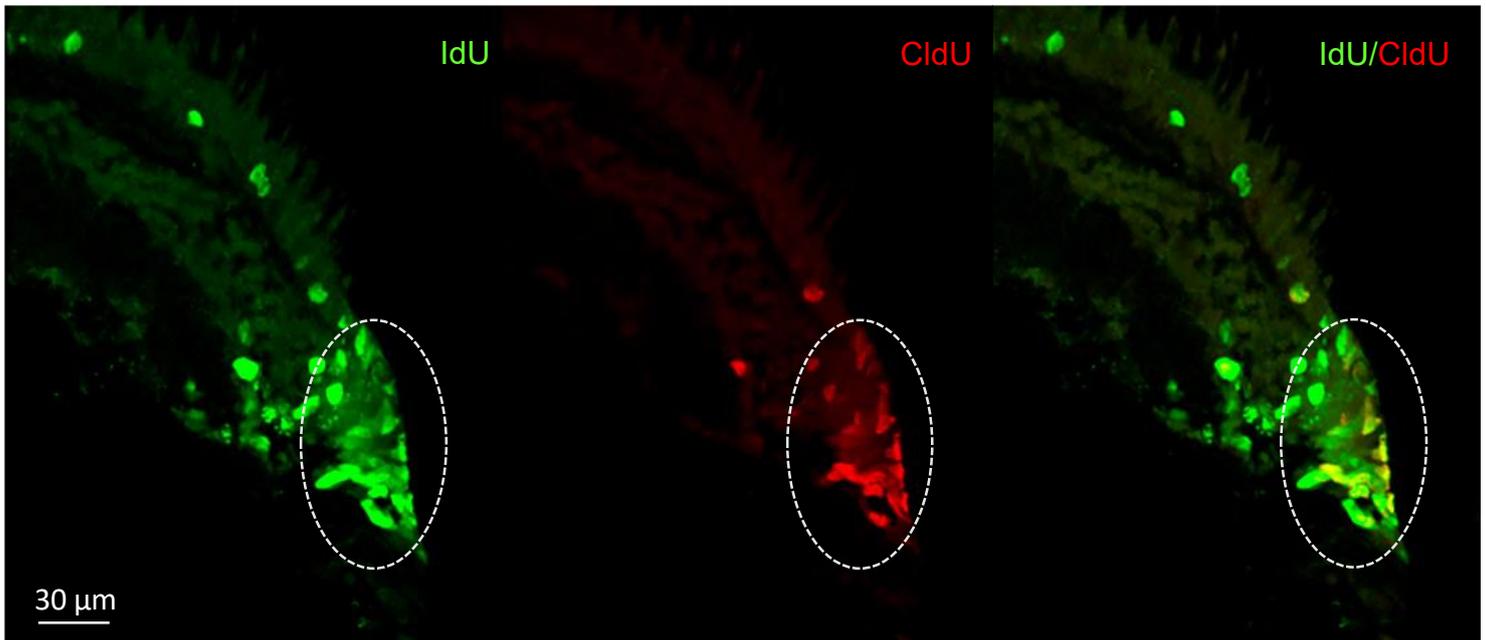


Figura 11. Imagen confocal de un corte sagital de retina de *A. charrua* de tratamiento de luz, se observa en detalle la ZMC (círculo punteado). En verde los núcleos IdU+, rojo los CldU+ y amarillo los doble marcados, en un apilado de 30 µm.

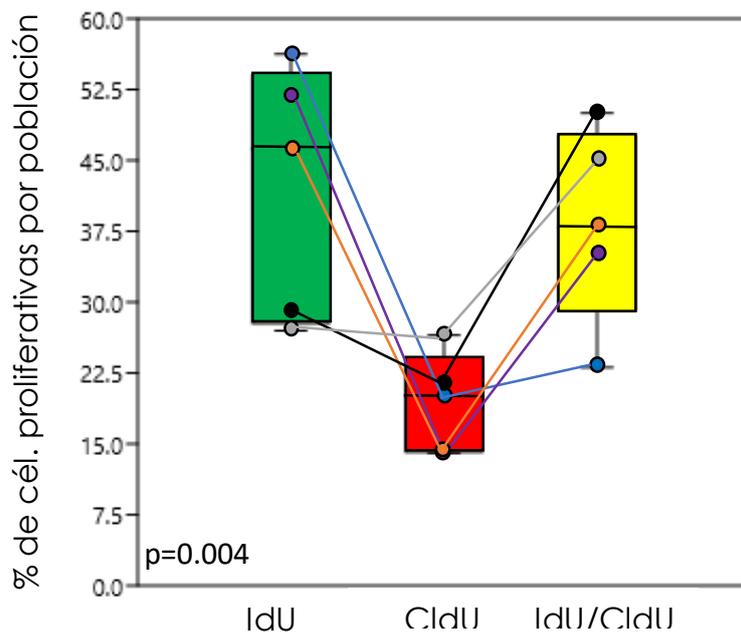


Figura 12. Porcentaje de las células proliferativas en la ZMC + 200µm de la retina de cada población, para los *A. charrua* de tratamiento de luz ($N=5$, test de K-W, $p=0.004$)

Localización y análisis estadísticos de las poblaciones celulares proliferantes de los peces en tratamiento de oscuridad

Los experimentos del grupo criado en condiciones de oscuridad mostraron una discriminación temporal y espacial de las células proliferantes en la retina, cada población presentó las siguientes características:

-Población 1: células IdU positivas, estas estaban presentes en las tres regiones de la ZMC y en el epitelio ciliar no pigmentario. También se encontraron en las demás capas celulares de la retina como la capa de las células ganglionares, la capa nuclear interna y externa. Se destaca que la zona proliferativa deja de verse restringida a la ZMC para extenderse hasta 200µm rostrocaudalmente (Figura 13).

-Población 2: células CldU positivas, estas también se encuentran en las tres regiones de la ZMC y en las demás capas celulares de la retina al igual que la población 1, aunque en menor cantidad (Figura 13).

-Población 3: células doble marcadas IdU/CldU positivas, estas se ven principalmente en la ZMC, pueden encontrarse en otras capas celulares pero en menor cantidad y generalmente cercanas a la ZMC (Figura 13).

El análisis muestra una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones (test de Kruskal Wallis, $N_{osc}=3$, $p=0.004$) siendo el porcentaje mayor en la población 1 (IdU), seguido por la población 2 (CldU) y por último la población 3 (IdU/CldU) (Figura 14).

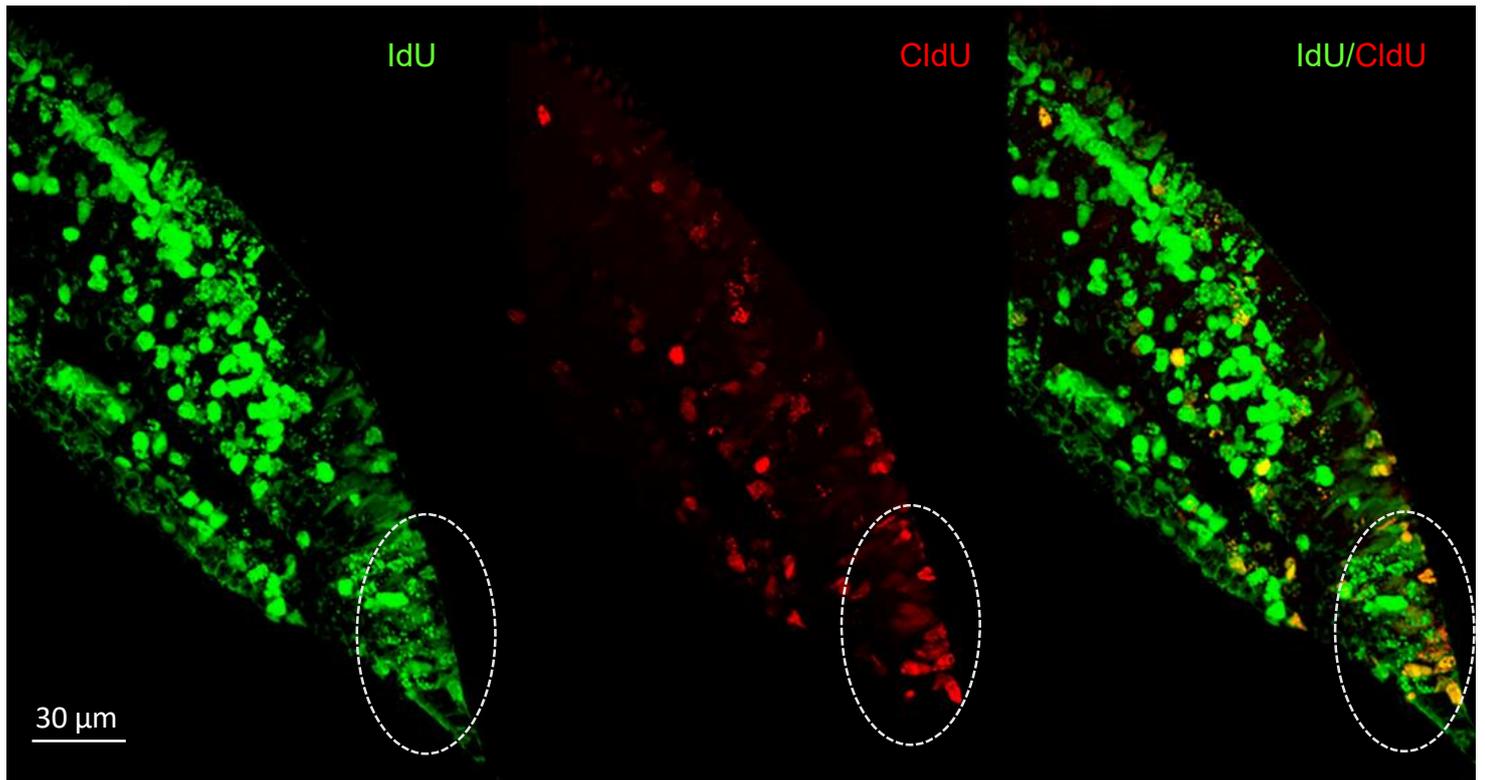


Figura 13. Imagen confocal de un corte sagital de retina de *A. charrua* de tratamiento de oscuridad, se observa en detalle la ZMC (círculo punteado). En verde los núcleos IdU+, rojo los CldU+ y amarillo los doble marcados, en un apilado de 30 µm.

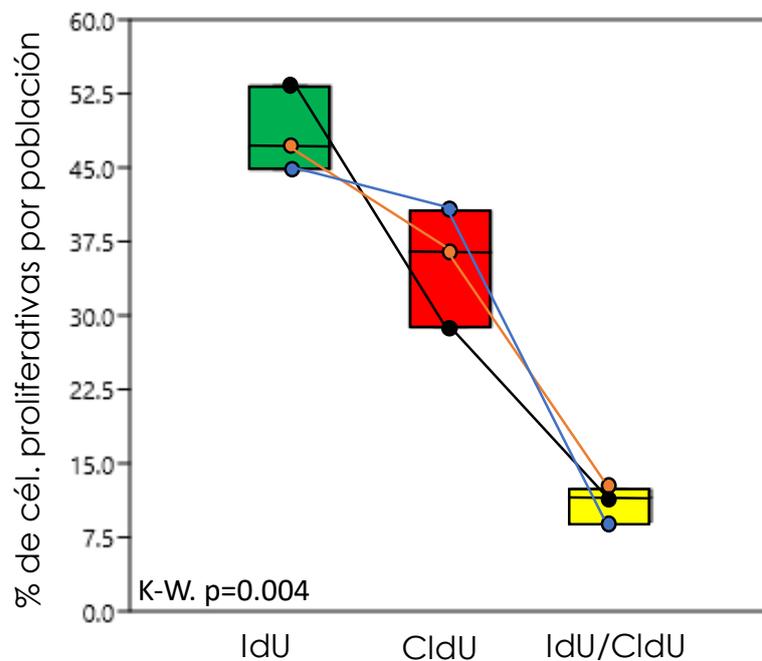


Figura 14. Porcentaje de las células proliferativas de la ZMC + 200 µm de la retina de cada población, para los *A. charrua* de tratamiento de oscuridad (N=3, test de K-W, p=0.004).

Comparación de las poblaciones celulares proliferantes en peces de tratamiento luz vs oscuridad

Al comparar el número de células totales proliferativas entre los peces con tratamientos de luz y oscuridad, se observó que la proliferación en los peces el tratamiento de oscuridad es significativamente mayor que en los peces de luz (test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$, $p=0.03$) (Figura 15). La comparación de las células proliferativas por corte de las poblaciones para cada tratamiento reveló que: la población 1 (IdU) tiene una tendencia a ser mayor en los peces de oscuridad (test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$, $p=0.06$), la población 2 (CIdU) es significativamente mayor en peces de oscuridad (test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$, $p=0.03$) y no hay diferencia significativa entre la población 3 (IdU/CIdU) (test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$, $p=0.79$).

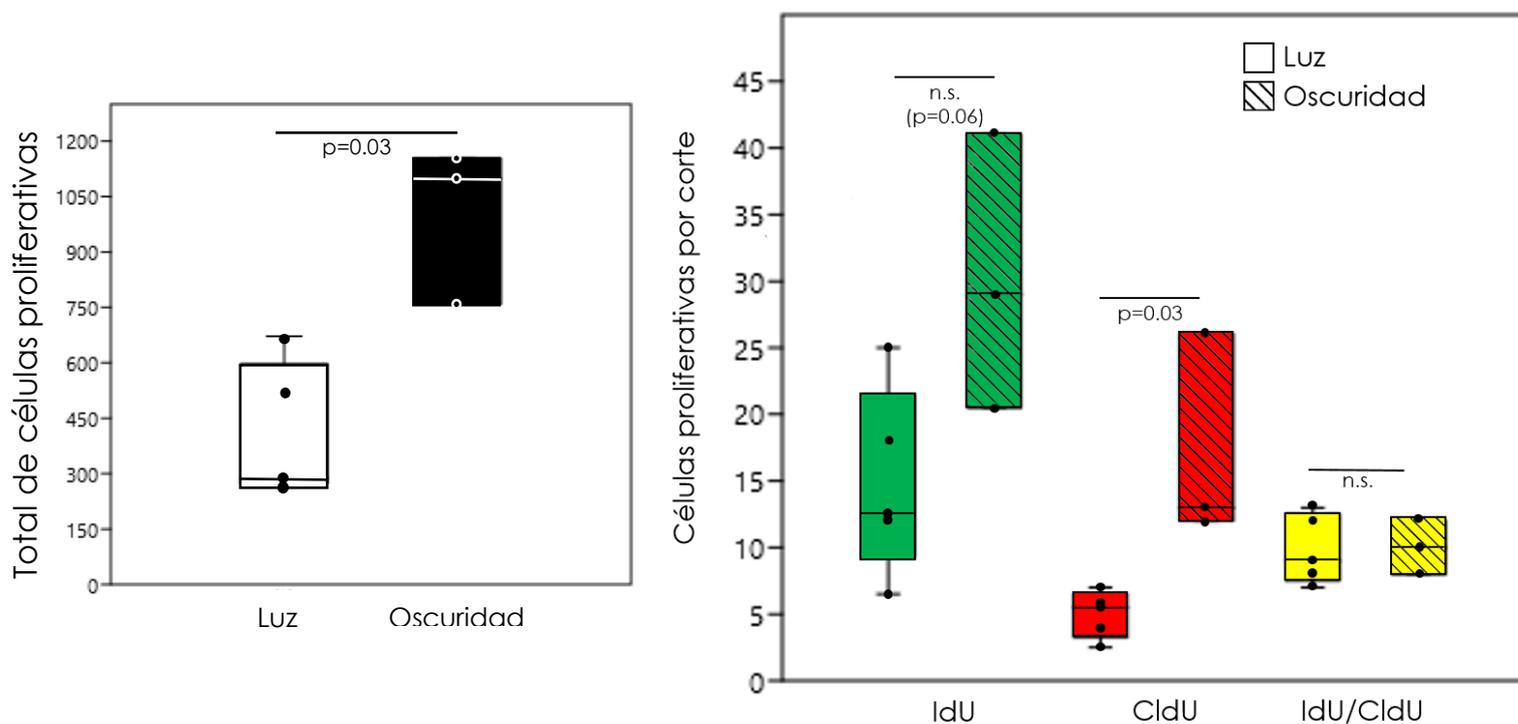


Figura 15. En la gráfica de la izquierda se observa el número total de células proliferativas para los peces cada tratamiento: luz y oscuridad test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$). La gráfica de la derecha muestra el promedio de células proliferativas por corte para cada población celular en los peces de ambos tratamientos (test Mann Whitney, $N_{\text{luz}}=5$, $N_{\text{osc.}}=3$).

Comparación de la presencia de bastones en la retina madura en peces de tratamiento luz vs oscuridad

Mediante el revelado inmunohistoquímico del XAP-2, se obtuvo información sobre los fotorreceptores del tipo bastón. En la Figura 16 se observa la retina madura de un pez de cada tratamiento, en donde el anticuerpo revela los segmentos externos de los bastones. La imagen superior (A) muestra una retina de un pez criado en condiciones de luz natural y la inferior (B) de un pez criado en oscuridad permanente, evidenciándose una mayor presencia bastones en las retinas de peces del tratamiento de oscuridad (Figura 16).

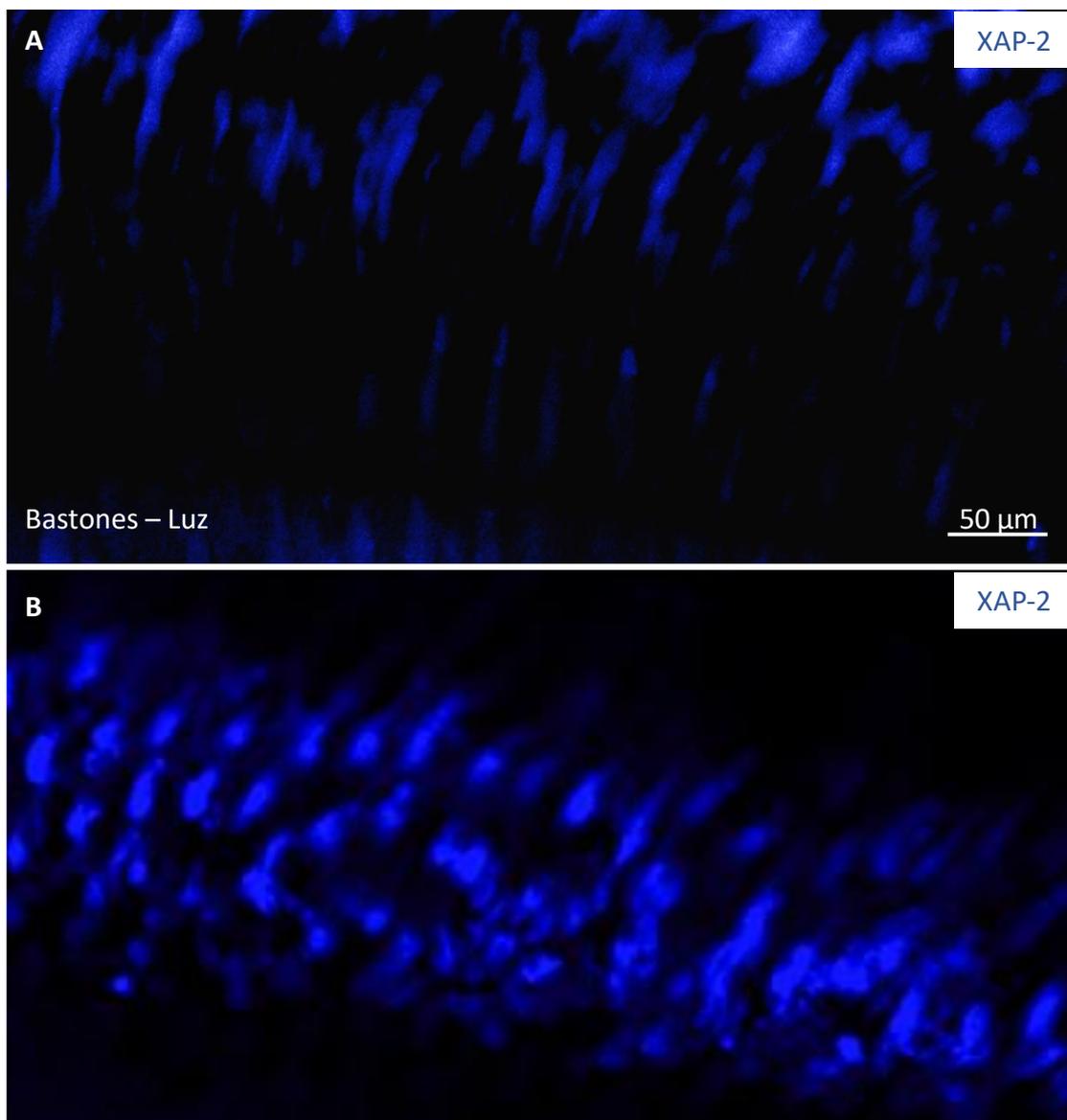


Figura 16. Imagen confocal de un corte sagital de retina de *A. charrua*, con XAP-2 (marcador de bastones), en un apilado de 30 μm . A. Retina de un pez perteneciente al tratamiento de luz. B. Retina de un pez perteneciente al tratamiento de oscuridad.

Discusión

Mediante la aplicación de los marcadores de proliferación celular IdU (30 días de sobrevida) y CldU (1 día de sobrevida) en dos poblaciones criadas en condiciones lumínicas diferentes en *A. charrua*, la inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares que captaron diferencialmente el IdU, el CldU y ambos marcadores. La señal de estos marcadores revelados, mostró la localización del nicho proliferante en la retina, en la ZMC y una diferencia en la proliferación entre tratamientos.

Los marcadores de proliferación utilizados (IdU, CldU), son análogos de la timidina y al BrdU y presentan una estructura química que sólo varía en el halógeno. En estudios realizados con peces se determinó que el tiempo de biodisponibilidad metabólico del BrdU es de 30 minutos a 4 horas (Zupanc & Horschke, 1995; Hirsch & Zupanc, 2007), por lo que los tiempos de biodisponibilidad del IdU y el CldU se estima sean similares al BrdU. De este modo, todas las células que se encontraron en algún momento de la fase S de síntesis de ADN, captaron los marcadores de proliferación utilizados durante el tiempo de biodisponibilidad.

El hecho de que en ambos tratamientos se encuentren múltiples células positivas se explica porque en los peces el crecimiento del globo ocular y la retina, acompaña el crecimiento del tamaño corporal del animal durante toda la vida (Johns & Fernald, 1981; Otteson & Hitchcock, 2003; Stenkamp, 2007). Este crecimiento ocurre por dos procesos: uno de hipertrofia, en donde ocurre una expansión del tejido y un aumento de tamaño de las células ya diferenciadas; y un segundo proceso de hiperplasia, en donde se generan nuevas células y se añaden a los circuitos preexistentes (Otteson & Hitchcock, 2003).

Al comparar el porcentaje de cada una de las tres poblaciones proliferantes en el tratamiento de luz se observó que la población de células IdU positivas parecería ser mayor que la de las células CldU positivas (Figura 12). Esto se explica porque el IdU estuvo 30 días en el organismo y pudo dividirse más de una vez manteniendo la marca nuclear, mientras que el CldU estuvo solo 24 horas. Comparando las poblaciones de IdU e IdU/CldU, no se observan diferencias notorias, es decir que de las células que se estaban dividiendo hace un mes (o sus hijas) y no migraron, aproximadamente la mitad, también se dividieron hace 24

horas. También se observó que la población de células CldU positivas fue menor que la de las doble marcadas IdU/CldU (aproximadamente un 20% y un 40%, respectivamente). Esto significa que de las células que se estaban dividiendo 24 horas antes, casi 2/3 también se estaban dividiendo hace un mes (o sus hijas). Parte de las células doble marcadas que se encuentran en la ZMC, es decir que no migraron, pueden ser consideradas como células madre putativas.

La proporción de células proliferativas mostró diferencias en las retinas de los peces del tratamiento de oscuridad. La población de células IdU (verdes) positivas fue mayor que la de las células CldU (rojas) e IdU/CldU (amarillas) (Figura 14). La mayor población de células IdU frente a las CldU se debe a que, igual que en el tratamiento de luz, debido a que la sobrevivencia del IdU es de un mes, es esperable que esta población haya experimentado más divisiones mitóticas y por ende sea más abundante. A diferencia del tratamiento de luz, en el de oscuridad la población de IdU fue mayor que la de IdU/CldU (aproximadamente 50% y 16% respectivamente), esto significa que del total de células que se estaban dividiendo hace un mes (y sus hijas) y no migraron, solo un bajo porcentaje se estaban dividiendo hace un día. Esto podría significar que la mayoría de dichas células proliferantes IdU+, ya son neuronas diferenciadas y por ende no realizan nuevas divisiones mitóticas. Esto es de esperarse dado que la mayoría de las células IdU positivas no se encuentra en la ZMC, sino en diferentes capas de la retina. La población de células CldU fue considerablemente mayor que la de las células IdU/CldU (aproximadamente un 38% y 16% respectivamente), a diferencia del tratamiento de luz, eso significa que de las células que se estaban dividiendo hace un día, solo un bajo porcentaje también se estaban dividiendo hace un mes. Al igual que la comparación anterior, esto también podía significar que posiblemente muchas de las células que se dividieron migraron, en mayor medida que en el tratamiento de luz y ya son neuronas diferenciadas, indicando una mayor demanda celular.

Al comparar el número de células proliferativas por corte de cada población entre los tratamientos de luz y oscuridad se observa que la población de células IdU y la de CldU es mayor en la retina de los peces del tratamiento de oscuridad que para el de luz (Figura 15). Esto indica una mayor proliferación celular en los peces criados en condiciones de oscuridad que en aquellos criados en luz. No hay diferencia al comparar el número de células proliferativas por corte entre tratamientos en las poblaciones de células doble marcadas IdU/CldU, evidenciando que la población de progenitores y células madre que allí habitan son una población estable.

Respecto al número total de células proliferativas de los peces de ambos tratamientos, se observó mayor número en los peces mantenidos en oscuridad (Figura 15). Esto sumado al resultado anterior reafirma que los peces en oscuridad elevaron la proliferación, e indica probablemente una mayor demanda a nivel funcional que requiera de un mayor número de células.

La descripción preliminar obtenida con el marcador de bastones, parece indicar que, en los peces del tratamiento de oscuridad, la presencia de bastones es superior a la de los peces del tratamiento de luz.,

El conjunto de resultados parecería ir en contra de las hipótesis que plantean que “mientras más se utiliza un sistema, más crece y se desarrolla”, ya que, en la oscuridad, la visión no parecería ser el sentido más utilizado (Cline, 2001; Ohno, 2013) y por ende un aumento en la proliferación celular en la retina no sería probable. Sin embargo, la diferencia en la cantidad de células proliferantes, puede explicarse posiblemente por dos razones. La primera sería que, frente a una disminución en la luminosidad, en vez de disminuir la proliferación general de la retina, se apunte a un aumento de aquellas células que permiten la visión en la oscuridad, los bastones. La segunda razón reafirma la primera y se basa en el lugar de origen de los distintos tipos celulares en la retina. La ZMC se encuentra en un proceso continuo y secuencial de proliferación, y constituye una región histológicamente distintiva, en la cual se encuentran células multipotentes que poseen la capacidad de generar todos los tipos celulares retinianos, excepto los fotorreceptores de tipo bastón (Lahne et al., 2018). Los bastones son generados por la glía de Müller de división lenta, que se localiza en la capa nuclear interna (Otterson et al., 2001; Bernardos et al., 2007). La glía de Müller se divide asimétricamente para dar progenitores celulares neuronales que continúan proliferando hasta formar agrupaciones en la CNI, que luego migran a la CNE y producen las células precursoras de bastones, que se dividen una vez más hasta diferenciarse en bastones (Figura 17) (Otterson et al., 2003; Lahne et al., 2018). El incremento de células proliferantes de los peces del tratamiento de oscuridad no se vio restringido a la ZMC, sino que por el contrario, se destaca que el aumento de la proliferación se extiende hasta 200µm rostrocaudalmente. Esto podría deberse a que estas nuevas células son principalmente parte del linaje de los bastones. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que además de aumentar el linaje de bastones, también lo haga la proliferación de otras células no

fotorreceptoras como las células ganglionares, bipolares y amácrinas, dado que el aumento de la proliferación se da en las tres capas celulares.

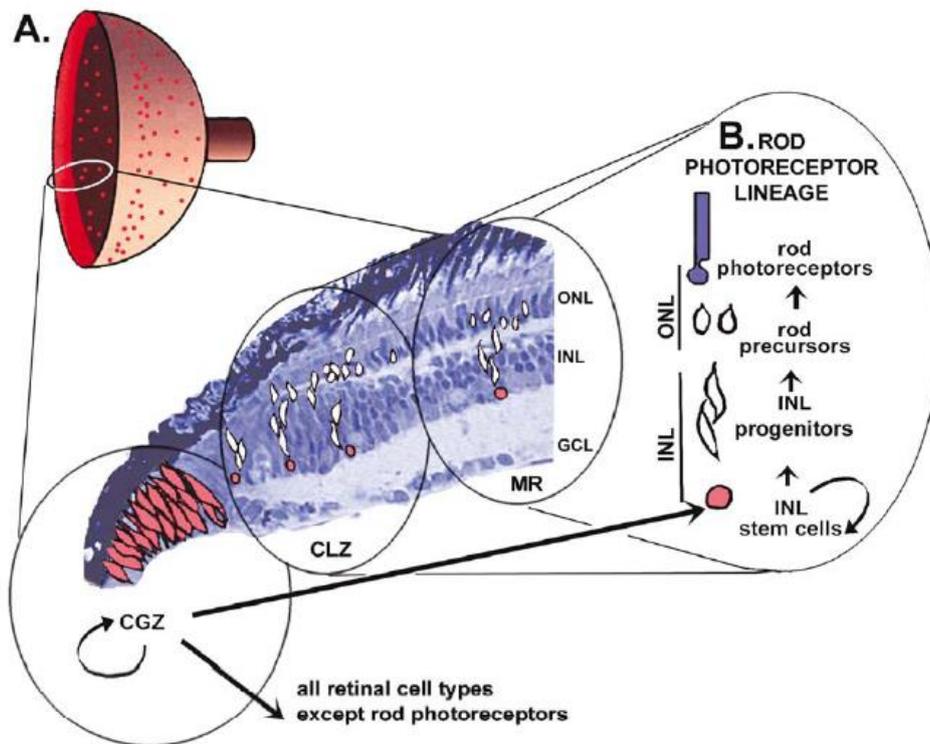


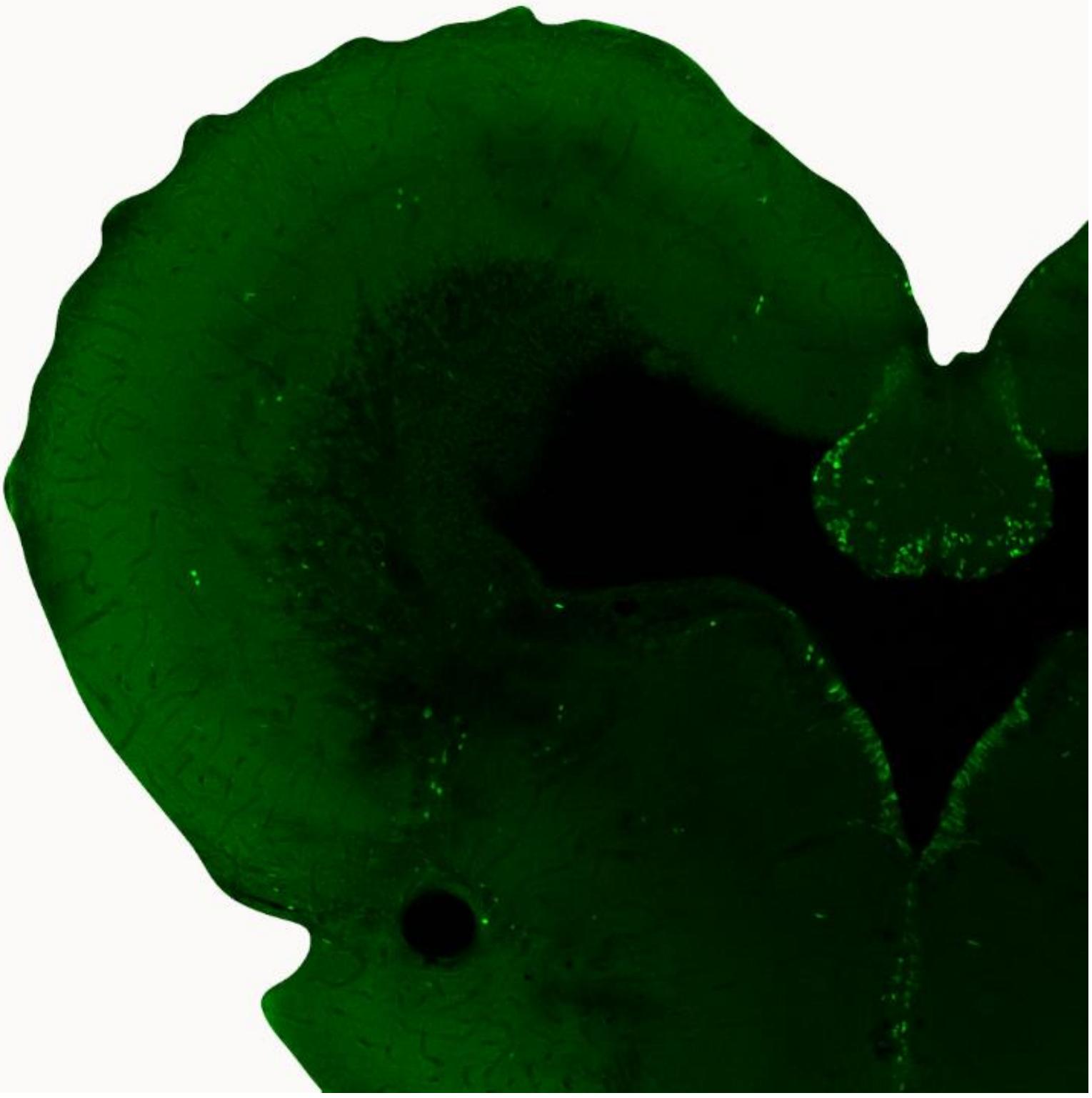
Figura 17. Modelo de neurogénesis y generación de bastones en retina de teleosteos. A. Dibujo de la retina, con los sitios neurogénicos en rojo. Debajo una sección de retina que muestra zonas de proliferación celular. En la CGZ (zona marginal ciliar) se encuentran los progenitores que dan lugar a todos los tipos celulares excepto los bastones. En la CLZ (zona circunferencial larval), contigua a la CGZ y en la MR (retina madura) ocurre la generación de bastones a través del linaje proveniente de las células madre (glía de Müller) presentes en la capa nuclear interna (INL) que se diferencian y migran acercándose a la capa nuclear externa (ONL) donde finalmente se generan los bastones. Tomado de Otteson & Hitchcock, 2003.

Teniendo en cuenta que en las condiciones de oscuridad los bastones serían una célula de gran utilidad, el aumento masivo de su producción sería un mecanismo para intentar contrarrestar la falta de luz. Esto es concordante con un estudio que muestra que peces criados en condiciones de total oscuridad, aumentan la proliferación de las células precursoras de bastones (Lahne et al., 2018). También se ha descrito que la proliferación de células precursoras de bastones aumenta durante la noche (Chiu et al. 1995; Kwan et al. 1996).

Estos resultados preliminares muestran una firme tendencia que, con el fin de ser corroborada, exigen un n mayor.

CAPÍTULO 2

Proliferación celular en TO, TL y BO de *A. reicherti* criadas en diferentes condiciones lumínicas



Materiales y métodos

Con el objetivo de determinar si las condiciones de luminosidad modifican la proliferación celular en el BO, TO y TL de *A. reicherti*, se realizó la administración de un marcador proliferativo.

Obtención y mantenimiento de animales

Se colectaron hembras adultas (aproximadamente 6 meses) de *A. reicherti* en la localidad de Vergara (Departamento de Treinta y Tres, Uruguay) en el mes de julio. Fueron mantenidas en el acuario del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) a una temperatura de 19°C, dispuestas de en peceras (14 x 22 x 30cm) en grupos de a 3 individuos, con oxigenación y recambio parcial de agua cada 2 días y alimentadas diariamente con *Tubifex* (*Tubifex rivolorum*).

Tratamiento

Los especímenes se dividieron en dos grupos experimentales al azar. Un grupo de hembras fue mantenido en condiciones de luz y oscuridad naturales (tratamiento luz, n=6) y las hembras del otro grupo fueron mantenidas en condiciones de oscuridad constante (tratamiento oscuridad, n=6). Para crear las condiciones de oscuridad, las peceras fueron colocadas en una estantería forrada con doble nylon negro en su totalidad, durante 45 días,

Administración del marcador de proliferación celular

Transcurridos 45 días de mantenimiento en las condiciones establecidas se realizó la administración del marcador de proliferación celular BrdU intraperitoneal. Esta vía de administración se eligió por la simplicidad de la maniobra y porque la cavidad peritoneal tiene una gran superficie de absorción, permitiendo que las sustancias pasen al sistema circulatorio con facilidad. La dosis aplicada fue de 100 mg/kg y el tiempo de sobrevida fue de 72 horas (Figura 18).

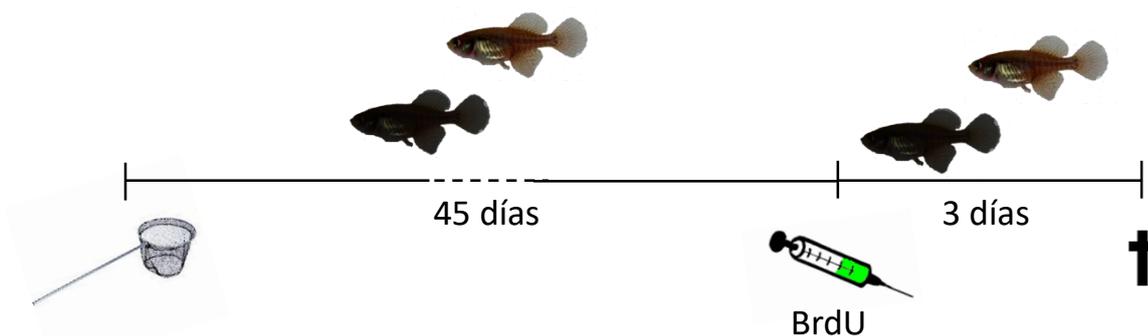


Figura 18. Esquema metodológico para estudio del encéfalo de hembras *A. reicherti* adultas. Luego de la pesca, los animales se separan en 2 grupos experimentales (luz y oscuridad), pasados los 45 días son inyectadas con el marcador de proliferación BrdU, a los 3 días se realiza la perfusión.

Fijación y perfusión

Transcurridas las 72 horas luego de la administración del marcador, los peces fueron anestesiados con Eugenol (Eugenol 10% en etanol 96%) en concentración 1:1000. Como plano anestésico profundo se consideró la disminución del movimiento opercular, pérdida del reflejo de escape y su flotabilidad. Una vez anestesiado el animal, se realizó la perfusión intracardiaca. Para esto, se removió la sangre del aparato circulatorio realizando un lavado con solución salina, la cual tiene un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO_2 al 1%) para facilitar el paso de las soluciones y evitar el colapso de los vasos; y un anticoagulante (Citrato de sodio, $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$ al 2%), para evitar que se generen trombos al contactar el fijador con la sangre. Una vez realizado el lavado cada pez fue perfundido con PAF al 10% en BF 0.1 M pH=7.2. Luego se realizó la apertura de la caja craneana para realizar una postfijación por inmersión de 24 horas (en el mismo PAF al 10%).

Técnica de disección, encastre y realización de los cortes

Finalmente se realizó la disección de los encéfalos (Figura 26) bajo lupa (NIKON, SMZ800) y se encastraron en una mezcla de gelatina (1.5%)-albúmina (45%) disuelta en solución salina de cloruro de sodio (0.9%) con glutaraldehído (0,25%), obteniendo un bloque cuya consistencia permitió realizar los cortes. Cada bloque se colocó, fijó y cortó en un vibrátomo (LEICA VT100S). Los cortes fueron seriados de $60\mu\text{m}$ de grosor en planos de corte transversales.

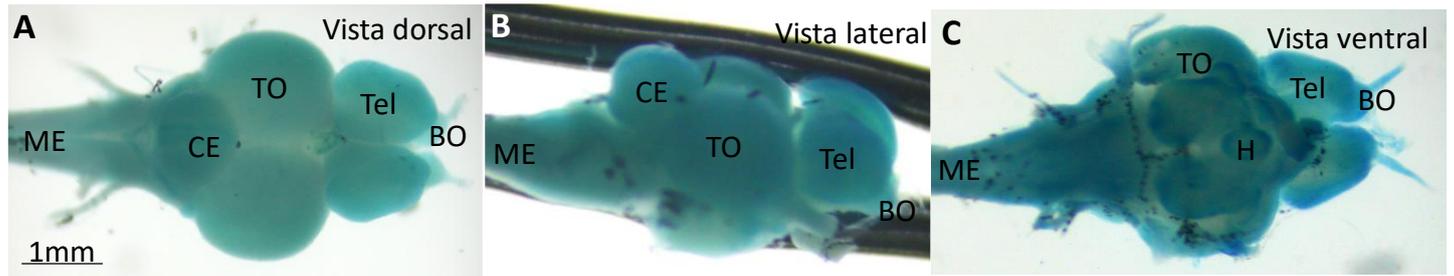


Figura 19. Microfotografía bajo lupa del encéfalo de *A. reicherti* hembra. A. Vista dorsal. B. vista lateral. C. Vista ventral. ME: médula espinal; CE: cerebelo; TO: tectum óptico; Tel: telencéfalo; BO: bulbo olfatorio; H: hipófisis.

Detección de inmunohistoquímica

Los anticuerpos encargados de detectar el BrdU (Tabla 2) reconocen estas sustancias en el ADN monocatenario, para esto los cortes deben ser previamente tratados. Esto se logra mediante la incubación de los cortes en HCl diluido en BFT al 0,3% (HCl 2N - BFT 85%). El BFT desorganiza la estructura lipídica y genera agujeros en las membranas biológicas, permitiendo que el HCl ingrese a las células y desnaturalice el ADN doble cadena, exponiendo los antígenos donde están unidos al BrdU a los anticuerpos específicos. Una vez que los antígenos fueron expuestos, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario y luego con el secundario conjugado a un fluoróforo para su detección mediante inmunofluorescencia, utilizando microscopía láser confocal. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo:

- 1- Se lavaron tres veces los cortes en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 2- Se incubaron los cortes en la solución de BFT-HCl, durante 40 minutos.
- 3- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 4- Se incubaron los cortes en el anticuerpo primario 48 horas en BFT.
- 5- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 6- Se incubaron los cortes en el anticuerpo secundario conjugado con fluorocromos, en BFT durante una hora y media en oscuridad.
- 9- Se realizaron tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.

Una vez aplicado el protocolo, los cortes fueron montados y mantenidos en heladera evitando procesos de crecimiento de microorganismos, y en cajas opacas para que los

conjugados fluorescentes no se vean excitados por la luz, evitando así la pérdida de la intensidad de la señal.

Tabla 2. Descripción de anticuerpos primario y secundario utilizados, marca comercial y dilución recomendada.

Anticuerpo primario	Marca	Dilución
Ratón anti-BrdU	Hybridoma Bank	1/80
Anticuerpo secundario	Marca	Dilución
Burro anti-ratón Alexa 488	Molecular probes	1/1000

Controles del marcador de proliferación

Durante la puesta a punto de la técnica de reconocimiento del BrdU se utilizaron secciones histológicas de intestino de pez (que presenta gran proliferación celular) como controles positivos. En otros casos, se incubaron simultáneamente cortes de encéfalo de pez sin anticuerpo primario o sin anticuerpo secundario como control negativo. También se realizaron controles con cortes histológicos que no recibieron los marcadores de proliferación.

Observación y fotografiado de los cortes

Los preparados histológicos, fueron observados y analizados con un Microscopio Confocal Olympus FluoView™300 asistido por el software para Windows® FluoView™300. Para la visualización de los preparados se utilizó el láser apropiado al fluorocromo conjugado al anticuerpo secundario:

-Láser de argón azul, de 488 nanómetros de longitud de onda, que excita al conjugado Alexa-fluor 488, de esta forma se obtiene una señal de color verde, que corresponde a las moléculas de ADN que portan al BrdU.

Una vez especificados los parámetros de visualización de las imágenes en el FluoView™300 (línea de excitación e intensidad del láser, apertura del pinhole de detección, ganancia del fotomultiplicador, velocidad de barrido del láser, tamaño de la imagen), se seleccionó el modo de barrido XYZ, que capta una serie de imágenes ópticas confocales XY de diferentes planos a través del espesor de la muestra. En cada corte (grosor 60µm) se estableció una ventana de 30µm donde se encuentra la información de interés (núcleos marcados) y se obtuvieron fotos de esa ventana cada 1µm (en el plano Z), es decir, de cada corte se obtienen 31 planos focales. Con el método de apilamiento brindado por el software del

microscopio, puede obtenerse una imagen que contiene los 31 planos juntos, lo que permite cuantificar los núcleos marcados en ese volumen del corte

Cuantificación celular

Una vez obtenidas las imágenes, en el programa ImageJ se procedió al conteo de los núcleos BrdU positivos de la totalidad de los cortes de las regiones de interés, mediante el apilado de los planos. Las regiones fueron: el BO en su totalidad, la BOzv, el TL, el TO y la ZMT (compuesta por la ZMTd y ZMTv) (Figura 20).

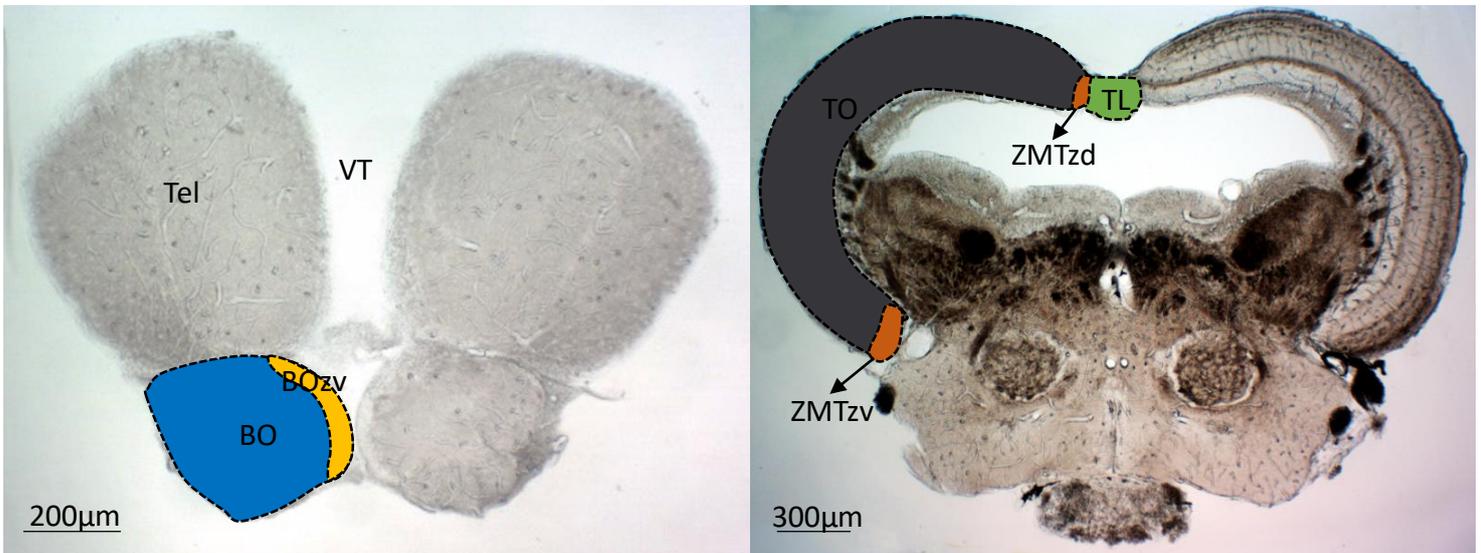


Figura 20. Regiones analizadas para la contabilización de los núcleos. A nivel telencefálico: el BO (azul + amarillo) y BOzv (amarillo) (izquierda). A nivel mesencefálico: el TL (verde) el TO (gris) y la ZMT (ZMTd y ZMTv, naranja). Tel: telencefalo; VT: ventrículo telencefálico; BO: bulbo olfatorio; BOzv: zona ventricular del bulbo olfatorio; TL: *torus longitudinalis*; TO: tectum óptico; ZMTd: zona marginal tectal dorsal; ZMTv: zona marginal tectal ventral.

Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de libre acceso Past. Se realizó la comparación entre las zonas de interés entre los tratamientos de luz y oscuridad mediante test de Student para muestras independientes.

Resultados

Se estudiaron las características histológicas y proliferativas de dos grupos de hembras adultas *A. reicherti*, que permanecieron 45 días en luz natural (tratamiento luz) u oscuridad permanente (tratamiento oscuridad). Esto se realizó con un pulso de 72 horas del marcador proliferativo nuclear: BrdU (Figura 18).

Distribución de los núcleos marcados con BrdU en el encéfalo de *A. reicherti*

Tratamiento de luz

El revelado inmunohistoquímico evidenció la presencia de núcleos que variaron en tamaño, forma y localización. En la Figura 21 se observa la imagen de un corte encéfalo a nivel telencefálico, visualizándose el bulbo olfatorio, donde se pueden encontrar núcleos BrdU+ en toda la extensión, pero principalmente en la zona proliferativa que se encuentra entre la ICL y el ventrículo telencefálico medial. También se encontraron núcleos BrdU+ en la región dorsal del BO, correspondiente a la transición entre esta estructura con los con los lóbulos telencefálicos.

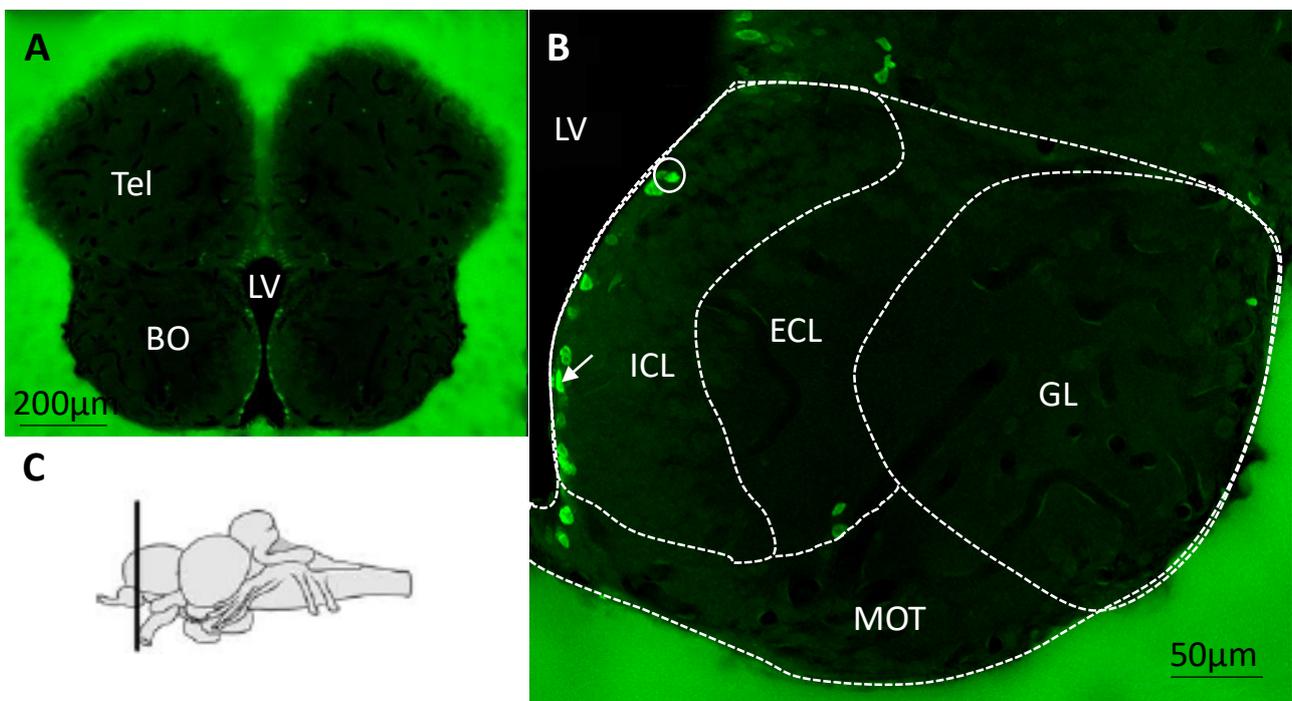


Figura 21. Imagen confocal de un corte transversal de encéfalo de *A. reicherti* del tratamiento de luz. En verde se observan los núcleos BrdU+, en un apilado de 30µm. A. Imagen panorámica de encéfalo a nivel del BO (bulbo olfatorio). B. Aumento del BO. Tel: telencefalo; LV: luz ventricular; ICL: capa celular interna; ECL: capa celular externa; GL: capa glomerular; MOT: tracto olfatorio medial; círculo: núcleos redondeados; flecha: núcleos alargados. C. Esquema de un encéfalo de *Austrolebias* indicando el nivel del corte.

En la figura 22, se muestra un corte del encéfalo a nivel del mesencéfalo, donde se visualizan las zonas de interés: TO y TL. En el TO se destacan dos regiones altamente proliferativas, la zona marginal tectal dorsal (ZMTd), en contacto con el TL, y la zona marginal tectal ventral (ZMTv), en el extremo inferior del casquete óptico. Ambas regiones se caracterizan por tener abundantes núcleos BrdU+ con dos formas predominantes: ovoides y alargados. También hay presencia de núcleos BrdU+ en el resto del TO, generalmente de forma redondeada. El TL presenta un elevado número de núcleos BrdU+, mayoritariamente hacia el ventrículo tectal y de aspecto esférico u ovoide.

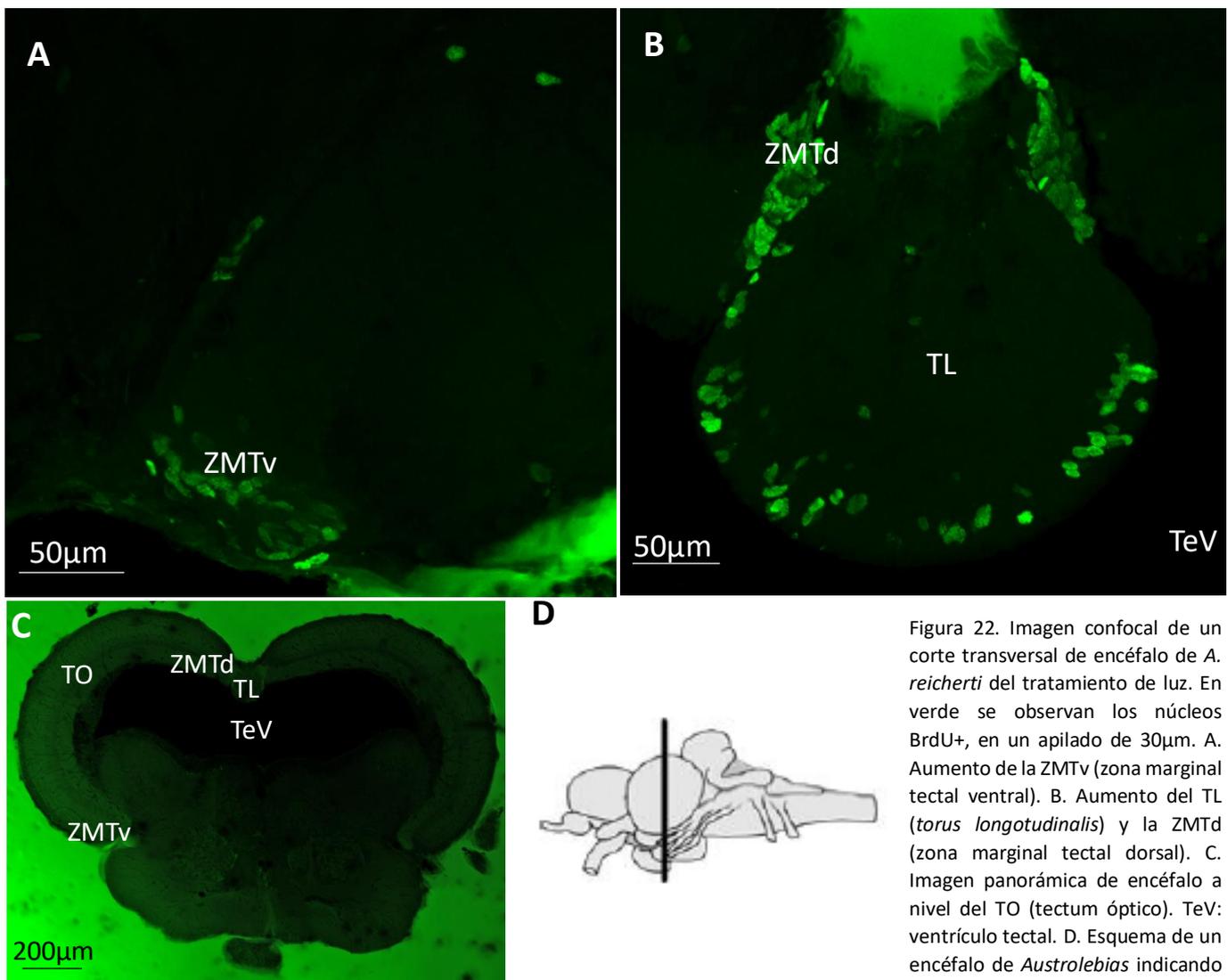


Figura 22. Imagen confocal de un corte transversal de encéfalo de *A. reicherti* del tratamiento de luz. En verde se observan los núcleos BrdU+, en un apilado de 30µm. A. Aumento de la ZMTv (zona marginal tectal ventral). B. Aumento del TL (*torus longitudinalis*) y la ZMTd (zona marginal tectal dorsal). C. Imagen panorámica de encéfalo a nivel del TO (tectum óptico). TeV: ventrículo tectal. D. Esquema de un encéfalo de *Austrolebias* indicando el nivel del corte.

Tratamiento de oscuridad

Al igual que en el tratamiento de luz, el revelado inmunohistoquímico reveló que en el tratamiento de oscuridad la forma, tamaño y localización de los núcleos fue variada. En la Figura 23 se observa un corte del BO, en donde la población proliferante se encuentra en la zona ventricular, aunque también se observan núcleos en otras áreas.

En la Figura 24 se muestra un corte transversal de encéfalo a nivel del mesencéfalo, donde puede verse el TO y TL. En el TO también se destacan las dos regiones altamente proliferativas: ZMTd y ZMTv, siendo sus núcleos proliferantes principalmente ovoides y alargados. También hay presencia de núcleos BrdU+ en el resto del TO, generalmente de forma redondeada. El TL presenta un elevado número de núcleos BrdU+, mayoritariamente hacia el ventrículo tectal y de aspecto esférico u ovoide.

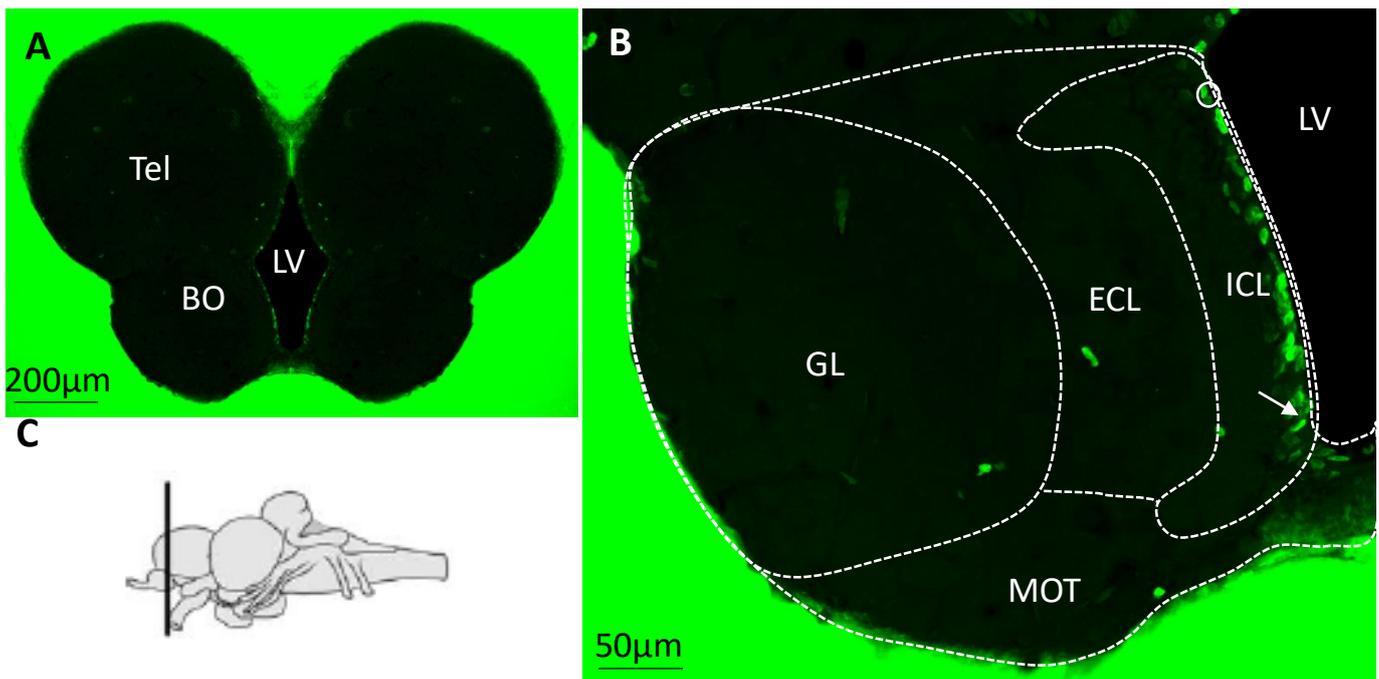


Figura 23. Imagen confocal de un corte transversal de encéfalo de *A. reicherti* de tratamiento de oscuridad. En verde se observan los núcleos BrdU+, en un apilado de 30 μ m. A. Imagen panorámica de encéfalo a nivel del BO (bulbo olfatorio). B. Aumento del BO. Tel: telencéfalo; LV: luz ventricular; ICL: capa celular interna; ECL: capa celular externa; GL: capa glomerular; MOT: tracto olfatorio medial; círculo: núcleos redondeados; flecha: núcleos alargados. C. Esquema de un encéfalo de *Austrolebias* indicando el nivel del corte.

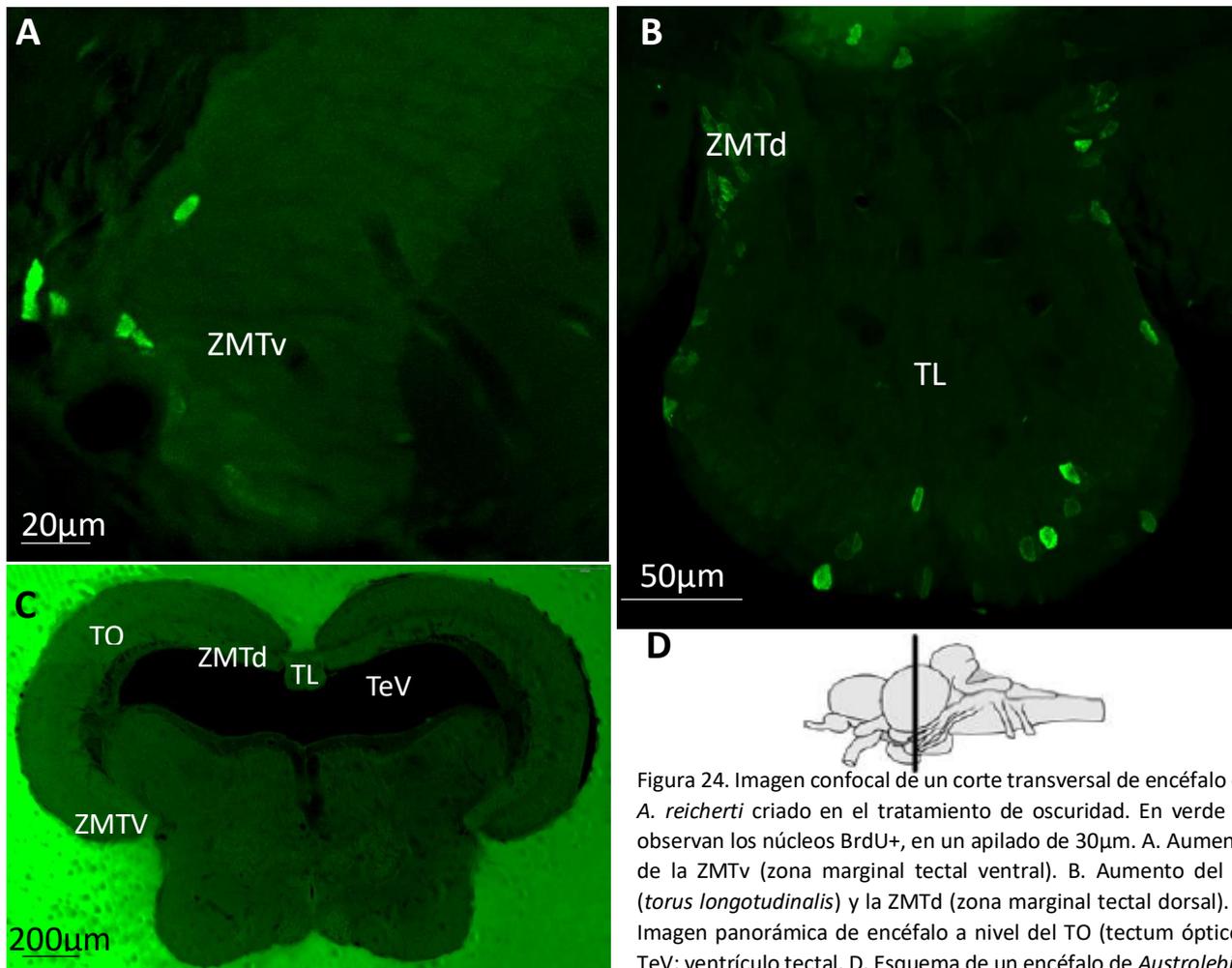


Figura 24. Imagen confocal de un corte transversal de encéfalo de *A. reicherti* criado en el tratamiento de oscuridad. En verde se observan los núcleos BrdU+, en un apilado de 30µm. A. Aumento de la ZMTv (zona marginal tectal ventral). B. Aumento del TL (*torus longitudinalis*) y la ZMTd (zona marginal tectal dorsal). C. Imagen panorámica de encéfalo a nivel del TO (tectum óptico). TeV: ventrículo tectal. D. Esquema de un encéfalo de *Austrolebias* indicando el nivel del corte.

Cuantificación de los núcleos BrdU+

Se comparó la proliferación de estructuras encefálicas relacionadas con el procesamiento de la olfacción y de la visión en los tratamientos de luz y oscuridad. En este sentido se contaron los núcleos totales de las siguientes estructuras relacionadas con la olfacción: BO y BOvz; y relacionadas con la visión: TO (entendido como todo el TO excepto la ZMT), ZMT (entendida como la suma de los núcleos proliferantes de la ZMT dorsal y ventral) y TL (Figura 20).

Olfacción

La proliferación total del BO del tratamiento de oscuridad fue significativamente mayor que la del tratamiento de luz (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=3.13$, $p=0.01$). De igual forma, al comparar la BOvz, la proliferación en el tratamiento de oscuridad fue significativamente mayor que en el de luz (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=3.14$, $p=0.01$) (Figura 25).

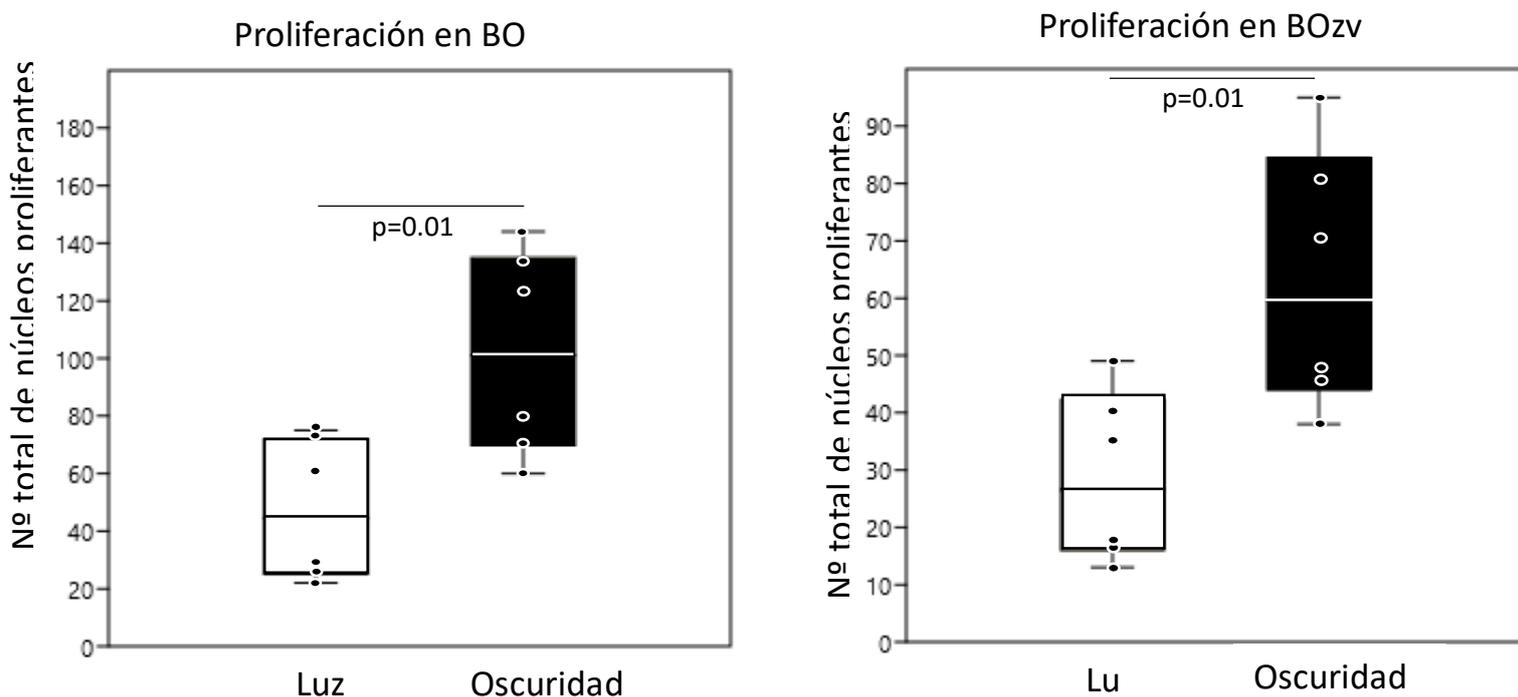


Figura 25. Número total de núcleos proliferantes (BrdU+) en el BO (izquierda) y en la BOvz (derecha) para los tratamientos de luz ($N=6$) y oscuridad ($N=6$) (test de t, media, \pm ES).

Visión

Al comparar el TO en el tratamiento de luz contra el de oscuridad se observó que el primero presentó una proliferación significativamente mayor que el segundo (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=2.23$, $p=0.048$) (Figura 26). De igual forma, la comparación de la ZMT, también presentó una proliferación significativamente mayor en el tratamiento de luz respecto al de oscuridad (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=5.44$, $p<0.001$) (Figura 26). El TL del tratamiento de luz también mostró una proliferación significativamente mayor que el TL del tratamiento de oscuridad (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=3.52$, $p=0.006$) (Figura 27). La suma de la proliferación de las 3 regiones cuantificadas para la visión muestra que, la proliferación en las áreas visuales es

significativamente mayor en el tratamiento de luz, respecto al de oscuridad (test de t para muestras independientes, $N=6$, $t=5.22$, $p<0.001$) (Figura 27).

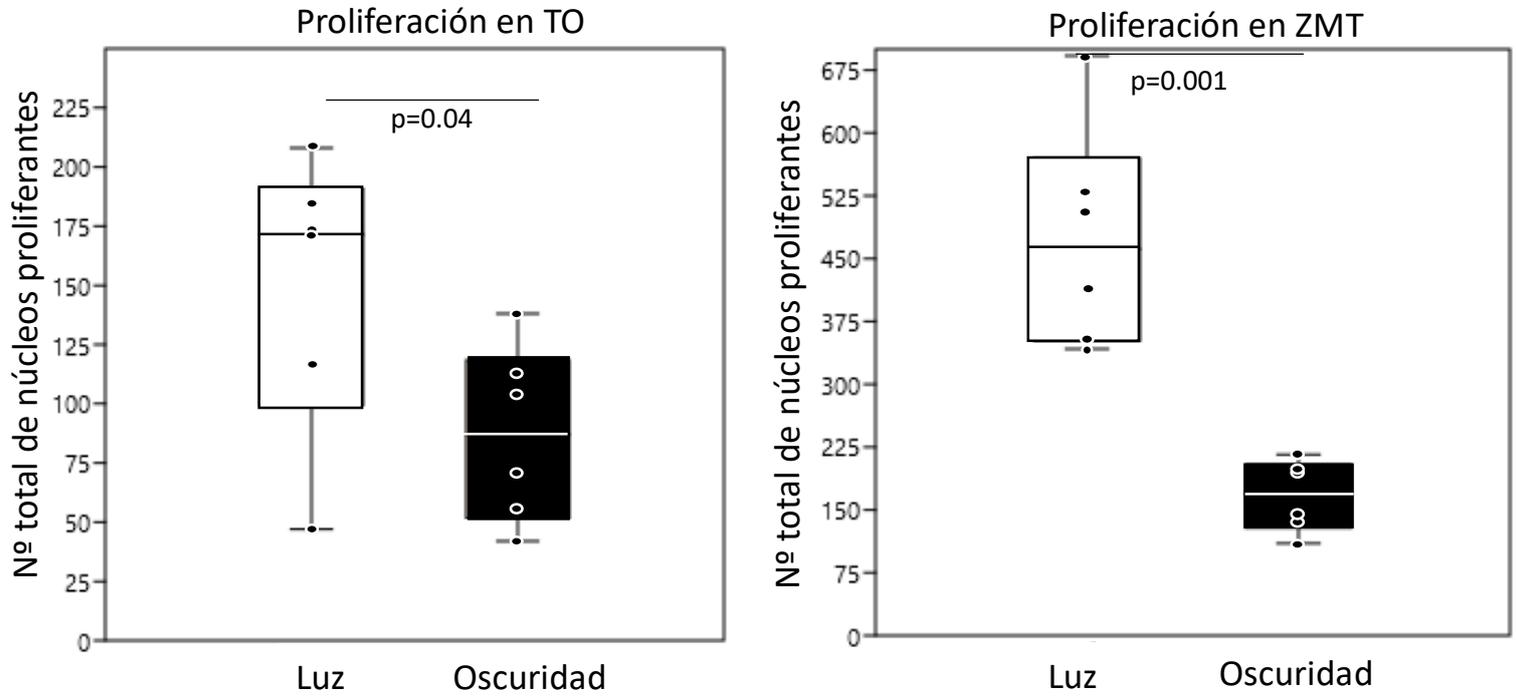


Figura 26. Número total de núcleos proliferantes (BrdU+) en el TO (izquierda) y en la TL (derecha) para los tratamientos de luz ($N=6$) y oscuridad ($N=6$) (test de t, media \pm ES).

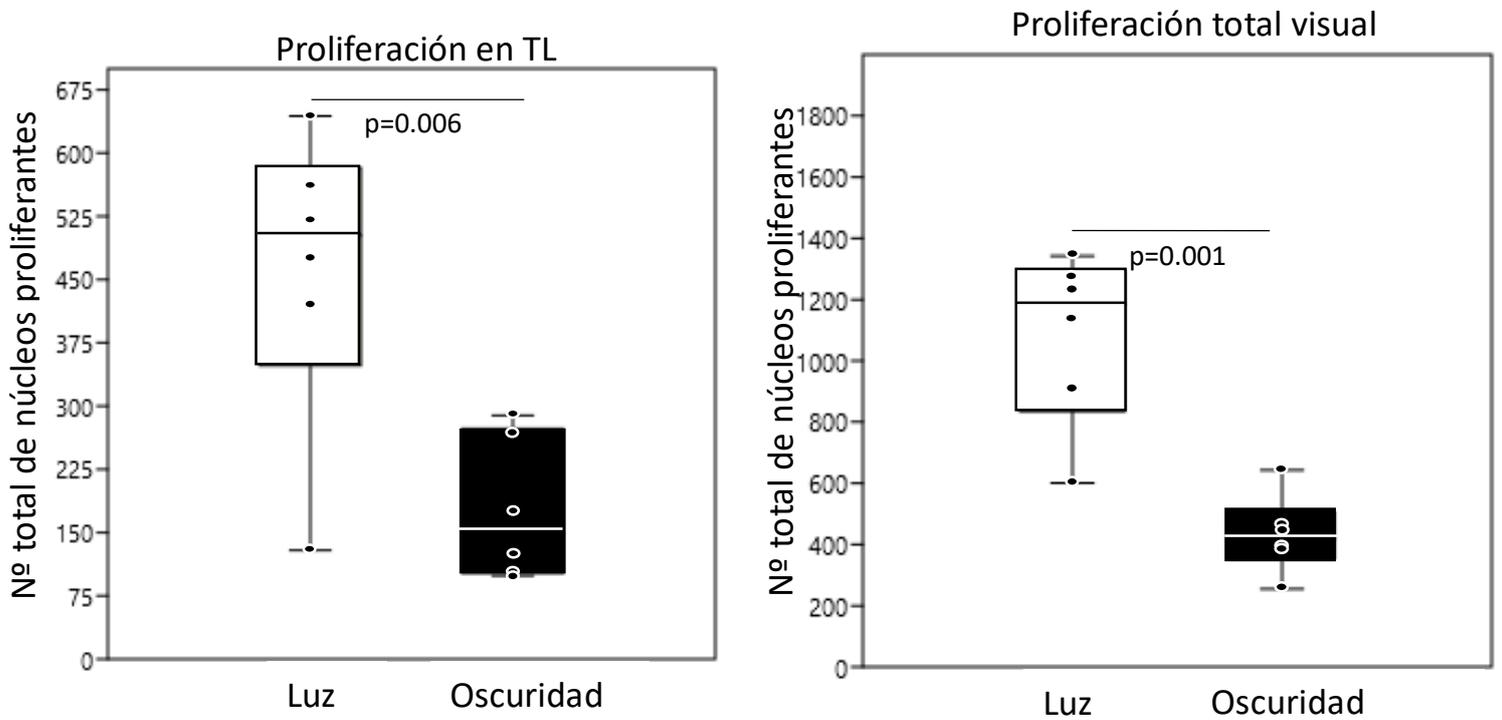


Figura 27. Número total de núcleos proliferantes (BrdU+) en el TL (izquierda) y en la suma de todas las regiones visuales analizadas (derecha) para los tratamientos de luz ($N=6$) y oscuridad ($N=6$) (test de t, media \pm ES).

Los resultados se muestran resumidos en el siguiente cuadro (Tabla 3):

Tabla 3. Resumen que muestra qué tratamiento obtuvo mayor proliferación (>) o menor (<) para cada región del encéfalo estudiada. BO: bulbo olfatorio; BOzv: zona ventricular del bulbo olfatorio; TO: tectum óptico; ZMT: zona marginal tectal; TL: *torus longitudinalis*. Total: las 3 zonas visuales sumadas.

Regiones encefálicas		Tratamiento luz	Tratamiento oscuridad
Olfacción	BO	<	>
	BOzv	<	>
Visión	TO	>	<
	ZMT	>	<
	TL	>	<
	Total	>	<

Discusión

Mediante la aplicación del marcador de proliferación celular BrdU con una sobrevivida de 72 horas, la inmunohistoquímica reveló que las hembras *A. reicherti* criadas en condiciones de oscuridad, presentaron una proliferación mayor en las regiones vinculadas a la olfacción respecto a aquellas criadas en condiciones de luz natural, mientras que las hembras criadas en luz natural presentaron mayor proliferación en las regiones vinculadas a la visión, que aquellas criadas en condiciones de oscuridad.

Al momento de la eclosión, el encéfalo de los teleósteos no presenta la morfología ni la organización interna característica de un encéfalo adulto, por lo que continúa desarrollándose histológica y morfológicamente post eclosión y a lo largo de toda la vida (Brandstätter y Kotrschal 1989, 1990; Zupanc y Horschke 1995; Nieuwenhuys et al., 1998), al igual que ocurre en la retina. El número de células del encéfalo, neuronas y glías, aumenta conforme avanza la edad y el tamaño corporal del animal y, la mayor parte de estas células neoformadas se originan en zonas proliferativas específicas (Kaslin et al., 2008; Torres-Pérez, 2019). Los resultados permitieron reafirmar algunas zonas proliferativas y encontrar variaciones en la proliferación en dichas zonas, frente a diferentes condiciones lumínicas de cría.

En un estudio comparativo entre especies de *Austrolebias* se ha descrito que en la pared ventricular del BO existe proliferación (Fernández et al., 2011) y que en esta zona extendida dorso medialmente existen al menos tres nichos neurogénicos con diferentes características celulares (Rosillo et al., 2016). Los resultados confirman la presencia de proliferación en la pared ventricular ventral, medial y dorsal del BO, con núcleos proliferativos muy heterogéneos del tipo esferoides, ovalados, alargados y planos, indicando distintos progenitores o células en diferente estadio de diferenciación.

El BO es una estructura de procesamiento olfatorio en donde ocurre el primer relevo sináptico con los axones provenientes de las neuronas sensitivas de primer orden ubicadas en la roseta olfatoria (Hamdani & Døving, 2007). En él se encuentran 3 tractos olfatorios, dos mediales (IMOT, tracto olfatorio medial lateral y mMOT, tracto olfatorio medial medial) y uno lateral (LOT, tracto olfatorio lateral) vinculados con funciones específicas de reproducción (IMOT), alarma (mMOT) y alimentación (LOT). Los resultados indican que las

hembras criadas en condiciones de oscuridad permanente, exhibieron una mayor proliferación que las criadas en condiciones de luz natural, para la totalidad del BO y su zona ventricular.

El TO es el centro visual primario en todos los teleósteos y presenta zonas proliferativas bien caracterizadas. Los resultados permitieron identificar en *A. reicherti* las mismas zonas proliferativas observadas en *A. charrua*, el TO, el TL y las ZMT (dorsal y ventral) (Torres-Pérez, 2019). Los resultados revelan que las hembras criadas en condiciones de luminosidad natural presentaron mayor proliferación celular en las estructuras visuales consideradas (TO, TL, ZMTv y ZMTd), que las hembras criadas en condiciones de oscuridad.

Ambos resultados coinciden con numerosos estudios que muestran que el sistema nervioso es modulable por condiciones ambientales. Varios autores plantean que la plasticidad depende de la actividad: es decir que el ganar o perder conexiones, así como una mayor o menor neurogénesis, depende del uso de las estructuras, de esta forma plantean que mientras más se utilice un sistema, más crece o se desarrolla (Cline, 2001; Ito et al., 2007). Un ejemplo es el estudio de Jeserich y H. Rahmann (1979) en donde describen que la oscuridad permanente durante el primer mes posteclosión en *Salmo gairdneri*, genera una reducción en: el número de sinapsis por unidad de área, tamaño de zonas de contacto sináptico y número de vesículas por terminal nerviosa. De la misma forma se observó que la privación de luz genera reducción o deformación en las espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza visual en conejos y ratones, (Globua & Scheibel, 1967; Valverde, 1967). Esto podría explicar por qué es reducida la proliferación en estructuras del procesamiento visual en aquellos peces que son criados en total oscuridad, frente a una menor posibilidad de utilizar este sentido, se invierte menos en él.

Así como se evidencia que mientras menos se utiliza un sentido, menos se desarrolla, también se ha visto que, a modo de plasticidad compensatoria, ante la falta o disminución de una modalidad sensorial, otra puede verse potenciada (Ryugo et al., 1975; Hyvarinen et al., 1978a; Toldi et al., 1994; Rauschecker, 1995; Bavelier & Neville, 2002; Chapman et al., 2010). Esto podría explicar una mayor cantidad de células proliferativas en las estructuras de procesamiento olfatorio en aquellas hembras criadas en total oscuridad. Dado que en este grupo de hembras la visión se vería comprometida y presentan una menor proliferación en estructuras de procesamiento visual, lo compensarían aumentando la proliferación en el BO.

Se conoce además que *A. charrua* posee el nervio terminal, una conexión anatómica y funcional entre las aferencias sensitivas de la visión y olfacción, formada por cuerpos neuronales en el BO, cuyos axones llegan a través del nervio óptico a la capa nuclear interna de la retina (Rosillo et al., 2013). Esta conexión directa entre ambos sistemas sensoriales, condiciona las respuestas olfativas y visuales cuando hay variaciones en el entorno. Es de destacar que el sistema del nervio terminal está vinculado con las actividades sociales y reproductivas del pez (Whitlock, 2011). Esta estructura reafirma una retroalimentación entre ambas modalidades sensoriales.

CAPÍTULO 3

Ensayos comportamentales de agudeza sensitiva en hembras *A. reicherti* criadas en condiciones lumínicas diferentes



Materiales y métodos

Con el objetivo de determinar la capacidad de las hembras criadas en distintas condiciones de luminosidad, de distinguir al homoespecífico utilizando el sentido de la olfacción o la visión, se realizaron pruebas comportamentales de preferencia frente a dos estímulos.

Obtención y mantenimiento de animales

Las hembras de *A. reicherti* utilizadas en las pruebas comportamentales se obtuvieron a partir de la eclosión de huevos provenientes de cruzamientos realizados en el acuario de Facultad de Ciencias siguiendo un protocolo establecido para la cría de peces anuales (Berois et al., 2016), en el mes de abril. Se colocaron díadas macho-hembra en acuarios (40 x 13 x 15 cm) acondicionados con un recipiente conteniendo turba orgánica, durante 3 a 5 días. Luego de cada cruzamiento la turba fue extraída, secada y almacenada en bolsas plásticas, y luego de un período de desecación de 5 meses se procedió con la eclosión de los huevos. Los alevines fueron alimentados con *Artemia salina*, y una vez alcanzada la diferenciación sexual, las hembras fueron separadas y mantenidas en peceras (40 x 13 x 15 cm) en grupos de a 3, con oxigenación y recambio parcial de agua cada 2 días, a una temperatura de 19°C y alimentadas diariamente con *Tubifex* (*Tubifex rivolorum*).

Por otra parte, machos adultos de *A. reicherti* y *A. charrua* fueron obtenidos por colecta en las localidades de Vergara y La Charqueada (Departamento de Treinta y Tres), respectivamente. Estos fueron trasladados y mantenidos individualmente en el acuario de la Facultad de Ciencias bajo las mismas condiciones detalladas anteriormente para las hembras.

Tratamiento

A los 3 meses y medio de la eclosión, se dividieron los dos grupos experimentales. Un grupo de hembras permaneció en condiciones de luz y oscuridad naturales (tratamiento luz, n=7), y otro grupo se colocó en condiciones de oscuridad (tratamiento oscuridad, n=7). Para crear las condiciones de oscuridad, las peceras fueron colocadas en una estantería forrada con doble nylon negro en su totalidad. Luego de 1 mes y medio, cuando las hembras alcanzaron los 5 meses de edad, se realizaron los experimentos comportamentales (Figura 28).

Ensayos comportamentales

Para estandarizar la condición reproductiva de las hembras previo a la realización de los ensayos comportamentales se colocaron machos *A. reicherti* no experimentales para habilitar el desove, durante 48 horas. Luego las hembras de ambos tratamientos fueron nuevamente aisladas por 48 horas con un ciclo de luz de 12 horas de oscuridad y 12 de luz intermedia (iluminación led y tejido sombra sobre las peceras), y se evaluó la capacidad de discriminar a un macho homoespecífico mediante la utilización de la visión u olfacción. Para ello las hembras fueron individual y secuencialmente evaluadas en condiciones de luz, en dos pruebas de elección dual: ensayos de olfacción y ensayos de visión.

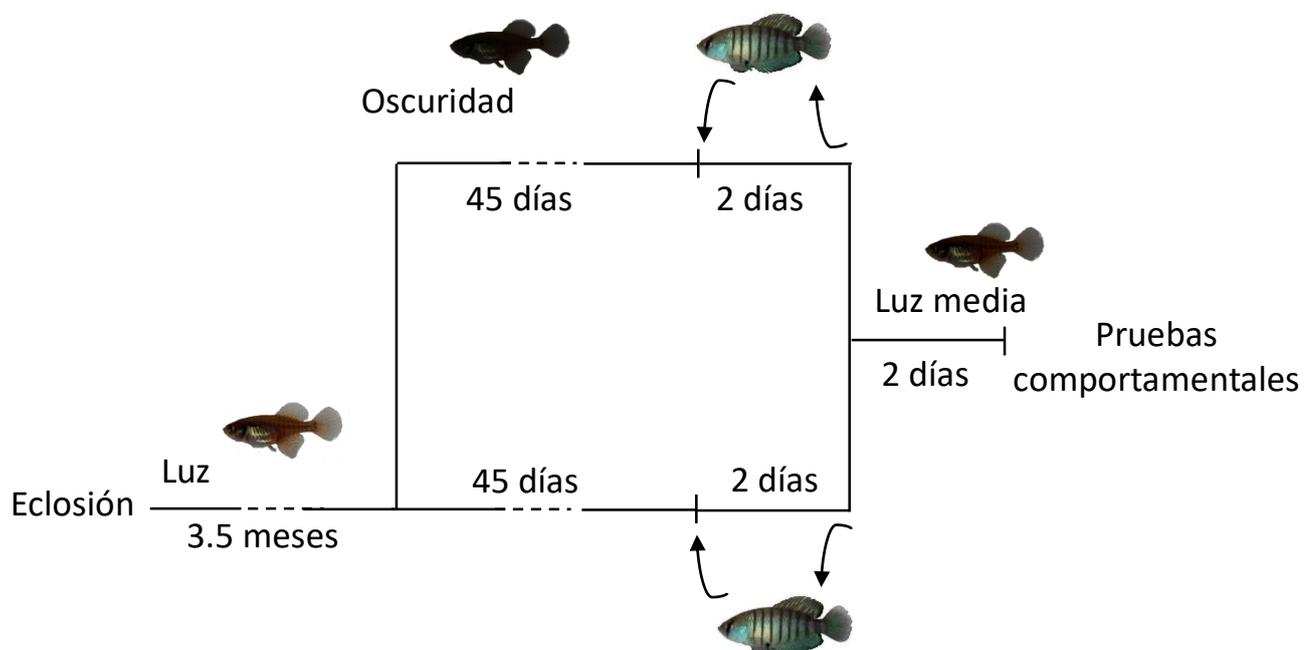


Figura 28. Esquema metodológico para estudio comportamental, previo a los Ensayos de elección dual. Luego de la eclosión, las hembras *A. reicherti* son criadas en condiciones de luz natural por 3.5 meses, luego son expuestas al tratamiento luz/oscuridad durante 45 días. Pasados estos días se introducen machos *A. reicherti* por 2 días y al ser removidos, las hembras permanecen en luz intermedia durante 2 días más, para finalmente comenzar las pruebas comportamentales de elección del macho.

Para la realización de las pruebas de elección dual se utilizaron peceras (60 x 20 x 13cm) con tres compartimentos: uno central de 40 cm donde se colocó a la hembra focal y dos laterales de 10 cm cada uno donde se colocaron los machos estímulo, en uno un homoespecífico y en el otro un macho heteroespecífico *A. charrua*. El compartimento central se dividió mediante marcas externas en una zona central, denominada “zona neutra” (ZN, 30cm), y dos zonas laterales, cada una próxima al compartimento de cada macho, denominadas

“zonas de preferencia” (ZP, 5cm). Para evaluar cada sentido de forma independiente, se siguió el protocolo propuesto por Reyes et al., (2017) (Figura 29):

-La pecera utilizada para testear la visión presentó tabiques divisorios transparentes, que permitían que la hembra observara a ambos machos, pero impedía el paso de sustancias químicas.

-La pecera diseñada para testear la olfacción presentó tabiques divisorios opacos y perforados, que permitían el pasaje de sustancias químicas, pero impedían que la hembra observara a los machos. En los experimentos de olfacción, se colocaron peceras con hembras junto a los compartimentos laterales de los machos, para estimular el cortejo y la producción de pista químicas (Passos et al., 2013).

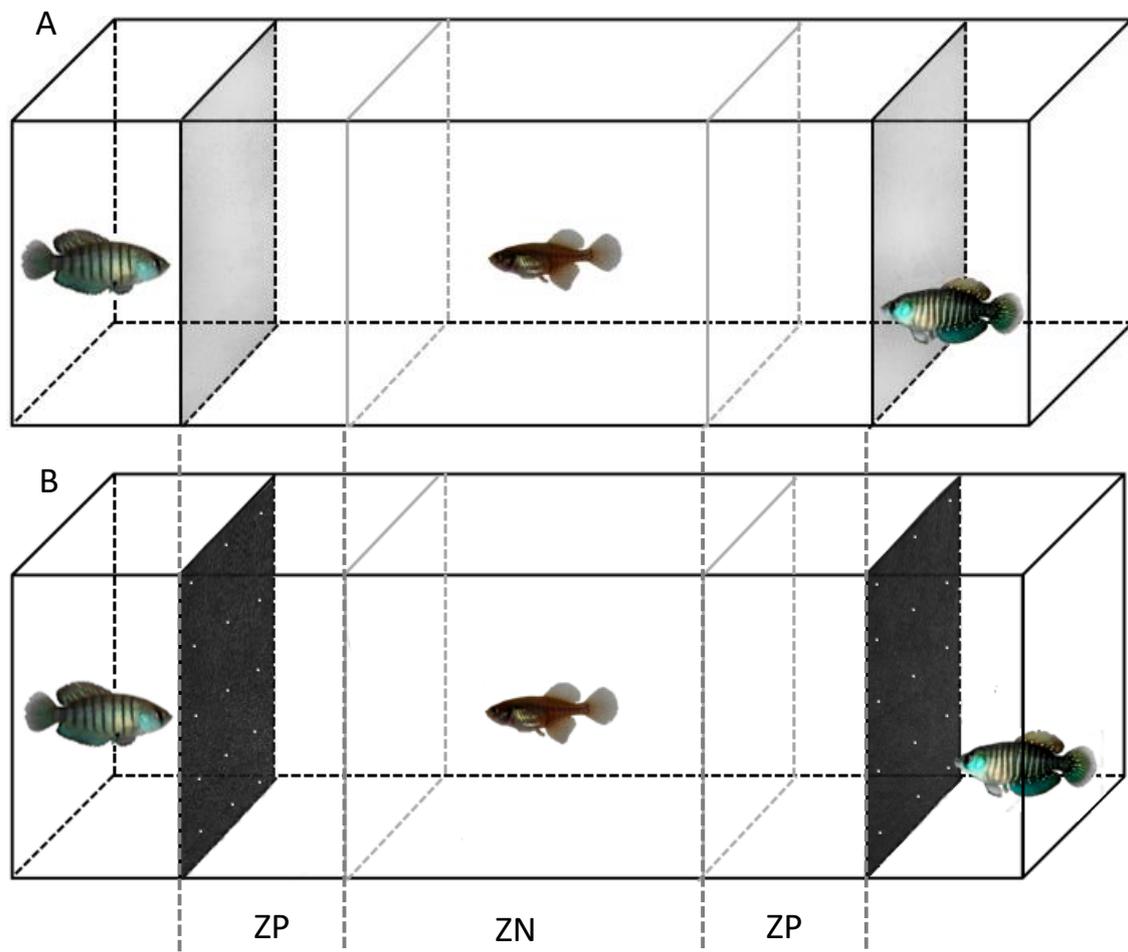


Figura 29. A: esquema de pecera utilizada en los ensayos visuales, se observan las separaciones transparentes. B: esquema de pecera utilizada en los ensayos de olfacción, se observan las separaciones oscuras y perforadas. ZN: zona neutra; ZP: zona de preferencia.

Se consideró el tiempo de permanencia de las hembras en ambas zonas de preferencia como variable proxy de la preferencia de apareamiento. El tiempo de asociación es una medida comúnmente utilizada para evaluar la preferencia de pareja y es considerada una medida válida en muchas especies de peces (Gonçalves y Oliveira, 2003; Reichard y Polačik, 2010; Walling et al., 2010; Dechaume-Moncharmont et al., 2011; Reyes et al., 2017).

Los machos *A. charrua* y *A. reicherti* no difirieron en tamaño (test de t para muestras dependientes, $N=8$, $t=1,26$, $p=0,25$), y se colocaron de forma aleatoria en los compartimentos derecho e izquierdo. Los experimentos de olfacción y visión se realizaron en días consecutivos entre las 11:00 y 16:00 horas, y se definió al azar cuál de los dos se realizaba primero. Las díadas de machos también fueron colocadas al azar frente a cada hembra focal. Luego de 10 min de habituación de la hembra al set experimental, los ensayos experimentales consistieron en 40 minutos en presencia de los machos, siendo esta segunda instancia grabada en video.

Análisis y estadística

Para el procesamiento de los videos se utilizó el programa JWatcher de libre acceso. Se registró el tiempo de permanencia de las hembras en cada una de las tres zonas y se calculó el porcentaje del tiempo de asociación con el macho coespecífico, tomando como tiempo total el pasado en las dos zonas de preferencia.

Para descartar que el cortejo de los machos influyera en la preferencia, se registró la intensidad de cortejo en los ensayos visuales, entendida como el tiempo que la hembra está en una ZP y el macho la corteja, sobre el tiempo total que la hembra está en la ZP de ese macho. Las unidades comportamentales consideradas como cortejo fueron despliegues laterales y sigmoides (García et al., 2008).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Past de libre acceso. Se comprobó la distribución normal de las variables y se realizaron test de Student para muestras dependientes para la comparación del desempeño de las hembras entre los ensayos de visión y olfacción y muestras independientes para la comparación entre el desempeño de los tratamientos de luz y oscuridad en cada ensayo.

Resultados

Comparación entre tratamientos

Al comparar el desempeño de las hembras del tratamiento luz y oscuridad, en cada uno de los ensayos se observó que:

a. En el ensayo de olfacción, en donde las hembras *A. reicherti* fueron testeadas frente a un homoespecífico y un heteroespecífico utilizando únicamente señales olorosas, las hembras del tratamiento de oscuridad tuvieron un mayor porcentaje de tiempo de permanencia con el homoespecífico que las hembras del tratamiento de luz (test de t para muestras independientes, $N=7$, $t=2,18$, $p=0.01$) (Figura 30).

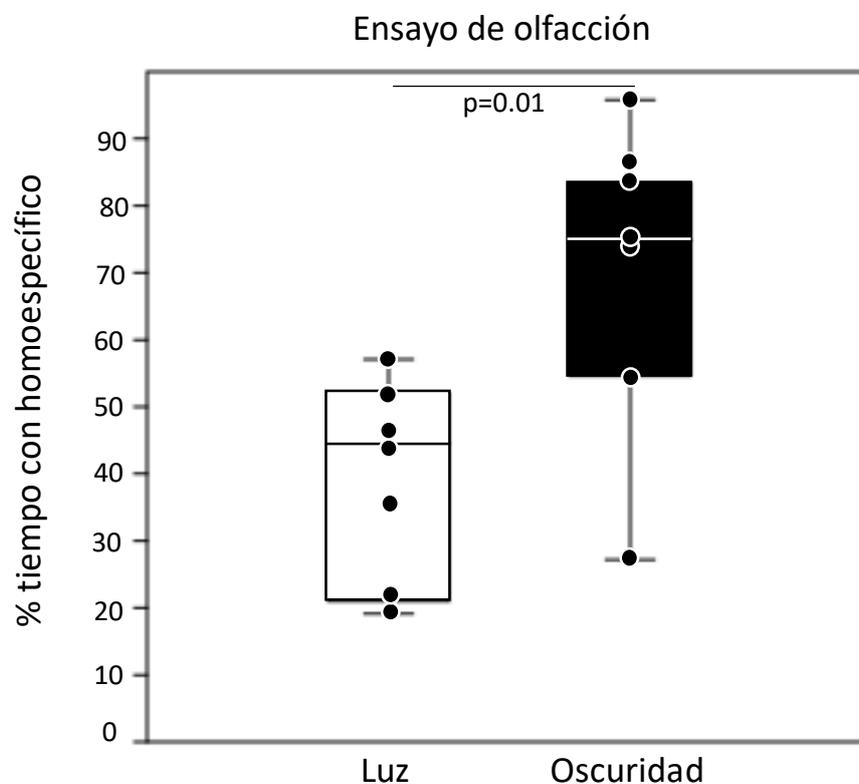


Figura 30. Porcentaje de tiempo de permanencia en el compartimento de la zona de preferencia del homoespecífico de los tratamientos de luz ($N=7$) y oscuridad ($N=7$) en el ensayo de olfacción (test de t, media \pm ES).

b. En el ensayo de visión, en donde las hembras *A. reicherti* fueron testeadas frente a un homoespecífico y un heteroespecífico utilizando únicamente señales visuales, las hembras del tratamiento de luz permanecieron un mayor porcentaje de tiempo con el homoespecífico que las hembras del tratamiento de oscuridad (test de t para muestras independientes, $N=7$, $t=2.21$, $p=0.04$) (Figura 31).

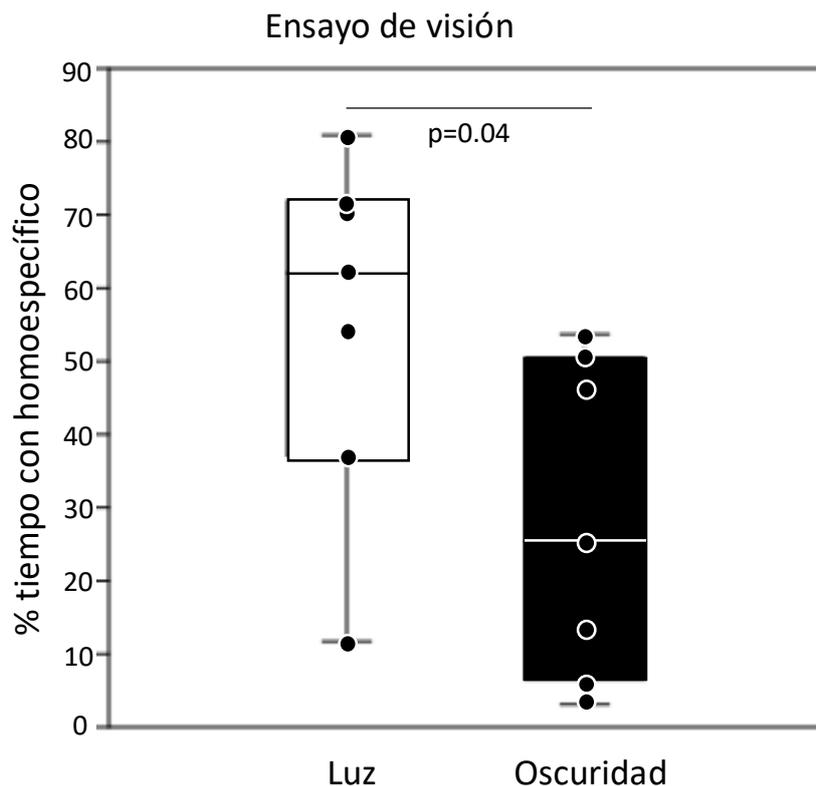


Figura 31. Porcentaje de tiempo de permanencia en el compartimento de la zona de preferencia del homoespecífico de los tratamientos de luz (N=7) y oscuridad (N=7) en el ensayo de visión (test de t, media \pm ES).

La intensidad de cortejo de los machos homo y heteroespecíficos en los ensayos de visión no tuvo una diferencia significativa (test de t para muestras dependientes, tratamiento luz: N=7, $t=-0.03$, $p=0.96$; tratamiento oscuridad: N=7, $t=0.48$, $p=0.66$) (Figura 32).

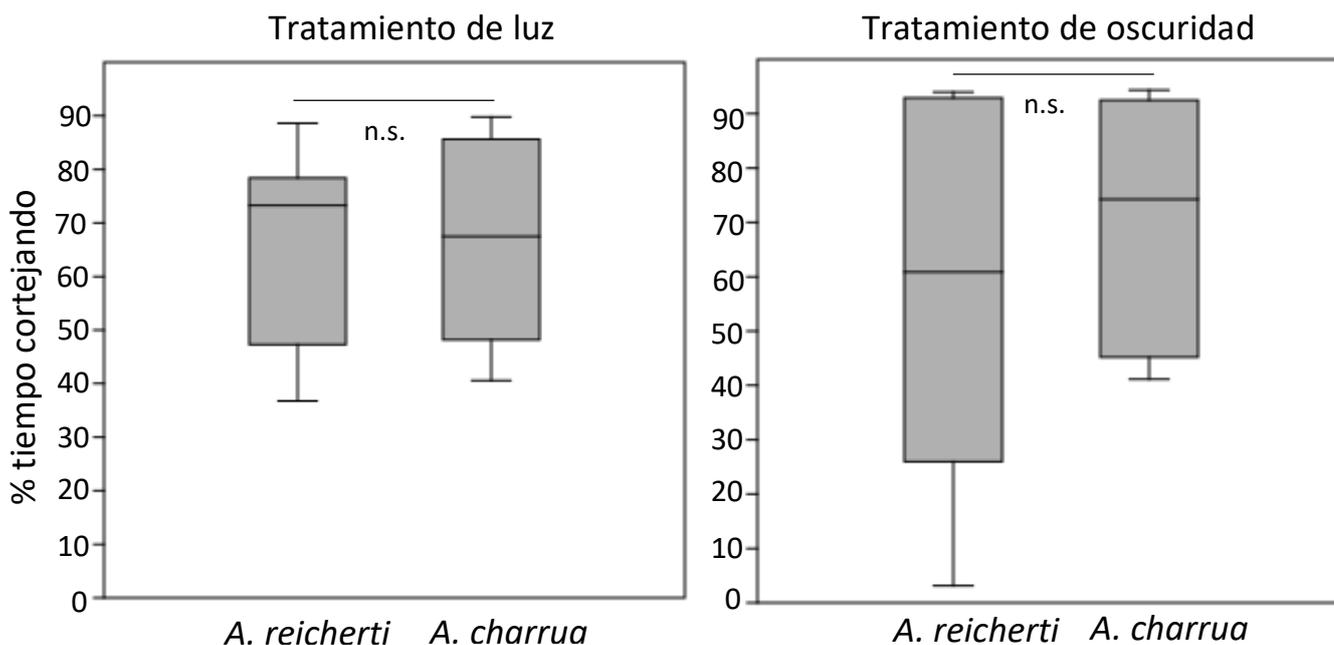


Figura 32. Intensidad del cortejo de los machos *A. reicherti* vs *A. charrua* en los ensayos de visión, del tratamiento luz (izquierda, N=7) y el tratamiento oscuridad (derecha, N=7). (test de t, n.s. $p>0.05$, media \pm ES).

Comparación entre ensayos

Al comparar el desempeño de las hembras del mismo tratamiento (luz y oscuridad), en cada uno de los ensayos, se observó que:

a. Las hembras del tratamiento de luz no mostraron una diferencia significativa en el porcentaje del tiempo de permanencia con el homoespecífico en los ensayos de visión respecto a los de olfacción (test de t para muestras dependientes, $N=7$, $t=1,63$, $p<0.15$) (Figura 33).

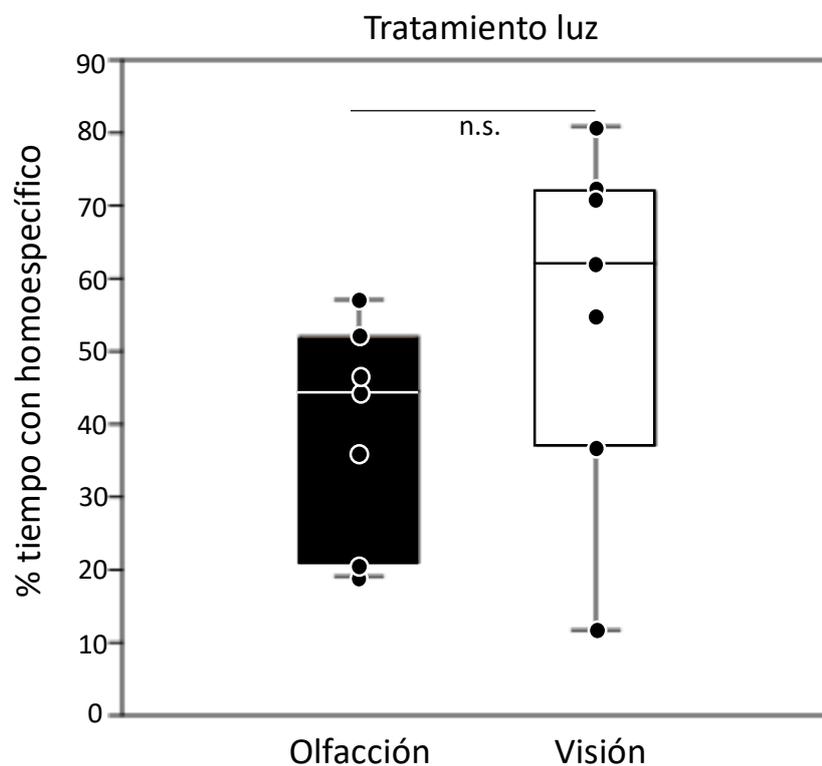


Figura 33. Porcentaje de tiempo de permanencia en el compartimento de la zona de preferencia del homoespecífico del tratamiento de luz, para cada uno de los ensayos: de olfacción ($N=7$) y visión ($N=7$) (test de t, n.s.= $p<0.05$, media \pm ES).

b. Las hembras del tratamiento de oscuridad tuvieron un porcentaje de permanencia significativamente mayor en el compartimento contiguo al homoespecífico en el ensayo de olfacción que en el de visión (test de t para muestras dependientes, $N=7$, $t=3.33$, $p=0.03$) (Figura 34).

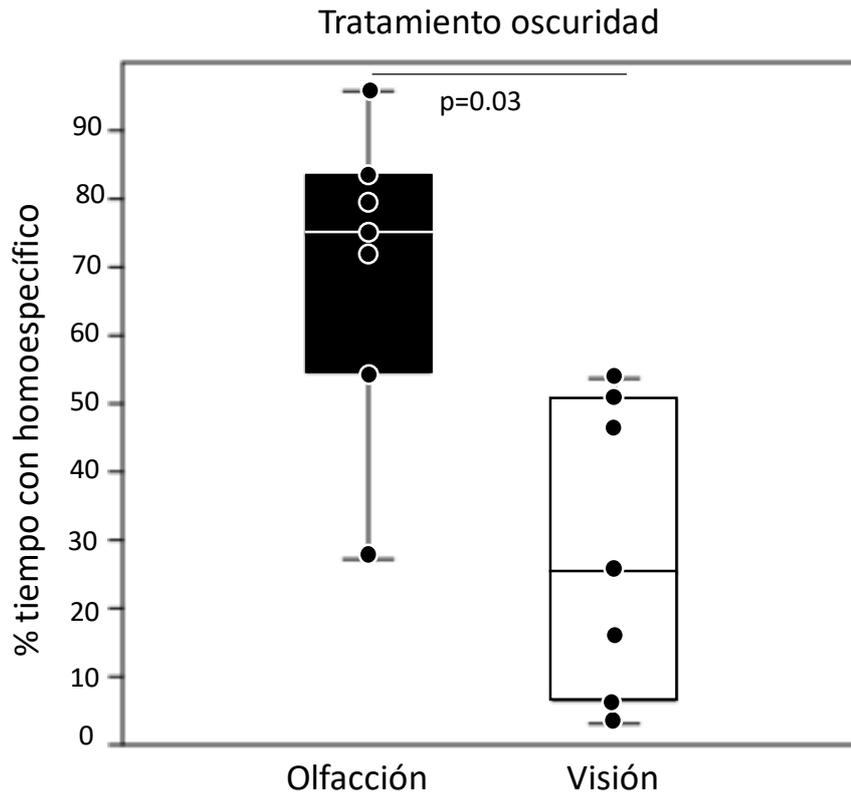


Figura 34. Porcentaje de tiempo de permanencia en el compartimento de la zona de preferencia del homoespecífico de las hembras del tratamiento de oscuridad, para cada uno de los ensayos: de olfacción (N=7) y visual (N=7) (test de t, media \pm ES).

Discusión

Las hembras criadas en condiciones de oscuridad constante lograron discriminar mejor a los machos homoespecíficos mediante pistas químicas que las mantenidas en condiciones de luz. Por otro lado, las hembras criadas en ambientes iluminados lograron identificar mejor a las parejas homoespecíficas mediante pistas visuales que las que fueron criadas en oscuridad constante.

En una primera comparación los resultados muestran que: en el ensayo de olfacción, las hembras del tratamiento de oscuridad tuvieron un porcentaje de permanencia significativamente mayor en el compartimento cercano al homoespecífico que las hembras del tratamiento de luz. Tomando el tiempo como medida de preferencia, puede interpretarse que las hembras del tratamiento de oscuridad son más acertadas en distinguir al homoespecífico utilizando pistas olfativas, que aquellas del tratamiento de luz.

En el ensayo de visión, las hembras del tratamiento de luz tuvieron un porcentaje de permanencia significativamente mayor en el compartimento cercano al homoespecífico que las hembras del tratamiento de oscuridad. De igual forma, este resultado se interpreta como una mayor capacidad de las hembras del tratamiento de luz de distinguir al homoespecífico utilizando pistas visuales, que aquellas del tratamiento de oscuridad.

Estos resultados sugieren que dependiendo de las condiciones de luminosidad en las cuales se mantengan las hembras, estas modifican su capacidad de distinguir al homoespecífico utilizando pistas visuales u olfatorias. Por lo tanto, se evidencia la plasticidad en las habilidades sensoriales frente a períodos prolongados de privación de luz.

Por un lado, los resultados se destacan por la relevancia que tiene la visión y la olfacción en los peces para lograr una adaptación exitosa de los diversos hábitats (Ledo et al., 2006; Zupanc, 2006). Se ha documentado, que las claves químicas y visuales juegan un papel importante en el reconocimiento de homoespecíficos, incluyendo la especie *A. reicherti*, pudiendo constituir un valioso mecanismo de aislamiento reproductivo (Rafferty & Boughman, 2006; Passos et al., 2013b; Berois et al., 2016; Reyes et al., 2017). Estos resultados difieren de lo observado por Reyes et al., 2017; que muestran que las hembras criadas en condiciones de luz natural (análogas al tratamiento de luz) sí son capaces de

identificar al homoespecífico utilizando pistas olfativas. Una de las razones que podría explicar esta diferencia es que tanto sus resultados como los de este trabajo, fueron obtenidos utilizando una muestra pequeña, lo que implica que se requiere de más experimentos para confirmar cualquiera de los dos resultados. Además, el origen de los especímenes fue distinto, en el trabajo de Reyes los peces provienen de su pesca en el campo, mientras que esta tesis obtuvo los individuos por eclosión en el laboratorio.

En segundo lugar, los cuerpos de agua pueden ser ambientes visualmente limitados debido a la reducción de la luz en la columna de agua, la turbidez y densidad de la vegetación, (Dusenbery, 1992). Al igual que otras especies de peces anuales, el hábitat de *A. reicherti* se caracteriza por presentar cambios drásticos en distintos ejes ambientales a lo largo de la estación, viniendo estos acompañados de cambios fisiológicos que inciden en decisiones comportamentales (Passos et al., en prensa). Típicamente, a medida que avanza la temporada disminuye el volumen de agua en los charcos, aumenta la turbidez y consecuentemente disminuye la visibilidad. Esto podría generar una fuerte presión de selección para el desarrollo de procesos plásticos, y como consecuencia adaptarse a la disminución gradual de la luminosidad ya sea para evitar ser depredados, alimentarse o reproducirse exitosamente. Es, por lo tanto, una característica ventajosa que la preponderancia de los canales sensoriales se modifique de manera acorde a el ambiente que los peces habitan.

La plasticidad compensatoria en las hembras de *A. reicherti* que muestran estos experimentos, habilita a los individuos a responder eficazmente a cambios ambientales, tal como ha sido reportado en otras especies de teleósteos, en las que cuando la utilización de claves visuales para la elección de pareja se ve comprometida, aumenta la importancia de las claves olfativas (Heuschele & Candolin, 2007). En este estudio, el aumento del pH (resultado de la eutrofización y por ende disminución de la luminosidad) genera que las hembras se sientan más atraídas a señales olfativas de los machos, posiblemente como una forma de compensar la visibilidad limitada. En esa misma línea, Chapman et. al (2010) observaron que los guppys criados en condiciones de baja luminosidad respondían más frente a claves químicas de alimento, respecto a aquellos criados en condiciones de mayor luminosidad. Sin embargo, al ser puestos a prueba para claves visuales, los individuos criados en condiciones de mayor luminosidad exhibieron una mayor respuesta al alimento.

El cambio en la capacidad de distinguir al homoespecífico según las condiciones lumínicas durante el desarrollo, también se observó en dos especies de peces cíclidos que cohabitan a distintos niveles de profundidad y están sometidas por lo tanto a diferente luminosidad. Si bien las hembras de ambas especies son capaces de identificar al macho homoespecífico por sus colores nupciales (Selz et al., 2014), esta preferencia se invierte si son criadas bajo las condiciones lumínicas de la otra especie (Wright et al., 2017). Estos resultados, al igual que los obtenidos en esta tesis, evidencian que la luminosidad influye en la capacidad de distinguir al macho homoespecífico por pistas visuales. La capacidad de desarrollar procesos plásticos es de vital importancia en la naturaleza y la falta de los mismos puede resultar en una disminución de la diversidad. Un aumento en la turbidez del agua tiene impactos significativos en los mecanismos que mantienen la diversidad. En especies de peces cíclidos en donde la elección de pareja se da por la coloración, se observó que un aumento en la turbidez del agua, producto de la eutrofización, lleva a una coloración apagada, pocas variaciones de morfos pudiendo amenazar a largo plazo la diversidad de especies (Seehausen et al., 1997).

Una segunda comparación entre los porcentajes de los tiempos de permanencia de los peces de cada tratamiento con el homoespecífico reveló que, las hembras del tratamiento de oscuridad tuvieron una diferencia significativa en el porcentaje de permanencia con el homoespecífico, siendo este mayor en el ensayo de olfacción que en el de visión. Esto expresa que su desempeño para detectar al homoespecífico fue mejor en el ensayo de olfacción que en el de visión. En este caso, las hembras vieron comprometido el sentido de la visión, dada la oscuridad permanente en que fueron criadas por un período prolongado, razón que podría explicar su mejor desempeño en el ensayo de olfacción.

Por el contrario, las hembras del tratamiento de luz, tuvieron un porcentaje de tiempo de permanencia con el homoespecífico que no fue significativamente distinto entre los ensayos de visión y olfacción, si bien sí hay una tendencia a que tengan un mejor desempeño en el ensayo de visión. Lo que significa que su desempeño en la elección del homoespecífico no varió significativamente entre las diferentes condiciones de los tratamientos. Esto podría explicarse considerando que el tratamiento de oscuridad es el que más se asemeja a las condiciones del charco, es decir que en la naturaleza las hembras tenderían a ser más acertadas en la detección del homoespecífico usando pistas olfatorias que visuales, pero en

los peces mantenidos en luz, el sentido de la visión se vuelve más “confiable”, su desempeño utilizando pistas visuales mejora, volviéndose similar al desempeño del uso de pistas olfativas.

El conjunto de estos fenómenos complejos podría reafirmar el hecho de que el uso de varias pistas y canales sensoriales durante el reconocimiento y elección de pareja, permite realizar una mejor evaluación por parte de las hembras (Candolin., 2003), lo que hace que el desempeño de los peces en tratamiento de luz se asemeje en ambos ensayos, cuando los dos sentidos son igualmente confiables.

Es por esto que la plasticidad compensatoria genera que, en el caso de los peces en tratamiento de oscuridad, las pistas olfativas cobren más valor y conlleve a un mejor desempeño en los ensayos olfatorios respecto a los visuales.

Discusión y conclusiones generales

La suma de los resultados de proliferación celular encefálica y comportamentales, evidencian una correlación positiva entre una mayor proliferación celular en estructuras sensitivas con un mejor desempeño en una modalidad sensorial. Es decir que las hembras criadas en luz natural tienen mayor proliferación en estructuras de procesamiento visual y son mejores utilizando el sentido de la visión, mientras que las hembras criadas en condiciones de total oscuridad tienen una mayor proliferación celular en estructuras olfatorias y son mejores utilizando la modalidad sensorial olfatoria. Esto se encuentra en concordancia con la bibliografía actual, donde se vio que en un modelo transgénico de ratón cuyas células madre neurales de la zona subvetricular tenían aumentada la neurogénesis (por la expresión de genes que regulaban el ciclo celular) y por ende mayor cantidad de neuronas maduras e integradas en el BO, esto mejoraba su capacidad de discriminar entre odorantes altamente similares (Alonso et al., 2019).

El resultado de la proliferación en la retina muestra cómo una modalidad sensorial puede intentar contrarrestar las adversidades del ambiente respecto a ese sentido, en este caso posiblemente con una mayor proliferación de células especializadas para estas nuevas condiciones lumínicas, los bastones.

La plasticidad neural ayuda a la adaptación y flexibilidad que demandan los diversos ambientes en donde los peces viven (Gonda et al., 2011), por ende, la habilidad de un organismo de responder al medio que lo rodea puede ser crítica para su éxito (Price et al., 2003), los peces anuales del género *Austrolebias* se ven sometidos a cambios extremos a lo largo de su ciclo de vida, el del aumento de la turbidez de los charcos en los que viven es uno de ellos. Es de vital importancia que estos peces desarrollen mecanismos plásticos a nivel del sistema nervioso que se vean reflejados en su respuesta comportamental. Esto les permitiría desarrollar mejores estrategias no solo a los efectos de búsqueda de alimento y evitar depredadores, sino también al momento de seleccionar pareja.

Si bien los abordajes metodológicos realizados no permiten determinar qué porcentaje de las células proliferantes son neuronas o glías, se estima que, dadas las zonas proliferativas encefálicas tenidas en cuenta y la morfología redondeada de los núcleos, la mayoría de ellas

sean neuronas (Torres-Pérez et al., 2017). Zupanc (2001) plantea 3 funciones para la neurogénesis adulta: 1. Reemplazo de neuronas dañadas en el proceso de regeneración neuronal; 2. Acompasar el crecimiento de elementos sensoriales y motores de la periferia (los teleósteos crecen en tamaño durante toda su vida, incluyendo el SNC); 3. Establecer un sustrato neural para acompañar la plasticidad comportamental. En este tercer punto plantea que, en ciertas áreas del encéfalo, una neurogénesis continua puede proveer un sustrato para acomodar los cambios comportamentales a largo plazo, como ocurre por ejemplo en animales con reproducción por temporadas como las aves (Zupanc & Lamprecht, 2000). El reemplazo de neuronas anteriores por nuevas o el aumento de las mismas, puede permitir una reorganización estructural de redes neuronales que están involucradas en el control de comportamientos, es por esto que los resultados obtenidos en este trabajo se suman a lo planteado por Zupanc (2001) y reafirman el tercer punto, en donde se evidencia una **neurogénesis adaptativa**, que permite no solo modificar el SNC sino también la respuesta comportamental.

De este trabajo se desprenden varias conclusiones que permiten conocer más acerca de la plasticidad de los peces del género *Austrolebias*.

En el Capítulo 1 relacionado a la proliferación de la retina en diferentes condiciones de luminosidad, se evidenció que especímenes *A. charrua* criados en oscuridad, presentan una mayor proliferación en la retina que aquellos criados en condiciones de luz natural, así como una mayor cantidad de fotorreceptores bastones. Lo que permite concluir que, frente a un cambio en la luminosidad, esta especie es capaz de regular su proliferación en la retina, posiblemente modificando la cantidad de bastones y posiblemente otras células pertenecientes a los circuitos vinculados a los bastones, para adaptarse a las características del medio en el que viven.

En el Capítulo 2, que evalúa la proliferación celular en diferentes regiones encefálicas, se reveló que las hembras *A. reicherti* también modifican su proliferación celular en función de las condiciones de luminosidad en las que son mantenidas. Se mostró que aquellas hembras criadas en condiciones de luz natural tenían mayor proliferación en estructuras de procesamiento visual, mientras que las hembras criadas en condiciones de oscuridad mostraban mayor proliferación en estructuras de procesamiento olfativo. Concluyéndose que las condiciones de luminosidad en las cuales se cría a esta especie, modifican la

proliferación celular del SNC y genera una compensación sensorial. Esta proliferación estaría reforzando los circuitos sensoriales según las demandas del entorno.

En el Capítulo 3, referido a los experimentos comportamentales, los resultados muestran que, en función de la luminosidad en la cual son criadas, las hembras *A. reicherti* son capaces de modificar su habilidad sensorial. Esto se refleja en una mayor agudeza visual cuando son criadas en luz natural y una mayor agudeza olfatoria cuando estas son criadas en oscuridad. Se concluye que la luminosidad en la cual esta especie es criada, genera cambios comportamentales, que permite una mejor adaptación al hábitat circundante.

De la combinación de los Capítulos 2 y 3 se concluye que la proliferación celular en estructuras de procesamiento sensorial, tienen una repercusión directa en el desempeño sensorial, mostrando una correlación positiva.

Como conclusión general se plantea que las condiciones de luminosidad son de gran importancia en especies del género *Austrolebias*, estos desencadenan procesos de plasticidad adaptativa que permiten un mejor desempeño al medio, especialmente teniendo en cuenta las características del mismo. Esta plasticidad adaptativa puede conferirles no solo mejores oportunidades de encontrar alimento y huir de depredadores, sino que les facilitaría la identificación del homoespecífico, hecho de gran importancia dado el aumento de turbidez de los charcos dificulta la visión. Se destaca que existen charcos donde las especies del género se solapan y el reconocimiento específico se vuelve crucial para el mantenimiento de la especie.

Perspectivas

Las conclusiones de este trabajo conllevan a innumerables interrogantes acerca de la proliferación en el SNC y comportamiento de especies del género *Austrolebias*, generando perspectivas de investigaciones a futuro, dentro de las cuales se encuentran las siguientes preguntas:

-Repetir el estudio proliferativo en la retina con un n mayor y combinado con marcadores gliales y neuronales, para determinar los porcentajes proliferativos.

-Mediante la utilización de distintos marcadores gliales y neuronales, determinar los porcentajes proliferantes de cada tipo celular en el encéfalo frente a distintas condiciones lumínicas. Así como determinar las estirpes celulares proliferantes en las distintas capas de la retina.

-Dado que existen cambios plásticos, es de gran interés demostrar si estos son reversibles o permanentes.

-Teniendo en cuenta los conocimientos neuroanatómicos que se tienen sobre distintas especies del género *Austrolebias*, sería valioso demostrar si existe una correlación entre los tamaños de las estructuras encefálicas de procesamiento sensorial, con su habilidad sensitiva.

-Detectar mediante transporte de colorantes neuronales “in vivo” las características del nervio terminal (conexión entre retina y BO) en *A. reicherti* y compararlo con las especies que ya han sido estudiadas por el laboratorio, *A. affinis* y *A. charrua*, donde fueron encontradas diferencias anatómicas significativas.

Bibliografía

Akimov NP. & Renteria RC. (2014). Dark rearing alters the normal development of spatiotemporal response properties but not of contrast detection threshold in mouse retinal ganglion cells. *Development Neurobiology* 74, 692-706.

Alonso S., Reinert J., Marichal N., Massalini S., Bergier B., Kuner T., Calegari F. (2019). An increase in neural stem cells and olfactory bulb adult neurogenesis improves discrimination of highly similar odorants. *The embo journal*. 38: e98791

Alunni, A., & Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development*, 143(5), 741-753.

Andersson, M., Simmons, LW. (2006) Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(6): 296–302.

Andreas, P. (2002) Sexuals selection and mate choice. *International Journal of Primatology* 23 (4): 877–904.

Aubret, F., Bonnet, X. & Shine, R. (2007). The role of adaptive plasticity in major evolutionary transition: early aquatic experience affects locomotor performance of terrestrial snakes. *Functional Ecology*, 21, 1154–1161.

Aubret, F. & Shine, R. (2008). Early experience influences both habitat choice locomotor performance in tiger snakes. *The American Naturalist*, 171, 524–531.

Axelrod, CJ., Laberge F. & Robinson, BW. (2018). Intraspecific brain size variation between coexisting sunfish ecotypes. *Proceedings of the Royal Society B*. 285

Bavelier D. & Neville H. (2002). Cross-modal plasticity: where and how?. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 443-452.

Bernardos RL., Barthel LK., Meyers JR., Raymond PA. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *Journal of Neuroscience*. 27, 7028-7040.

Berois, N., Garcia, G., & de Sa, R. O. (2016). Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution. CRC Press.

Berrosteguieta I. (2016). *Caracterización histológica y estudio proliferativo de la retina de peces anuales Austrolebias charrua*. (Tesis de Grado) Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Berrosteguieta I., Passos C., Fernández A. (2019). Plasticidad neuroetológica en *Austrolebias reicherti* frente a cambios en la luminosidad. En C. Viera (Presidencia). *2ª Reunión. Biología del Comportamiento del Cono Sur*. Congreso llevado a cabo en Montevideo, Uruguay.

Bisazza, A., Marconato, A. (1988) Female mate choice, male–male competition and parental care in the river bullhead, *Cottus gobio* L. (Pisces, Cottidae). *Animal Behaviour* 36 (5): 1352–1360.

Bonduriansky, R. (2001) The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society* 76: 305–339.

Brandstätter, R., & Kotrschal, K. (1989). Life history of roach, *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain, behavior and evolution*, 34(1), 35-42.

Broglio, C., Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F. M., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F. & Salas, C. (2005). Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Research Bulletin* 66, 277–281.

Broglio, C., Rodríguez, F., Gómez, A., Arias, J. L. & Salas, C. (2010). Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behavioural Brain Research* 210, 191–201.

Candal, E., Anadon, R., Bourrat, F. & Rodriguez-Moldes, I. (2005). Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): a segmental approach. *Developmental Brain Research* 160, 157–175.

Candolin, U. (2003). The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78: 575–595.

Candolin, U. (2004). Effects of algae cover on egg acquisition in male three–spined stickleback. *Behaviour*, 141: 1389–1399.

Candolin, U., Salesto, T. (2006). Effects of increased vegetation cover on nesting behaviour of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59: 689–693.

Candolin, U., Salesto, T., Evers, M. (2007). Changed environmental conditions weaken sexual selection in sticklebacks. *European Society for Evolutionary Biology*, 20: 233– 239.

Carbajo Pérez, E., Carbajo Pérez, S., Triviño, A., Hernández, LC., López, A. (1994). Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica. Univ Cor Serv Pub. p. 135-156.

Chapman, B., Morrell, L., Tosh, C. & Krause J. (2010). Behavioural consequences of sensory plasticity in guppies. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 1395-1401.

Chapouton, P., Jagasia, R., & Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays*, 29(8), 745-757.

Chiu JF., Mack AF., Fernald RD. (1995). Daily rhythm of cell proliferation in the teleost retina. *Brain Research*. 673, 119-125.

Cline, H. T. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 118–126.

Clutton-Brock TH, Harvey PH. (1980) Primates, brains and ecology. *Journal of Zoology*. 190, 309–323.

Cothran, RD. (2008). Direct and indirect fitness consequences of female choice in a crustacean. *Evolution*, 62 (7): 1666–1675.

Dechaume-Moncharmont, FX., Cornuau, JH., Keddar, I., Ihle, M., Motreuil, S., Cézilly, F. (2011). Rapid assessment of female preference for male size predicts subsequent choice of spawning partner in a socially monogamous cichlid fish. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 906–910.

Dunlap, K. D., Silva, A. C. & Chung, M. (2011). Environmental complexity, seasonality and brain cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Journal of Experimental Biology* 214, 794–805.

Dusenbery, DB. (1992). Sensory Ecology: how Organisms Acquire and Respond to Information. New York: W. H. Freeman.

Ebbesson LOE., Braithwaite VA. (2012). *Journal of Fish Biology*. 81, 2151-2174.

Ekstrom, P., Johnsson, C. M. & Ohlin, L. M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *Journal of Comparative Neurology* 436, 92–110.

Emde, G., Mogdans J. & Kapoor BG. (2004). The senses of the Fish. Dordrecht, Netherlands: Narosa.

Engström-Öst, J., Candolin, U. (2007). Human-induced water turbidity alters selection on sexual displays in sticklebacks. *Behavioral Ecology*, 18 (2):393–98.

Fernández, AS., Rosillo, JC., Berrosteguieta, I., Herrera, ML. & Torres-Pérez, M. (2020). *Microscopy & Microanalysis* 1.

Fernández, AS., Rosillo, JC., Casanova, G., & Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience*, 189, 12-24.

Finger, TE. (1986). Electroreception in catfish. Behavior, anatomy, and electrophysiology. En H. Bullock TH, Heilingenberg W (Ed.) *Electroreception* (287–317). New York: Wiley-Interscience.

Folgueira, M., Anadon, R. & Yanez, J. (2004a). An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: olfactory bulb and ventral area. *Journal of Comparative Neurology* 480, 180–203.

Folgueira, M., Anadon, R. & Yanez, J. (2004b). Experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: dorsal area and preoptic region. *Journal of Comparative Neurology* 480, 204–233

Font, E., Desfilis, E., Pérez-Cañellas, MM., & García-Verdugo, JM. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), 276-295.

Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2377–2383.

Furutani-Seikia, M., & Wittbrodt, J. (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mechanisms of Development*, 629-637.

García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M.J., Casanova, G., Clivio, G., Olivera, A. (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 620–635.142.

García D., Loureiro M., Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 6, 243-248.

Gavrilets, S., Arnqvist, G., Friberg, U. (2001). The evolution of female mate choice by sexual conflict. *Proceedings of the Royal Society of London Series B–Biological Sciences*, 268 (1466): 531–539.

Gilbert, S.F. & Epel, D. (2008). *Ecological Developmental Biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Globua, A., & Scheibel, A. (1967). The effect of visual deprivation on cortical neurons: a Golgi study. *Experimental neurology* 19, 331-345.

Gonçalves, DM., Oliveira, RF. (2003). Time spent close to a sexual partner as a measure of female mate preference in a sex-role-reversed population of the blenny *Salaria pavo* (Risso) (Pisces: Blenniidae). *Acta Ethologica*, 6, 1–5.

Gonda, A., Herczeg, G. & Merilä, J. (2011). Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*) – local adaptation or environmentally induced variation? *BMC Evolutionary Biology* 11, 75.

Gottlieb MD., Fugate-Wentzek LA. & Wallman J. (1987). Different visual deprivations produce different ametropias and different eye shapes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 28, 1225-1235.

Gould, E. & Gross, C. G. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *Journal of Neuroscience* 22, 619–623.

Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N. B. & Shors, T. J. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends in Cognitive Sciences* 3, 186–192.

Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., & Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental biology*, 295(1), 263-277.

Gratzner, H. (1982). Monoclonal antibody to S-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474-475.

Harris W., & Messersmith S. (1992). Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron*, 9(2), 237-372

Heuschele, J., Candolin, U. (2007). An increase in pH boosts olfactory communication in sticklebacks. *Biology Letters*, 3 (4): 411–413

Hinsch, K., & Zupanc, GKH. (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience*, 146(2), 679-696

Hitckcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., Otteson D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23:183-194.

Hyodo-Taguchi, Y. (1990). Inbred strains of the medaka and their characters. En K. Y. N. Egami (Ed.), *Biology of the Medaka* (págs. 129–142). Tokyo: Tokyo University Press.

Hyvarinen, J., Carlson, S. & Hyvarinen, L. (1978a). Early visual deprivation alters modality of neuronal responses in area 19 of monkey cortex. *Neuroscience Letter*, 26, 239–243

Hyvarinen, J., Hyvärinen L., Färkkilä M. & Carlson S. & Leinonen L. (1978b). Modification of visual functions of the parietal lobe at early age in the monkey. *Med. Biol.* 56, 103–109.

Ito, H., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Yamamoto, N. (2007). Diversity of Brain Morphology in Teleosts: Brain and Ecological Niche. *Brain, Behavior, and Evolution*, 76-86.

Jeserich, G. & Rahmann, H. (1979). Effect of Light Deprivation on Fine Structural Changes in the optic tectum of the rainbow trout during ontogenesis. *Developmental Neuroscience* 2, 19-24.

Jia, F., Greenfield, MD. Collins, RD. (2000) Genetic variance of sexually selected traits in waxmoths: maintenance by genotype × environment interaction. *Evolution*, 54: 953–967.

Johns PR., Fernald RD. (1981). Genesis of rods in the retina of teleost fish. *Nature*, 293, pages141–142.

Kannan M., Gross GG., Arnold DB. & Higley MJ. (2016). Visual Deprivation During the Critical Period Enhances Layer 2/3 GABAergic Inhibition in Mouse V1. *Journal of neuroscience* 36, 5914-5919.

Kaslin, J., Ganz, J., & Brand, M. (2007). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1489), 101-122.

Kemp, DJ., Macedonia, JM., Ball, TS., Rutowski, RL. (2007). Potential direct fitness consequences of ornament-based mate choice in a butterfly. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 62:1017–1026.

Kihlslinger, R. L. & Nevitt, G. A. (2006). Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology* 209, 504–509.

Kirn, J., Clower, R., Kroodsma, D., Devoogd, T. (1989). Song-related brain regions in the red-winged blackbird are affected by sex and season but not repertoire size. *Journal of Neurobiology*, 20 (3): 139-163.

Knudson, E. I. (2004). Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience* 16, 1412–1425.

Kokko, H., Jennions, MD., Brooks, R. (2006). Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 43–66.

Kokko, H. & Monaghan, P. (2001). Predicting the direction of sexual selection. — *Ecology Letters* 4 (2): 159–165.

Kotrschal K, Junger H. 1988 Patterns of brain morphology in mid-European Cyprinidae (Pisces. Teleostei)—a quantitative histological study. *Journal fur Hirnforschung*. 29, 341–352.

Kotrschal K, Palzenberger M. 1992 Neuroecology of cyprinids: comparative, quantitative histology reveals diverse brain patterns. *Environmental Biology of Fishes* 33, 135–152.

Kotrschal, K., Van Staaden, MJ. & Huber, R. (1998). Fish brains: evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8, 373–408.

Kwan JW., Lee MJ., Mack AF., Chiu JF., Fernald RD. (1996). Nonuniform distribution of cell proliferation in the adult teleost retina. *Brain Research*. 712, 40-44.

Lahne, M., Piekos, S.M., O'Neill, J., Ackerman, J.K. & Hyde DR. (2018). Photo-regulation of rod precursor cell proliferation. *Experimental Eye Research* 178, 148-159.

Lledo, P.M., Alonso, M. & Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 7:179-193.

Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.

Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., Arim, M. (2016). *Austrolebias* in Space: scaling from ponds to biogeographical regions, in: Berois, N., García, G., De Sá, R.O. (Eds.), *Annual Fishes. Life History Strategy, Diversity and Evolution*. CRC Press, Boca Raton, pp. 125–141.

Loureiro, M., García, G., (2008). *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa*, 1940: 1–15.

Luskin, M. B., Zigova, T., Soteres, B. J., & Stewart, R. R. (1997). Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate in vitro and express a neuronal phenotype. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(5), 351-366.

Maaswinkel H. & Li L. (2003). Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *Journal of Experimental Biology*, 206:2201-2209.

Mandaïron, N., Jourdan, F., and Didier, A. (2003). Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb upregulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience* 119, 507–516.

Mandaïron, N., Sacquet, J., Jourdan, F., and Didier, A. (2006). Longterm fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 141, 443–451.

Milinski, M. (2003). The function of mate choice in sticklebacks: optimizing MHC genetics. *Journal of Fish Biology* 63 (Supplement A): 1–16.

Miller LK., Brooks, R. (2005). The effects of genotype, age, and social environment on male ornamentation, mating behaviour, and attractiveness. *Evolution*, 59(11): 2414– 2425.

Møller, AP., Alatalo, RV. (1999). Good genes effects in sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 266: 85–91.

Møller, AP., Jennions, MD.(2001) How important are direct fitness benefits of sexual selection. *Naturwissenschaften* 88: 401–415.

Neff, BD., Pitcher, TE. (2005). Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology*, 14: 19–38.

Northcutt, R. G. (2002). Understanding vertebrate brain evolution. *Integrated and Comparative Biology*, 42, 743–756.

Nottebohm, F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 457(1), 143-161.

Olivera-Pasilio, V., Peterson D. & Castelló M. (2014). Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 88.

Ohno, S. (2013). *Evolution by Gene Duplication*. Duarte, USA: Springer.

Oliveira, R. F. (2009). Social behavior in context: hormonal modulation of behavioural plasticity and social competence. *Integrative and Comparative Biology* 49, 423–440.

Otteson DC., D'Costa AR., Hitchcock PF. (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev. Biol.* 232, 62-76.

Otteson, DC. & Hitchcock, PF. (2003). Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury induced regeneration. *Vision Research*, 43:927-36

Passos, C., Reyes, F., Jalabert, C., Quintana, L., Tassinio, B., Silva, A. (2020). Stress promotes reproduction in the annual fish *Austrolebias reicherti*. *Animal Behaviour*. Aceptado en prensa.

Passos, C., Reyes, F., Tassinio, B., Rosenthal, G.G., González, A. (2013b). Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology* 119, 891–897.

Passos, C., Tassinio, B., Loureiro, M., Rosenthal, G.G. (2013a). Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes*, 96, 20–

26. Petreanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *Journal of Neuroscience* 22, 6106–6113.

Penn, DJ. (2002) The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology*, 108: 1–21.

Polenov, AL., & Chetverukhin, VK. (1993). Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. *Cell and tissue research*, 271(2), 351-362.

Portavella, M., Vargas, J. P., Torres, B. & Salas, C. (2002). The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Research Bulletin* 57, 397–399.

Rafferty NE. & Boughman JW. (2006). Olfactory mate recognition in a sympatric species pair of three-spined sticklebacks. *Behavioral Ecology*, 17(6), 965-970.

Rahmann, H. (1968). Autoradiographische Untersuchungen zum DNS-Stoffwechsel (Mitose-Häufigkeit) im ZNS von *Brachydanio rerio* HAM. BUCH. (Cyprinidae, Pisces). *Journal für Hirnforschung* 10: 279–284.

Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 614-618.

Rauschecker, J. (1995) Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends Neuroscience*, 18, 36–43.

Rauschecker J. (1996). Substitution of visual by auditory inputs in the cat's anterior ectosylvian cortex. *Progress in Brain Research*, 112, 313–323.

Reading, KL., Backwell, PR. (2007). Can beggars be choosers? Male mate choice in a fiddler crab. *Animal Behaviour* 74: 867–872.

Reichard, M., Bryja, J., Ondrackova, M., Davidova, M., Kaniewska, P., Smiths, C. (2005). Sexual selection for male dominance reduces opportunities for female mate choice in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Molecular Ecology*, 14: 1533– 1542.

- Reichard, M., Polačik, M. (2010). Reproductive isolating barriers between colour-differentiated populations of an African annual killifish, *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes). *Biological Journal Linnean Society*, 100, 62–72.
- Reyes F., Tassinio B., Passos C. (2017). Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. *Behavioural Processes*, 155, 33-37.
- Rivas N. (2018). *Estudio de la agresión entre machos de Austrolebias reicherti y A. charrua y su efecto sobre el aislamiento sexual entre ambas especies*. (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Rodríguez, F., Durán, E., Gómez, A., Ocaña, F. M., Álvarez, E., Jiménez-Moya, F., Broglio, C. & Salas, C. (2005). Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Research Bulletin* 66, 365–370.
- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, JD. & Lledo, PM. (2002). Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *Journal of Neuroscience*, 22(7):2679-89
- Romer AS. (1959). *The Vertebrate Story*. Chicago, IL: Univ Chicago Press.
- Rosillo JC. (2017). *Características distintivas del bulbo olfatorio de Austrolebias charrua como nicho neurogénico y su vínculo con la vía olfacto-retinal*. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Rosillo, JC., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Garcia-Verdugo, JM., & Fernandez, AS. (2013). Olfacto-retinalis pathway in *Austrolebias charrua* fishes: a neuronal tracer study. *Neuroscience*, 253, 304-315.
- Rowell, JT., Servedio, MR. (2009). Gentlemen prefer blondes: the evolution of mate preference among strategically allocated males. *The American Naturalist* 173 (1): 12–25.
- Ryugo D., Ryugo R., Globus A., Killackey H. (1975). Increased spine density in auditory cortex following visual or somatic deafferentation. *Brain research*, 6;90(1):143-6.
- Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gámez, A., Ocaña, F. M., Jiménez-Moya, F. & Rodríguez, F. (2006). Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish* 3, 157–171.

Salas, C., Rodríguez, F., Vargas, J. P., Durán, E. & Torres, B. (1996). Spatial learning and memory deficits after telencephalic ablation in goldfish trained in place and turn maze procedures. *Behavioral Neuroscience* 110, 965–980.

Salvanes AGV, Moberg O, Ebbesson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA. 2013 Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B*. 280.

Schellart N. 1991 Interrelations between the auditory, the visual and the lateral line systems of teleosts; a mini-review of modelling sensory capabilities. *Netherlands Journal of Zoology*, 42, 459–477.

Seehausen, O., van Alphen, J., Witte, F. (1997). Cichlid Fish Diversity Threatened by Eutrophication That Curbs Sexual Selection. *Science*, 277, 1808-1811

Seki, M., Wakano, JY., Ihara Y. (2007). A theoretical study on the evolution of male parental care and female multiple mating: Effects of female mate choice and male care bias. *Journal of Theoretical Biology*, 247 (2): 281–296

Selz, O., Pierotti, M., Maan, M., Schmidt, C., Seehausen, O. (2014). Female preference for male color is necessary and sufficient for assortative mating in 2 cichlid sister species. *Behavioral Ecology*, 25(3), 612–626

Shors, TJ., Anderson, ML., Curlik, M. & Nokia, M. S. (2012). Use it or lose it: how neurogenesis keeps the brain fit for learning. *Behavioural Brain Research* 227, 450–458.

Shykoff, JA., Møller, AP. (1999). Fitness and asymmetry under different environmental conditions in the barn swallow. *Oikos*, 86 (1): 152–158

Stenkamp DL. (2007). Neurogenesis in the Fish Retina. *Int Rev of Cytol.* Vol. 259

Striedter GF. (2005). *Principles of brain evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Taupin, P., & Gage, F. H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research*, 69(6), 745-749.

Tian N. & Copenhagen DR. (2001). Visual deprivation alters development of synaptic function in inner retina after eye opening. *Neuron* 32, 439-449.

Toldi, J., Farkas, T. & Volgyi, B. (1994a). Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neuroscience Letters*, 167, 1–4.

Toldi, J., Rojik, I. & Feher, O. (1994b). Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat. *Neuroscience*, 62, 105–114.

Torres-Pérez M. (2019). *Correlación entre la aromatasa B y las zonas proliferativas en el encéfalo de Austrolebias charrua adulto*. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay. Torres-Pérez M. (2019). *Correlación entre la aromatasa B y las zonas proliferativas en el encéfalo de Austrolebias charrua adulto*. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay.

Torres-Pérez, M., Rosillo, JC., Berrosteguieta, I, Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, JM. & Fernández, AS. (2017). Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain Research*. 1673, 11-22.

Tregenza, T., Wedell, N. (2000). Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology* 9: 1013–1027.

Valverde, F. (1967). Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse, *Experimental Brain Research*, 3, 337-352.

Van Staaden MJ, Huber R, Kaufman L, Liem K. (1994) Brain evolution in cichlids of the African Great Lakes: brain and body size, general patterns, and evolutionary trends. *Zoology*, 98, 165–178.

Vega, CJ., Peterson, DA. (2005). Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nature Methods*, 2:167-169

Vidyasagar, T. (1978). Possible plasticity in the rat superior colliculus. *Nature*, 275, 140–141

Volgyi, B., Farkas, T. & Toldi, J. (1993). Compensation of a sensory deficit inflicted upon newborn and adult animals. A behavioural study. *Neuroreport* 4, 827–829 (1993).

Von Krogh, K., Sørensen, C., Nilsson, G. E. & Øverli, Ø. (2010). Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiology and Behavior* 101, 32–39.

Walling, CA., Royle, NJ., Lindström, J., Metcalfe, NB. (2010). Do female association preferences predict the likelihood of reproduction? *Behavioral Ecology Sociobiology*, 64, 541–548.

Whitlock KE. (2011) Olfactory Behavior: Making Scents of a Changing World. In: Kalueff A., Cachat J. (eds) Zebrafish Models in Neurobehavioral Research. *Neuromethods*, vol 52. Humana Press, Totowa, NJ

Wong, BB., Candolin, U., Lindström, K. (2007). Environmental deterioration compromises socially enforced signals of male quality in three-spined sticklebacks. *The American Naturalist*, 170: 184–189.

Wright, D., Demandt, N., Alkema, J., Seehausen, o., Groothuis, T., Maan, M. (2017). Developmental effects of visual environment on species-assortative mating preferences in Lake Victoria cichlid fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(2) 289-299.

Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (27) 9697-9702.

Yuji Ishikawa, MY. (1999). Different Brain Morphologies from Different Genotypes in a Single Teleost Species, the Medaka (*Oryzias latipes*). *Brain, Behavior and Evolution*, 2-9.

Zupanc, GKH. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, Behavior and Evolution* 58, 250–275.

Zupanc GKH. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A*. 192:649-670

Zupanc, GKH. & Heiligenberg, W. (1989). Sexual maturity dependent changes in neuronal morphology in the prepacemaker nucleus of adult weakly electric knifefish, *Eigenmannia*. *Journal of Neuroscience*, 9, 3816–3827.

Zupanc, GKH., Hirsch, K. & Gage, F. H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology* 488, 290–319.

Zupanc, GKH. & Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 213-233.

Zupanc, GKH., Horschke, I., Ott, R. & Rascher, G. B. (1996). Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *Journal of Comparative Neurology* 370, 443–464.

Zupanc, GKH., and Lamprecht J. (2000). Towards a cellular understanding of motivation: Structural reorganization and biochemical switching as key mechanisms of behavioral plasticity. *Ethology*, 106: 467–477.

Zupanc, GKH., & Sîrbulescu, RF. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 917-929.

Contribuciones

Este trabajo fue presentado en modalidad poster en 4 eventos académicos:

Eventos nacionales:

2019 – II Congreso Nacional de Biociencias 2019

Plasticidad neuroetológica en *Austrolebias reicherti* frente a cambios en la luminosidad

Eventos internacionales:

2015 –II Simposio Internacional de peces anuales. Uruguay

Efectos de las variaciones de luminosidad en la proliferación celular de la retina de peces

Austrolebias charrua

2016 XII Congress, International Society for Neuroethology. Uruguay

Effects of light variations in cell proliferation in the retina of fish *Austrolebias charrua*

2019- Segunda Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur. Uruguay

Plasticidad neuroetológica en *Austrolebias reicherti* frente a cambios en la luminosidad

También, se encuentra bajo revisión para ser publicado en la revista arbitrada

Neuroscience, bajo el título “Plasticity of cell proliferation dynamics in the retina and in ciliary marginal zone of *Austrolebias charrua* fish under light and darkness conditions”,

autores: Inés Berrostequieta, Juan Carlos Rosillo, María Laura Herrera, Silvia Olivera-Bravo, Gabriela Casanova.