

Adaptación a la oscuridad de la retina
de peces anuales *A. charrua*:
cambios en la proliferación celular y en la
citoarquitectura de la retina

María Laura Herrera Astorga

Tutora: Dra. Anabel Fernández

Co-tutor: Dr. Juan Carlos Rosillo

TESIS DE MAESTRÍA
PEDECIBA Biología-Neurociencias
2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, Anabel y Juanca que me han guiado a lo largo de este proceso, a veces tortuoso y con pandemia de por medio. Por todo el tiempo que dedicaron en ayudarme y las horas “silla”, por no decir la expresión verdadera. No solo les agradezco por su tutoría en lo académico, por todas las valiosas lecciones sobre la vida científica, pero también por sus enseñanzas en todo sentido y seguirme en las locuras que se me ocurren con cada paper volado que encuentro. Agradezco profundamente a mis compas de laboratorio Inés y Stephanie, que con tantas charlas, chistes y cafeína de por medio ayudaron a salir adelante esta tesis. Agradezco los demás integrantes de nuestro grupo y del Instituto, Gaby, Silvia y Daniel, por todo su apoyo en el análisis y perspectivas que por suerte nunca dejan de surgir. Agradezco también a todos los que colaboraron desde FCien, Nicolás, Hellen, Walter, y especialmente a Dani, Ana, Vane, André y Nandy por toda la comprensión, consejos y palabras de aliento.

Agradezco al tribunal, por dedicarle el tiempo a este trabajo, por todas las valiosas recomendaciones, ideas y correcciones que han mejorado mucho esta tesis.

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

Contenidos

Abreviaturas.....	4
Resumen	5
Introducción.....	6
1.1 La neurogénesis como un proceso adaptativo	7
1.2 El sistema visual en peces	7
1.3 La retina: Una estructura conservada.....	8
1.4 Capacidades proliferativas de la retina de teleósteos	9
La zona marginal ciliar.....	10
1.5 El ambiente acuático: efectos de la intensidad lumínica sobre el sistema visual	16
1.6 Los peces anuales como modelo de estudio	17
Peces anuales <i>Austrolebias</i> como modelo de estudio de proliferación neural.....	17
Peces anuales <i>Austrolebias</i> como modelo de estudio de proliferación neural de la retina.....	18
1.7 Hipótesis y objetivos	19
Materiales y Métodos.....	22
2.1 Recolección y mantenimiento de peces anuales.....	22
2.2 Grupos experimentales.....	22
2.3 Inyección de BrdU	23
2.4 Fijación por Perfusión Intracardiaca y Disección de los Globos Oculares	23
2.5 Obtención de secciones histológicas	23
2.6 Inmunodetección	24
Controles.....	25
2.7 Cuantificación de núcleos marcados con BrdU.....	25
2.8 Análisis estadístico de los datos de proliferación	26
2.9 Cuantificación de intensidad de fluorescencia para BLBP	27
2.10 Microscopía electrónica de transmisión.....	29
Fijación, disección y obtención de bloques	29
2.11 Obtención de cortes semifinos y finos en ultramicrotomo	30
Capítulo 1: Análisis de la citoarquitectura de la retina	32
Resultados.....	32
Distribución de los melanosomas del epitelio pigmentario de la retina	38
Discusión	40
3.1 Distribución de los pigmentos del EPR en luz y oscuridad.....	40
3.2 Precursos de bastones de la CNE.....	41

Capítulo 2: Análisis de la proliferación celular de la retina en luz y oscuridad.....	43
Resultados.....	43
4.1 Descripción de la ubicación y morfología de los núcleos BrdU+	43
4.2 Comparación de los datos de proliferación celular entre condiciones de luz y oscuridad...	45
4.3 Densidades proliferativas: proliferación en función del tamaño de la retina	48
4.4 Relación entre tamaños corporales y proliferación de la retina	49
4.5 Proliferación celular de las capas de la retina y ZMC en relación a la proliferación total	51
4.6 Proliferación según la zona de la retina.....	52
Discusión	55
4.7 Ubicación y características de los núcleos BrdU+.....	55
Patrón de marcado de BrdU	55
Ubicación de los núcleos BrdU+.....	56
4.8 Diferencias entre condiciones de luz estándar y oscuridad permanente.....	56
Relación entre tamaños corporales y retinales con la proliferación de la retina	56
Proliferación diferencial en la ZMC y capas nucleares de la retina neural	57
Capítulo 3: Las glías de Müller BLBP+	61
Resultados.....	61
Discusión	65
Discusión y conclusiones generales	67
Perspectivas	70
Anexo: Análisis estadístico de los datos de cuantificación de núcleos proliferativos BrdU+	71
6.1 Análisis de la muestra	71
Descripción de la muestra para cuantificación y análisis estadístico de núcleos proliferativos BrdU+	71
Datos atípicos.....	74
Estadística descriptiva.....	74
Número de datos óptimo.....	77
6.2 Normalidad de los Datos.....	78
6.3 Homogeneidad de Varianza	78
6.4 Validación del modelo lineal de correlación entre el tamaño corporal y la proliferación celular de la retina	79
6.5 Normalidad de los datos por zona	82
6.6 Homogeneidad de varianza de los datos por zona.....	82
Referencias bibliográficas	87

ABREVIATURAS

B: Bastón

BLBP: Brain lipid-binding protein

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

C: Cono

CCG: Capa de las células ganglionares

CNE: Capa nuclear externa

CNI: Capa nuclear interna

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

GM: Glía de Müller

H: neurona horizontal

M: Melanosomas del epitelio pigmentario de la retina

SEb: Segmento externo de bastones

SEc: Segmento externo de conos

Slb: Segmento interno de bastones

Slc: Segmento interno de conos

ZMC: Zona marginal ciliar

ZMC-C: Zona marginal ciliar central

ZMC-M: Zona marginal ciliar medial

ZMC-P: Zona marginal ciliar periférica

RESUMEN

Los peces anuales presentan una gran capacidad proliferativa y neurogénica del sistema nervioso adulto. Esta plasticidad responde a diferentes necesidades funcionales del animal como crecimiento, reparación y adaptación al medio. Los peces anuales del género *Austrolebias* habitan charcos temporales con grandes variaciones lumínicas. La variabilidad de los factores ambientales a los que se exponen estos peces constituye un desafío que los ha llevado a desarrollar diferentes estrategias adaptativas, entre las que se encuentran la plasticidad del sistema nervioso. Los cambios drásticos en las condiciones lumínicas dados por el aumento de la turbidez del agua hacen de las *Austrolebias* un excelente modelo para estudiar la plasticidad en la retina. Estos antecedentes llevaron a postular la hipótesis de que el sistema nervioso de peces anuales es capaz de responder rápida y plásticamente frente a cambios en el entorno. La capacidad proliferativa del sistema visual, en particular de la retina, respondería a cambios lumínicos activando procesos de generación de nuevos fotorreceptores y células que integran los circuitos asociados.

Como objetivo general se planteó evaluar la proliferación y las características de los progenitores de la retina de *A. charrua* machos, en condiciones de oscuridad permanente durante periodos cortos (11 días) y en condiciones de ciclo de luz natural, a los efectos de evidenciar plasticidad adaptativa.

Con este fin, se analizó la proliferación celular de la retina de peces mantenidos en los dos grupos experimentales planteados. Luego de cuatro días de acondicionamiento a la oscuridad permanente, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con el marcador de proliferación celular 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (100 mg/kg, tiempo de sobrevida de 7 días) que fue revelado por inmunofluorescencia.

Se analizó la distribución y cantidad de núcleos BrdU+ en las diferentes capas y regiones. De esta forma se identificaron diferencias entre grupos experimentales: se observó una mayor proliferación celular en ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad permanente en la zona marginal ciliar y en la capa nuclear interna. Esta mayor proliferación se vinculó con la capacidad progenitora de las glías de Müller, postuladas como progenitores principales en procesos regenerativos de la retina. El análisis de BLBP, un marcador de glías de Müller y células madre, mostró una presencia más extendida que la reportada en otras especies de teleósteos, y una mayor señal en la capa nuclear interna cercana a la zona marginal ciliar en condiciones de oscuridad permanente. El análisis en cortes semifinos con azul de metileno y finos por microscopía electrónica de transmisión evidenció diferencias en la citoarquitectura de la capa nuclear externa, en el epitelio pigmentario y en la plexiforme interna. La microscopía electrónica de transmisión permitió identificar una población celular con características propias, localizada entre los núcleos de los conos y los bastones como posible precursora de fotorreceptores.

Nuestros hallazgos indican que la actividad proliferativa es sensible a cambios lumínicos mostrando una rápida plasticidad adaptativa al servicio de la fisiología visual. Estas evidencias permiten postular que la activación de la glía de Müller estaría involucrada en procesos de plasticidad adaptativa. La importancia de comprender este fenómeno radica también en profundizar en estrategias conservadas de adaptación y reparación de la retina, más allá de las implicancias adaptativas en peces anuales.

INTRODUCCIÓN

El ambiente en el que un organismo habita, ya sea natural o artificial, provee estímulos que moldean e influyen el repertorio comportamental mediado por cambios plásticos en el sistema nervioso, tanto a nivel estructural como fisiológico, permitiendo así la adaptación de los organismos a su entorno (Salvanes et al., 2013).

La plasticidad fenotípica refiere a la capacidad de un genotipo para producir diferentes fenotipos en respuesta a variaciones en el ambiente. Esta es crucial para que los organismos puedan responder a las condiciones ambientales, especialmente en entornos heterogéneos o cambiantes (Fordyce, 2006), siendo los cambios a nivel del sistema nervioso centrales en diferentes aspectos adaptativos. La plasticidad neural involucra un amplio espectro de cambios a diferentes niveles de la organización del sistema nervioso como respuesta a diferentes estímulos (von Bernhardi et al., 2017), es decir que la experiencia es capaz de impactar la funcionalidad y como consecuencia cambiar estructura física del sistema nervioso (Ebbesson & Braithwaite, 2012). Los cambios estructurales involucrados en la plasticidad neural pueden influir tanto sobre el tamaño y desarrollo de diferentes estructuras nerviosas, sobre su conectividad a través de procesos de crecimiento axonal o formación de nuevas conexiones sinápticas, como sobre la población celular, incluyendo procesos de proliferación celular neural, neurogénesis o apoptosis (Bastian & Zakon, 2005; Ebbesson & Braithwaite, 2012; Ito et al., 2007; Lindsey et al., 2018a; Salvanes et al., 2013; Zhao et al., 2008).

La neurogénesis adulta es un proceso que se define como la generación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales que se integran en diferentes circuitos existentes (Gage, 2000; Gomazkov, 2014; Gross, 2000). Los procesos neurogénicos pueden clasificarse según sus consecuencias funcionales en (1) constitutivos o fisiológicos o (2) regenerativos. La neurogénesis constitutiva se encarga del mantenimiento de la organización histológica y funcional de los circuitos nerviosos, mientras que la neurogénesis reparativa o regenerativa se activaría para reestablecer las estructuras dañadas frente a lesiones o daños del tejido nervioso (Alunni & Bally-Cuif, 2016).

Actualmente es aceptado que las células madre neurales persisten en zonas con microambientes especializados llamados nichos neurogénicos. Dentro de estos nichos, residen diferentes clases de células madre y progenitoras neurales, que incluyen a las glías radiales y células neuroepiteliales, aunque la composición celular de los nichos es variable a lo largo de los diferentes taxa y zonas del sistema nervioso (Alunni & Bally-Cuif, 2016). En general, las células neuroepiteliales son cruciales durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, típicamente transformándose en glías radiales en las etapas tardías y posteriormente en células astrocitarias en la vida adulta de mamíferos. Sin embargo, en teleósteos, existiría una retención de células neuroepiteliales y radiales capaces de mantener características de células madre o progenitoras en una gran variedad de nichos neurogénicos en la adultez, confiriendo así extensas capacidades neurogénicas y reparativas a lo largo de toda la vida adulta (Agathocleous & Harris, 2009; Alvarez-Buylla et al., 2001; Lindsey et al., 2018b; Miles & Tropepe, 2021; Raymond et al., 2006; Zupanc, 2001).

El abordaje de la neurogénesis en diferentes modelos experimentales permite aportar una visión comparativa acerca de su importancia biológica, regulación molecular, e incluso, conocimientos sobre sus mecanismos de regulación molecular y sus implicancias terapéuticas. La gran susceptibilidad y prevalencia de lesiones físicas o químicas, así como de enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso, y en particular de la retina, han despertado un gran interés sobre los fenómenos reparativos y proliferativos en diferentes especies, en especial en animales con importantes capacidades regenerativas como anfibios, aves y teleósteos. Estos grupos de vertebrados se presentan, entonces, como modelos muy poderosos para el estudio de los diferentes factores genéticos, epigenéticos, vías de señalización y regulación de la activación de las células madre de la retina, permitiendo así

profundizar también en las características de estos fenómenos en mamíferos, cuya capacidad regenerativa es muy limitada (Lindsey et al., 2018b). Esto ha llevado a diferentes autores a considerar que el estudio de la neurogénesis constitutiva y regenerativa de la retina de peces permitiría desarrollar nuevas estrategias para el restablecimiento de las funciones retinales incluso en síndromes degenerativos de la retina humana (Revisado en Richardson et al., 2017; Revisado en Sherpa & Hui, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007).

1.1 LA NEUROGÉNESIS COMO UN PROCESO ADAPTATIVO

Se ha descrito que la neurogénesis adulta es un factor determinante en numerosos fenómenos de plasticidad (Ebbesson & Braithwaite, 2012), permitiendo postular la existencia de un tercer tipo de neurogénesis: la neurogénesis adaptativa (Gomazkov, 2014; Lledo & Gheusi, 2003; Lledo & Valley, 2016; Ortega-Perez et al., 2007). La plasticidad otorgada por la neurogénesis adulta contribuiría a la adaptación y a la flexibilidad necesaria para afrontar los desafíos ambientales (Ebbesson & Braithwaite, 2012), a través de una modulación en la generación, maduración e integración de las nuevas neuronas al servicio de las necesidades funcionales. Por lo tanto, la regulación de la neurogénesis jugaría un rol central en el balance del recambio neuronal para modular la estructura y función del sistema nervioso de acuerdo a desafíos provocados por el medio ambiente cambiante (Zhao et al., 2008).

En particular, la experiencia sensoriomotora es uno de los principales reguladores de estos procesos y se han reportado numerosos casos de modulación de la neurogénesis en estructuras sensoriales del sistema nervioso en respuesta a variaciones en la estimulación sensorial (Revisado en Lindsey et al., 2018b; Revisado en Zhao et al., 2008).

1.2 EL SISTEMA VISUAL EN PECES

Los animales se relacionan con el ambiente que los rodea mediante distintos sentidos para la obtención de información sensorial crítica para la sobrevivencia y reproducción, en múltiples procesos como localizar alimento, encontrar pareja y evitar ser depredados. Por lo tanto, la diversidad de los órganos sensoriales está moldeada por el contexto ecológico y, por consiguiente, por los estímulos ambientales, generando que diferentes modalidades sensoriales puedan ser más confiables en distintas situaciones ambientales (Bastian & Zakon, 2005). En consecuencia, las estructuras nerviosas sensoriales y comportamientos que estos controlan deben poder adaptarse de forma plástica a medida que los organismos y sus condiciones ambientales cambian (Bastian & Zakon, 2005).

La visión constituye una de las principales fuentes de información sensorial para la mayor parte de las especies de peces. En ecosistemas acuáticos, la ecología visual es altamente dependiente del régimen de luz ambiental, impactando en los comportamientos de alimentación, evasión de depredadores, interacción con coespecíficos y reproducción. Sin embargo, las características lumínicas pueden variar en gran medida generando importantes cambios en el ambiente lumínico físico, incluyendo la longitud de onda (color), dispersión de luz y, sobre todo, en la intensidad. De este modo, las variaciones ambientales de la luz podrían ejercer grandes presiones selectivas sobre la visión de los peces, tanto a nivel comportamental, como también a nivel fisiológico y anatómico. En respuesta a estas presiones, los sistemas visuales de teleósteos han desarrollado diversas adaptaciones para acompasar el espectro e intensidad de luz del microhábitat (Evans, 2004). Es de esperar que parte de estas adaptaciones se encuentren relacionada a fenómenos de neurogénesis adaptativa, que permitan afinar y ajustar el funcionamiento de las estructuras visuales a las necesidades funcionales impuestas por el ambiente visual.

Dadas las importantes capacidades proliferativas, neurogénicas y plásticas de la retina de peces, así como su exposición a nichos ecológicos complejos y la variedad de adaptaciones de las estructuras visuales (Evans, 2004), estos constituyen un modelo privilegiado para profundizar en los mecanismos subyacentes a la modulación de la neurogénesis retiniana por las condiciones lumínicas.

1.3 LA RETINA: UNA ESTRUCTURA CONSERVADA

La retina de los peces teleósteos posee una estructura común al resto de los vertebrados. La retina es una estructura cuyo desarrollo embrionario y sus características anatómicas y fisiológicas adultas se encuentran altamente conservadas en la filogenia de los vertebrados. La retina neural madura de todos los vertebrados está compuesta por siete tipos celulares principales, seis de ellos neuronales y uno glial. La retina se organiza en dos capas sinápticas -la capa plexiforme externa y la capa plexiforme interna- y tres capas celulares (capa nuclear externa, capa nuclear interna, y capa de células ganglionares). El soma de los fotorreceptores, tanto conos como bastones, se localiza en la capa nuclear externa (CNE). Estos dos tipos de fotorreceptores se diferencian en estructura y función: la diferencia en los fotopigmentos expresados determina que los conos sean los fotorreceptores encargados principalmente de la visión de colores (según el fotopigmento expresado pueden responder a diferentes longitudes de onda) y definición para la visión diurna; mientras que los bastones son esenciales para la visión a bajas iluminaciones y visión nocturna (Jacobs, 1993; Reuter & Peichl, 2008; Veleri et al., 2015). La capa nuclear interna (CNI) se compone de células horizontales, células bipolares, células amácrinas, e interplexiformes, así como el principal tipo glial de la retina neural: las glías de Müller. El soma de las células ganglionares constituye la capa de las células ganglionares (CCG). En la capa plexiforme externa ocurre la sinapsis entre los procesos de los fotorreceptores, células horizontales, células bipolares e interplexiformes, mientras que en la capa plexiforme interna se contactan las prolongaciones de células bipolares, amácrinas, interplexiformes y ganglionares (Bringmann, 2001; Revisado en Marc, 1998; Revisado en Stenkamp, 2007). En la Fig. 1 se muestra un esquema representativo de la retina de ratón.

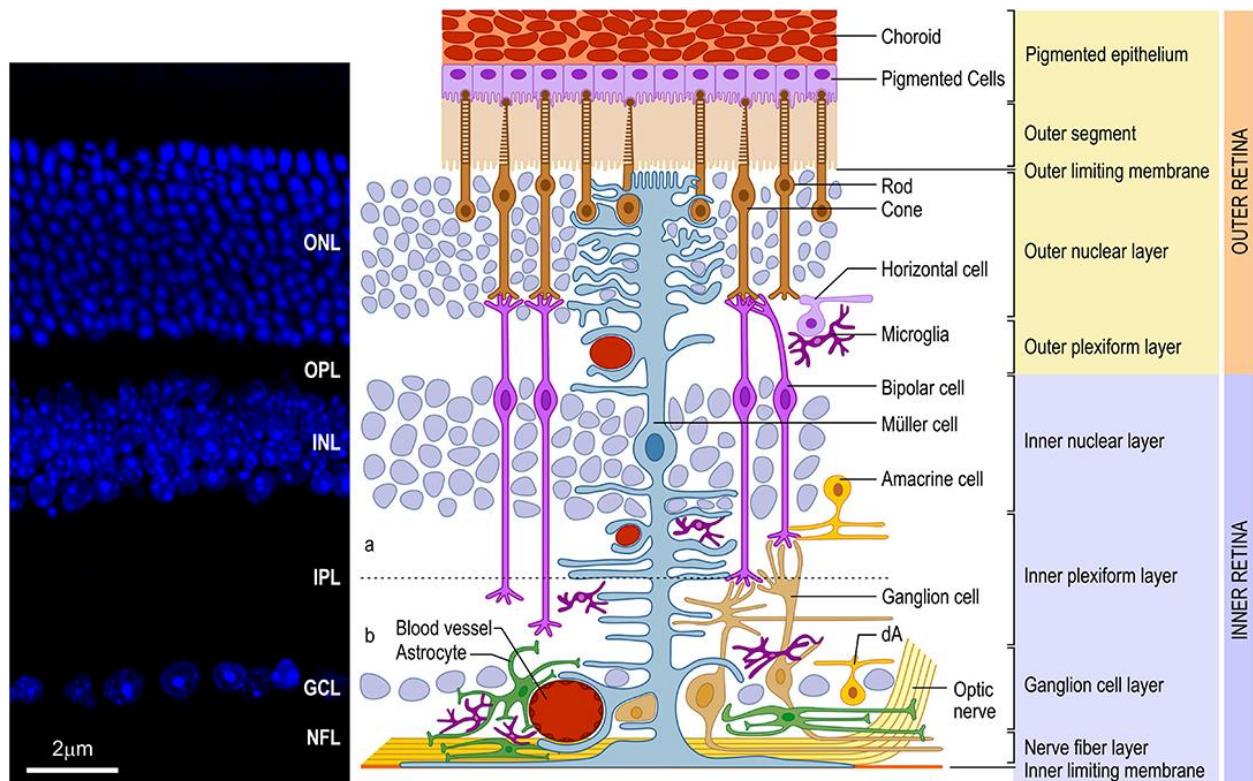


Fig. 1: Estructura de la retina de vertebrados: Izquierda: Sección vertical de la retina de ratón marcada con el marcador nuclear DAPI revelando la organización en capas: capa de las células ganglionares (GCL), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL).

Derecha: Representación esquemática de la retina de vertebrados. La misma consiste de diferentes tipos celulares localizados en capas específicas. El soma de los fotorreceptores conos y bastones se ubica en la ONL. Ambos hacen sinapsis en la OPL con las células bipolares y horizontales, ubicadas en la INL junto con las células amácrinas y glías de Müller. Las células bipolares y amácrinas arborizan en la IPL, contactando las dendritas de las neuronas ganglionares. Estas, junto con células amácrinas desplazadas (dA) se encuentran en la GCL. Los axones de las células ganglionares forman la capa de fibras nerviosas que se dirigen hacia las estructuras cerebrales de procesamiento a través el nervio óptico. La retina contiene tres tipos de células gliales, glías de Müller, astrocitos y microglía. Los astrocitos se restringen a la porción interna de la retina, en la NFL y GCL y se encuentran en estrecho contacto con los vasos sanguíneos. La microglía se ubica preferentemente en las capas plexiformes. Las glías de Müller, las glías predominantes, extienden sus procesos radialmente a través de la retina formando la membrana limitante interna y externa y son capaces de interactuar con casi todos los tipos retinales y vasos sanguíneos de la retina. Barra de calibración: 20 μ m (Extraída de Campos et al., 2020)

1.4 CAPACIDADES PROLIFERATIVAS DE LA RETINA DE TELEÓSTEOS

La retina de aves, anfibios y peces teleósteos posee la capacidad de proliferar y producir nuevas neuronas retinales a lo largo de toda la vida adulta (Agathocleous & Harris, 2009). A diferencia de estos grupos de vertebrados, en mamíferos, las células neuronales de la retina son producidas casi por completo en el desarrollo embrionario, mientras que las glías se producen en la vida temprana del animal. En la mayoría de las especies de mamíferos, la neurogénesis de la retina cesa dentro de las primeras dos semanas de vida postnatal, sugiriendo que los cambios postembrionarios de crecimiento estarían asociado en general por procesos no neurogénicos (Miles & Tropepe, 2021).

En los peces, a diferencia de otros vertebrados, existe un crecimiento durante toda la vida postnatal. El aumento del tamaño de la retina, ligado al crecimiento a lo largo de la vida adulta, se da por tres mecanismos principales: (1) expansión de la retina existente y agrandamiento de las células retinales,

(2) adición de tejido en la periferia de la retina, generado por una zona germinal circunferencial (la zona marginal ciliar) y (3) inserción de bastones en la capa nuclear externa. Los dos últimos mecanismos mencionados implican la generación de nuevas neuronas. De este modo, la retina neural de peces adultos presenta dos tipos de nichos que con células madre retinales multipotentes y con capacidad de autorrenovación: la zona marginal ciliar y los progenitores del linaje de bastones (Johns, 1977; Raymond et al., 2006).

La zona marginal ciliar

La zona marginal ciliar (ZMC) es una zona de proliferación activa identificada en peces teleósteos y anfibios. Esta se encuentra en la periferia de la retina neural, en el límite con el epitelio del iris (Fig. 2). Esta zona consiste de células madre o progenitoras de la retina capaces de proliferar en la mayor parte de la vida adulta de estos organismos (Revisado en Fischer et al., 2014; Revisado en Miles & Tropepe, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007).

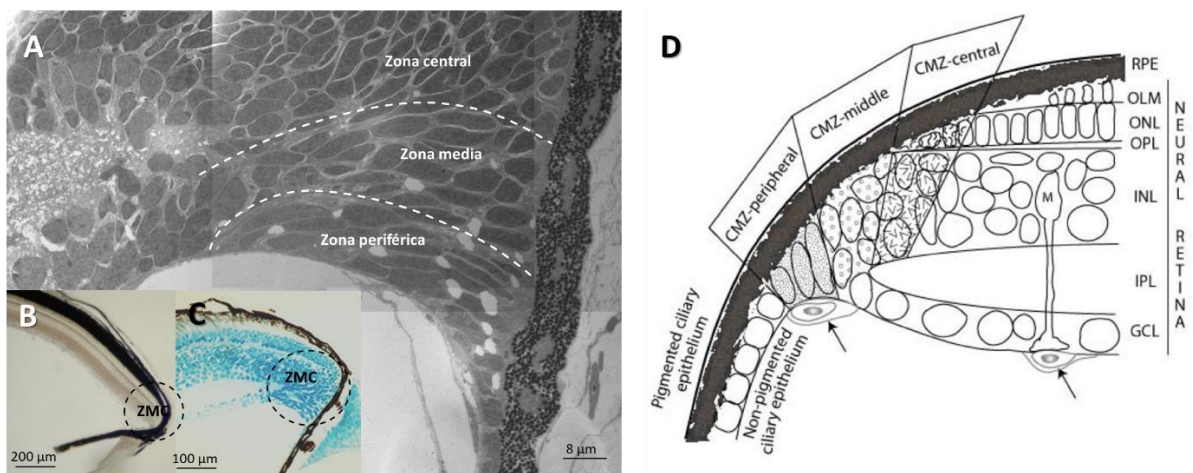


Fig. 2: A) Micrografía electrónica de transmisión de la zona marginal ciliar (ZMC) de la retina de *A. charrua*. Se indican las tres divisiones de la zona marginal ciliar. B,C) Imagen panorámica de un corte sagital de la retina sin tinción (B) y con tinción de azul de metileno borácico (C). A-C) (Extraída de Berrosteguieta et al., 2021). D) Representación esquemática de la zona marginal ciliar (CMZ) y sus características histológicas. Se muestra la zona marginal ciliar dividida en cuatro regiones según sus características y expresión génica: la zona periférica, media y central. RPE: epitelio pigmentario de la retina, OLM: membrana limitante externa, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa plexiforme interna, GCL: capa de las células ganglionares, M: glías de Müller. Las flechas indican vasos sanguíneos (Extraída de Raymond et al., 2006)

La ZMC se comporta como un neuroepitelio embrionario, capaz de generar todas las células neurales retinales y es crucial en procesos de crecimiento durante prácticamente toda la vida adulta de peces teleósteos (Revisado en Miles & Tropepe, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007). La visión clásica plantea que a partir de la ZMC, la retina de peces crece por la aposición de anillos concéntricos, donde las células menos recientes se encuentran en la zona central, y las células más recientemente generadas, en la zona periférica (Johns, 1977).

La ZMC constituye un verdadero nicho de células madre, con una localización y composición celular estereotipada (Wehman et al., 2005). Sus características histológicas, expresión génica y la naturaleza proliferativa de estas células por fuera del periodo embrionario han llevado a que sea considerada como un nicho de células madre *bona fide* que podría estar conservado entre especies de vertebrados. Si bien otros tipos celulares, como las células del epitelio pigmentario de la retina, el epitelio ciliar y las glías de Müller exhiben características de células madre o progenitoras, la ZMC es uno de los nichos

proliferativos más importantes de la retina (Revisado en Agathocleous & Harris, 2009; Revisado en Miles & Tropepe, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007).

Diferencias de la ZMC entre teleósteos y otros vertebrados

La presencia de una ZMC similar a la de teleósteos y anfibios ha sido también descrita en la retina adulta de otros grupos de vertebrados. En aves, se ha reportado la proliferación y producción de neuronas capaces de integrarse en el margen de la retina neural. Sin embargo, la ZMC de aves presentaría un potencial neurogénico más limitado que en teleósteos, posiblemente limitado a únicamente la producción de neuronas bipolares y amácrinas, sin evidencia aun de la posibilidad de producción de fotorreceptores, células horizontales o ganglionares bajo condiciones fisiológicas (Fischer, 2005; Revisado en Fischer et al., 2014; Kubota et al., 2002).

En mamíferos, incluyendo a los humanos, la identificación de una ZMC ha sido dificultosa dada la ausencia o muy reducida capacidad proliferativa en la retina madura. En mamíferos, la zona que corresponde anatómicamente a la ZMC es el área alrededor del margen periférico de la retina neural y durante la retinogénesis embrionaria, contiene células madre/progenitoras. Sin embargo, luego del nacimiento, el espacio entre la retina neural y el cuerpo ciliar se encuentra muy reducido (Fig. 3), por lo que una ZMC no estaría presente o se encontraría muy disminuida, es decir, que esta población de células madre se encontraría depletada y/o en estado de quiescencia. Sin embargo, diferentes trabajos *in vivo* e *in vitro* han postulado que el cuerpo ciliar o el epitelio pigmentario en el margen periférico podrían existir células retinales con potencial proliferativo capaces de dividirse en condiciones *in vitro* o bajo ciertas condiciones específicas o patológicas, pero su proliferación *in vivo* sería muy limitada (Ahmad et al., 2000, 2004; Revisado en Frøen et al., 2013; Kubota et al., 2002; Revisado en Miles & Tropepe, 2021).

Estas evidencias sugieren la presencia de una región ZMC-like, que podría ser una característica conservada en la mayor parte de los vertebrados, pero cuya localización y actividad proliferativa presenta importantes diferencias *in vivo* (Revisado en Agathocleous & Harris, 2009; Revisado en Miles & Tropepe, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007).

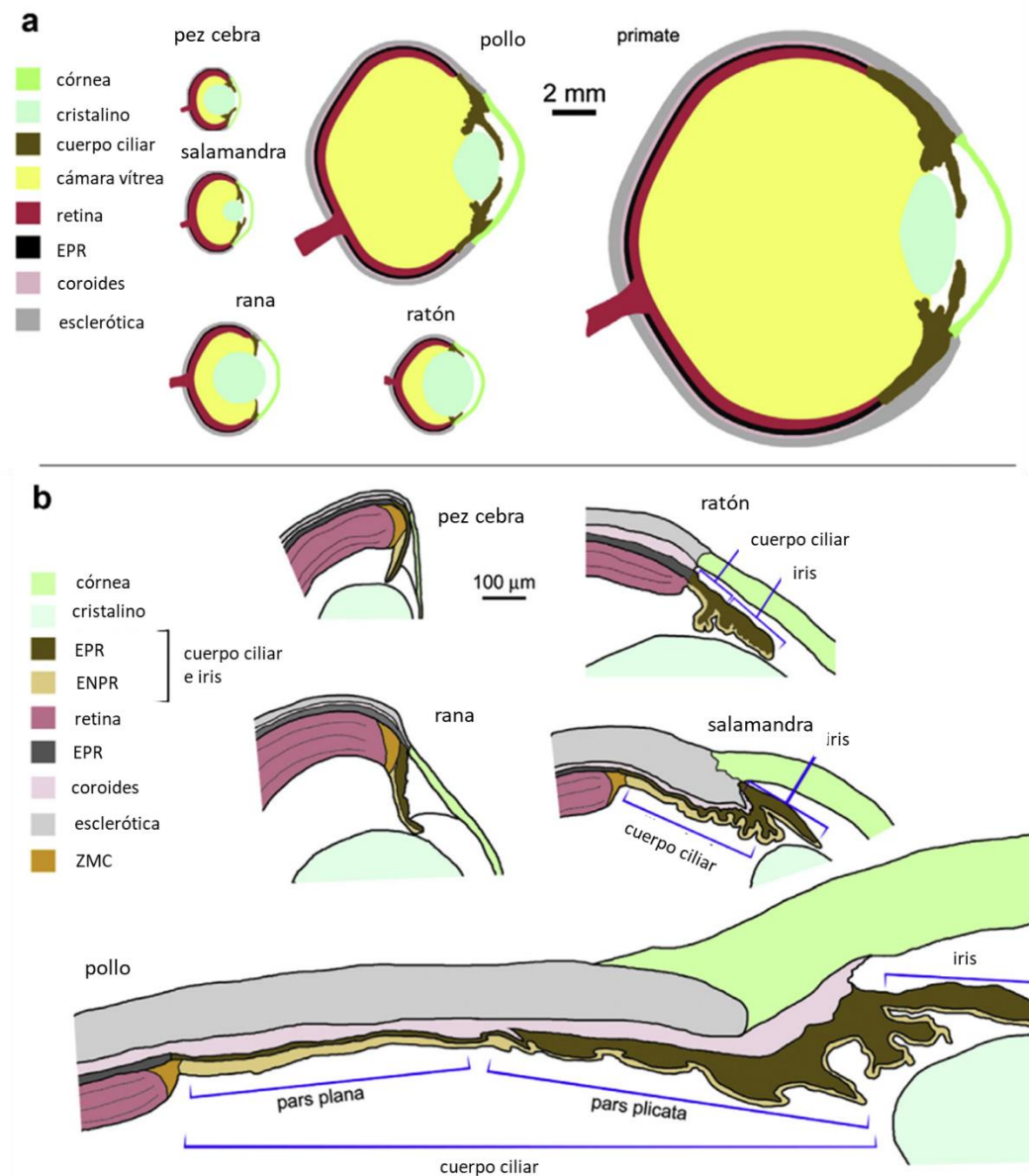


Fig. 3: Anatomía comparada del ojo, cuerpo ciliar y zona marginal ciliar (ZMC) de diferentes clases de vertebrados, incluyendo pez cebra, anfibios (salamandra y rana), pollo, ratón y primates. En el panel a se incluyen ilustraciones de cortes longitudinales a través del ojo de diferentes vertebrados. Las ilustraciones incluyen representaciones de la córnea, cristalino, cuerpo ciliar, cámara vítrea, retina, epitelio pigmentario de la retina (RPE), coroides y esclerótica. En el panel b ilustran representaciones de la córnea, cristalino, cuerpo ciliar, epitelio pigmentario y no pigmentario (ENPR) del cuerpo ciliar, la zona marginal ciliar, retina, epitelio pigmentario de la retina, corioide y esclerótica. Figura modificada de Fischer et al. (2014)

Regulación de la proliferación de las células madre de la ZMC

Más allá de las diferencias en la identidad de las células madre, la presencia y capacidad proliferativa de la ZMC estaría regulada tanto por factores intrínsecos, como por factores extrínsecos, ya sea establecidos durante el desarrollo embrionario o durante la vida adulta. Un claro ejemplo, es que la proliferación de la ZMC y, por lo tanto, la producción de nuevas neuronas retinales, se encuentra ligado al crecimiento corporal. Estudios en teleosteos han demostrado que factores reguladores del crecimiento como la hormona de crecimiento y el *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) son capaces de

regular la proliferación de la ZMC, permitiendo acompañar el crecimiento corporal y retinal (Becker et al., 2021; Mack & Fernald, 1993). A su vez, en mamíferos también se ha identificado la regulación de las putativas células madre de la retina frente a diferentes factores de señalización, entre ellos factores de crecimiento como EGF y FGF2 (Ahmad et al., 2004). Por otro lado, estas también estarían reguladas por diferentes factores contextuales, como situaciones patológicas o de regeneración frente a lesiones, pero también como respuesta plásticas o adaptaciones específicas de los organismos (Revisado en Miles & Tropepe, 2021; Revisado en Stenkamp, 2007). Existe evidencia de que la proliferación de los progenitores de la ZMC puede ser regulada por la experiencia visual. Esta es capaz de regular el crecimiento del globo ocular y de la proliferación de la ZMC de la retina de aves y mamíferos (Fischer et al., 2014; A. V. Tkatchenko et al., 2006; T. Tkatchenko et al., 2021). Estas evidencias, sugieren entonces que la manipulación del ambiente visual de los organismos podría constituir un modelo prometedor para el estudio de la proliferación de la ZMC en condiciones fisiológicas.

Por qué distintas especies muestran diferentes comportamientos de las células madre o progenitoras de la periferia retinal todavía no está entendido de forma cabal. El abordaje comparativo podría contribuir a comprender la variación fenotípica natural de las especies con adaptaciones evolutivas únicas en el mantenimiento de la retina a través de ZMC o ZMC-like y así continuar contribuyendo al conocimiento de los potenciales regenerativos en la retina humana (Miles & Tropepe, 2021).

Progenitores de bastones

Además de la ZMC, existe otra fuente de células progenitoras retinianas en peces teleósteos en la retina diferenciada (Raymond et al., 2006). En condiciones fisiológicas los fotorreceptores del tipo bastón se acumulan en la retina madura a medida que los peces crecen (Johns & Fernald, 1981). El origen proximal de los bastones se da por células proliferativas denominadas precursores o progenitores de bastones. Estos constituyen células precursoras de división rápida, de linaje restringido a la producción de bastones, ubicados en la CNE entre los núcleos de los bastones diferenciados produciendo bastones *in situ*, a diferencia de los otros tipos neuronales que deben ser producidos en la ZMC (Johns & Fernald, 1981).

En la retina adulta, estos precursores derivan de progenitores que proliferan de forma más lenta en la capa nuclear interna, generando células amplificadoras que migran a la CNE a través de los procesos radiales de las glías de Müller, formando acúmulos de células que atraviesan la capa plexiforme externa hacia la capa nuclear externa, donde continuarían dividiéndose y diferenciándose a bastones (Otterson et al., 2001; Raymond & Rivlin, 1987). Sin embargo, se ha reportado que estas células de la CNI no serían únicamente capaces de producir bastones, sino que en diferentes especies de teleósteos, frente a lesiones o neurotoxinas, estas poseen una robusta capacidad de regenerar todos los tipos retinales y restaurar la estructura laminar de la retina (Sherpa & Hui, 2021) (Fig. 3).

La identidad y características de estas células progenitoras multipotentes ha sido un tema de extensa investigación. Se ha propuesto que diferentes células podrían corresponder a las células madre o progenitoras en la retina de vertebrados adultos, incluyendo el epitelio pigmentario y el cuerpo ciliar. Sin embargo, un tipo glial ha tomado gran protagonismo en esta área, y se postula incluso que podría corresponder a células multipotenciales en la retina de todos los vertebrados: las glías de Müller (Salman et al., 2021)

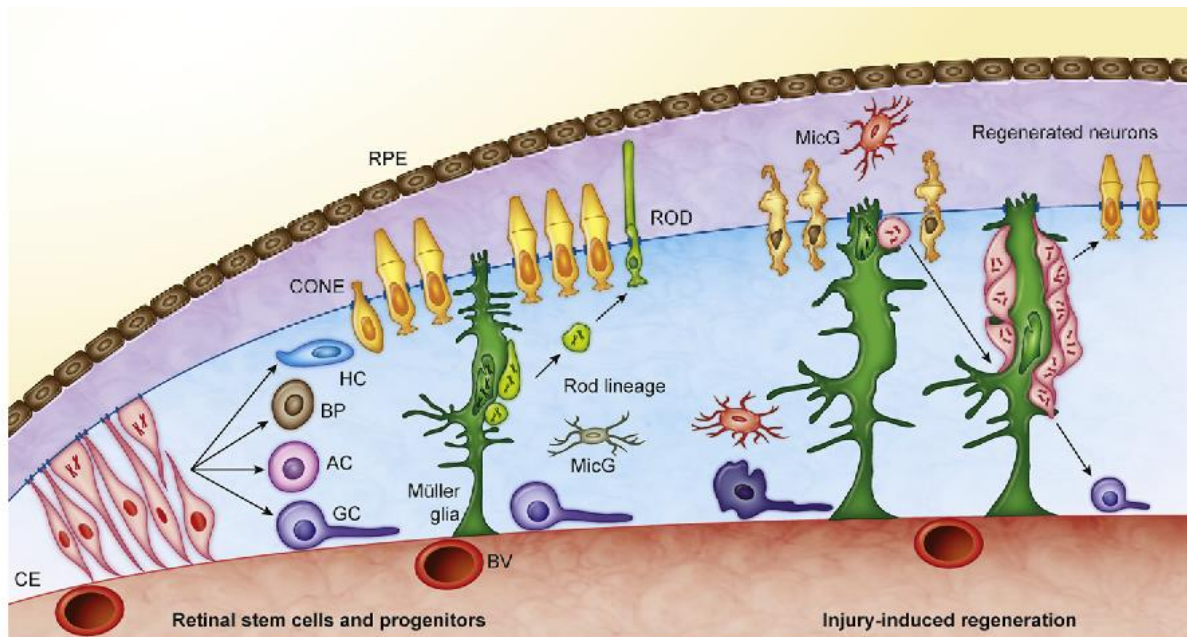


Fig. 4: Neurogénesis en la retina adulta de teleósteos durante el crecimiento y regeneración. La zona marginal ciliar con células madre multipotentes se indica en rosado en la unión entre la retina neural y el epitelio ciliar (CE). Los procesos radiales de las glías de Müller (verde) se extienden apico-basalmente a lo largo de la retina y sus procesos laterales envuelven a los distintos tipos neuronales. Las glías de Müller son células madre retinales somáticas que sostienen el linaje de los bastones: se dividen infrecuentemente, mediante división asimétrica que permite la autorrenovación, que da lugar a progenitores proliferativos comprometidos (verde claro) que migran apicalmente para generar fotorreceptores del tipo bastón en la retina madura. Cuando las neuronas retinales son destruidas, se activa la microglía (MicG) para eliminar restos celulares, los núcleos de las glías de Müller se translocan a la superficie apical, se dividen asimétricamente y dan lugar a progenitores multipotentes proliferativos (rosado) que se acumulan alrededor de las fibras radiales de las glías de Müller y migran hacia la capa celular adecuada para regenerar los tipos neuronales perdidos (por ejemplo, CG y conos). GC: Células ganglionar, AC: células amácrinas, BP: células bipolares, HC: célula horizontal, ROD: fotorreceptores del tipo bastón, CONE: fotorreceptor del tipo cono, BV: vasos sanguíneos, RPE: Epitelio pigmentario de la retina. Extraída de Lenkowski y Raymond (2014).

Las glías de Müller como progenitores retinianos

Las glías de Müller son células radiales críticas en el funcionamiento de la retina diferenciada en todas las especies de vertebrados. Sus somas se encuentran ubicados en la CNI y poseen procesos radiales que se extienden en todo el espesor de la retina neural, entre las membranas limitantes interna y externa, donde forman uniones estrechas con los fotorreceptores. Sus procesos radiales pueden contactar con todos los tipos neuronales de la retina, pero también con vasos sanguíneos, siendo claves en el mantenimiento de la estructura retinal, la homeostasis y el metabolismo. A su vez, sus procesos laterales se extienden en las capas plexiformes interna y externa envolviendo las sinapsis, contribuyendo en el correcto funcionamiento sináptico y en el ciclo de los neurotransmisores (Bringmann, 2001).

En teleósteos, creciente evidencia ha demostrado que estas células serían el componente central en la producción de bastones en la retina adulta (Bernardos et al., 2007). Como ya se ha mencionado, sus procesos radiales cumplen la función de andamiaje para la migración de precursores de bastones hacia la CNE. Numerosos estudios aportan evidencia contundente de que las glías de Müller no solo cumplirían un rol estructural, sino que constituyen células multipotenciales que pueden ser activadas

en procesos regenerativos y serían las principales células madre de la retina madura (Bernardos et al., 2007; Raymond et al., 2006). Las glías de Müller son activadas frente a lesiones y adquieren características moleculares de células progenitoras o madre, que sugieren un fenotipo de gliosis reactiva, pero también de desdiferenciación y reentrada en el ciclo celular. Se ha observado que son capaces de incorporar marcadores proliferativos, y que comparten la expresión de factores descritos en la ZMC, pero también en la retina y cerebro embrionarios, incluyendo la expresión de Sox2, Pax6 y BLBP. A su vez, se ha observado que son capaces de desdiferenciarse, proliferar y expresar marcadores neuronales, evidenciando su potencial neurogénico (Bernardos et al., 2007). Esto además se sustenta en investigaciones que han determinado que las células madre del encéfalo adulto corresponderían a glías radiales con potenciales neurogénicos (Agathocleous & Harris, 2009; Alvarez-Buylla et al., 2001).

BLBP (brain lipid-binding protein, también llamada Fabp7) es una proteína perteneciente a la familia de proteínas de unión a lípidos intracelulares, una familia multigénica conservada en todo el reino animal (Feng et al., 1994; Haunerland & Spener, 2004), y es un marcador de glía radial del sistema nervioso embrionario y adulto (Osumi et al., 2008). No obstante, las funciones de BLBP, especialmente en el sistema nervioso, aún no están bien comprendidas (Diotel et al., 2016). La glía radial proliferativa adulta en el cerebro expresa BLBP, lo que sugiere funciones clave para esta proteína en la activación de células madre neurales de vertebrados (Diotel et al., 2016; Feng et al., 1994). En la retina del pez cebra adulto, BLBP se expresa mediante glía de Müller inmadura y reactivada (Raymond et al., 2006), y en respuesta al daño en la retina, la glía de Müller regula rápidamente la expresión de BLBP y reingresa al ciclo celular (Bernardos et al., 2007; Nagashima et al., 2013; Raymond et al., 2006).

A diferencia de la capacidad de otros peces, anfibios y aves, capaces de regeneración espontánea mediada por glías de Müller frente a lesiones o patologías, este proceso es muy limitado en la retina de mamíferos. Por lo tanto, las enfermedades retinales humanas muchas veces generan pérdida permanente de la visión y ceguera. Si bien las glías de Müller de la retina de mamíferos presentan características de células madre *in vitro*, no se ha demostrado su capacidad de regenerar la retina *in vivo*. Al igual que en otros grupos de vertebrados, las glías de Müller en mamíferos son capaces de responder frente a lesiones o patología generando una expresión de gliosis reactiva, sin embargo, este proceso no prosigue con la regeneración y proliferación para producir neurogénesis como en peces. Actualmente, no se conocen los factores que pueden estar restringiendo o impidiendo la capacidad regenerativa de las glías de Müller en mamíferos (Salman et al., 2021), por lo que la investigación en modelos como los peces capaces de producir estos procesos de forma muy conspicua pueden dar información muy valiosa al respecto.

Las evidencias expuestas destacan cómo entender las propiedades de la ZMC y de la retina madura de forma comparativa, tanto respecto a la identidad de las células madre/precursoras retinales como los mecanismos que las regulan, podrían dar importantes claves para comprender cómo las capacidades germinativas endógenas se adaptan en situaciones de fisiología retinal alterada e incluso generar potenciales terapéuticos en situaciones patológicas degenerativas humanas (Miles & Tropepe, 2021). El abordaje de estas temáticas en teleósteos, con sus propiedades de proliferación y regeneración exacerbadas puede contribuir a la identificación de las características y los procesos regulatorios de las células madre de la retina necesarios para su funcionamiento, y por lo tanto, contribuir al conocimiento para el desarrollo de abordajes terapéuticos (Stenkamp, 2007).

Hoy en día, el pez cebra, con la variedad de herramientas moleculares y genéticas disponibles, se ha vuelto una especie ampliamente utilizada para el estudio en diferentes áreas de la biología, incluso, como modelo de síndromes degenerativos humanos. Sin embargo, peces con ciclos de vida particulares pueden proveer oportunidades excepcionales para el entendimiento de la plasticidad visual como un mecanismo adaptativo natural y no necesariamente frente a estímulos patológicos,

dado que las capacidades neurogénicas podrían ser modificadas frente a cambios en los requerimientos visuales de los animales (Revisado en Stenkamp, 2007).

1.5 EL AMBIENTE ACUÁTICO: EFECTOS DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA SOBRE EL SISTEMA VISUAL

En general, el aumento de la turbidez de sistemas acuáticos de agua dulce es considerado uno de los más importantes cambios antropogénicos muchas veces asociado a la eutrofización como consecuencia de la agricultura o aumento de la sedimentación o erosión. En general, en aguas turbias la información visual se deteriora, y posiblemente impactando de forma negativa a los organismos que dependerían de la modalidad visual. De hecho, aumentos de la turbidez son considerado una de las más importantes amenazas en ecosistemas acuáticos impactando negativamente sobre la biodiversidad. Muchos estudios han demostrado que una menor disponibilidad de luz veces disminuye el campo visual y tiempo de reacción de diferentes especies de peces (Evans, 2004; Utne-Palm, 2002)

Si bien la turbidez del agua está asociada a ecosistemas degradados, pero en algunos casos, las comunidades ecológicas pueden continuar prosperando en estas condiciones (Schulz et al., 1999). De hecho, existen numerosas evidencias de adaptación plástica frente a las importantes presiones selectivas de los cambios en el ambiente visual, principalmente en peces dependientes de la visión, y por lo tanto, los sistemas visuales de los mismos estarán afinados para el tipo de ambiente lumínico al que están expuestos (Nieman et al., 2018).

A su vez, resulta interesante el estudio de fenómenos de plasticidad frente a alteraciones en el ambiente visual en la vida de los organismos. Una posible estrategia adaptativa sería utilizar información derivada de otras modalidades sensoriales (compensación sensorial) (Hartman & Abrahams, 2000). Por otro lado, organismos que experimentan turbidez o cambios en la misma podrían generar compensaciones *dentro* de una misma modalidad a través de fenómenos de plasticidad (Ehlman et al., 2015)

En condiciones de luz alteradas, se han reportado cambios en la sensibilidad visual incluso en cortos periodos de tiempo. El mantenimiento de guppies (*Poecilia reticulata*) en aguas turbias, llevó a un cambio en la expresión génica de opsinas, cambiando de predominantemente detección de ondas de longitud media, a longitudes de onda largas. La sensibilidad de estas últimas podría estar ligada a la detección de movimiento, y por lo tanto, este cambio podría ser una estrategia adaptativa para mantener la habilidad de detección de movimiento en aguas oscurecidas por la turbidez, demostrando la importancia de la plasticidad ontogénica en las respuestas frente a ambientes rápidamente cambiantes (Ehlman et al., 2015)

En particular, otros autores han procurado estudiar cómo se ve afectada la proliferación retinal según la variación lumínica considerando diferentes manipulaciones de periodos de luz y oscuridad permanente.

Previamente se ha reportado la presencia de variaciones circadianas en los ritmos proliferativos en la retina de teleósteos. En varias especies, se ha reportado mayores ritmos proliferativos en la producción de bastones durante la noche, es decir, durante el periodo de oscuridad (Chiu et al., 1995; Julian et al., 1998), así como también variaciones diarias en la capacidad de incorporación de marcadores proliferativos durante el día en el caso de la ZMC de pez cebra (Ricatti et al., 2011).

Llamativamente, la retina de otros peces teleósteos, como pez dorado, mantenidos en diferentes periodos de oscuridad constante durante su desarrollo posteclosión no mostró alteraciones en los números o diferenciación de fotorreceptores (Raymond et al., 1988).

Un importante antecedente para este trabajo ha sido el publicado por Lahne et al. (2019). Estos investigadores estudiaron los efectos de adaptaciones a condiciones de oscuridad permanente durante 14 días sobre las capacidades proliferativas del linaje de producción de bastones en ejemplares de peces cebra albinos en diferentes ventanas temporales. Estos investigadores reportaron una mayor proliferación en la CNE, pero no observaron cambios en la cantidad de células proliferativas en la CNI. En particular, el número de células marcadas en la CNE aumentó hasta los 8 días de adaptación a la oscuridad bajando nuevamente hasta los 14 días de adaptación.

1.6 LOS PECES ANUALES COMO MODELO DE ESTUDIO

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

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

Peces anuales *Austrolebias* como modelo de estudio de proliferación neural

Diferentes especies de este género han servido como modelo en nuestro laboratorio para el estudio de aspectos neuroanatómicos, neurogénicos y de su plasticidad. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los peces anuales del género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) poseen una activa proliferación neural y neurogénesis en numerosas zonas a lo largo del encéfalo y retina (Fernández et al., 2011; Rosillo et al., 2010, 2016b; Torres-Pérez et al., 2017). Su alto potencial proliferativo convierte, entonces, a estos peces en buenos modelos para el estudio de la proliferación neural y neurogénesis posnatal.

A su vez, estos peces se presentan como interesantes modelos para el estudio del sistema visual y su plasticidad adaptativa. Una característica conspicua de este género es el marcado dimorfismo sexual corporal. Las hembras presentan una apariencia críptica, mientras que los machos presentan un patrón de coloración y bandeo colorido especie-específico (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, Tassino, et al., 2013; Passos, Reyes, et al., 2013; Passos et al., 2015, 2021), sugieren que las claves visuales son de gran importancia con un rol central en el reconocimiento, y por lo tanto, en la reproducción.

El hábitat de estos peces presenta grandes variaciones temporales en distintos parámetros ecológicos, particularmente en la turbidez del agua y por lo tanto en la intensidad lumínica. 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. En este contexto, es probable que la importancia de las diferentes modalidades sensoriales cambie a lo largo de la estación en función de las condiciones del ambiente, llevando a la necesidad de estos organismos a presentar adaptaciones plásticas en sus estructuras sensoriales (Berrostequieta et al., 2019; Passos et al., 2014).

Previamente, nuestro grupo de trabajo ha descrito tres regiones neurogénicas en el bulbo olfatorio, estructura encefálica encargada del procesamiento de la información olfativa, de peces *A. charrua*. En ese trabajo se describe la composición celular, rutas migratorias y tasas proliferativas de los tres nichos neurogénicos de esta estructura. A su vez, esos resultados sugieren la existencia de nichos neurogénicos diferentes entre sí, que son capaces de responder de forma diferencial a los requerimientos funcionales particulares, permitiendo la actividad sensorial y crecimiento del bulbo olfatorio (Rosillo et al., 2016b)

Recientemente hemos descrito que en *A. reicherti* la exposición por períodos prolongados a la oscuridad, genera una diferencia en la proliferación de estructuras sensitivas asociadas al procesamiento de la visión (retina, TO y torus longitudinalis (TL)) y olfacción (BO) respecto a aquellos criados en condiciones de luz natural. Se evidenció que aquellos peces criados en condiciones de oscuridad constante tenían mayor proliferación celular en áreas de procesamiento olfativo y una menor proliferación en áreas de procesamiento visual, respecto a aquellos criados en condiciones de luz natural. A su vez, esta proliferación estaría directamente relacionada con el desempeño de ambos sentidos, generando que los peces criados en oscuridad fueran mejores utilizando el sentido de la olfacción que aquellos criados en luz, mientras que los peces criados en luz fueron mejores utilizando la visión que aquellos criados en oscuridad (Berrostequieta, 2021).

Peces anuales *Austrolebias* como modelo de estudio de proliferación neural de la retina

Austrolebias charrua, también presenta características que lo convierten en un modelo atractivo para estudiar adaptaciones a los cambios en la luminosidad. Nuestro grupo de trabajo previamente ha descrito la organización histológica de la retina de esta especie, que refleja adaptaciones que evidencian que esta características propias como resultado de su hábitat cambiante y extremo (Berrostequieta et al., 2018). La retina de *A. charrua* presenta una citoarquitectura correspondiente a la del resto de vertebrados. A su vez, los grosores y la composición celular de las capas mostraron características propias de peces diurnos macrópticos, similares a las de peces cebra. A su vez, algunas de las características de la distribución de las células ganglionares y conos y bastones podrían corresponderse con características propias de peces de hábitos nocturnos. Adicionalmente, el análisis de la distribución de los melanosomas, también arrojó interesantes resultados al respecto. Otros autores han descrito que la distribución de los melanosomas de las células pigmentarias de la retina difiere según los niveles de luminosidad del hábitat: especies adaptadas a la luz presentan una distribución de melanosomas a lo largo de los segmentos externos de los fotorreceptores (SF), mientras que las adaptadas a la oscuridad poseen una distribución más restringida a la zona perinuclear de las células del epitelio pigmentario (Marc, 1998). En *A. charrua* se observó que la distribución de los melanosomas se extiende tanto a lo largo de los SF, como a nivel perinuclear de las células del epitelio pigmentario. Esto podría indicar un estado intermedio, una adaptación de individuos que a lo largo de su vida están expuestos a condiciones de luz y oscuridad (Berrostequieta et al., 2018).

Más recientemente, hemos descrito la presencia de células madre/progenitoras en la ZMC mediante la aplicación de pulsos de dos marcadores de proliferación a diferentes tiempos, sumado a un análisis de la organización ultraestructural y expresión molecular de marcadores de células progenitoras Sox2, Pax6 y BLBP. Este análisis ha permitido identificar diferentes poblaciones de progenitores en este

nicho. A su vez estos experimentos fueron realizados en condiciones de ciclo de luz natural y en animales mantenidos en condiciones de oscuridad permanente durante 30 días. Se observó que el número de células proliferativas de todas las capas de la retina aumentó significativamente en las condiciones de oscuridad respecto a la condición de luz. Llamativamente, el número de células identificadas como células madre no mostró diferencias, indicando que existe un pool estable de células madre en la ZMC de la retina de los peces anuales *A. charrua* que podría encargarse del crecimiento de la retina. En este trabajo, postulamos que las diferencias en la proliferación observadas podría deberse a la división de progenitores retinianos fuera de la ZMC, posiblemente glías de Müller, que jugarían un rol crucial en la producción de fotorreceptores del tipo bastón y elementos celulares que componen sus circuitos, que permiten la adaptación a condiciones de luminosidad reducida (Berrosteguieta et al., 2022).

1.7 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los antecedentes antes expuestos, demuestran que los peces anuales constituyen modelos muy poderosos para el estudio de los fenómenos proliferativos que constituyen la base de la plasticidad adaptativa, siendo la retina un modelo adecuado para comprender cómo los nichos neurogénicos pueden responder a diferentes propósitos funcionales.

Considerando el importante rol de la visión para el éxito reproductivo y forrajeo de estos peces reflejado en sus conductas, la citoarquitectura particular de la retina, y las condiciones extremas a las que estos peces se ven sometidos, cabe esperar que las estructuras nerviosas relacionadas con la modalidad visual, y en particular la retina, posean importantes adaptaciones que permitan responder de forma plástica a cambios en su ambiente lumínico.

A su vez, nuestros antecedentes mostraron que los peces anuales poseen una marcada proliferación en la ZMC y la retina neural adyacente y que existe una población de células madre/progenitores en la retina madura con la capacidad de responder con cambios en la actividad proliferativa, al servicio de la producción de los fotorreceptores bastones y células que conforman los circuitos retinianos como forma de adaptación a la disminución de la luminosidad de los charcos temporales. Existen escasas evidencias similares en la literatura que muestren una respuesta de este tipo y magnitud frente a cambios en la luminosidad del ambiente. Como se ha expuesto anteriormente, en pez cebra Lahne et al. (2019) han demostrado un aumento de la proliferación en la capa retinal donde se ubican los fotorreceptores frente a condiciones de oscuridad en tiempos cortos, pero, llamativamente, no observaron diferencias en la proliferación de la CNI donde se ubican las glías de Müller. No obstante, no se ha reportado en este artículo el análisis de la ZMC. Por otro lado, nuestros hallazgos indican una mayor proliferación en todas las capas de la retina en condiciones de oscuridad constante (Berrosteguieta et al., 2022). Sin embargo, no se ha realizado un análisis diferencial para cada capa de la retina y la ZMC, ni conocemos todavía qué sucede en la retina de peces *Austrolebias* frente a periodos acotados de oscuridad.

La presente tesis es una continuación del trabajo de nuestro grupo de investigación referente a la estructura y proliferación de la retina y su plasticidad y adaptabilidad frente al cambio de parámetros lumínicos. que reflejen los desafíos ambientales que el hábitat determina sobre esta especie. A lo largo de esta tesis, se pretenderá mostrar cómo la proliferación celular en la retina de individuos adultos es capaz de responder rápidamente frente a un cambio ambiental extremo, aportando además

información sobre la proliferación celular en las diferentes capas y regiones de la retina, los cambios citoarquitectónicos relacionados, y el posible rol de las glías de Müller en este proceso.

HIPÓTESIS GENERAL

La variabilidad de los factores ambientales a los que se exponen los peces del género *Austrolebias*, constituye un desafío que los ha llevado a desarrollar diferentes estrategias adaptativas, entre las que se encuentran la plasticidad del sistema nervioso en los adultos. Los cambios drásticos en las condiciones lumínicas dado por el aumento de la turbidez del agua hacen de las *Austrolebias* un excelente modelo para estudiar la plasticidad en la retina. Estos antecedentes llevan a postular que **el sistema nervioso de peces anuales sería capaz de responder rápida y plásticamente frente a cambios en el entorno. La capacidad proliferativa del sistema visual, en particular de la retina, sería capaz de responder a cambios lumínicos activando procesos de generación de nuevos fotorreceptores a través de la activación de células progenitoras que también darían origen a células que integran los circuitos asociados.**

Hipótesis específicas:

Estudios previos de nuestro grupo mostraron que la exposición a oscuridad permanente durante 30 días aumenta la proliferación en todas las capas de la retina de *A. charrua*. **En esta tesis se propone que el aumento de la proliferación celular puede ocurrir en periodos más cortos de tiempo de exposición a la oscuridad.**

En periodos de 30 días de oscuridad, hemos detectado un aumento en la población de fotorreceptores de tipo bastón (visión escotópica). **En este trabajo, postulamos que existe una población progenitora ubicada en la capa nuclear externa de la retina madura.**

Es de esperar, que exista a su vez un aumento de la proliferación celular en la CNI en condiciones de oscuridad. Esta podría encontrarse relacionada con la activación de la glía de Müller, como candidata a progenitora de bastones y de nuevas neuronas que integren los circuitos retinianos asociados a los nuevos fotorreceptores.

Dado que el soma de la glía de Müller se localiza en la CNI, es de suponer que el aumento de la proliferación en la oscuridad ocurra diferencialmente en las distintas capas de la retina.

Objetivo general

Evaluar la distribución, identidad y cambios en la proliferación y las características de los progenitores retinianos de la retina madura y zona marginal ciliar de ejemplares macho de *A. charrua*, comparando ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad permanente durante periodos cortos respecto a condiciones de ciclo de luz natural, con el fin de evidenciar plasticidad adaptativa.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Describir mediante microscopía electrónica de transmisión y técnicas histológicas clásicas las características citoarquitectónicas de la capa nuclear externa de la retina de *A. charrua* en condiciones de ciclo de luz natural.

Objetivo 2: Determinar si existen variaciones en la citoarquitectura de las retinas de ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad permanente.

Objetivo 3: Identificar mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión células progenitoras y precursoras neurales en la retina de *A. charrua*.

Objetivo 4: Detectar las células proliferantes de la ZMC y retina central de *A. charrua* mediante el uso de un pulso de BrdU con una sobrevida de 7 días y su revelado mediante inmunofluorescencia en grupos mantenidos en condiciones de luz natural y oscuridad permanente.

Objetivo 5: Cuantificar y comparar la proliferación celular de la retina en las diferentes capas de la retina entre grupos mantenidos en condiciones de ciclo de luz natural y oscuridad permanente

Objetivo 6: Determinar la presencia y distribución de las glías de Müller, a través del inmunomarcado de BLBP en condiciones de oscuridad permanente y ciclo de luz natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RECOLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE PECES ANUALES

La colecta de campo y mantenimiento de los ejemplares de *A. charrua* se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Papa et al (2015). Brevemente, estos peces fueron recolectados en el campo a fines octubre del charco anual “El Podrido”, ubicado en la entrada principal de La Coronilla, Rocha, Uruguay (33°53'46.8"S, 53°30'56.1"W). Los animales fueron capturados mediante el uso de calderines golpeando el fondo barroso, transportados al bioterio del Instituto Clemente Estable y acondicionados gradualmente para mantenerlos en condiciones de laboratorio (temperatura de 19°C, conductividad del agua de 300±50µS y alimentación diaria con *Daphnia sp.* y gusanos *Tubifex sp.*).

Todos los procedimientos se realizaron utilizando como guía los métodos planteados por Fernández, et al. (2011) y Berrosteguieta, et al. (2022) y se encuentran aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE (número de registro 004/05/2012).

2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Los ejemplares macho de *A. charrua* capturados en el campo fueron divididos al azar en dos condiciones experimentales (Fig. 5):

Grupo luz

Estos ejemplares fueron mantenidos en condiciones de ciclo de luz natural (aproximadamente 14h de luz y 10h de oscuridad) durante un total de 11 días en peceras individuales. Luego de los primeros 4 días, se realizó una inyección intraperitoneal de BrdU. Pasados los 7 días de sobrevida, se procedió a anestésiar a los especímenes y a la fijación de los mismos por perfusión intracardíaca.

Grupo oscuridad

Los ejemplares de este grupo fueron mantenidos en condiciones de oscuridad durante un total de 11 días en peceras individuales de acuerdo a Berrosteguieta et al. (2022). Para esto, las peceras fueron forradas con plástico negro para evitar el pasaje de la luz. Bajo estas condiciones, el pasaje de luz es reducido en gran medida, creando un ambiente de luminosidad menor (~480 lux en la condición del grupo de luz y ~40 lux en condición de oscuridad, medido a las 12 p.m.). Luego de los primeros 4 días, se realizó una inyección intraperitoneal del marcador de proliferación celular BrdU. Pasados los 7 días de sobrevida, se procedió a anestésiar a los especímenes y a la fijación por perfusión intracardíaca.

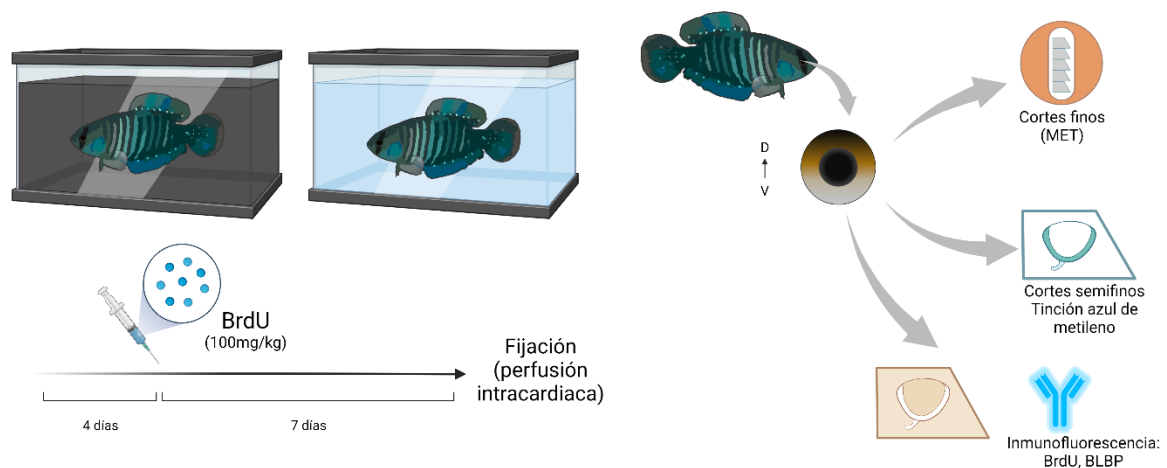


Fig. 5: Esquema de la estrategia experimental utilizada en este trabajo.

2.3 INYECCIÓN DE BRDU

Como aproximación para la determinación de células proliferantes en la retina de *A. charrua* se utilizó un pulso de 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y su posterior detección a través de la técnica inmunohistoquímica. Para esto, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis única (100 mg/kg de peso corporal) de BrdU (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) disuelto en solución salina 0.9% de cloruro de sodio.

2.4 FIJACIÓN POR PERFUSIÓN INTRACARDIACA Y DISECCIÓN DE LOS GLOBOS OCULARES

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

Luego de la perfusión los peces fueron medidos en su longitud total (desde el extremo rostral de la cabeza hasta el extremo posterior de la aleta caudal). Los globos oculares fueron disecados, mantenidos por 24hs en una solución fijadora de PFA 10% a 4°C y luego transferidos a PB por una noche para eliminar el exceso de fijador.

2.5 OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS

Para la obtención de secciones histológicas se utilizó un encastre en bloques de gelatina-albúmina 1:2 (1,5 y 45 % respectivamente), disueltas en solución salina. De este modo, los globos oculares encastrados fueron cortados en vibrátomo (Vibrátomo S100, Leica Buffalo Grone, IL, USA) de forma

sagital y seriada con un grosor de 70 μm . Los bloques fueron tallados de forma de mantener la orientación del globo ocular y determinar la orientación en el eje dorso-ventral.

2.6 INMUNODETECCIÓN

Los cortes destinados a inmunofluorescencia para la visualización del BrdU incorporado fueron incubados por 45 min con HCl 2N y Tritón X-100 0,3% disuelto en PB. A continuación, se realizaron tres lavados con PB (10 minutos cada uno con agitación, a temperatura ambiente) y se incubaron los cortes con anticuerpos primarios por 48hs a 4°C. Los cortes de cada globo ocular fueron incubados con BrdU y combinado con anticuerpos anti-BLBP (Tabla 1). A continuación, se hicieron otros tres lavados con PB y los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes: los cortes fueron incubados con anticuerpos secundarios anti-rata biotinilados en PBT durante 1h, luego los cortes fueron lavados nuevamente 3 veces en PB y finalmente incubados con streptavidina conjugada a FITC 1:500 y anticuerpos secundarios anti-conejo Alexa Fluor 546 (Tabla 1).

Tabla 1: Anticuerpos primarios y secundarios con sus respectivas diluciones para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Marca, Código, especie, tipo	Dilución
Anticuerpos primarios		
Anti-BrdU	Accurate Chemical and Scientific Corporation, Cat #OBT0030, rata, monoclonal	1:500
Anti-BrdU	Hybridoma Bank, Cat #G3G4, ratón, monoclonal	1:80
Anti-BLBP	Abcam, Cat # ab32423, conejo, policlonal	1:500
Anticuerpos secundarios		
Burro Anti-Rata (biotinilado)	Jackson	1:500
Cabra Anti-Ratón	Abcam, Conjugado a HRP	1:300
Cabra Anti-Ratón	Abcam, Alexa Fluor 488	1:1000

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

Los cortes de inmunofluorescencia fueron visualizados y fotografiados mediante un microscopio confocal Zeiss LSM 800.

El revelado de BrdU por HRP fue efectuado de acuerdo a la metodología utilizada en Fernández et al. (2011).

Controles

Durante la puesta a punto de la técnica de reconocimiento de BrdU se utilizaron como controles positivos secciones histológicas de intestino de pez (que presenta gran proliferación celular). En otros casos, se incubaron simultáneamente cortes de retina 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.

2.7 CUANTIFICACIÓN DE NÚCLEOS MARCADOS CON BRDU

Para cuantificar los núcleos BrdU+ se fotografiaron regiones análogas para cada ejemplar utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Como criterio para la elección de los cortes se seleccionaron hasta seis secciones mediales del ojo, utilizando como referencia anatómica la salida del nervio óptico. Se fotografiaron los cortes más cercanos al mismo, descartando los extremos donde la configuración de la zona marginal ciliar y las capas nucleares de la retina no se apreciaba claramente dado el plano de corte.

Cada sección seleccionada fue recorrida en su totalidad. En áreas donde se observaron núcleos BrdU+, se realizó un apilado de imágenes confocales de 24 μm del espesor total, tomando imágenes cada 2 μm . Asimismo, se tomaron imágenes de epifluorescencia del marcador nuclear DAPI a un aumento panorámico para la ubicación en el plano de las imágenes confocales.

Los núcleos BrdU+ fueron cuantificados y numerados manualmente utilizando el programa ZEN Blue (Blue Edition, Versión 2.5, Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2018) y clasificados en las siguientes categorías según su ubicación en la retina: ZMC, CNE, CNI y CCG. Para evitar superposición de núcleos y, por lo tanto, su sobreestimación, las imágenes confocales fueron orientadas espacialmente utilizando la herramienta Zen Connect del programa ZEN Blue sobre las imágenes de fluorescencia, eliminando así núcleos que ya habían sido contados (Fig. 6).

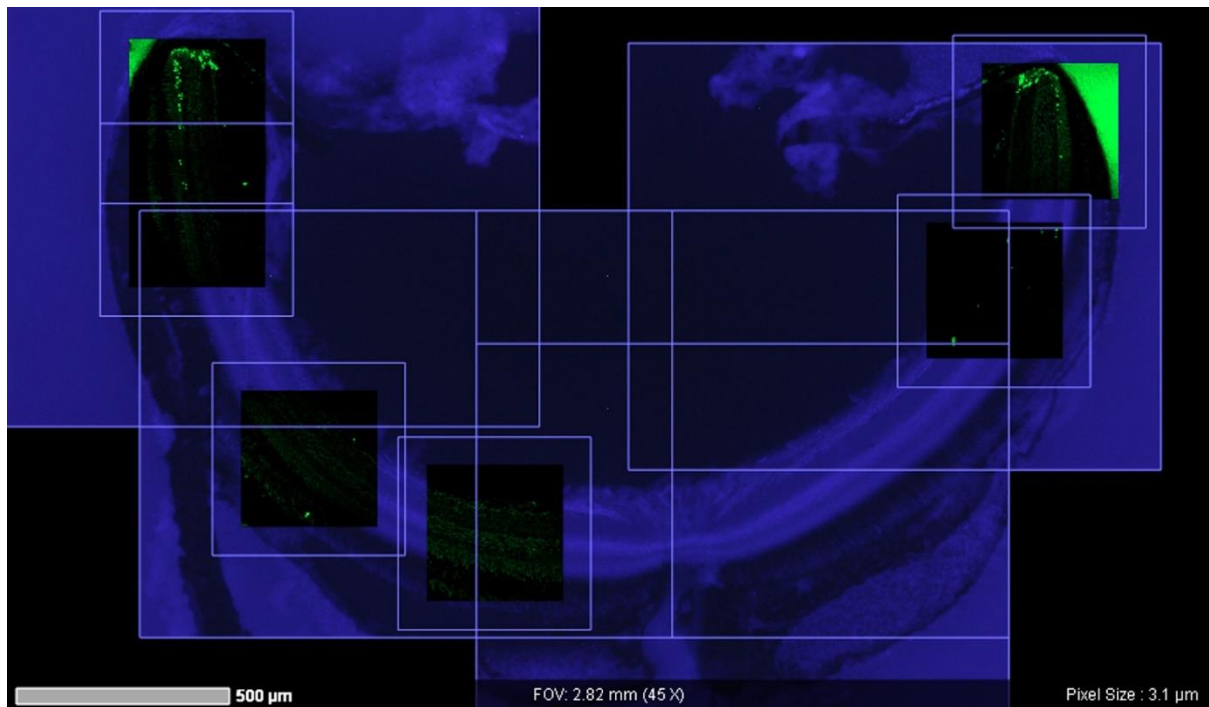


Fig. 6: Captura de pantalla de la aplicación Zen Connect del software ZEN Blue (Carl Zeiss Microscopy). Se muestra la reconstrucción en el plano de los apilados de imágenes confocales con núcleos BrdU+ (verde) sobre imágenes panorámicas obtenida mediante epifluorescencia para el marcador nuclear DAPI (azul). FOV: field of view.

Utilizando esta herramienta, se dividieron los núcleos en tres zonas según su ubicación a lo largo de la retina: zona dorsal, zona central y zona ventral. Las zonas ventrales y dorsales fueron definidas como la porción de la retina que se encontrara entre la ZMC y hasta 400μm). El resto del tejido de la retina que se encuentra entre estas porciones fue definido como la zona central. Con este criterio, se determinó la posición de los núcleos y separados para su análisis en las tres zonas mencionadas.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE PROLIFERACIÓN

Los datos obtenidos de la cuantificación de núcleos BrdU+ fueron analizados utilizando el programa de libre acceso PAST (V4.10) (Hammer et al., 2001) y GraphPad Prism (V8.0) (GraphPad Software, San Diego, California USA).

El análisis descriptivo de la muestra se realizó obteniendo la tabla de estadísticos descriptivos. El análisis de los datos atípicos se realizó aplicando los test de Dixon y Grubb. En todos los casos, los límites de las cajas en los gráficos de cajas (*box plots*) indican los percentiles 25 y 75, mientras que los bigotes corresponden a los valores mínimos y máximos, excepto en las Fig. 33 y 35 donde se utiliza el criterio de Tukey.

Para la comparación entre grupos, en cada caso, se comprobaron los supuestos de Normalidad y homogeneidad de varianza para determinar el tipo de test estadístico a utilizar. La Normalidad de los datos fue probada utilizando el test estadístico de Lilliefors y la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. De acuerdo a estos resultados, se procedió a utilizar el test t de Student o Mann-Whitney para la comparación entre muestras. El test de Mann-Whitney fue preferido para la comparación de los datos por ejemplar, dado el pequeño tamaño de la muestra, así como en los casos en donde no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza.

A su vez, de forma complementaria y para tener un indicador estandarizado de la magnitud del efecto observado, se ha calculado el tamaño de los efectos mediante el coeficiente de r de Pearson para los test de comparación de medias (t Student) y rangos (Mann-Whitney) (Field, 2005). Los mismos fueron clasificados por el siguiente criterio: $r=0.10$ constituye un pequeño efecto, $r=0.30$ efecto mediano y $r=0.50$ efecto grande. Para los test de Mann-Whitney, el tamaño del efecto r fue calculado de la siguiente forma (Field, 2005):

$$r = \frac{z}{\sqrt{N}}$$

siendo z el valor del z-score brindado por los programas estadísticos, y N el número total de observaciones. Para el caso del test de t el coeficiente de Pearson r fue calculado de la siguiente forma (Field, 2005):

$$r = \sqrt{\frac{t^2}{t^2 - df}}$$

siendo t el valor del estadístico del t-test y df los grados de libertad.

El análisis de correlación y regresión funcional fue efectuado mediante el software PAST. Teniendo en cuenta que se trata de variables bivariantes, para el análisis de regresión funcional se utilizó un modelo de eje mayor reducido (RMA). La validación de la correlación, fue considerada por el estadístico de t para determinar la existencia de un valor del coeficiente de Pearson significativo, es decir, $H_0: \rho = 0$ (Zar, 2014). La validación de la regresión funcional se realizó también mediante test de t para determinar si la pendiente de la recta obtenida, así como el coeficiente de correlación de Pearson fueron significativamente diferentes de 0. A su vez, el modelo fue validado cuando los errores presentaron distribuciones Normales determinada mediante test de Lilliefors.

2.9 CUANTIFICACIÓN DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA PARA BLBP

Con el mismo criterio anatómico utilizado para la selección de cortes para cuantificación de BrdU, se tomaron fotografías confocales de las zonas marginales ciliares dorsales y ventrales de una sección por cada ejemplar para ambas condiciones (tomando fotografías de secciones entre aproximadamente 400 y 600 μ m), utilizando en todos los casos la misma configuración del microscopio. Las mismas fueron seleccionadas observando un corte considerado como control negativo (incubación con anticuerpos primarios, pero no secundarios).

La intensidad de fluorescencia de la zona adyacente a la ZMC (entre 250 y 400 μ m) fue delineada para generar una región de interés (Fig. 7) en el software FIJI (Schindelin et al., 2012), para la cual se obtuvieron los valores de intensidad de fluorescencia promedio. Los mismos fueron promediados por ejemplar y comparados mediante test de Mann-Whitney.



Fig. 7: Fotografía confocal de la zona marginal ciliar y retina adyacente marcada con anticuerpos anti-BLBP. Se representa la región de interés empleada para la cuantificación de intensidad de fluorescencia promedio.
Barra de calibración: 20 μm

A su vez, las fotografías fueron ensambladas utilizando los plugins MosaicJ (Thévenaz & Unser, 2007) y Stitching (Preibisch et al., 2009) del software FIJI para generar imágenes de mayor distancia desde la ZMC. A partir de estas imágenes, se trazó una línea como región de interés, a través de la zona basal de la CNI donde se observó la mayor parte de los somas de las glías de Müller BLBP+ (Fig. 8). A partir de esta se obtuvo el perfil de intensidades de fluorescencia en función de la distancia en cada imagen con la herramienta *Plot profiles* del software FIJI.

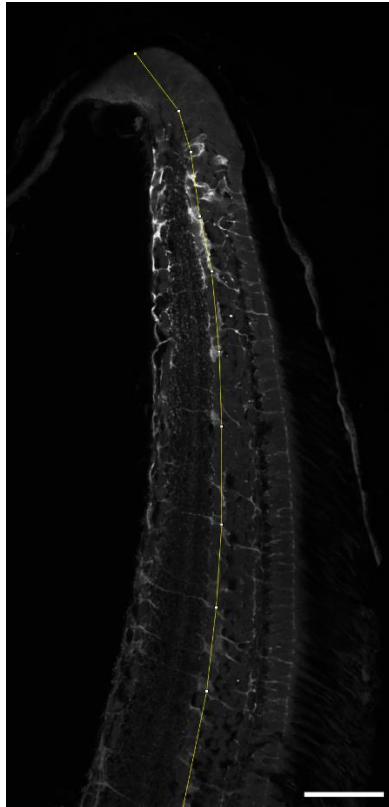


Fig. 8: Fotografía confocal de la zona marginal ciliar y retina adyacente marcada con anticuerpos anti-BLBP. Se representa la región de interés trazada a través de la capa nuclear interna para la cuantificación de intensidad de fluorescencia en función de la distancia. Barra de calibración: 50 μ m

Los datos fueron ingresados en el software GraphPad Prism. Los datos fueron agrupados por condición. Se aplicó la herramienta *prune rows* para generar un dato promedio 20 μ m cada aproximadamente. Estos datos fueron luego analizados mediante un test de t múltiple para determinar si existieron diferencias entre condiciones en cada punto.

2.10 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Fijación, disección y obtención de bloques

La fijación de los ejemplares (n=5 de cada grupo) destinados a procesamiento para microscopía electrónica de transmisión (MET) y obtención de cortes semifinos se realizó por perfusión intracardíaca de acuerdo a la metodología antes descrita, utilizando una solución fijadora compuesta por PFA 4% y glutaraldehído 2,5% para los ejemplares destinados a MET y PFA 10% en PB para aquellos destinados únicamente a obtención de secciones semifinas.

Los globos oculares fueron disecados inmediatamente, mantenidos en la solución fijadora durante 2h a 4°C y lavados 3 veces durante 10 min con PB para eliminar el exceso de fijador.

Uno de los globos oculares de cada ejemplar fue cortado en dos para asegurar la correcta penetración de las soluciones utilizadas posteriormente en el procesamiento. El otro ojo fue seccionado mediante vibrátomo como antes se mencionó y cortados sagitalmente con un grosor de 200 μ m. Los cortes fueron expuestos al revelado de BrdU siguiendo el mismo protocolo desarrollado anteriormente, pero utilizando anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano, cuyo precipitado marrón se

visualiza al microscopio de luz y que luego del procesamiento puede ser visualizado también en microscopio electrónico.

Los cortes revelados por peroxidasa y las mitades de los globos oculares fueron posfijados con tetróxido de osmio 1% en PB durante 1:30 h a temperatura ambiente, en oscuridad y bajo campana de extracción de gases. Posteriormente, se lavaron 3 veces por 10 min con PB, se deshidrataron en alcohol de graduación creciente y acetona. Luego, fueron incubados en concentraciones crecientes de resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA). El material fue orientado en cápsulas Beem (Electron Microscopy Sciences) y completado con Araldita 100% para formar bloques, que fueron polimerizados durante 48 h en estufa a 60°C.

2.11 OBTENCIÓN DE CORTES SEMIFINOS Y FINOS EN ULTRAMICRÓTOMO

Mediante el uso del Ultramicrotomo (RMC-Power Tome XL) se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor utilizando cuchillas de vidrio. Estos fueron teñidos con azul de metileno borácico 1% durante 30s y lavados con agua bidestilada. Estos cortes se observaron con el microscopio de luz para obtener datos relacionados con la calidad de la fijación, localización de las áreas de interés y análisis citoarquitectónico de los diferentes grupos experimentales.

Los bloques fueron retallados para obtener cortes finos entre 60 y 80 nm que se colectaron con rejillas de cobre de ranura (2x1 mm), previamente recubiertas con membranas de soporte de Polivinilformvar (Solución de Formvar al 0.3% diluido en Cloroformo). Una vez adheridas a la membrana, para aumentar la densidad electrónica del tejido, las secciones se contrastaron por flotación con una solución acuosa saturada de acetato de uranilo al 2% (a 4°C durante toda la noche) y luego en Citrato de Plomo al 3% (10 min en Atmósfera de Hidróxido de Sodio).

La observación de los cortes se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 1010) operando a 80 kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95. Las imágenes obtenidas se transfirieron a la computadora y fueron analizadas mediante el programa Photoimpact de libre acceso.

A vertical strip on the left side of the page shows a microscopic image of retinal tissue, likely a histological section stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image displays various cellular structures, including what appears to be the outer plexiform layer with its characteristic plexiform arrangement of synapses, and the inner plexiform layer. The overall color palette is dominated by shades of blue and white, with some brownish structures visible.

CAPÍTULO 1

Análisis de la citoarquitectura de la retina

CAPÍTULO 1: ANÁLISIS DE LA CITOARQUITECTURA DE LA RETINA

RESULTADOS

Para abordar los objetivos 1 a 3, se obtuvieron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de metileno borácico y cortes finos para microscopía electrónica de transmisión, a modo de observar citoarquitectura de la retina en ambas condiciones y determinar si existieron diferencias entre condiciones.

La tinción con azul de metileno permitió visualizar la estructura de las diferentes capas de la retina e identificar la morfología de algunos componentes celulares tanto a nivel de la retina como de la zona marginal ciliar. Mediante esta técnica, se observó la presencia de las tres zonas descritas de la ZMC: Periférica (ZMC-P), medial (ZMC-M) y central (ZMC-C) (Fig. 9). En la ZMC-P, los núcleos presentaron una morfología alargada y presentaron tamaños mayores que en las otras dos secciones de la ZMC. Los núcleos de la ZMC-M, presentaron morfologías también alargadas y se tiñeron más intensamente con el colorante. La ZMC-C presentó núcleos de forma redondeada o fusiforme con tamaños y ubicaciones similares a las de la retina neural adyacente. Estos núcleos también se tiñeron de forma intensa con el colorante azul de metileno.

Se observó presencia de figuras mitóticas, principalmente en las áreas central y medial de la zona marginal ciliar, adyacentes al epitelio pigmentario (Fig. 9C).

En algunos ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad, se observó la presencia de un cúmulo de células en la capa plexiforme interna, que se extendía entre la CNI y CCG. Dentro de este cúmulo se observó la presencia de figuras mitóticas en la capa plexiforme interna (Fig. 9A,B). Esto se presentó de forma simétrica, es decir, que este fenómeno fue observado tanto en la zona cercana a la ZMC dorsal como ventral en el mismo corte. Estos cúmulos no fueron observados en los ejemplares pertenecientes a las condiciones de luz estándar.

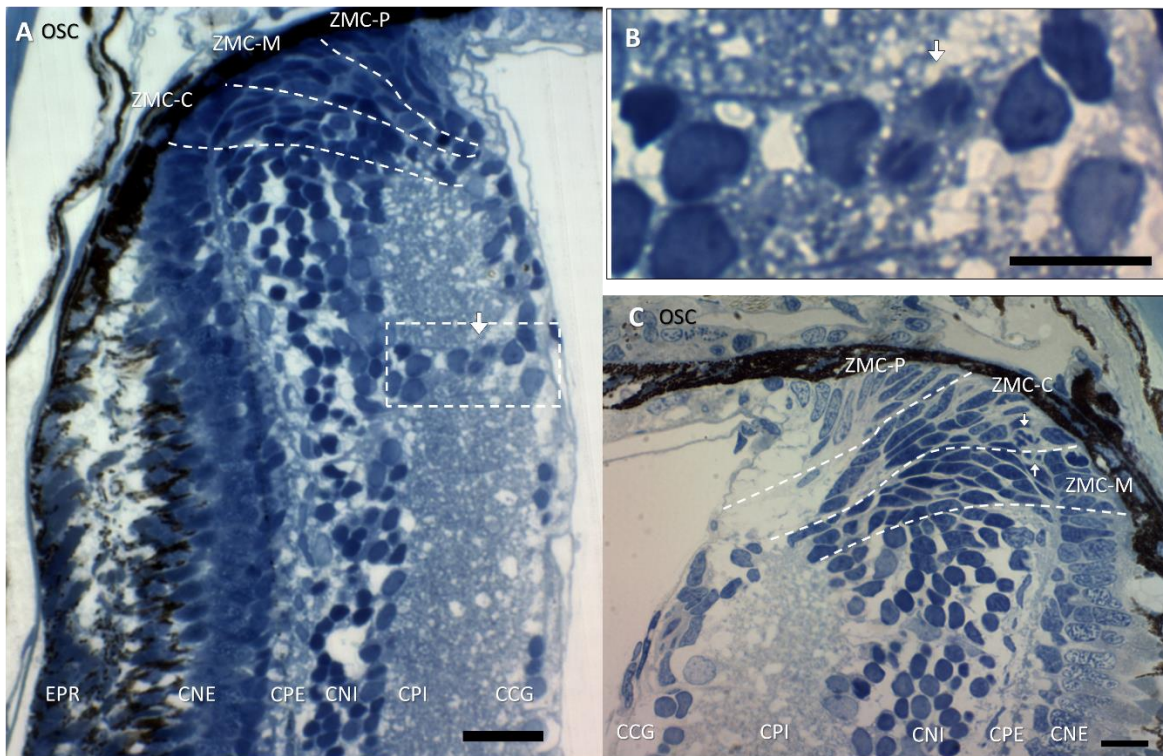


Fig. 9: Cortes semifinos ($1\mu\text{m}$ de espesor) de la zona marginal ciliar y retina neural adyacente (A, C) de ejemplares expuestos a condiciones de oscuridad teñidos con azul de metileno borácico. Se indican los tres compartimientos de la ZMC de acuerdo a la morfología y ubicación celular. En la figura A se indica con un recuadro la zona magnificada en B. Con flechas blancas se indica la presencia de mitosis. CCG: Capa de células ganglionares, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPE: Capa plexiforme externa, CPI: Capa plexiforme interna, ZMC-P: Zona marginal ciliar periférica, ZMC-M: Zona marginal ciliar medial, ZMC-C: Zona marginal ciliar central. Barra de calibración: A) $20\mu\text{m}$, B,C) $10\mu\text{m}$.

Por otro lado, sobre todo en los ejemplares de condiciones de oscuridad, se observaron células con prolongaciones que atravesaban la capa plexiforme interna desde la CNI, contactando con la CCG (B).

En la CNE, esta tinción permitió observar los dos tipos de fotorreceptores: conos y bastones. Se clasificó como conos a aquellos núcleos con un núcleo claro, circular y ovalado, con cúmulos de cromatina teñida, ubicados en la zona apical de la CNE inmediatamente por debajo o atravesando la membrana limitante externa, con un segmento inicial oscuro y un segmento externo triangular que se inserta en el epitelio pigmentario de la retina. Por otro lado, los bastones fueron identificados como aquellas células ubicadas en la zona basal de la CNE, con núcleos más pequeños redondeados y más oscuros que el de los conos, con un segmento interno y externo de ancho constante y menor que el de los conos. En general, se observaron una o dos capas de conos, y una o dos capas de bastones en la CNE, ocasionalmente hasta 3 o 4 (Fig. 10C).

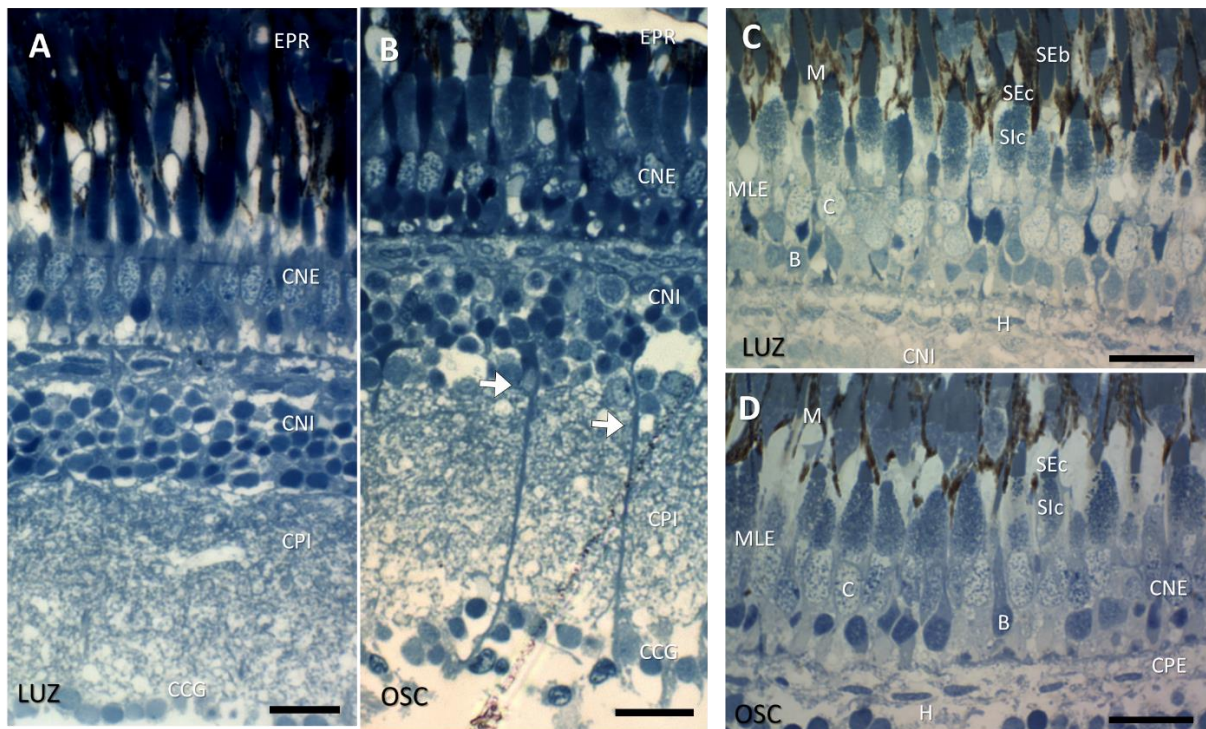


Fig. 10: Cortes semifinos (1µm de espesor) de la retina neural central de ejemplares de condición de luz estándar (LUZ) (A,C) y oscuridad permanente (OSC) (B,D) teñidos con azul de metileno boráxico. Se indican las capas nucleares de la retina de acuerdo a la morfología y ubicación celular. B) con flechas se indican células que emiten prolongaciones que atraviesan la CPI, posiblemente correspondiendo a glías de Müller. B: Bastón, CCG: Capa de células ganglionares, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, C: Cono, CPE: Capa plexiforme externa, CPI: Capa plexiforme interna, EPR: Epitelio pigmentario de la retina, H: neurona horizontal, M: Melanosomas del EPR, MLE: Membrana limitante externa, SEb: Segmento externo de bastones, SEc: Segmento externo de conos, Slc: Segmento interno de conos. Barra de calibración: 20 µm

Por otro lado, el análisis de las micrografías obtenidas por MET, permitió analizar más finamente la composición de la CNE. Se observaron acumulaciones de pigmentos que se extendieron a partir del epitelio pigmentario de la retina hasta el segmento interno de los fotorreceptores (Fig. 11, Fig. 12C).

Se observaron también entre una y tres capas de núcleos redondeados u ovalados con acúmulos electrondensos de cromatina, que fueron identificados como pertenecientes a fotorreceptores del tipo cono. Estos se ubicaron en las zonas más apicales de la CNE, inmediatamente por debajo o atravesando la membrana imitante externa. Estas células presentaron citoplasmas electronlúcidos, con acúmulos de mitocondrias de gran tamaño en su segmento interno ensanchado, así como segmentos externos electrondensos más angostos en la región del epitelio pigmentario de la retina (Fig. 11, Fig. 12B). Estas células presentaron a su vez ensanchamientos ubicados hacia la capa plexiforme externa, consistentes con los pedículos sinápticos con múltiples cintas sinápticas (Fig. 12A,B).

Además, se identificaron como bastones a aquellas células con núcleos de menor tamaño que los de los conos, con núcleos y citoplasmas homogéneamente electrondensos en la zona basal de la CNE, que muestran segmentos más angostos hacia el epitelio pigmentario (Fig. 11, Fig. 12C). Estos presentaron terminales sinápticas más pequeñas y electrondensas que las observadas para conos, con una única cinta sináptica, consistente con la morfología de las esférulas descritas para bastones (Fig. 12A,B).

Nótese, que se observaron además núcleos que aparentan encontrarse en etapas de condensación de cromatina para formar una figura mitótica (Fig. 11).

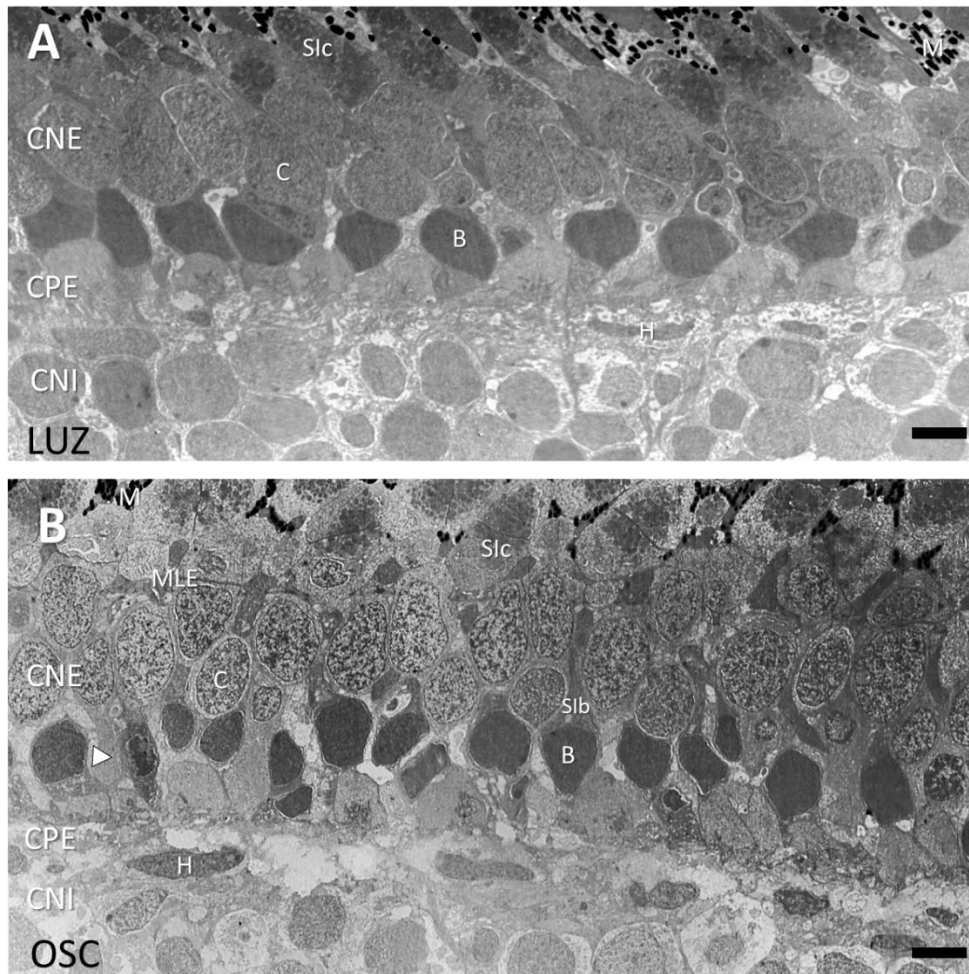


Fig. 11: Micrografía electrónica de transmisión de la CNE de la retina de un ejemplar mantenido en condiciones de luz estándar (A) y en oscuridad permanente (B). La cabeza de flecha indica una figura mitótica. B: Bastón, Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, C: Cono, CPE: Capa plexiforme externa, H: neurona horizontal, M: Melanosomas del epitelio pigmentario de la retina, MLE: Membrana limitante externa, Slb: Segmentos internos de bastones, Slc: Segmentos internos de conos. Barra de calibración: 5 μ m.

Además de estos dos tipos de núcleos correspondientes a los fotorreceptores, se observaron otros núcleos de características diferentes. Estos fueron de tamaños variables y se ubicaron en general entre los núcleos de conos y bastones, presentaron morfologías irregulares y escaso citoplasma a su alrededor. Sus núcleos tuvieron una apariencia electronlúcida, con acúmulos electrondensos de cromatina condensada, de mayor tamaño que aquellos observados en conos. Los mismos se encontraron espaciados a lo largo de la CNE. A su vez, se observó la presencia de núcleos BrdU+ en zonas de la CNE a la misma altura que el tercer tipo de núcleos antes mencionado. Observaciones preliminares cualitativas parecen mostrar mayor densidad de estos núcleos en la CNE de ejemplares de oscuridad (Fig. 13)

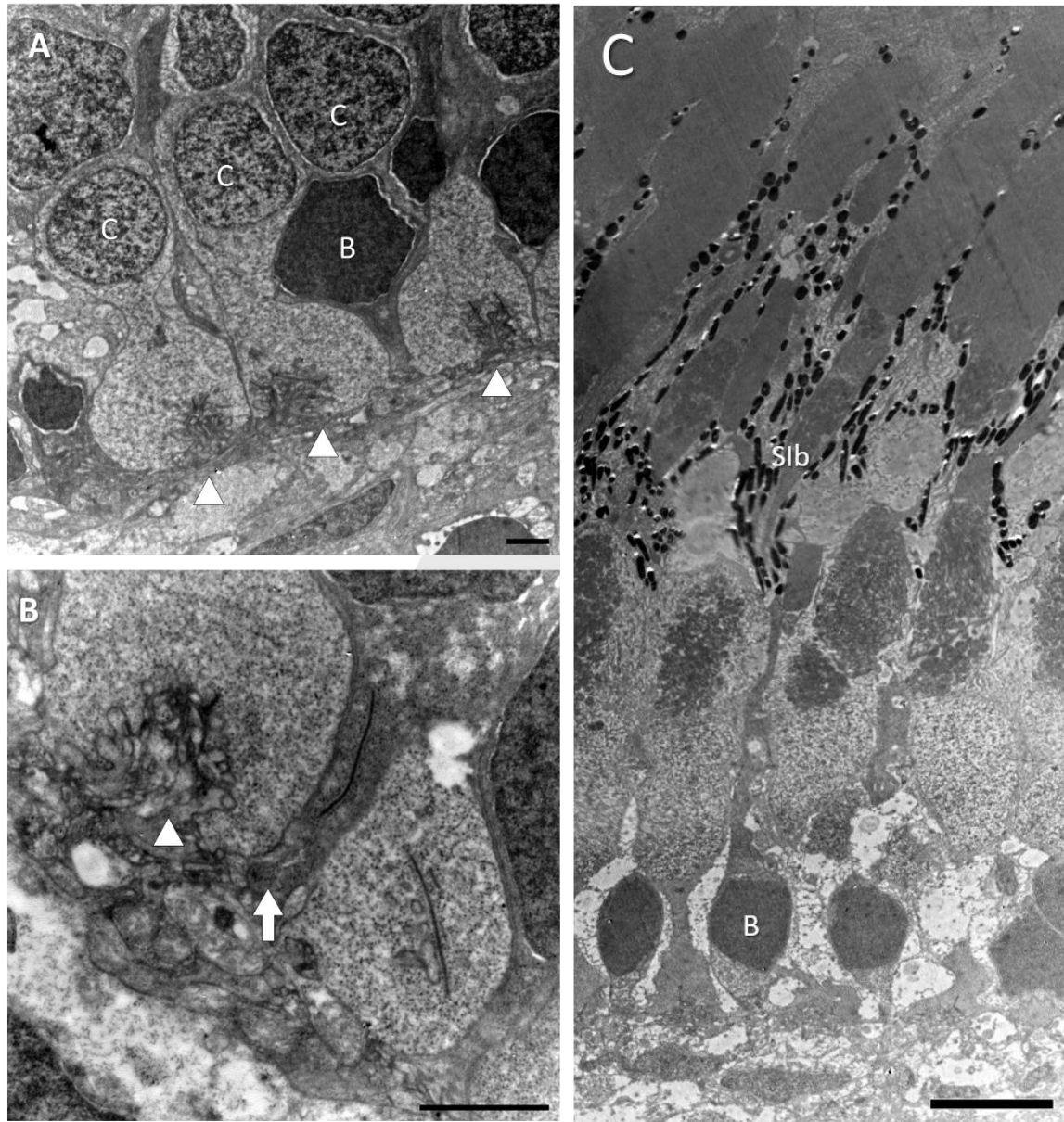


Fig. 12: Micrografía electrónica de transmisión de la CNE de la retina. A) Zona basal de la CNE donde se observan conos y bastones. Con puntas de flecha se indican los pedículos sinápticos de conos. B) Terminales sinápticas de los fotorreceptores. Con punta de flecha se señala un pedículo sináptico de un cono, la flecha indica la terminal sináptica de un bastón. C) Reconstrucción de micrografías electrónicas de transmisión de un fotorreceptor del tipo bastón y un cono. C: Cono, B: Bastón. Barra de calibración: A,B) 2 μ m, C) 5 μ m.

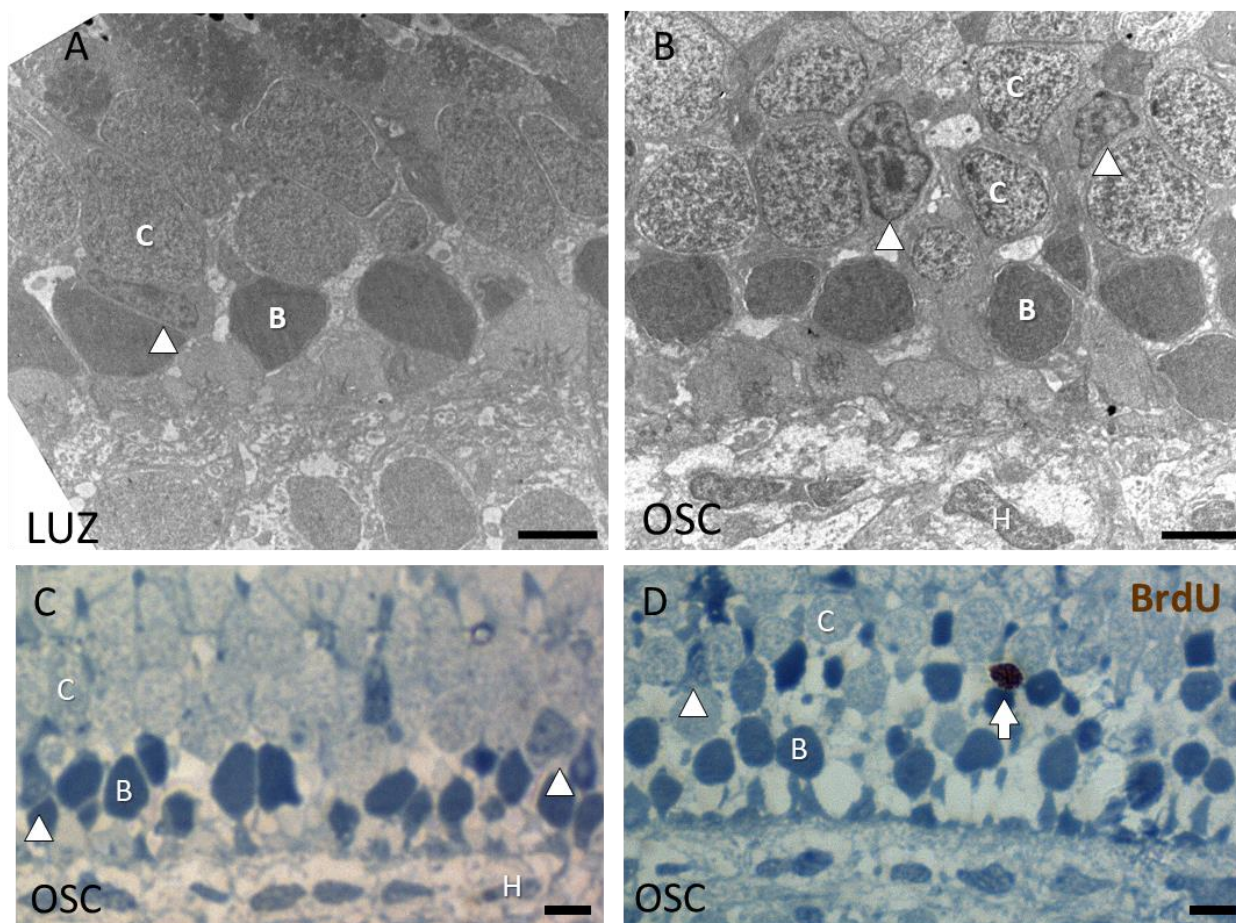


Fig. 13: Micrografía electrónica de transmisión de la CNE de la retina de un ejemplar de luz (A) y oscuridad (B) y cortes semifinos de la CNE de ejemplares de oscuridad (D,E). La cabeza de flecha señala núcleos con una apariencia diferente a los de conos y bastones tanto en la microscopía electrónica como microscopía de campo claro. La flecha marca un núcleo BrdU+ que se encuentra en la misma ubicación de la CNE que este tercer tipo nuclear. B: Bastón, C: Cono, H: neurona horizontal. Barras de calibración: 5 μ m.

Por otro lado, en ejemplares de oscuridad, se observó la presencia de una prolongación que se extendía desde una célula de la CNE hacia la CNI, tanto visible en cortes de microscopía óptica como de microscopía electrónica de transmisión. En la micrografía por MET, esta prolongación posee la apariencia de ser continuo con el citoplasma de la célula ubicada en la CNE (Fig. 14).

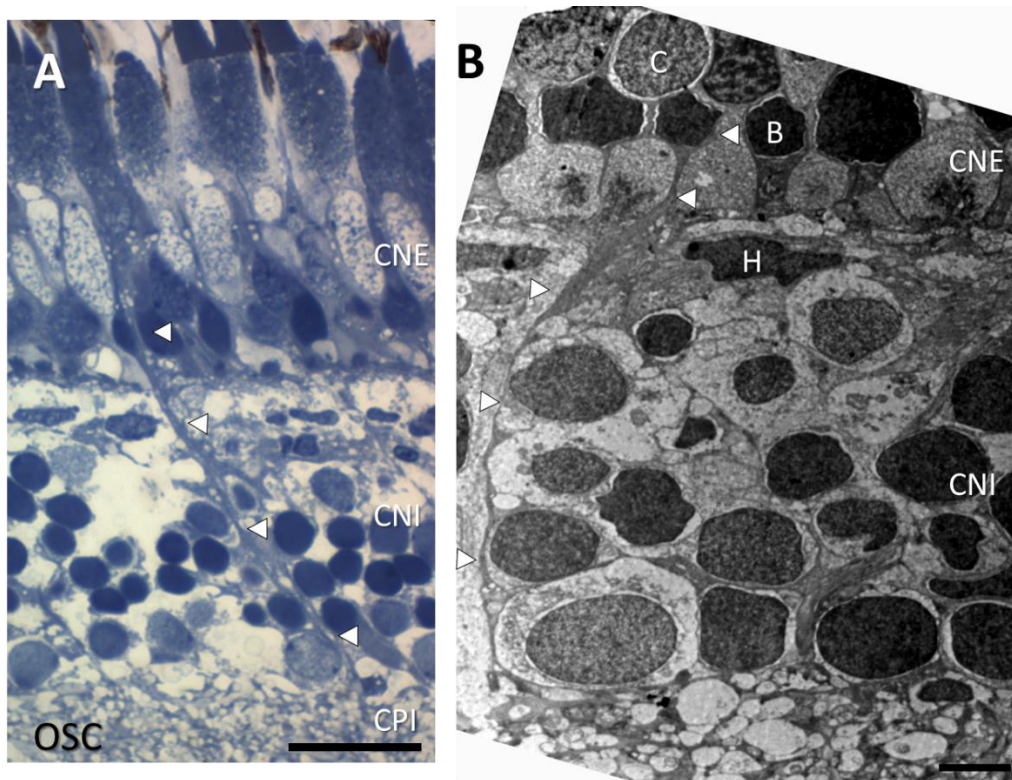


Fig. 14: A) Cortes semifinos (1 μ m de espesor) de la retina neural central de un ejemplar de condición de oscuridad permanente (OSC) teñido con azul de metileno borácico. Con puntas de flecha se indica una célula y prolongación que atraviesa la CNI desde la CNE hasta la CPI. B) Micrografía electrónica de transmisión de la CNI y CNE de un ejemplar de oscuridad. Con puntas de flecha se indica una célula y prolongación que atraviesa la CNI desde la CNE hasta la CPI. CNI: Capa nuclear interna, CNE: Capa nuclear externa, CPI: Capa plexiforme interna, C: Cono, B: Bastón, H: neurona horizontal. Barra de calibración: A) 20 μ m, B) 5 μ m.

Distribución de los melanosomas del epitelio pigmentario de la retina

Mediante microscopía electrónica de transmisión fue posible observar la distribución de los melanosomas de las proyecciones citoplasmáticas del EPR. En ambas condiciones, estos se extendieron desde la zona escleral de la retina hacia la CNE, envolviendo los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (Fig. 15). Un análisis cualitativo preliminar de la distribución de los melanosomas mostró diferencias entre condiciones. En condiciones de luz, se observaron pigmentos en menor número en la zona escleral del EPR donde se encuentran los núcleos celulares, aumentando su densidad hacia la zona vitreal (Fig. 15A). Por otro lado, en el caso de la condición de oscuridad permanente, los pigmentos mostraron una distribución similar, excepto en la zona más escleral del EPR, donde se observó una mayor concentración de melanosomas que en condición de luz estándar (Fig. 15B).

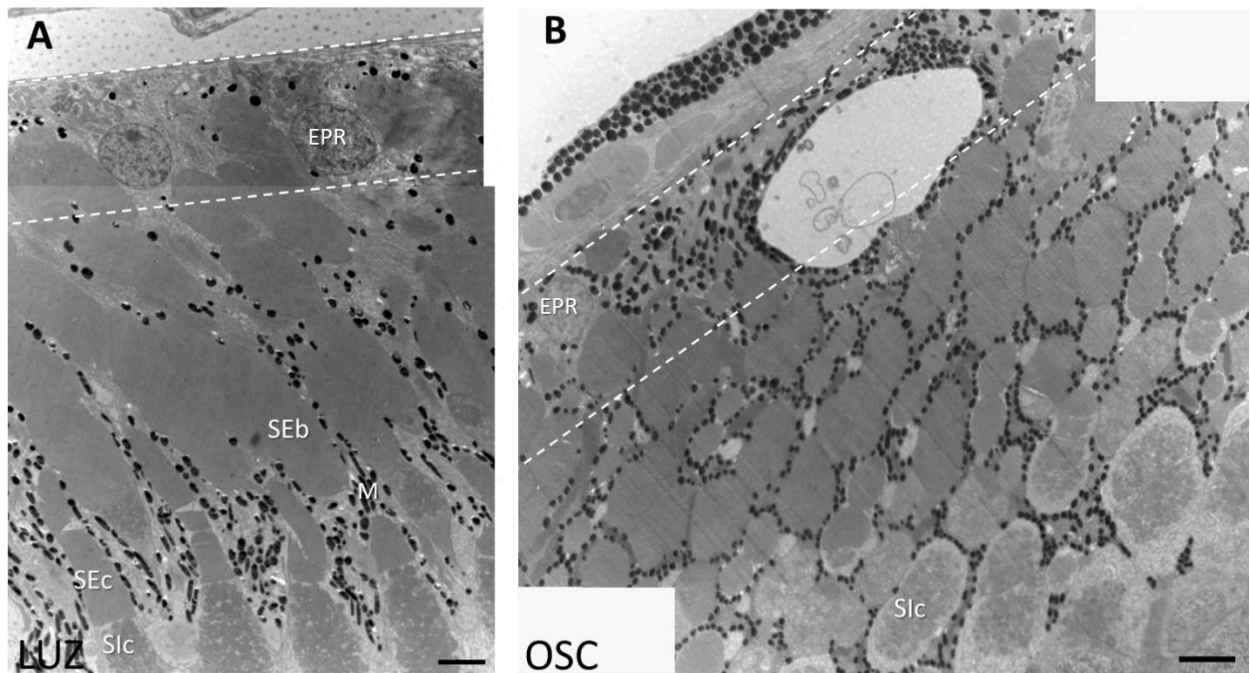


Fig. 15: Micrografía electrónica de transmisión del epitelio pigmentario de la retina de un ejemplar de condición de luz estándar (A) y de oscuridad permanente (B). Entre líneas punteadas se indica la zona escleral del epitelio pigmentario donde se observaron diferencias en la distribución de los pigmentos entre condiciones. EPR: Núcleos celulares del epitelio pigmentario de la retina, M: Melanosomas, SEb: Segmentos externos de bastones, SEc: Segmentos externos de conos, Sic: Segmentos internos de conos. Barras de calibración: 5 μ m.

DISCUSIÓN

La retina de *A. charrua* presenta una organización compartida en cuanto al número de capas con el resto de los vertebrados (Berrosteguieta et al., 2018; Stenkamp, 2007). Tanto la tinción convencional de azul de metileno como la microscopía electrónica permitieron identificar las características correspondientes a conos y bastones. Las características de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, así como sus terminales sinápticas se asemejaron a las reportadas para otras especies (Tarboush et al., 2012). La disposición y apariencia de la cromatina en los núcleos de fotorreceptores de *A. charrua* se diferenció de la reportada en mamíferos, como en el caso de ratones (Carter-Dawson & Lavail, 1979), asemejándose a la observada en pez dorado (Raymond & Rivlin, 1987), y sobre todo a la de *D. rerio* (Tarboush et al., 2012).

La presencia de figuras mitóticas en la ZMC, principalmente zona marginal ciliar medial y central, adyacente al epitelio pigmentario de la retina, es consistente con lo observado por nosotros y otros autores (Berrosteguieta et al., 2022; Raymond & Rivlin, 1987).

Resulta interesante la presencia en individuos sometidos a condiciones de oscuridad de cúmulos de células a lo largo de procesos celulares que se extienden en la capa plexiforme interna, incluyendo una imagen que correspondería a una mitosis. La presencia de mitosis podría correlacionarse con núcleos BrdU+ observados esporádicamente en la CPI y estar relacionada a los núcleos proliferativos de la CCG (Capítulo 3). Esto podría deberse a diferentes fenómenos: el plano de corte de las secciones obtenidas, o posibles lesiones que hayan cicatrizado en este ejemplar, donde se hayan activado procesos regenerativos, en los cuales pueden producirse todos los tipos neuronales de la retina, incluyendo neuronas ganglionares a partir de glías de Müller en la CNI (Lenkowski & Raymond, 2014). Sin embargo, esto parece poco probable, dado que, llamativamente se han observado cúmulos equivalentes en las cercanías de la zona marginal opuesta. Debe considerarse que este es un resultado preliminar observado por el momento de forma aislada. De confirmarse en próximas oportunidades la presencia de este tipo de observaciones, podría inferirse que las condiciones de oscuridad podrían activar mecanismos moleculares relacionados con los descritos para procesos regenerativos (Lenkowski & Raymond, 2014).

3.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS PIGMENTOS DEL EPR EN LUZ Y OSCURIDAD

Un importante actor en la adaptación rápida y dinámica a las diferentes luminosidades es el epitelio pigmentario de la retina provisto de pigmentos denominados melanosomas. Se ha descrito que animales adaptados a la luz presentan una distribución de melanosomas a lo largo de los segmentos de los fotorreceptores, mientras que en los adaptados a la oscuridad los pigmentos se ubican en la zona perinuclear del epitelio pigmentario (Marc, 1998). Sin embargo, en *A. charrua* poseen una distribución intermedia entre la descrita para animales adaptados a la luz o a la oscuridad, lo que ha llevado a sugerir que la histología de la retina que *A. charrua* le permitirían adaptarse a un medio de luz variable (Berrosteguieta et al., 2018). En relación a estas características, una respuesta ampliamente observada en vertebrados e invertebrados son los movimiento retinomotores, en donde la posición de los pigmentos del epitelio pigmentario y de los segmentos externos de los fotorreceptores son capaces de cambiar según la iluminación a la que se expone la retina (Burnside & Nagle, 1983). La distribución diferencial de los pigmentos del EPR en condiciones de luz y oscuridad aquí observada sugiere la presencia de movimientos retinomotores. Para confirmar esta asunción se propone como perspectiva realizar experimentos de luz-oscuridad en diferentes tiempos, también

analizando la posición de los segmentos externos de fotorreceptores, considerando que es un fenómeno de naturaleza muy rápida, del orden minutos (Burnside & Nagle, 1983).

Otros autores han reportado cambios ultraestructurales en los fotorreceptores de animales criados en ambientes de oscuridad permanente (Donatti & Fanta, 2007), por lo que resultará interesante ahondar en futuros análisis de esta naturaleza.

3.2 PRECURSORES DE BASTONES DE LA CNE

Es escasa la literatura en la que se ha propuesto caracterizar esta población mediante técnicas histológicas convencionales y microscopía electrónica. Raymond y Rivlin (1987) caracterizaron células de apariencia y ubicación que coinciden con la del tercer tipo de núcleos observados en la CNE en esta tesis, que identificaron como los precursores de bastones de la CNE en la retina de pez dorado juvenil mediante microscopía electrónica de transmisión. Al igual que lo aquí observado, las autoras reportan diferencias en su apariencia con respecto a la de los fotorreceptores diferenciados o en proceso de diferenciación. Describieron estos precursores como ubicados en la zona basal de la CNE, mientras que en *A. charrua* estos se ubicaron entre los núcleos de los conos y los bastones. Al igual que en *A. charrua*, en el pez dorado estas células presentaron núcleos irregulares o lobulados de cromatina menos condensada que los núcleos de fotorreceptores. Por lo tanto, considerando estos antecedentes, se postula que el tercer tipo de núcleo observado en la CNE de *A. charrua* podría corresponder a los precursores de bastones. Una evidencia a favor de esta hipótesis, es que se han observado núcleos con la misma ubicación marcados con BrdU, sugiriendo una activa proliferación celular de los mismos.

Por otro lado, otros autores han descrito que los precursores de bastones se ubicarían entre los núcleos de conos, adyacentes a la membrana limitante externa. Allí atravesarían las diferentes fases del ciclo celular. Al momento de la diferenciación a bastones, estas migrarían hacia las zonas basales de la CNE (Mack & Fernald, 1995, 1997). Por lo tanto, resta todavía comprender más finamente la ubicación e identidad de las células progenitoras de la retina de teleósteos.

A vertical strip on the left side of the slide shows a fluorescence microscopy image of retinal cells. The cells are stained with a green fluorescent dye, highlighting specific structures against a dark background. The text 'CAPÍTULO 2' is overlaid on this image.

CAPÍTULO 2

Proliferación
celular de la
retina en luz y
oscuridad

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA RETINA EN LUZ Y OSCURIDAD

RESULTADOS

Con el fin de cumplir los objetivos específicos 4 y 5 -detectar las células proliferantes de la ZMC y retina central de *A. charrua* se aplicó un pulso de BrdU en ejemplares mantenidos en las condiciones de luz estándar y oscuridad permanente como antes descrito. De forma breve, la metodología empleada implicó luego de 7 días de sobrevida el revelado mediante inmunofluorescencia del BrdU incorporado. De este modo, los núcleos BrdU+ pudieron ser observados y fotografiados mediante microscopía confocal.

Mediante estas técnicas, se observaron en todos los ejemplares analizados núcleos BrdU+ en todas las capas nucleares (CNE, CNI y CCG) y ZMC (Fig. 16 y Fig. 17). Asimismo, se observó la presencia de núcleos marcados en la capa de las células pigmentarias y en la zona externa de la membrana limitante interna y de forma ocasional en las capas plexiformes interna y externa. Este trabajo se centrará únicamente en el análisis y cuantificación de los núcleos presentes en las tres capas nucleares de la retina neural y ZMC.

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA UBICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LOS NÚCLEOS BRDU+

Tanto los ejemplares de la condición de ciclo de luz natural, como los de oscuridad permanente, presentaron una mayor concentración de núcleos en las zonas adyacentes a la ZMC en todas las capas nucleares de la retina. En general, en la zona inmediatamente adyacente a la transición entre la ZMC y las capas nucleares de la retina neural se observaron cúmulos de núcleos BrdU+ para ambas condiciones experimentales (Fig. 16B).

En el caso de la ZMC, se observaron núcleos en las tres divisiones (ZMC central, medial y periférica). Los núcleos de las células BrdU+ de todas las divisiones de la ZMC mostraron núcleos de morfologías alargadas. Los núcleos marcados de la ZMC periférica se mostraron más elongadas y de mayor tamaño. Por otro lado, los núcleos proliferativos de la ZMC medial mostraron una morfología más irregular de menor tamaño con presencia frecuente de figuras mitóticas. Finalmente, los núcleos proliferativos de la ZMC central mostraron formas ahusadas o más redondeadas, comenzando a asemejarse a aquellos observados en las capas nucleares de la retina neural (Fig. 16).

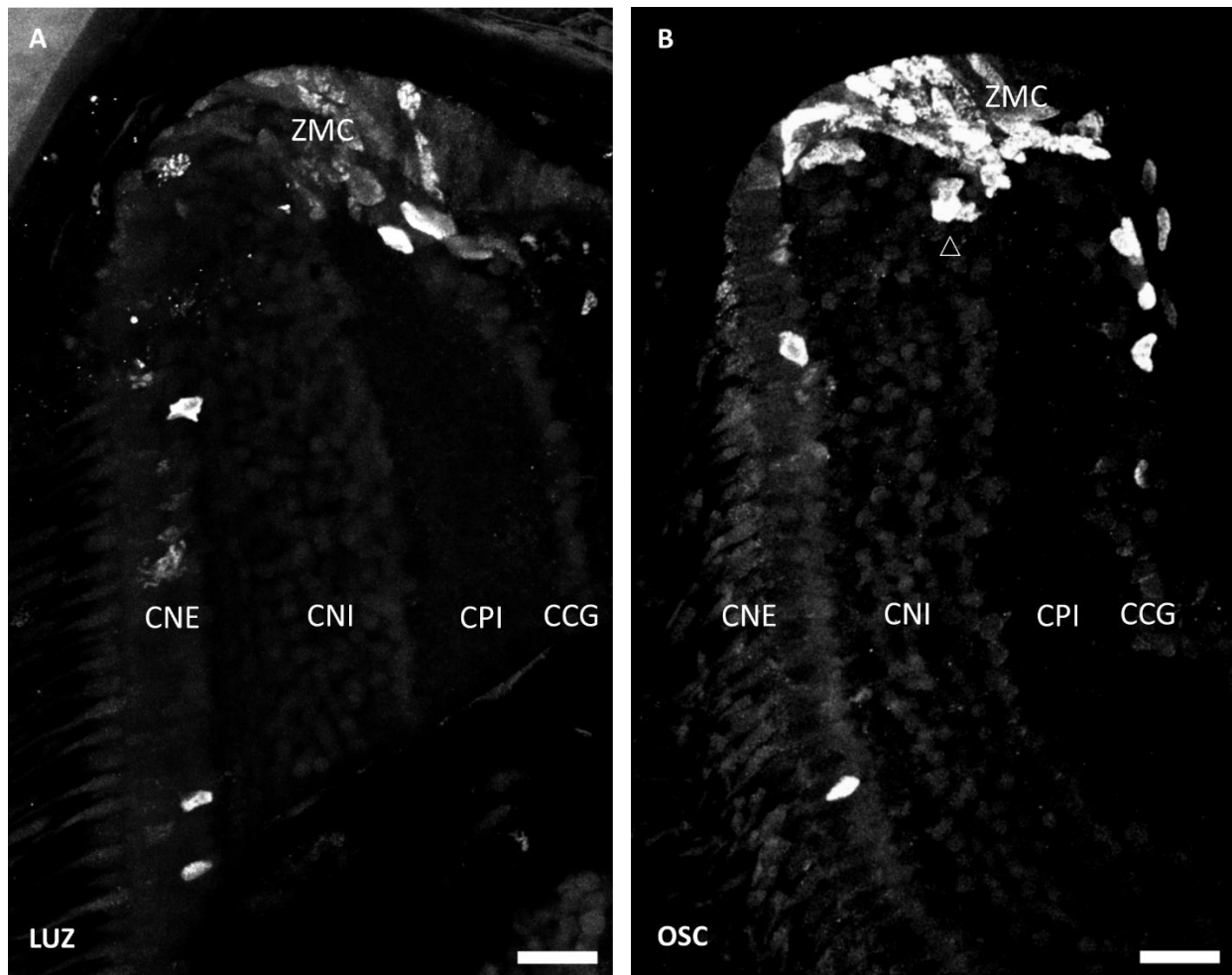


Fig. 16: Apilado (proyección de máxima intensidad) de microfotografías confocales de la zona marginal ciliar y retina neural adyacente de dos secciones de la retina de ejemplares mantenidos en condiciones de ciclo de luz natural (A) y oscuridad permanente (B). Con una punta de flecha se indica un cúmulo de núcleos BrdU+ en la CNI limitante con la ZMC. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de las células ganglionares, LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Se muestran los núcleos BrdU+ marcados en las diferentes capas nucleares y zona marginal ciliar. Barra de calibración: 20µm.

El análisis de la CNE en las zonas más alejadas de la ZMC, en la retina central, en general mostró núcleos BrdU+ espaciados a lo largo de toda la retina en ambas condiciones, con una mayor concentración a medida que se avanzaba hacia la cercanía de la ZMC. Dentro del eje apicobasal de la CNE, se presentaron tanto en la zona adyacente a la membrana limitante externa (apical), como en la zona cercana a la plexiforme externa (basal). Los núcleos presentaron morfologías alargadas, con su eje mayor en dirección perpendicular a las capas de la retina, en algunos casos con formas triangulares. También se observaron núcleos con morfologías redondeadas, en general en la parte más basal de la CNE (Fig. 17D). Es importante destacar que en esta capa nuclear también se notaron núcleos con intensidades de fluorescencia muy débiles. Debido a que las mismas no podían ser claramente diferenciadas de la señal de fondo de las microfotografías, estos, no fueron considerados en los análisis histológicos o cuantitativos.

En el caso de la CNI, se observaron núcleos principalmente formando cúmulos en la zona anular de crecimiento muy cercana a la ZMC. En esta zona, las células se mostraban con morfologías en general redondeadas o en algunos casos, cuanto más cercanas a la ZMC con morfologías fusiformes similares a las observadas en las células de la ZMC (Fig. 16). Por otro lado, en la CNI de la retina central, se

observaron células redondeadas en la parte más basal de la capa. Asimismo, se observaron células de apariencia alargada en el plano horizontal, ubicadas en la zona correspondiente a las células horizontales (Fig. 17A-C).

En la capa de las células ganglionares se observaron células marcadas, sobre todo en la zona adyacente a la ZMC. En el caso de la retina central, estos fueron escasos, pero fueron observados en varios de los ejemplares analizados. Los núcleos BrdU+ de esta capa presentaron en general morfologías ovaladas o aplanadas (Fig. 17E).

4.2 COMPARACIÓN DE LOS DATOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR ENTRE CONDICIONES DE LUZ Y OSCURIDAD

A continuación, con el fin de determinar si existieron diferencias entre condiciones en la proliferación celular de la retina se procedió a realizar un análisis cuantitativo del número de núcleos BrdU+ (objetivo específico 5).

En primer lugar, los datos de los números promedio por sección en cada ejemplar de núcleos BrdU+ totales y discriminados por capas o ZMC fueron comparados mediante un test de Mann-Whitney (para estadísticos descriptivos ver Anexo). El análisis mediante test de Mann-Whitney indicó la presencia de diferencias significativas para la CNE ($U=2$, $z=2.09$, $p=0.032$, $r=0.93$) siendo los valores en la condición de oscuridad menores a los de luz. Si bien no se obtuvieron p-valores significativos en los demás casos (TOT: $U=11$, $z=0.21$, $p=0.84$, $r=0.093$; ZMC: $U=10$, $z=0.42$, $p=0.69$, $r=0.19$, CCG: $U=5$, $z=0.84$, $p=0.42$, $r=0.38$) para la CNI se obtuvieron p-valores cercanos a la significancia ($U=4$, $z=1.68$, $p=0.079$, $r=0.75$) (Fig. 18). El tamaño del efecto para el valor promedio de núcleos por sección fue grande ($r>0.50$) tanto para CNE y CNI. En el caso de la ZMC y CCG, el efecto fue pequeño-medio y medio-grande, respectivamente, mientras que este fue pequeño ($r<0.10$) para los núcleos totales (Fig. 18).

Este análisis demostró entonces una cantidad de núcleos BrdU+ significativamente menor en la CNE en condiciones de oscuridad. Por otro lado, se observaron mayores valores para los núcleos totales, los núcleos de la ZMC y los núcleos de la CCG en la condición de oscuridad. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. De todas maneras, el análisis del tamaño del efecto, reveló que la exposición de los ejemplares a las condiciones de oscuridad presentó efectos importantes (reflejados en el valor del coeficiente de Pearson r) sobre los valores de la proliferación observados en la CNE y CNI, efectos medios sobre la ZMC y CCG, mientras que los mismos fueron pequeños sobre la proliferación total.

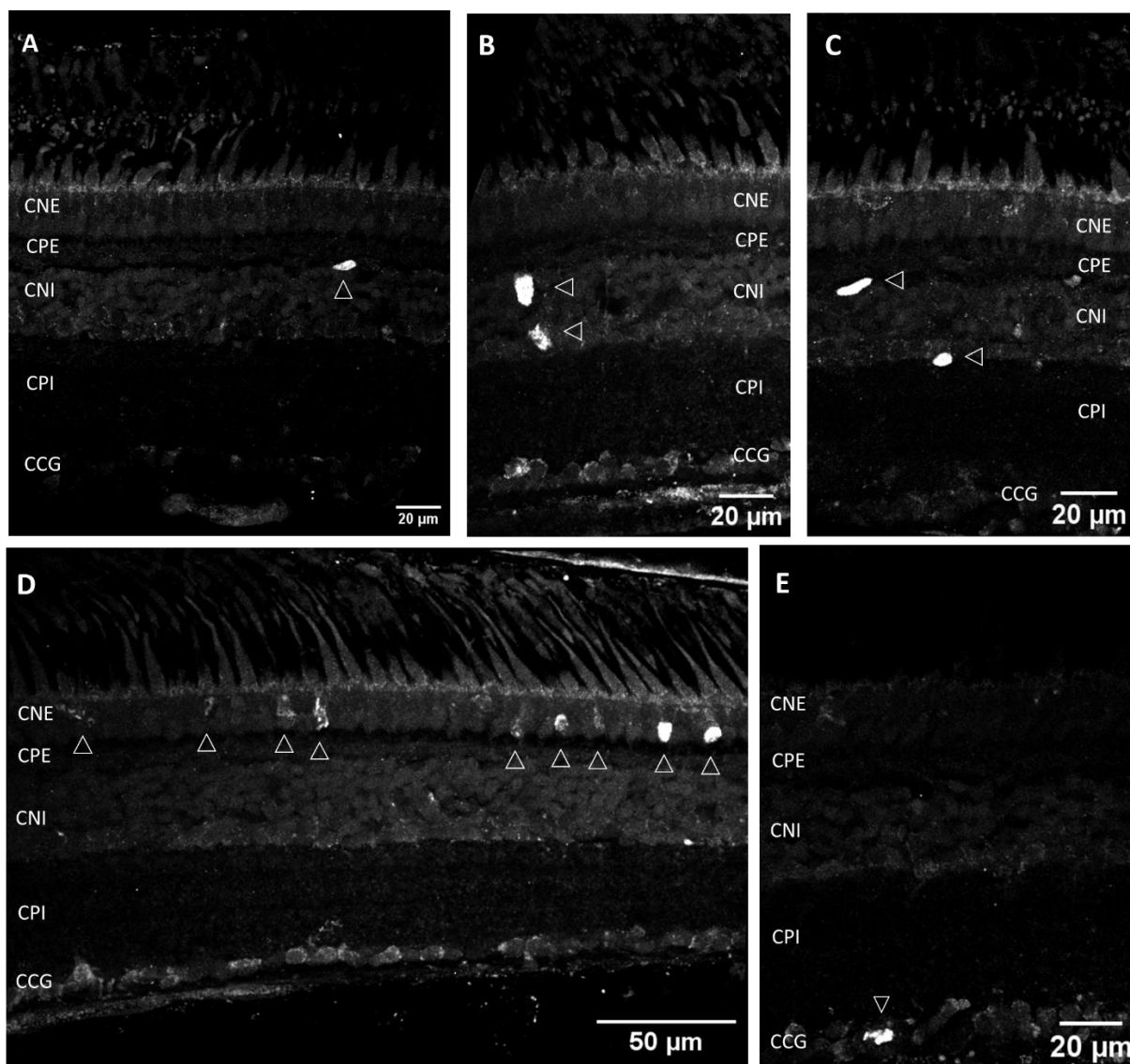


Fig. 17: Apilados (proyección de máxima intensidad) de microfotografías confocales de la retina neural central de un ejemplar de la condición de ciclo de luz natural. Nótese la presencia de núcleos BrdU+ (puntas de flecha) en todas las capas nucleares de la retina. A) Se observa la presencia de un núcleo BrdU+ en la zona apical de la CNI con morfología aplanada en la zona donde se ubican las neuronas horizontales. B y C) En este apilado se observan núcleos proliferativos BrdU+ ubicados en la CNI en diferentes posiciones apicobasales y con diferentes morfologías. D) Múltiples núcleos BrdU+ fueron observados en la CNE de la retina central. Estos presentaron también diferentes morfologías e intensidades de señal. E) Núcleo BrdU+ observado en la capa de las células ganglionares. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de las células ganglionares, LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Se muestran los núcleos BrdU+ marcados en las diferentes capas nucleares y zona marginal ciliar. Barra de calibración: 20 μ m.

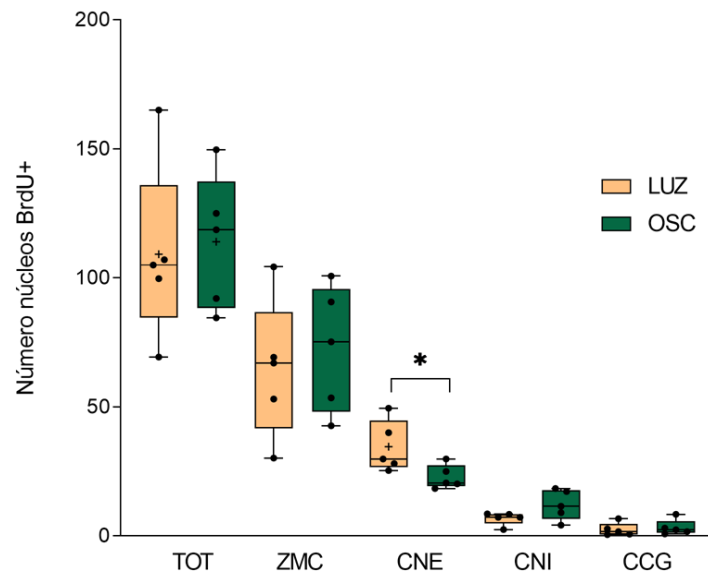


Fig. 18: Datos de conteo de núcleos proliferativos BrdU+, mostrados para cada uno de los diferentes grupos planteados. Se utilizaron para esto los promedios por sección para cada individuo. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p < 0.05$) obtenidas por test de Mann-Whitney.

De forma complementaria, se analizaron los datos de cada sección de forma individual y con la finalidad de poder comparar estos resultados con otros análisis que se encuentran más adelante. Para esto, se aplicaron test t de Student para la comparación entre grupos (ver Anexo II para la prueba de supuestos de Normalidad y homogeneidad de varianza).

Núcleos BrdU+ totales

En el caso de los núcleos totales, la condición de oscuridad mostró un número promedio de núcleos totales por cada sección mayor (media = $123.64 \pm \text{SEM} = 5.49$) que las secciones de la condición de ciclo de luz natural (105.24 ± 6.97). Por lo tanto, la diferencia entre medias fue de 18.396 [Intervalo de confianza 95% 0.17504, 36.662]. La misma fue significativa con un $t(45) = 2.03$, $p = 0.048$, mientras que el tamaño del efecto fue medio ($r = 0.29$) (Fig. 19).

Núcleos BrdU+ de la ZMC

Por otro lado, en la ZMC la condición de oscuridad permanente mostró un número promedio de núcleos mayor (124 ± 4.92) que las secciones de la condición de ciclo de luz natural (116 ± 5.08), con una diferencia entre medias de 18.675 [4.3297, 33.019], la misma fue también significativa ($t(45) = 2.622$, $p = 0.01$), con un tamaño de efecto medio ($r = 0.36$) (Fig. 19).

Núcleos BrdU+ de la CNE

En el caso de la CNE la condición de oscuridad permanente mostró un número promedio de núcleos menor (27.45 ± 2.85) que las secciones de la condición de ciclo de luz natural (34.12 ± 2.54). La diferencia entre medias fue de 6.6655 [-1.0083, 14.339] y no fue significativa ($t(45) = 1.7495$, $p = 0.087$), con un tamaño de efecto entre pequeño y medio de $r = 0.25$ (Fig. 19).

Núcleos BrdU+ de la CNI

En el análisis del número de núcleos de la CNI se observó una mayor cantidad media de núcleos BrdU+ en condiciones de oscuridad (11.41 ± 1.66) que en condiciones de luz (6.4 ± 0.85). Dicha diferencia de 5.0091 [1.3889, 8.6293] demostró ser significativa con un valor $t(45)=2.7868$ y $p=0.01$. A su vez, el valor del efecto presentó valores que se encontraron entre los medios y altos de $r=0.38$ (Fig. 19).

Núcleos BrdU+ de la CCG

Finalmente, para el caso de la CCG no se detectaron diferencias significativas ($t(45)=0.33$ y $p=0.74$ [-1.4952, 2.0916]) en los valores medios de núcleos entre el grupo luz (2.52 ± 0.66) y oscuridad (2.82 ± 0.58). A su vez, el tamaño del efecto fue pequeño, con un valor $r=0.05$ (Fig. 19).

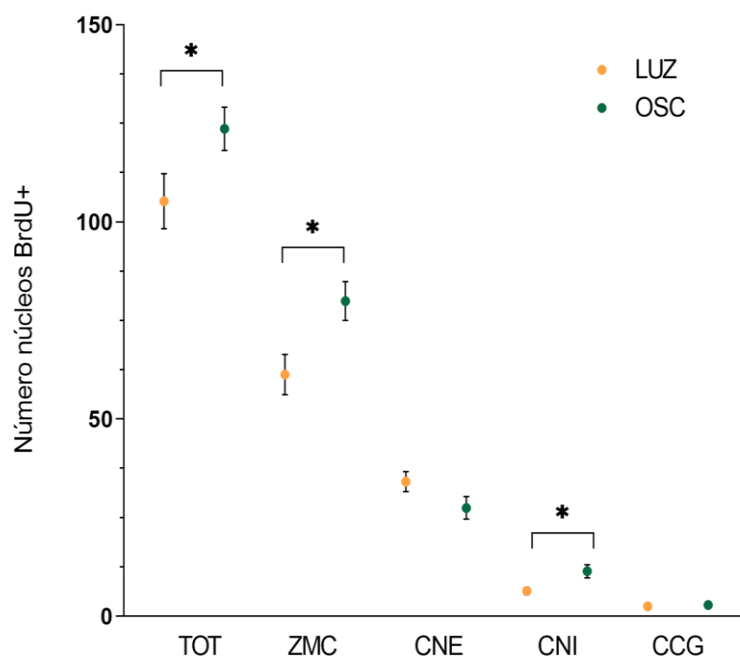


Fig. 19: Media $\pm$ SEM de los datos de conteo de núcleos proliferativos BrdU+ de cada corte analizado. Se muestran los núcleos totales por corte, así como divididos en cada capa nuclear y ZMC para cada condición.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en las medias entre condiciones se indican con un (*). ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad total.

En suma, se han registrado valores significativamente mayores en la cantidad de núcleos proliferativos BrdU+ totales, en la ZMC y CNI. Por otro lado, se observó un menor valor medio en la CNE en condiciones de oscuridad respecto a la condición de luz, y un mayor valor medio en la CCG. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

4.3 DENSIDADES PROLIFERATIVAS: PROLIFERACIÓN EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO DE LA RETINA

Los análisis mencionados más arriba fueron realizados tomando los números de núcleos, sin considerar si el tamaño de la retina. A continuación, los datos de cantidad total de núcleos por sección

fueron divididos por el largo de cada sección de la retina (y multiplicado por 100 para facilitar la visualización de los datos).

Una vez obtenidos estos cocientes y habiendo eliminado dos datos atípicos (ver Anexo), los datos fueron comparados mediante un test de Mann-Whitney para determinar si existieron diferencias significativas entre condiciones. De esta forma se demostraron valores significativamente mayores en la condición de oscuridad ($U=158$, $z=2.1457$, $p=0.032$), con un tamaño de efecto medio (0.32) (Fig. 20).

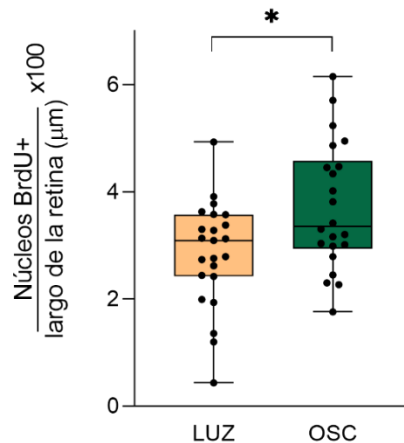


Fig. 20: Número de núcleos BrdU+ totales por sección en función del largo de la sección correspondiente. LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p<0.05$) obtenidas por test de Mann-Whitney.

A continuación, se repitió dicho procedimiento utilizando los datos obtenidos de la CNE. En este caso, los datos no mostraron diferencias significativas entre condiciones ($U=242$, $z=0.6929$, $p=0.48837$, $r=0.10$) (Fig. 21).

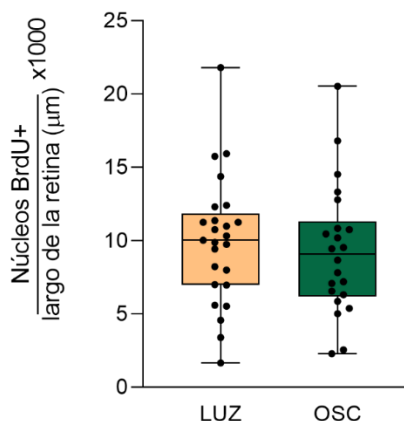


Fig. 21: Número de núcleos BrdU+ de la capa nuclear externa por sección en función del largo de la sección correspondiente. LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. No se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) por test de Mann-Whitney.

4.4 RELACIÓN ENTRE TAMAÑOS CORPORALES Y PROLIFERACIÓN DE LA RETINA

Teniendo en cuenta que el crecimiento y el tamaño corporal se encuentran relacionados con el crecimiento de la retina, se buscó identificar si las diferencias entre condiciones se deben a diferencias en los tamaños corporales.

En primer lugar, se analizaron los datos de todos los ejemplares cuyos cortes fueron utilizados para la cuantificación de la proliferación se muestran en la Fig. 22A, es decir, incluyendo los tres ejemplares cuya cantidad de núcleos fue considerada como baja y no utilizados para la comparación entre condiciones (n=6 LUZ, n=7 OSC). Esta comparación fue efectuada con el fin de evidenciar si la baja proliferación de los mismos estuviera relacionado a su tamaño corporal. La comparación entre grupos por test de Mann-Whitney arrojó un p-valor=0.52 (Mann-Whitney U=16, z=0.64286, r=0.18), por lo que no se constataron diferencias significativas entre las longitudes totales de los animales entre condiciones.

A continuación, se buscó analizar los datos de longitud total de los datos depurados con el fin de determinar si existen diferencias en el tamaño corporal entre grupos. Nótese que los animales eliminados no fueron necesariamente los más pequeños o los más grandes (Fig. 22B). Utilizando un test de Mann-Whitney, no se observaron diferencias significativas entre las longitudes entre condiciones (U=4, z=1.67, p=0.095, r=0.53).

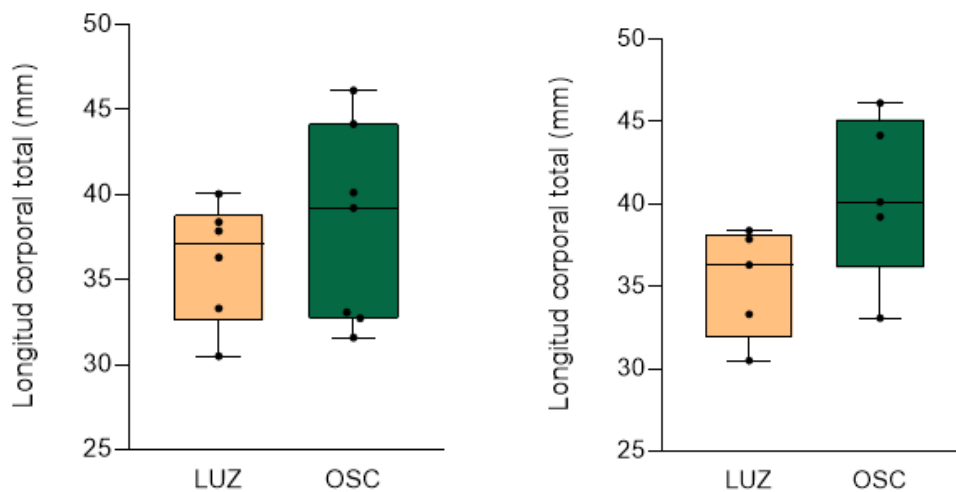


Fig. 22: A) Longitudes corporales totales de los ejemplares para cada condición. B) Longitudes corporales totales de los ejemplares cuyos datos fueron utilizados para el análisis de la cuantificación de núcleos proliferativos entre condiciones. En ninguno de los casos se constataron diferencias significativas entre las medias y medianas de cada grupo. LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente.

Luego, se buscó determinar si existe una relación entre el tamaño corporal de los individuos y la proliferación celular de la retina. Para esto, se utilizó un modelo de eje mayor reducido (RMA) (los valores de correlación y validación del modelo de regresión pueden verse en el Anexo).

En primer lugar, se utilizó el conjunto de datos tanto de luz como de oscuridad con sus respectivas longitudes corporales totales (Fig. 23A). El modelo fue validado, mostrando que existe una relación negativa entre el tamaño corporal y la cantidad de núcleos BrdU+, con una pendiente de -5.96. Por otro lado, el valor r^2 correspondió a aproximadamente 0.45.

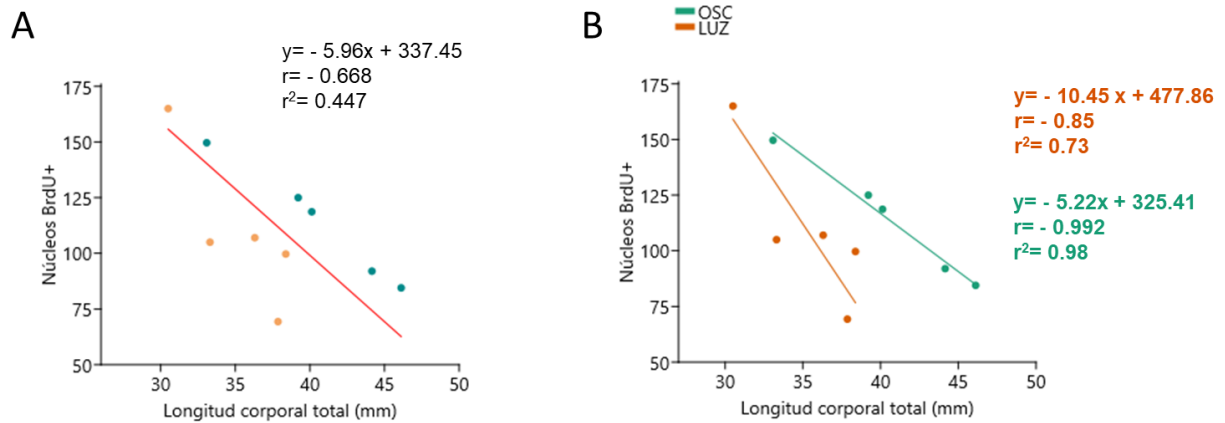


Fig. 23: Relación entre la longitud corporal de los ejemplares y el número de núcleos BrdU+ correspondiente (mostrado como el número total promedio por sección para cada ejemplar) mediante regresión funcional por modelo de eje mayor reducido. Se indican las ecuaciones de la recta para cada modelo, así como los valores de coeficiente de correlación de Pearson (r) y r^2 . A) Relación de la longitud corporal total y número de núcleos proliferativos obtenida utilizando el conjunto de datos de ambas condiciones. B) Relación de la longitud corporal total y número de núcleos proliferativos obtenida para los datos de cada uno de las condiciones de forma separada. Se indican los valores obtenidos de la ecuación de la recta, r y r^2 para cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta que la mayor parte de los valores de luz se encontraron por debajo de la línea del modelo, es decir, que sus residuos fueron negativos, y que lo contrario sucedió para los datos de oscuridad (ver Anexo), se analizaron los datos de cada condición de forma separada mediante regresión funcional.

En el caso de los datos de los individuos sometidos a la condición de ciclo de luz natural, también presentaron una pendiente negativa, con un valor en este caso mayor (-10.45). Por otro lado, el valor de r^2 en este caso también fue mayor al observado para el conjunto de datos, con un valor de 0.73. Por lo tanto, si solo se consideran los datos de la condición LUZ, una gran parte de la variabilidad (73%) estaría explicada por la longitud total (Fig. 23B).

Por otro lado, cuando se consideran los datos de la condición de oscuridad permanente, también existe una pendiente negativa, en este caso con un valor menor al observado en el conjunto de datos, y menor que en el caso de los datos de luz (-5.22). El valor r^2 por otro lado indicaría que considerando ahora este modelo solo con los datos de oscuridad, el 98% de la variación dentro de este grupo se debería a la longitud total (Fig. 23B)

Asimismo, la comparación brindada por el programa entre las pendientes arrojó resultados significativos ($p=0.013$), indicando que las mismas presentan diferencias significativas (Tabla 5).

4.5 PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CAPAS DE LA RETINA Y ZMC EN RELACIÓN A LA PROLIFERACIÓN TOTAL

A continuación, se buscó determinar si existieron diferencias entre las proporciones de núcleos que representa cada capa de la retina y ZMC en relación a la cantidad total de núcleos.

El análisis mediante test de Mann-Whitney de las proporciones respecto al número total de núcleos para cada una de las secciones, arrojó resultados significativos tanto para la ZMC como para la CNE. En el caso de la ZMC la proporción de núcleos BrdU+ fue significativamente mayor en la condición de oscuridad ($U=163$, $z=2.3775$, $p=0.017$, $r=0.35$). En el caso de la CNE, se constataron valores

significativamente menores en la condición de oscuridad ($U=98.5$, $z=3.7524$, $p=0.00017$, $r=0.54$). Por otro lado, para el caso de la CNI no se observaron diferencias significativas ($U=187$, $z=1.8656$, $p=0.062$, $r=0.2721$). Nótese que, si bien los valores no arrojaron diferencias significativas en el caso de la CNI, los p-valores fueron cercanos a la significancia ($p=0.06$) (Fig. 24).

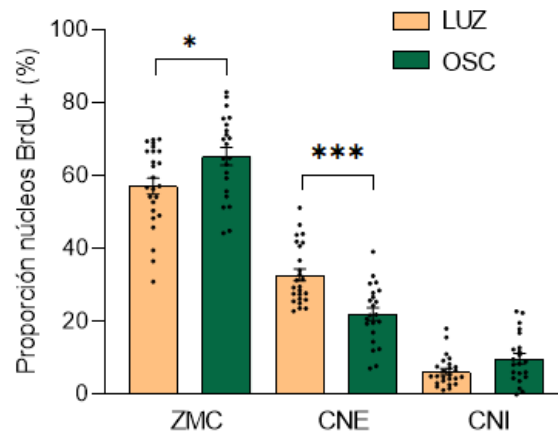


Fig. 24: Media $\pm$ SEM de la proporción de núcleos BrdU+ en relación a los núcleos totales. Se muestra la proporción de núcleos proliferativos BrdU+ de cada sección respecto al total para cada capa nuclear y ZMC en ambas condiciones. Las diferencias significativas ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) entre condiciones se indican con (*), (**), (***) , respectivamente. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad total.

4.6 PROLIFERACIÓN SEGÚN LA ZONA DE LA RETINA

Posteriormente, los datos de proliferación fueron divididos en tres zonas: zona ventral, zona dorsal (que comprenden los núcleos ubicados entre la ZMC y hasta 400um) y zona de la retina neural central.

Para esto, los núcleos de cada uno de los cortes fueron divididos en estas tres zonas para su análisis. En primer lugar, dentro de cada condición se sometieron los datos a una comparación mediante test de Kruskal-Wallis (se utilizó este test no paramétrico dado que los datos no se ajustaron a una distribución Normal y no presentaron homogeneidad de varianza, ver Anexo), y test a posteriori por test de Dunn.

Mediante estos test no se observaron diferencias significativas entre zonas dorsales y ventrales en ningún caso. Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas en todos los casos cuando se comparaban las zonas ventrales o dorsales con la zona central de la retina (Fig. 25, ver Anexo para tabla de valores para cada test).

A su vez, mediante test de Mann-Whitney, se ha analizado la existencia de diferencias entre condiciones para cada una de las zonas. De esta manera, se encontraron diferencias entre condiciones para los números totales de núcleos en la zona dorsal (Fig. 25A), para las ZMC dorsales y ventrales (Fig. 25B), en el caso de la CNE se observaron diferencias significativas para la zona ventral.

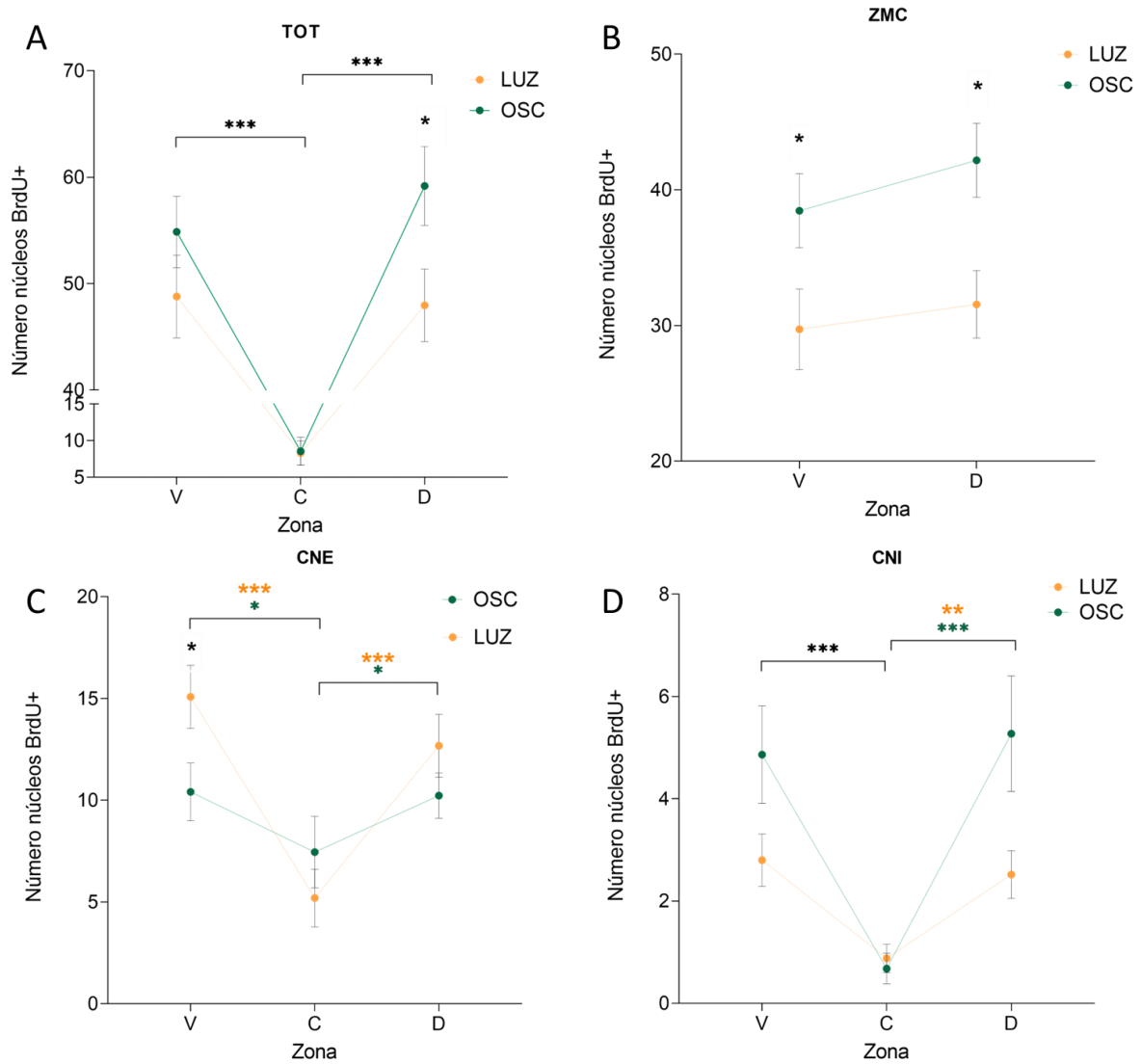


Fig. 25: Valores mostrados como la media $\pm$ SEM para los núcleos totales (A), para ZMC (B) y cada capa nuclear (C, D) en cada condición, separadas en las zonas ventrales, centrales y dorsales (en la ZMC únicamente las zonas centrales y dorsales). Las diferencias significativas ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) entre zonas se indican con (*), (**), (***) , respectivamente. Las diferencias entre zonas dentro de una misma condición se indican con asteriscos sobre llaves. Las diferencias entre una misma zona entre condiciones se indica con un asterisco sobre los valores de esa zona. Cuando los valores de significancia fueron diferentes en cada condición, se indican con el color correspondiente. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, TOT: cantidad total de núcleos; LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad total, V: Ventral, C: Central, D: Dorsal.

A continuación, se calcularon las proporciones que los núcleos correspondientes a la ZMC, CNE y CNI respecto al número total para cada una de las zonas (dorsal, central, ventral). Se compararon estos datos para cada condición mediante test de Mann-Whitney. De esta forma se encontraron diferencias significativas entre condiciones para la zona ventral en la ZMC y en las tres zonas para la CNE (Fig. 26).

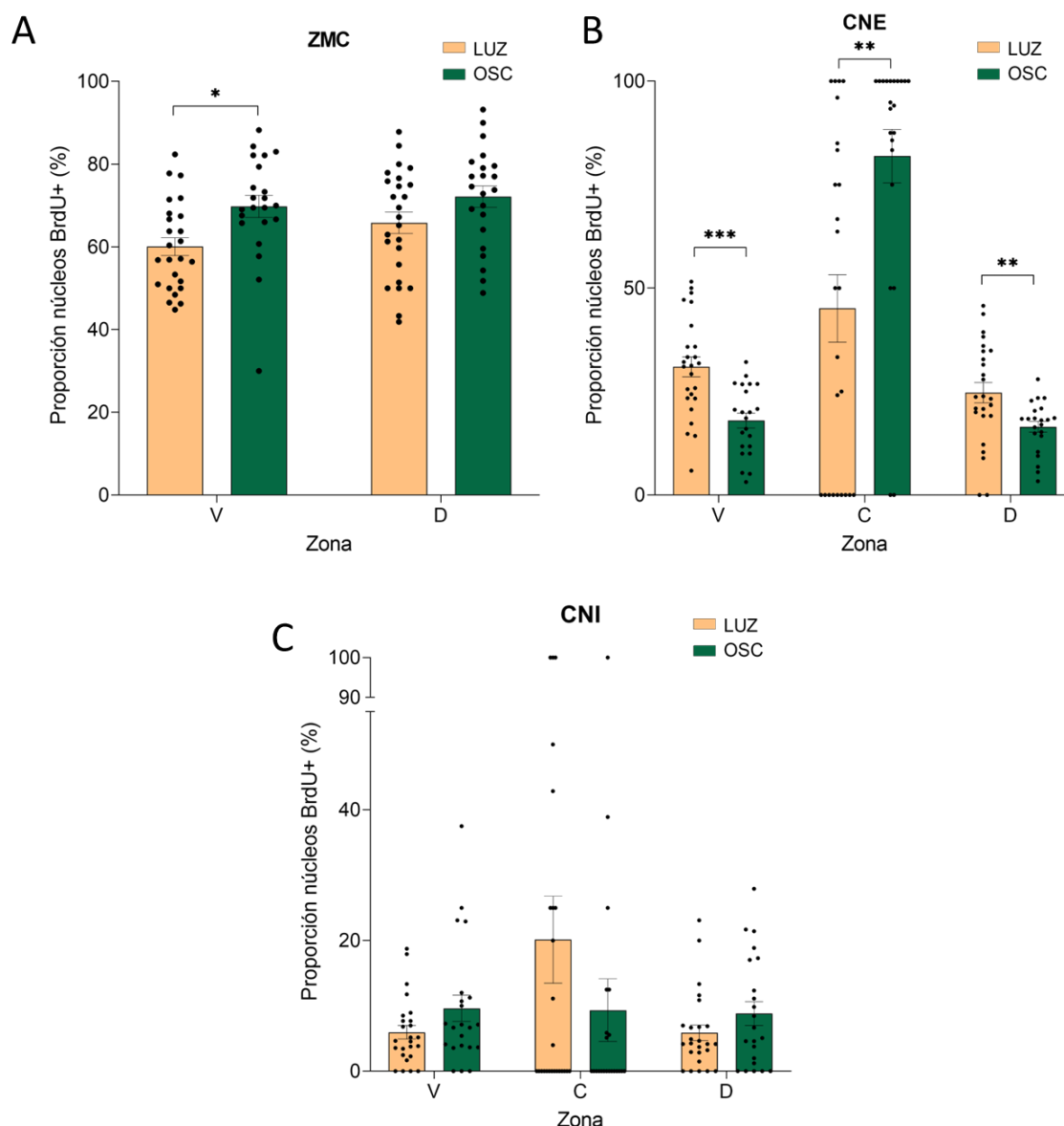


Fig. 26: Media $\pm$ SEM de la proporción de núcleos BrdU+ en relación a los núcleos totales para cada zona (ventral, central y dorsal). A) Se muestra la proporción de núcleos proliferativos BrdU+ para cada individuo para cada capa nuclear y ZMC en ambas condiciones. B) Se muestra la proporción de núcleos proliferativos BrdU+ de cada sección respecto al total para cada capa nuclear y ZMC en ambas condiciones. Las diferencias significativas ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) entre condiciones se indican con (*), (**), (***) , respectivamente. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad total, V: Ventral, C: Central, D: Dorsal.

DISCUSIÓN

En esta sección, nos hemos basado en la hipótesis específica de que, dada la información previamente descrita por nuestro grupo de trabajo, donde demostramos que la exposición a condiciones de oscuridad permanente durante 30 días aumenta la proliferación neural en la retina de *A. charrua*, postulamos aquí que el aumento de la proliferación celular puede ocurrir en periodos más cortos de tiempo de exposición a la oscuridad. Para trabajar sobre esta hipótesis, se han abordado en este capítulo los objetivos específicos 4 y 5.

La presencia de núcleos BrdU+ en la ZMC ha sido descrita en todos los peces estudiados. Sin embargo en la capas de la retina es menos frecuente encontrar células proliferantes en individuos adultos salvo en las adyacencias de la ZMC (Stenkamp, 2007). Por el contrario, en *A. charrua* hemos observado que la proliferación celular de las distintas capas se extiende a lo largo de toda la retina.

4.7 UBICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS NÚCLEOS BRDU+

Patrón de marcado de BrdU

Diferentes patrones de incorporación y marcado de BrdU+ podrían deberse a su incorporación en diferentes momentos de la fase de síntesis de ADN. A su vez, el tiempo de sobrevida post-inyección de BrdU empleado en estos experimentos (7 días) determina que puedan existir nuevas divisiones celulares luego de la incorporación del marcador, pudiendo “diluir” la intensidad de la señal (Mack & Fernald, 1997; Otteson et al., 2001). Por consiguiente, tanto debido al tiempo de sobrevida, como a la tasa de proliferación de la zona, pueden existir disminuciones en la intensidad de la fluorescencia observada (Mack & Fernald, 1997; Otteson et al., 2001). Por lo tanto, es posible inferir información acerca de la actividad proliferativa que ha experimentado un núcleo marcado. En relación a esto, Otteson et al. (2001) reportan que en experimentos con 10 días de sobrevida post aplicación de BrdU, observaron mayor variabilidad en la intensidad de la señal de BrdU en la retina de pez dorado en comparación con tratamientos más cortos. Esta variabilidad fue atribuida por los autores a una dilución de la marca debida a divisiones celulares continuadas.

La apariencia particulada o de menor intensidad observada en nuestros experimentos podría entonces deberse a múltiples divisiones celulares o un estado mitótico dada la presencia de cromatina condensada que pueda generar una apariencia particulada de la marca incorporada de BrdU. Este tipo de marcado fue observado sobre todo en la ZMC-Media, división de la ZMC descrita como una zona de alta presencia de figuras mitóticas y capacidad proliferativa (Berrosteguieta et al., 2022), indicando una importante actividad proliferativa de la retina de los ejemplares al momento de la eutanasia.

Como se esperaba, la CNE fue la capa nuclear en donde se constató la mayor cantidad de núcleos BrdU+ en cada condición. Esto es consistente con la actividad mitótica de los precursores de bastones ubicados en esta capa (Otteson et al., 2001; Stenkamp, 2007). Al igual que en el caso de la ZMC-Medial, y en concordancia con lo observado en esta capa en pez dorado (Otteson et al., 2001), tampoco existió homogeneidad en la intensidad y patrón de marcado de BrdU en la CNE. Es posible que, dada la alta actividad mitótica local en la CNE, en el tiempo de sobrevida, estos precursores hayan podido dividirse nuevamente además de comenzar su proceso de diferenciación a bastones. Los núcleos intensamente marcados observados en la CNE podrían entonces corresponder a bastones que ya se han diferenciado e integrado a la CNE o que se encuentran en proceso de diferenciación, habiendo captado BrdU en el momento de su última o una de sus últimas divisiones. De este modo, al no haber atravesado otras divisiones celulares, no sucederían procesos de dilución de la señal de BrdU (Mack & Fernald, 1995,

1997). Estos además presentaron morfología y posiciones basales en la CNE, correspondientes a las zonas predominantemente pobladas por bastones. Por otro lado, los núcleos con señales menos intensas o puntilladas, que presentaron morfologías más irregulares, podrían corresponder a células mitóticamente activas y muchas veces se ubicaron en zonas más apicales de la CNE.

Ubicación de los núcleos BrdU+

ZMC

La mayor parte de los núcleos BrdU+ fueron observados en la ZMC y zonas inmediatamente adyacentes a la ZMC. Esta distribución ha sido observada en otras especies (Julian et al., 1998) y se ajusta al crecimiento retinal posnatal por aposición de anillos concéntricos descrito en teleósteos (Stenkamp, 2007; Tsingos et al., 2019).

CCG y CNI

En este trabajo, se ha reportado también la presencia de núcleos BrdU+ en la CCG y CNI para ambas condiciones, no solo en las zonas adyacente a la ZMC, sino que en la retina central. Dado el corto tiempo de sobrevida postinyección de BrdU al que se han expuesto los animales y su ubicación en muchos casos alejada de la ZMC, resulta poco probable que las mismas hayan sido producidas en la ZMC.

Con esto en mente, cabe la posibilidad de que los núcleos BrdU+ observados en la CCG de la retina central, correspondan a células de la membrana limitante interna o a células gliales. Sin embargo, la localización y morfología de algunos núcleos podría ser indicativa de células neuronales ganglionares BrdU+.

Por otro lado, la morfología y ubicación de núcleos BrdU+ achatados observados en la CNI parecería corresponder a la de neuronas horizontales, si bien no puede descartarse la posibilidad de que se trate de células BrdU+ en proceso de migración hacia la CNE, correspondientes a núcleos BrdU+ de glías radiales o de microglías (Otteson et al., 2001).

De confirmarse que, en situaciones fisiológicas sin presencia de lesión, también pueden producirse nuevas neuronas en capas retinales por fuera de la CNE, esto constituiría una característica novedosa de la retina de peces anuales *A. charrua* ya que actualmente, es ampliamente aceptado que en condiciones fisiológicas sin lesiones, en la retina central se producen únicamente nuevos bastones (Lenkowski & Raymond, 2014; Otteson et al., 2001; Stenkamp, 2007). Esto sugeriría en *A. charrua* podrían generarse no solo fotorreceptores del tipo bastón en la vida adulta en la retina diferenciada, sino que los progenitores retinianos de la retina central poseerían capacidades multipotentes también en condiciones fisiológicas.

4.8 DIFERENCIAS ENTRE CONDICIONES DE LUZ ESTÁNDAR Y OSCURIDAD PERMANENTE

Relación entre tamaños corporales y retinales con la proliferación de la retina

Diferencias interindividuales en la proliferación celular de la retina han sido reportadas por otros autores, que han sido atribuidas en parte a diferencias individuales en las tasas de crecimiento, con mayores cantidades de células proliferativas en ejemplares con mayores tasas de crecimiento (Mack & Fernald, 1997; Otteson et al., 2001). Con esto en mente, se ha buscado determinar si este tipo de procesos podrían encontrarse en la base de las diferencias observadas entre condiciones de luz estándar y oscuridad constante, analizando la relación entre el tamaño corporal y la proliferación para

cada una de las condiciones. Si este fuera el caso, se esperaría que ambas regresiones presentaran los mismos parámetros. Por el contrario, se han observado diferencias entre los parámetros obtenidos para cada grupo.

Además, para evitar sesgos dados por tamaños del globo ocular se consideró un cociente de estos valores según el largo de la retina de cada sección. Los valores mayores en condiciones de oscuridad indican una mayor densidad de núcleos proliferativos.

El conjunto de estos resultados sugiere que los efectos observados frente a la condición de oscuridad permanente no se dan por diferencias en las dimensiones de los ejemplares de cada grupo, sino que las condiciones de luminosidad diferente influirían sobre la proliferación celular de la retina de forma diferencial.

Proliferación diferencial en la ZMC y capas nucleares de la retina neural

En concordancia con los resultados de la presente tesis, nuestro grupo (Berrosteguieta et al., 2022) ha reportado marcados efectos de condiciones de luminosidad reducida sobre la proliferación celular de la retina en el número total de núcleos BrdU+ en la cercanía a la ZMC. Sin embargo, en el trabajo de Berrosteguieta et al., no se ha analizado cuantitativamente discriminando las capas o regiones de la retina. A su vez, otros autores han observado diferencias en la respuesta proliferativa de la CNE y CNI frente a condiciones de luminosidad reducida (Lahne et al., 2019).

ZMC

En el caso de la ZMC, se detectó un efecto de la oscuridad en la cantidad y en la proporción que esta representó en la proliferación celular. Estos resultados indican que la proliferación de la ZMC es capaz de ser modulada a corto plazo por las condiciones lumínicas a las que los peces anuales se encuentran expuestos.

En contraste Ricatti et al. (2011) observaron un mayor ritmo proliferativo durante la fase de luz en la ZMC de pez cebra. Por otro lado, en salamandras, contrario a lo observado en esta tesis, un estudio ha reportado que en ejemplares juveniles disminuye la proliferación de la ZMC cuando son mantenidos en condiciones de oscuridad (Besharse & Brandon, 1976).

Sin embargo, en diferentes grupos de vertebrados, incluyendo aves (Fischer, 2011) y teleósteos (Becker et al., 2021; Vanhunsel et al., 2021), otros autores han demostrado que el crecimiento de la retina (y por lo tanto la proliferación de la ZMC) y el tamaño corporal se encuentran relacionados y finamente regulados para permitir un crecimiento armónico y coordinado de los diferentes tejidos. Existen numerosos reportes que prueban que la alteración de la experiencia visual, en particular de la intensidad lumínica, es capaz de alterar el crecimiento del ojo en la vida posnatal (Kröger & Fernald, 1994; Kröger & Wagner, 1996; Ramamurthy et al., 2015), afectando la proliferación celular en la periferia de la retina de aves (Fischer, 2011) e incluso de mamíferos (Tkatchenko et al., 2006; Tkatchenko et al., 2021). Por lo tanto, es posible que las condiciones de oscuridad constante, generen la activación de diferentes vías de crecimiento, generando un aumento de la producción de nuevas células por parte de la ZMC.

Capas nucleares

En la bibliografía, se reportan evidencias variadas sobre las consecuencias en ambientes de diferentes intensidades lumínicas sobre la proliferación celular de las capas nucleares de la retina.

Contrariamente a lo esperado, los valores de proliferación en oscuridad permanente en la CNE de *A. charrua* fueron menores sin diferenciar entre regiones. Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad de estos núcleos respecto al largo de la retina entre tratamientos. Al analizar esto entre las regiones dorsales, ventrales y centrales, se observaron valores menores en las proporciones representadas por la proliferación de la CNE en condiciones de oscuridad en las zonas cercanas a las zonas marginales ciliares pero mayores en la retina central.

A diferencia de lo observado en este trabajo, Lahne et al. (2019) reportaron una mayor proliferación de la CNE en *D. rerio* expuestos a condiciones de oscuridad constante por periodos similares a los aquí utilizados. Si bien utilizaron una estrategia experimental, con marcadores y tiempos de sobrevivencia, diferente a la de esta tesis que pueden generar mayores cantidades de células marcadas (Mack & Fernald, 1997), sus resultados sí se encuentran en línea con lo observado en la retina central de *A. charrua*, donde la CNE representó una mayor proporción de los núcleos BrdU+ en oscuridad.

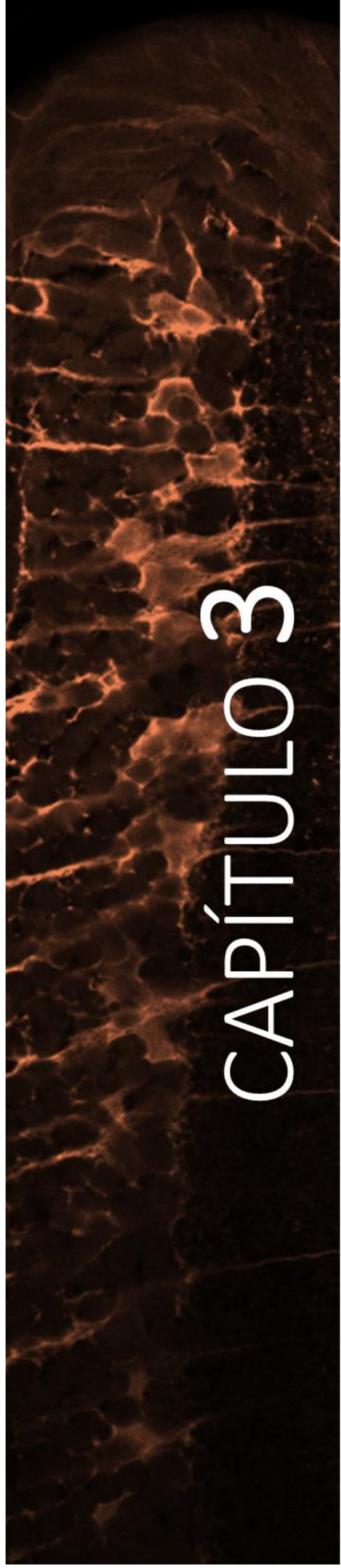
Teniendo en cuenta que se encuentra ampliamente descrito que la glía de Müller ubicada en la CNI es capaz de producir progenitores de bastones que migrarán hacia la CNE (Lenkowski & Raymond, 2014; Stenkamp, 2007), aumentos en la proliferación celular de esta capa en *A. charrua* sugieren una activación de procesos proliferativos de las mismas que podría derivar posteriormente en una mayor producción celular de bastones. Resulta llamativo que Lahne et al. (2019) no observaron diferencias en la proliferación celular de la CNI, por lo que postulan que las respuestas observadas en *D. rerio* frente a condiciones de oscuridad no serían mediadas por aumentos en la activación de procesos proliferativos de las glías de Müller o precursores de bastones en la CNI.

Raymond et al. (1988) demostraron que la exposición de hasta 8 meses a condiciones constantes de luz o de oscuridad permanentes en pez dorado no generaron consecuencias en las densidades de fotorreceptores, mientras que la exposición a condiciones de luz constante durante 12 meses generó una disminución en la densidad de bastones. A su vez, otros autores han demostrado la presencia de ritmos circadianos en los ritmos proliferativos de la retina de otros peces, incluyendo una mayor proliferación de células precursoras de bastones en el periodo de oscuridad en teleósteos (Chiu et al., 1995).

Es importante considerar que algunos de los autores que no reportan diferencias han utilizado condiciones de oscuridad permanente durante periodos prolongados de más de 200 días (Besharse & Brandon, 1976) o mayores a 8 meses (Raymond et al., 1988). Antecedentes de nuestro grupo de trabajo, han demostrado que la exposición de peces anuales *A. reicherti*, una especie evolutivamente cercana a *A. charrua*, a condiciones de oscuridad permanente durante periodos prolongados (hasta 4 meses) generaron una menor proliferación en estructuras de procesamiento encefálicas de la información visual y una mayor proliferación en el bulbo olfatorio, sugiriendo un proceso de compensación sensorial ante privación de la modalidad visual (Berrostequieta, 2021). Existe la posibilidad de que las diferencias observadas con los artículos antes mencionados correspondan efectos especie-específicos de la regulación de la proliferación como respuesta a la adaptación a la oscuridad. Sin embargo, estas podrían deberse a diferencias en el tiempo de exposición a la condición de oscuridad. Es posible, que exista un curso temporal con diferentes fases. Teniendo en cuenta la evidencia de mayor proliferación celular de la retina de *A. charrua* observada (1) ante 11 y 30 días de oscuridad permanentes (Berrostequieta et al., 2022), y (2) evidencias de disminuciones en la proliferación celular de estructuras visuales y compensación sensorial ante exposiciones prolongadas a oscuridad, podría existir un aumento inicial de la proliferación ligado a las necesidades funcionales de la visión escotópica frente a disminuciones de la iluminación, seguido de disminuciones en la energía utilizada en dicha modalidad y priorización de los recursos hacia otras modalidades. Como

perspectiva se plantea la realización de experimentos que aborden este fenómeno a modo de estudiar el curso temporal de las adaptaciones a la luminosidad disminuida en la retina de peces anuales.

En suma, nuestros resultados permiten postular que la actividad proliferativa es sensible a cambios lumínicos a corto plazo, aumentando la proliferación celular en la CNI y ZMC. Estos resultados evidencian fenómenos de plasticidad adaptativa, que serían beneficiosos dado el corto ciclo de vida, condiciones cambiantes de su entorno y la importancia de la modalidad visual en la reproducción de estos peces. Los aumentos en la proliferación celular podrían estar relacionados a aumentos en la producción de los elementos celulares involucrados en la visión a baja luminosidad: ante condiciones de oscuridad, existiría un aumento inicial de la proliferación en la CNI y ZMC, que a tiempos mayores (por ejemplo 30 días) permitiría una producción de progenitores en la CNE, y potencialmente, una génesis exacerbada de bastones.

A vertical strip on the left side of the slide features a fluorescence microscopy image. It shows a dense network of cells with bright orange-yellow staining, likely representing Müller cells in a retinal section. The background is dark, and the stained cells form a complex, interconnected pattern.

CAPÍTULO 3

Glía de
Müller
BLBP+

CAPÍTULO 3: LAS GLÍAS DE MÜLLER BLBP+

RESULTADOS

Con el fin de abordar los objetivos específicos 2 y 6, las secciones de las retinas de ambas condiciones fueron coincubadas con anticuerpos anti-BLBP junto con BrdU.

La señal de BLBP fue observada en las secciones de la retina de ambas condiciones lumínicas. Esta permite discernir la morfología radial de las glías de Müller, extendiéndose desde la membrana limitante externa, donde se observa una marcada presencia de BLBP en la CNE, hasta la membrana limitante interna por debajo de la CCG. En general, los somas de las células BLBP+ se encontraron en la zona basal de la CNI. La mayor expresión de esta proteína fue observada en las zonas adyacentes a la ZMC, disminuyendo a medida que se avanza hacia las zonas más centrales de la retina. A su vez, no se observó expresión clara de BLBP en la ZMC. Cabe destacar que, en muchos casos, la señal de BLBP claramente discernible del valor de fondo se extendió a distancias importantes, incluso al menos 600µm desde la ZMC (Fig. 27, Fig. 29).

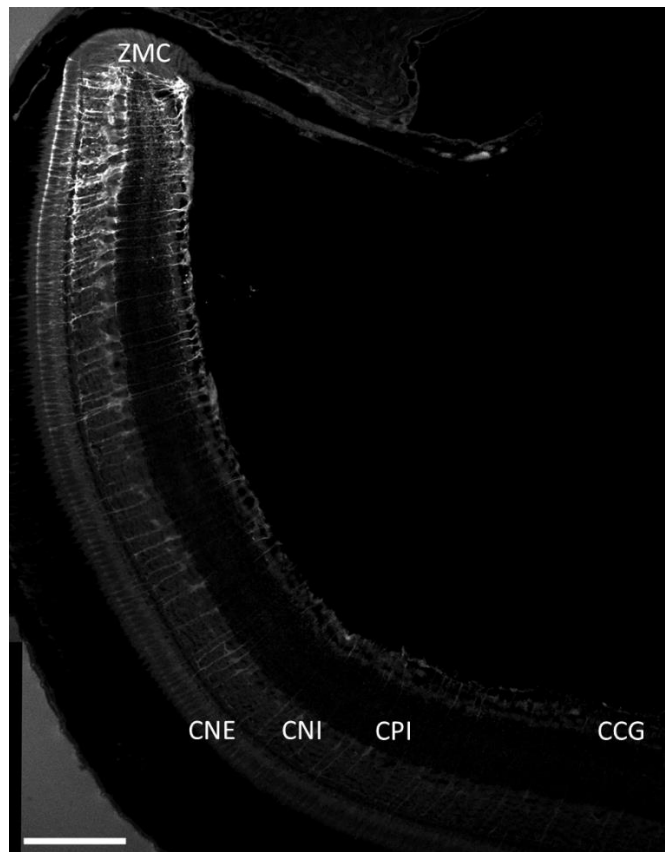


Fig. 27: Sección óptica obtenida mediante microscopía confocal donde se observa la localización de BLBP. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de las células ganglionares. Barra de calibración: 50µm

La coincubación con anticuerpos de BLBP y BrdU mostró algunas células BLBP+ marcadas también con BrdU+, indicando que las mismas habrían incorporado el marcador de proliferación (Fig. 28). Por otro lado, se observaron numerosas células BLBP+ que no mostraron expresión de BrdU y viceversa. Se

observaron también cúmulos de células BrdU+ en la cercanía de la ZMC, en contacto con una célula BLBP+ y BrdU+ (Fig. 28A-F).

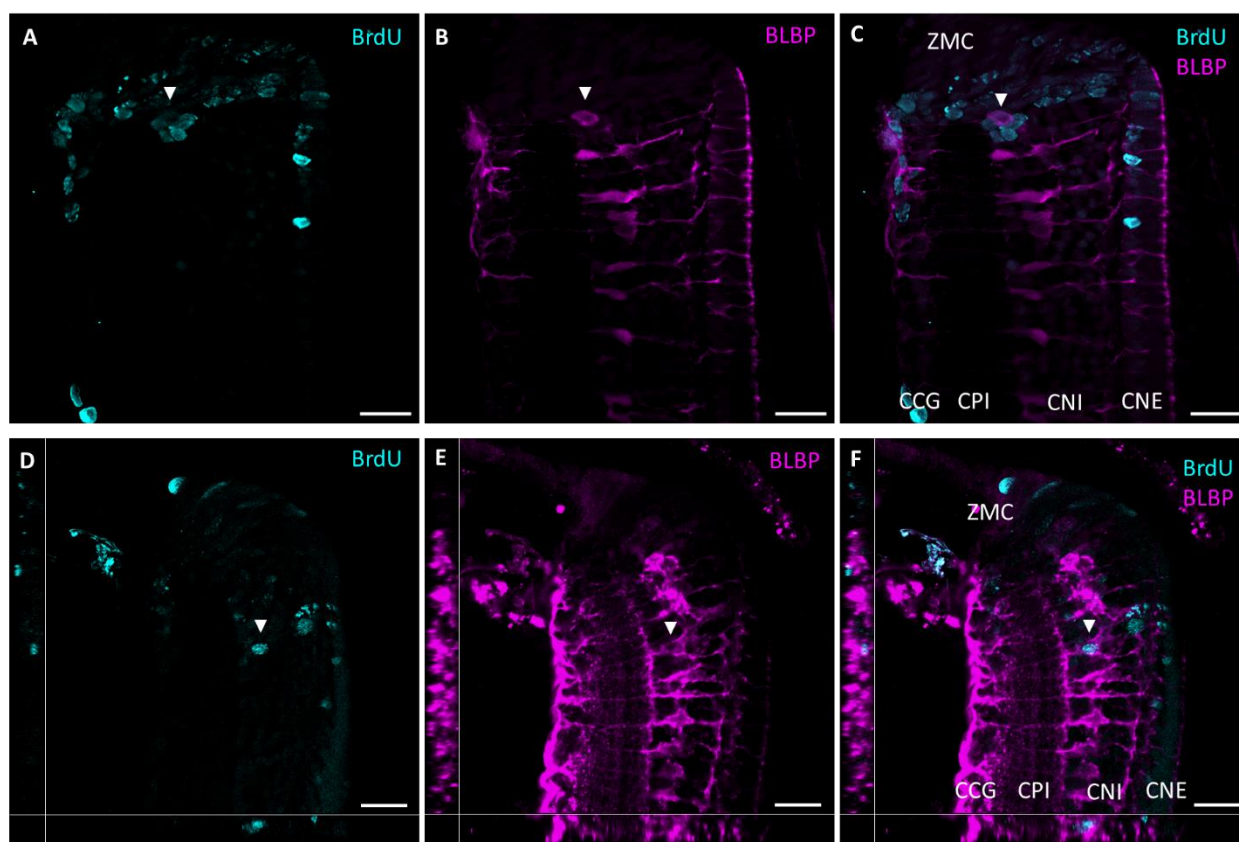


Fig. 28: Apilados (proyección de máxima intensidad) de microfotografías confocales de la retina. Se observa el revelado para BrdU (A,D), BLBP (B,E) y la superposición de canales (C,F) de la zona marginal ciliar y retina neural adyacente de dos secciones retinales de ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad permanente. Con cabeza de flecha se indica la presencia de células BLBP+ y BrdU+. En las imágenes inferiores (D-F), se muestran las proyecciones ortogonales del apilado de imágenes. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de las células ganglionares, LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Barra de calibración: 20µm.

Las secciones de ambas condiciones mostraron una posible mayor presencia de BLBP en condiciones de oscuridad. Para abordar esto de forma cuantitativa, en primer lugar, se ha cuantificado la intensidad de fluorescencia promedio de las zonas cercanas a la ZMC. Mediante el programa FIJI se han obtenido los datos de intensidad promedio fluorescencia para las zonas adyacentes a las ZMC de tres secciones por ejemplar para ambas condiciones. Estos datos fueron comparados mediante un test de Mann-Whitney, que no mostró diferencias significativas entre condiciones experimentales (Fig. 30).

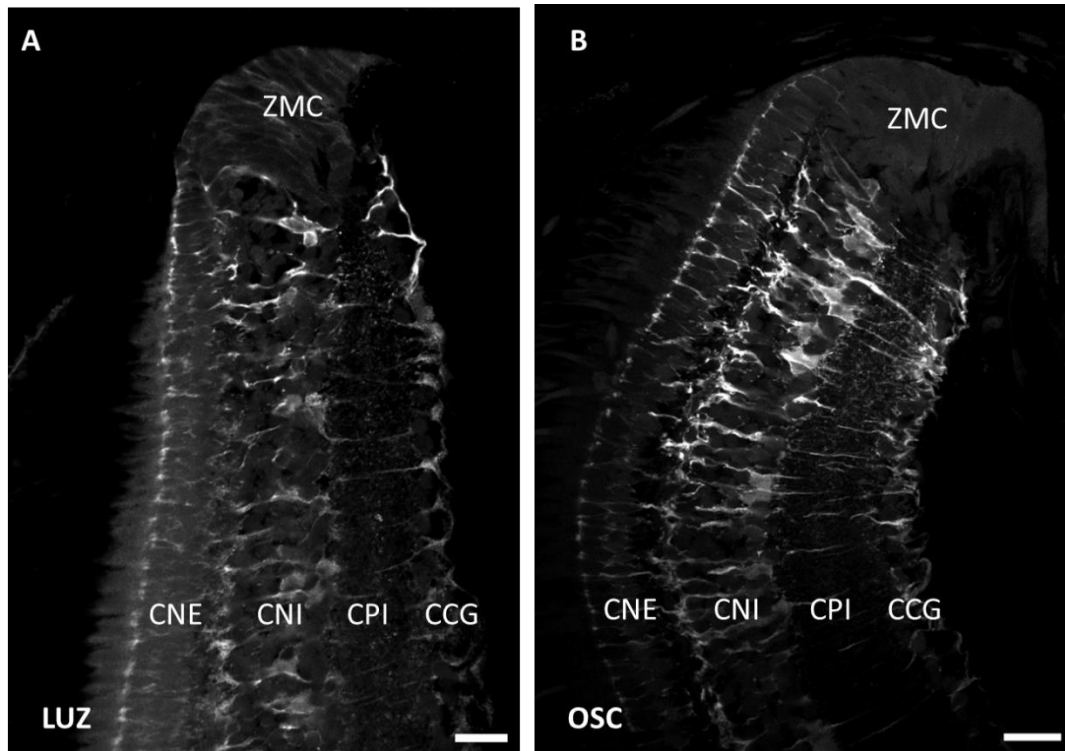


Fig. 29: Microfotografías confocales donde se observa la señal obtenida mediante inmunofluorescencia para BLBP de la zona marginal ciliar y retina neural adyacente de dos secciones retinales de ejemplares mantenidos en condiciones de ciclo de luz natural (A) y oscuridad permanente (B). ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: Capa plexiforme interna, CCG: Capa de las células ganglionares, LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente. Barra de calibración: 20μm.

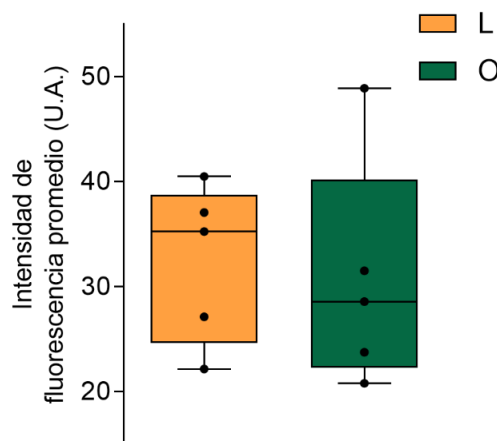


Fig. 30: Intensidad de fluorescencia de BLBP promedio de la zona cercana a la ZMC de las condiciones de ciclo de luz natural (L) y oscuridad permanente (O). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos por test de Mann-Whitney. U.A.: Unidades arbitrarias.

A su vez, se buscó obtener un análisis más detallado de la expresión de esta proteína en las secciones de retina de ambas condiciones. Para esto, se trazó una línea a lo largo de la CNI que atravesara la mayor parte de los somas de glías de Müller BLBP+. De este modo se obtuvieron los valores de intensidad de fluorescencia en función de la distancia a lo largo de la CNI. Estos valores fueron a su

vez graficados en función de la distancia desde el extremo periférico de la ZMC para cada una de las condiciones. En esta gráfica pueden observarse valores de intensidad menores en las zonas correspondientes a la ZMC. Por otro lado, se observa para ambas condiciones un aumento de la intensidad de fluorescencia en las zonas de la retina neural adyacentes a la ZMC. La misma, comienza a descender a medida que se avanza en la distancia hasta llegar a valores constantes. La comparación de las distribuciones en ambas condiciones fue comparada mediante test de Kolmogorov-Smirnov, el cual arrojó resultados significativos ($D = 0.32$, $p=0.0341$), por lo que hay diferencias significativas en la distribución de los datos. A su vez, se buscó determinar en qué puntos existieron diferencias entre condiciones mediante un test de t múltiple. Este mostró diferencias significativas entre condiciones en un único punto, a una distancia de aproximadamente $65\mu\text{m}$ de distancia, siendo los valores en condición de oscuridad mayores que en condición de luz ($p= 0.0002$) (Fig. 31).

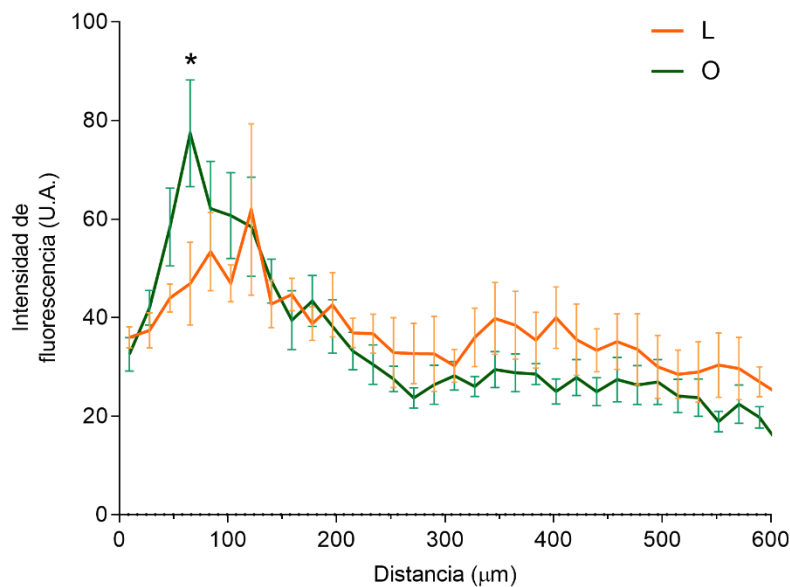


Fig. 31: Intensidad de fluorescencia de la señal de BLBP en función de la distancia desde la zona marginal ciliar (media + SEM) en condiciones de ciclo de luz natural (L) y oscuridad permanente (O). Con un asterisco se indican diferencias significativas entre las condiciones en el punto indicado calculadas por t test múltiple. U.A.: Unidades arbitrarias.

DISCUSIÓN

La expresión de BLBP en la retina de *A. charrua* de ambas condiciones mostró una gran extensión a lo largo de la mayor parte de la retina, incluso hasta 600 μm . Previamente, nuestro grupo ha descrito una expresión también muy extendida de BLBP, con un claro predominio de la expresión en las zonas cercanas de la ZMC hasta $\sim 200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$, decreciendo hacia el centro de la retina (Berrosteguieta et al., 2022). Esta mayor expresión por lo tanto fue observada también en las zonas en donde se constataron los mayores números de núcleos proliferativos, principalmente en la CNI, consistente con la naturaleza de BLBP como marcador de células de la glía de Müller relacionado a su identidad de célula madre/progenitor y multipotencialidad (Lenkowski & Raymond, 2014).

Previamente se ha demostrado que las células gliales de Müller pueden someterse a procesos de reprogramación para readquirir un estado de células madre/progenitoras, lo que les permite proliferar y generar nuevas neuronas frente a lesiones en la retina, un proceso que es más común en los peces que en los mamíferos (Bernardos et al., 2007; Fausett & Goldman, 2006; Gorsuch et al., 2017; Raymond et al., 2006; Sherpa & Hui, 2021). Diferentes factores han sido relacionados a la identidad, mantenimiento y activación de las células madre/progenitoras del sistema nervioso, y en particular, de las glías de Müller en la retina (Arai, 2005; Bernardos et al., 2007; Feng et al., 1994; Lenkowski & Raymond, 2014; Lust & Wittbrodt, 2018; Mercurio et al., 2019; Raymond et al., 2006; Reinhardt et al., 2015; Su et al., 2016; Thummel et al., 2010). En particular en la retina de pez cebra, BLBP se expresa en glías de Müller inmaduras y reactivadas (Raymond et al., 2006) y su expresión es rápidamente aumentada frente a lesiones retinales, acompañando la desdiferenciación y reentrada de las glías de Müller en el ciclo celular (Bernardos et al., 2007; Fausett & Goldman, 2006; Nagashima et al., 2013; Raymond et al., 2006). Esto ha llevado a otros autores a postular que la proteína BLBP podría tener un rol importante, pero todavía inexplorado en la regeneración retinal, no solo en la desdiferenciación de las glías de Müller, pero en la regulación del ciclo celular, sobrevivencia y destino celular durante la regeneración (Lenkowski et al., 2013). Por lo tanto, la constatación de diferencias en la señal de BLBP en la retina de ejemplares de *A. charrua* mantenidos en condiciones de oscuridad, podría encontrarse relacionados a la activación de la desdiferenciación y proliferación de glías de Müller, posiblemente contribuyendo a su activación y así a la producción de nuevos fotorreceptores frente a condiciones de luminosidad disminuida, posiblemente a través de procesos con aspectos en común a los observados en fenómenos regenerativos.

La expresión de BLBP en las glías de Müller durante la regeneración aumenta de manera muy rápida frente a lesiones de la retina (Nagashima et al., 2013), manteniéndose elevada durante 14 días hasta disminuir luego de 28 días postlesión (Lenkowski et al., 2013). Consistentemente, en esta tesis, se ha observado un aumento de la presencia de BLBP a 11 días de tratamiento de oscuridad. Sin embargo, no se ha abordado el estudio de cambios en su expresión en experimentos con otras ventanas temporales de exposición a oscuridad permanente, por lo que este tipo de abordajes podría contribuir a continuar comprendiendo aspectos en común entre fenómenos reparativos y adaptativos.

A su vez, la expresión y número de glías BLBP+ previamente reportada para *A. charrua*, e incluso en mayor medida la aquí observada, es considerablemente más extendida que la reportada para otras especies, como pez cebra (Berrosteguieta et al., 2022). En otros contextos, se ha descrito que las células madre neurales BLBP+ de la zona subventricular del encéfalo de teleosteos (Rosillo et al., 2016a) y roedores se dividen más frecuentemente, y que disminuciones de su expresión en cerebro humano y murino estarían relacionadas a la quiescencia observada a medida que la edad aumenta (Giachino et al., 2014). Por lo tanto, surge la interrogante, de si mayores niveles de expresión de BLBP,

así como de otros marcadores de células madre/progenitoras, en la retina de *A. charrua*, podrían también corresponder a capacidades proliferativas adaptativas y regenerativas más exacerbadas.

En suma, estos resultados sugieren que una mayor expresión de BLBP en la CNI en condiciones de oscuridad, podría estar relacionada a los mayores niveles de proliferación observados también en la CNI de la retina de ejemplares de oscuridad permanente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El conjunto de datos aquí presentados permite postular que el sistema visual, en particular las capacidades proliferativas de la retina de peces anuales *A. charrua*, se adapta rápidamente, aumentando la proliferación celular de la retina neural frente a condiciones lumínicas de baja intensidad u oscuridad.

La comunicación visual es usada ampliamente en invertebrados y vertebrados para transmitir información crucial sobre la identidad, el estado reproductivo y el sexo de coespecíficos. El uso de información visual de importancia en las interacciones sociales, la capacidad de detectar de manera óptima estas señales es de extrema importancia. En peces anuales, las evidencias de que las señales visuales jueguen un papel importante durante las interacciones reproductivas (Passos et al., 2015), sugieren que la adaptación de esta modalidad será crucial para el éxito reproductivo de esta especie y que por lo tanto esta deba ser rápida, dado el corto ciclo de vida de estas especies. Previamente, hemos reportado una respuesta adaptativa de la proliferación celular de la retina neural de *A. charrua* ante condiciones de oscuridad permanente durante 30 días. El corto ciclo de vida de estos peces determina que ese periodo de tiempo constituya una porción importante del tiempo total de vida. En la presente tesis, se ha demostrado que estos cambios pueden producirse de forma más rápida, utilizando tiempos experimentales menores para comprender en mayor medida los marcos temporales de estas respuestas dadas sus condiciones ecológicas.

Si bien los abordajes metodológicos no permiten determinar el destino de las células proliferantes, los resultados observados sobre los cambios de la proliferación celular de la retina demuestran cómo una determinada modalidad sensorial es capaz de responder, y por lo tanto adaptarse a cambios del ambiente. En este caso, estas adaptaciones posiblemente se relacionen con una mayor proliferación de células especializadas como los fotorreceptores para hacer frente a las nuevas condiciones lumínicas. Es así, que estos resultados resaltan cómo la proliferación celular, y posiblemente la neurogénesis, puede responder ante las necesidades funcionales de los organismos y cumplir así un rol adaptativo. En estos organismos, la inversión energética necesaria para la plasticidad del sistema visual podría constituir una parte importante de la inversión energética necesaria para el mantenimiento de la función reproductiva a pesar del deterioro de las condiciones ecológicas a las que se enfrentan estos organismos (Passos et al., 2021).

Las evidencias presentadas en este trabajo abren nuevas interrogantes acerca de los mecanismos involucrados en respuestas mediadas por neurogénesis adaptativa. La proliferación celular observada en todas las capas retinales, así como la expresión de BLBP aumentadas en condiciones de oscuridad, aspectos en común con procesos de lesión y regeneración, podrían indicar mecanismos compartidos entre ambos procesos. Estudios con diferentes paradigmas de lesión, han demostrado la activación de diferentes vías de señalización necesarias para la correcta producción de las neuronas retinales dañadas (Bernardos et al., 2007; Gorsuch et al., 2017; Lenkowski & Raymond, 2014; Raymond et al., 2006; Sherpa & Hui, 2021; Stenkamp, 2007). Por otro lado, también se ha destacado cómo la presencia de daño sobre los fotorreceptores podría producir fuertes señales de activación de procesos reparativos (Lenkowski & Raymond, 2014; Stenkamp, 2007). Por consiguiente, resulta interesante continuar explorando cómo cambios en los estímulos visuales, en particular en la intensidad lumínica, y por lo tanto en la actividad de los fotorreceptores, podrían influir sobre la regulación de la proliferación de células madre y progenitoras.

A su vez, es posible que también se activen procesos relacionados a alteraciones de ritmos circadianos de proliferación y crecimiento. Se ha demostrado con anterioridad que las células madre y

progenitoras de la retina son capaces de responder a diferentes factores de crecimiento (Becker et al., 2021; Zygar et al., 2005), y que diferencias en la experiencia visual son capaces de estimular el crecimiento ocular (Kröger & Fernald, 1994; Kröger & Wagner, 1996; Ramamurthy et al., 2015). De hecho, incluso se ha demostrado que los conos son capaces de producir factores como IGF-1 y que este es capaz de estimular la proliferación de precursores de bastones, y posiblemente de la ZMC, en la retina de teleósteos. Llamativamente, esta producción de IGF-1 posee un ritmo circadiano en el que se producen mayores niveles de IGF-1 durante la noche (Zygar et al., 2005). Adicionalmente, otros autores han determinado que los aumentos en la proliferación de precursores de bastones observados en peces cebra adaptados a la oscuridad se dan de forma dependiente de IGF (Lahne et al., 2019). Por lo tanto, resulta interesante continuar ahondando en qué factores podrían mediar las respuestas observadas frente a oscuridad, siendo IGF uno de los posibles candidatos.

En este trabajo se ha identificado por primera vez en la retina de peces anuales, una población de células con características individuales diferenciadas en la CNE, que podrían corresponder a los precursores de bastones que allí residen y podrían estar involucrados en la generación de respuestas plásticas y adaptación al ambiente lumínico. Esta identificación inicial, permitirá continuar ahondando en su dinámica y regulación para comprender en mayor profundidad sus implicancias funcionales.

En la Fig. 32 se resumen los resultados obtenidos en esta tesis.

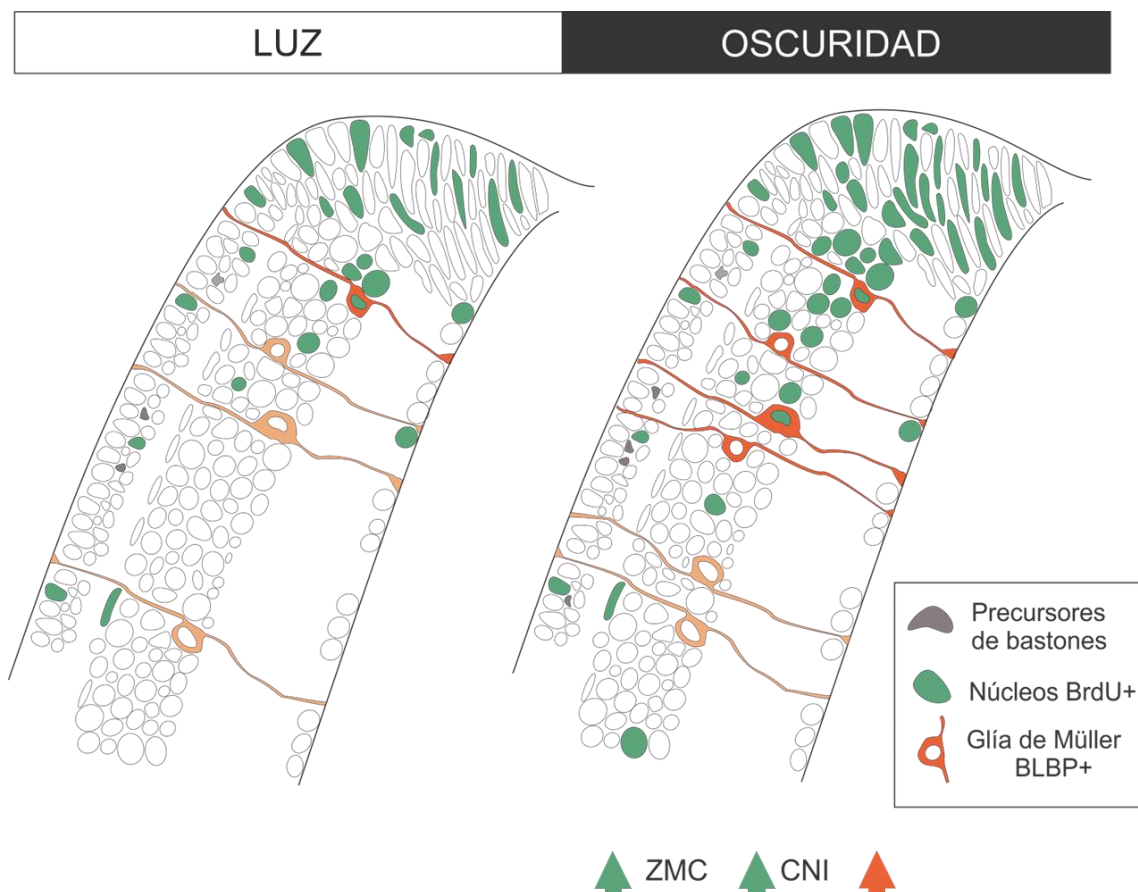


Fig. 32: Resumen de los principales resultados obtenidos. Se indican en la parte inferior derecha las principales diferencias observadas en las retinas de los ejemplares mantenidos en condiciones de oscuridad (mayor proliferación celular en la ZMC y CNI), así como mayor intensidad de señal de BLBP.

Conclusiones

El análisis por microscopía electrónica de transmisión y microscopía óptica permitió identificar un tipo celular que podría corresponder a los precursores de bastones en la capa nuclear externa de la retina de *A. charrua*.

Los tiempos utilizados en el presente trabajo (tiempo total de exposición a oscuridad permanente de 11 días) demuestran que la proliferación celular de la retina neural en *A. charrua* es capaz de responder rápidamente ante cambios en la luminosidad del ambiente. Junto a los antecedentes previamente reportados en esta especie, estos resultados demuestran que la proliferación celular de la retina de *Austrolebias charrua* es capaz de responder tanto a corto (11 días) como a más largo plazo (30 días) frente a cambios en el ambiente lumínico. A corto plazo, ante condiciones de oscuridad, existiría un aumento de la proliferación en la CNI y ZMC. A tiempos mayores (30 días), estos aumentos iniciales podrían permitir una mayor proliferación de la CNE, que podría generar una mayor producción de nuevos bastones. El análisis de la presencia de BLBP sugiere que este aumento de la proliferación en la CNI concuerda con una activación de la glía de Müller que dará origen a distintos tipos celulares de la retina, incluyendo los precursores de los bastones. Estas evidencias podrían sugerir que la activación de la glía de Müller no solo mediaría respuestas reparativas frente a daño, sino que tendría un rol central en fenómenos de plasticidad adaptativa.

La importancia de comprender estos fenómenos radica también en profundizar en aspectos adaptativos, pero también reparativos de la retina, más allá de las implicancias adaptativas en peces anuales.

PERSPECTIVAS

Las conclusiones que se desprenden de este trabajo abren las puertas a numerosas nuevas interrogantes sobre procesos de plasticidad adaptativa en la retina, y en el sistema nervioso en general, de especies del género *Austrolebias*.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de los cambios en la proliferación celular, la citoarquitectura y la expresión de BLBP en la retina frente a disminuciones de la intensidad lumínica.

Los datos aquí recabados ponen de manifiesto la necesidad de continuar indagando acerca de la identidad de la población de células precursoras de la CNE, así como de sus mecanismos y dinámica de activación. Se plantea como estrategia poner a punto técnicas de inmunomicroscopía electrónica para detectar marcadores de proliferación y vinculados a células madre/progenitoras. A su vez, en este trabajo no se ha abordado la presencia, identificación y caracterización de precursores de bastones de la CNI, por lo que el estudio de los mismos se beneficiaría de utilizar este tipo de estrategias. Una vez caracterizados en mayor profundidad, podríamos abordar su dinámica proliferativa para comprender si existen cambios en la cantidad en que son producidos o en los que estos se dividen en diferentes tipos de condiciones, incluyendo diferentes tiempos de oscuridad permanente.

Consideramos además que el estudio de posibles cambios relacionados a la activación de las glías de Müller podría beneficiarse ampliamente de la utilización de técnicas complementarios de cuantificación de la expresión de diferentes factores con Western Blot y qPCR.

Cabe destacar que la naturaleza neuronal de las células antes descritas en la CCG y CNI no ha podido ser confirmada, dado que no se han efectuado experimentos con coincubación de marcadores de estirpe celular. Se sugiere por lo tanto como aproximación utilizar marcadores neuronales y gliales para determinar el destino de las estas células proliferativas. Resultaría interesante utilizar técnicas de trazado de linajes para identificar el tipo, ubicación y dinámica de producción de diferentes tipos celulares en la ZMC y retina central.

Una de las principales perspectivas de este trabajo es continuar estudiando esta temática de forma comparativa, incluyendo especies modelo como pez cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*). El estudio sistemático, comparativo y con una perspectiva traslacional de la proliferación del sistema nervioso al servicio de la plasticidad adaptativa y reparativa permiten abordar y evidenciar los mecanismos conservados evolutivamente (Lindsey et al., 2018a; Stenkamp, 2007). Responder a estas preguntas en diferentes modelos incluyendo los peces anuales se ha planteado como el objetivo principal a ser abordado en mi trabajo experimental doctoral.

ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE CUANTIFICACIÓN DE NÚCLEOS PROLIFERATIVOS BrdU+

En este apartado se incluyen aspectos relacionados a al análisis estadístico de los datos de cuantificación de núcleos proliferativos BrdU+.

6.1 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra para cuantificación y análisis estadístico de núcleos proliferativos BrdU+

Como criterio para la elección de los cortes para la cuantificación de los núcleos BrdU+, se buscó fotografiar seis secciones mediales del ojo como se ha descrito en la sección de metodología. Con este criterio se obtuvieron las fotografías de secciones de seis ejemplares para la condición de ciclo de luz natural y siete para la de oscuridad permanente. El número de cortes en condiciones para su cuantificación por cada ejemplar se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Tabla 1: Cantidad de cortes cuantificados en la muestra para cada condición. Se indica la cantidad de ejemplares para los cuales se obtuvieron las determinadas cantidades de cortes. LUZ: Condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente

LUZ		OSC	
Nº de ejemplares	Nº de cortes por ejemplar	Nº de ejemplares	Nº de cortes por ejemplar
4	6	4	6
1	4	1	5
1	3	1	3
		1	2

De este modo, para el caso de la condición de ciclo de luz natural, se contaron 2777 núcleos totales para los 31 cortes analizados, mientras que para oscuridad permanente se cuantificaron 2783 núcleos en 34 cortes.

A partir de estos datos se comenzó con un análisis exploratorio. En primer lugar, se graficaron los núcleos totales por corte en cada condición (Fig. 33A) y el número promedio de núcleos totales por cada ejemplar (Fig. 33B). A partir de la representación gráfica, puede observarse que uno de los animales analizados para el grupo luz y dos del grupo oscuridad (cuyos datos se muestran en gris en las Fig. 33A,B) presentaron un número de núcleos menor que el resto de los animales, por lo que estos datos no fueron considerados para el análisis subsiguiente. Por lo tanto, se continuó el análisis de los datos de cinco animales para cada condición (25 cortes para condición de ciclo de luz constante, 22 para la condición de oscuridad permanente, ver

Tabla 3 para el número de cortes por ejemplar).

Adaptación a la oscuridad de la retina de peces anuales *A. charrua*

Tabla 3: Cantidad de cortes cuantificados en la muestra para cada condición luego de eliminar dos ejemplares de los datos a analizar. Se indica la cantidad de ejemplares para los cuales se obtuvieron las determinadas cantidades de cortes. LUZ: Condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente

LUZ		OSC	
Nº de ejemplares	Nº de cortes por ejemplar	Nº de ejemplares	Nº de cortes por ejemplar
3	6	2	6
1	4	1	5
1	3	1	3
		1	2

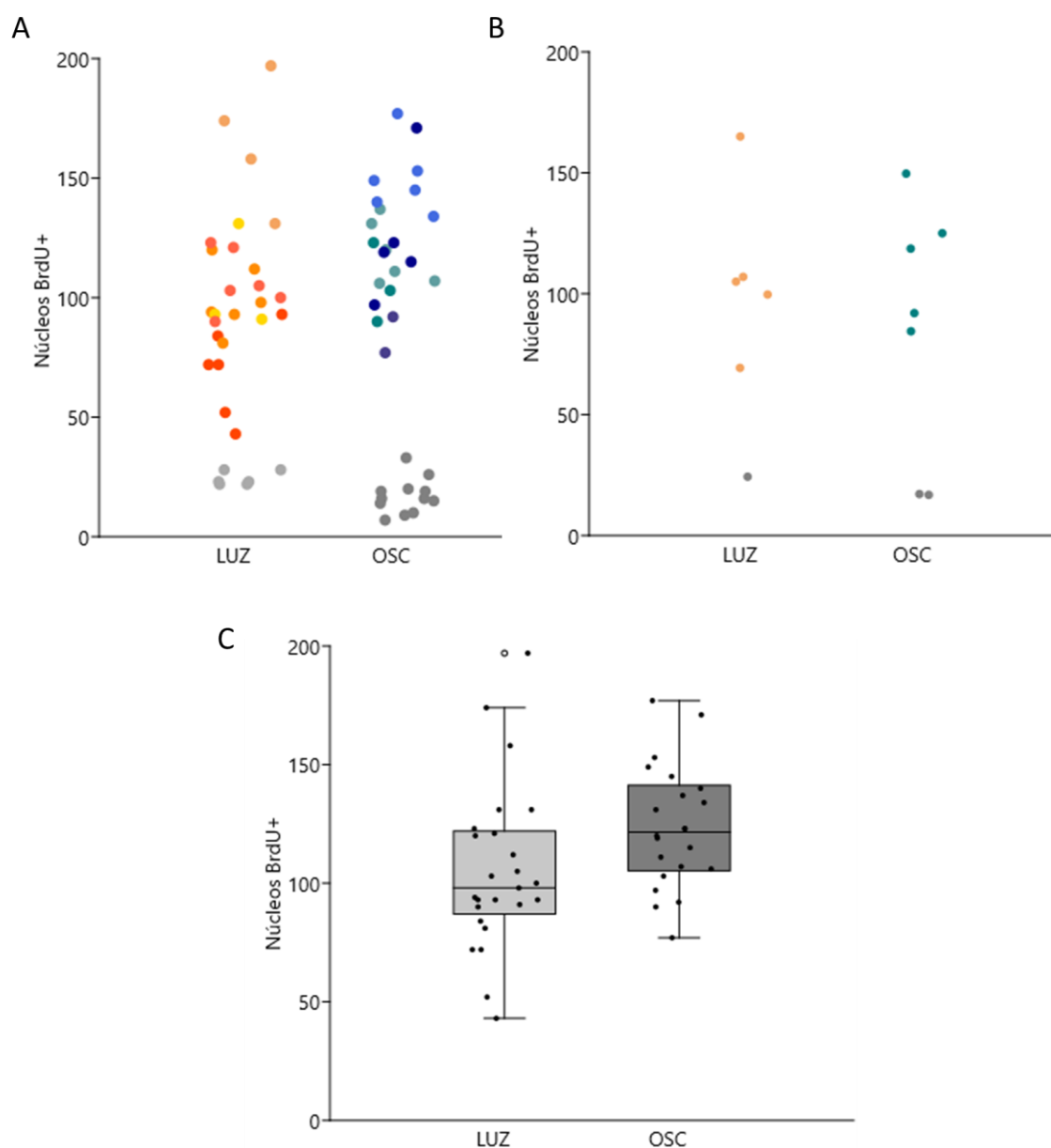


Fig. 33: Gráfica de dispersión de la cantidad de núcleos BrdU+ totales (suma de núcleos de todas las capas y zona marginal ciliar) por corte en cada condición. Se indican los datos correspondientes a un mismo animal con el mismo color, mientras que los datos de los animales cuyos datos no fueron considerados en los análisis subsiguientes se indican en gris. B) Gráfica de dispersión del número de núcleos BrdU+ totales (media por sección para cada individuo). Se indica en gris los datos de los animales que no fueron considerados en los análisis posteriores. C) Boxplot de los datos de núcleos BrdU+ por cada corte en condición LUZ y OSC luego de depurar la muestra. Los datos considerados como *outliers* se indican con un círculo blanco. LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente.

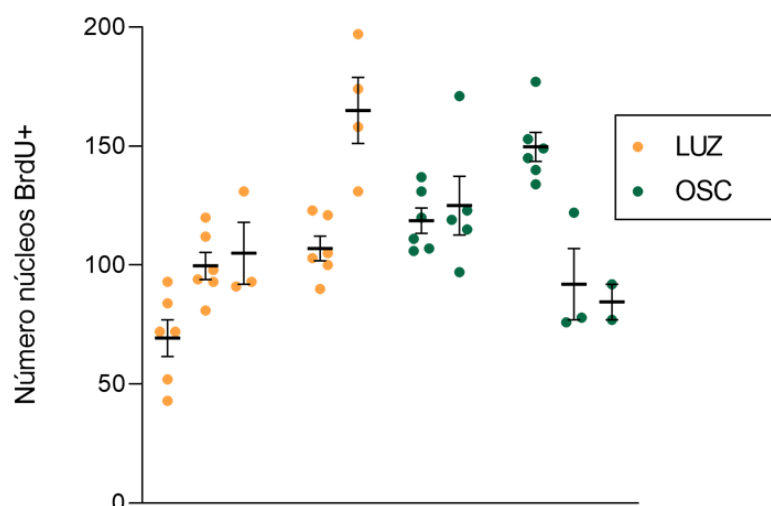


Fig. 34: Número de núcleos BrdU+ totales por sección para cada ejemplar mostrado como los valores de cada sección, con la sobreposición de la Media $\pm$ SEM para cada ejemplar. Se indica en un mismo color las condiciones de LUZ y OSC. LUZ: condición de ciclo de luz natural, OSC: condición de oscuridad permanente.

Datos atípicos

A continuación, se procedió a analizar los datos restantes para estudiar la existencia de datos atípicos para determinar si fuera necesario excluir más valores.

Se aplicaron los test de Dixon y Grubb para detección de datos atípicos (Tabla 4). Teniendo en cuenta que ambos arrojaron resultados no significativos, se optó por continuar el análisis de los datos incluyendo todos los datos.

Tabla 4: Estadísticos de test de Dixon y Grubb para detección de datos atípicos. TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad permanente. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p < 0.05$).

test		TOT L	TOT O	test		TOT L	TOT O
Grubb	G	2.633	2.07	Dixon	Q	0.312	0.1974
	p	0.1128	0.6668		p	0.2912	0.7255

Estadística descriptiva

Luego, se calcularon los estadísticos descriptivos para los datos de cuantificación totales para cada condición, así como para las diferentes capas y ZMC. En primer lugar, se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos como promedio de núcleos por sección para cada individuo (Tabla 5). A continuación, se muestran los valores de estadísticos descriptivos obtenidos utilizando los valores de núcleos BrdU+ para cada corte (Tabla 6, Fig. 35).

Adaptación a la oscuridad de la retina de peces anuales *A. charrua*

Tabla 5: Estadística descriptiva para cada uno de los diferentes grupos planteados. Se utilizaron para esto los promedios por sección para cada individuo. TOT: cantidad total de núcleos; ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

	TOT L	TOT O	ZMC L	ZMC O	CNE L	CNE O	CNI L	CNI O	CCG L	CCG O
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Min	69.33	84.50	30.17	42.67	25.33	18.40	2.50	4.17	0.50	0.78
Max	165.00	149.67	104.25	100.67	49.50	29.76	8.50	18.33	6.67	8.33
Sum	546.00	569.83	323.58	362.70	172.67	113.77	33.67	60.17	12.25	16.16
Mean	109.20	113.97	64.72	72.54	34.53	22.75	6.73	12.03	2.45	3.23
Std. error	15.52	11.77	12.08	10.91	4.49	2.06	1.09	2.62	1.13	1.33
Variance	1204.09	692.28	729.72	595.42	100.83	21.29	5.99	34.35	6.37	8.80
Stand. dev	34.70	26.31	27.01	24.40	10.04	4.61	2.45	5.86	2.52	2.97
Median	105.00	118.67	67.00	75.20	29.83	20.49	7.17	11.50	1.67	2.40
25 prcnil	84.50	88.25	41.58	48.08	26.67	19.26	4.83	6.58	0.58	1.23
75 prcnil	136.00	137.33	86.71	95.67	44.75	27.38	8.42	17.75	4.71	5.65
Skewness	1.09	0.25	0.40	-0.15	0.97	1.03	-1.88	-0.27	1.59	1.82
Kurtosis	2.54	-1.15	1.12	-2.14	-0.56	-0.09	3.74	-1.45	2.52	3.62
Geom. mean	105.08	111.53	59.92	69.02	33.45	22.40	6.19	10.63	1.59	2.39
Coeff. var	31.78	23.09	41.74	33.64	29.08	20.28	36.36	48.71	102.99	91.80

Tabla 6: Estadística descriptiva para cada uno de los diferentes grupos planteados. TOT: cantidad total de núcleos; ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

	TOT L	TOT O	ZMC L	ZMC O	CNE L	CNE O	CNI L	CNI O	CCG L	CCG O
N	25	22	25	22	25	22	25	22	25	22
Min	43	77	17	35	13	6	1	0	0	0
Max	197	177	116	124	67	67	19	34	13	9
Sum	2631	2720	1532	1759	853	604	160	251	63	62
Mean	105.24	123.64	61.28	79.95	34.12	27.45	6.40	11.41	2.52	2.82
Std. error	6.97	5.50	5.08	4.93	2.55	2.85	0.85	1.65	0.66	0.58
Variance	1214.11	664.81	645.88	533.86	162.19	178.64	18.17	60.25	11.01	7.30
Stand. dev	34.84	25.78	25.41	23.11	12.74	13.37	4.26	7.76	3.32	2.70

Median	98.00	121.50	61.00	82.50	33.00	26.00	5.00	10.00	1.00	2.50
25 prcntil	87.00	105.25	41.50	58.50	24.50	20.25	4.00	6.75	0.00	0.75
75 prcntil	122.00	141.25	74.50	97.25	42.00	34.25	7.50	14.75	3.50	4.25
Skewness	0.84	0.32	0.45	-0.32	0.62	1.03	1.49	1.13	1.87	1.04
Kurtosis	1.24	-0.25	-0.10	-0.38	0.35	2.60	2.16	2.31	3.31	0.60
Geom. mean	99.85	121.07	55.87	76.26	31.84	24.17	5.24	0.00	0.00	0.00
Coeff. var	33.11	20.85	41.47	28.90	37.33	48.68	66.60	68.04	131.67	95.86

A continuación, se procedió a analizar la variabilidad de los datos. Estos poseen varianzas altas. En cuanto a los coeficientes de variación (CV), se constató que existe una importante variabilidad de este valor entre grupos. Los grupos TOT O y ZMC O presentan CV menores a 30%, por lo que se trata de datos poco variables. Por otro lado, los grupos TOT L, ZMC L, CNE L y CNE O presentan CV que se encuentran entre el 30 y 60%, por lo que corresponden a datos variables, mientras que los datos de los grupos CNI L, CNI O, CCG L y CCG O presentan coeficientes de variaciones mayores a 60%, por lo que se clasifican como datos muy variables.

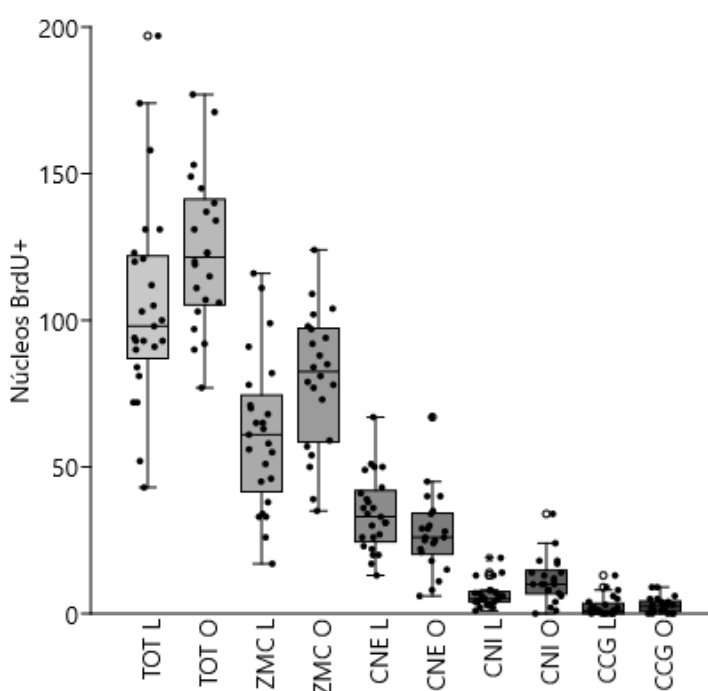


Fig. 35: Datos de conteo de núcleos proliferativos BrdU+, mostrados para cada uno de los diferentes grupos planteados. Se indican los datos atípicos con círculos blancos. TOT: cantidad total de núcleos; ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

De acuerdo con los datos obtenidos por estadística descriptiva, en todos los grupos de datos tanto la media como la mediana posee un valor mayor en el tratamiento de oscuridad, excepto en el caso de la CNE (Test estadísticos presentes en sección Resultados).

Número de datos óptimo

A continuación, se procedió a calcular la cantidad de datos óptimo para cada muestra, para así determinar la representatividad de la muestra utilizada y los valores de errores manejados con el número de ejemplares utilizado. Para esto se ha utilizado la siguiente fórmula (Zar, 2014):

$$\hat{n}_{op} = \left(\frac{\hat{s}_{n-1} \cdot t_{(n-1; \alpha)}}{d} \right)^2$$

Siendo:

$\hat{s}_{n-1}$ el desvío típico (que se indica en la tabla anterior obtenida del programa Past como Stand dev.)

$t_{(n-1; \alpha)}$ el estadístico de Student con n-1 grados de libertad y $\alpha=0.05$

d error dispuesto a admitir por el investigador en la estimación de la media

Utilizando los valores medios por sección para cada ejemplar (n=5), en la Tabla 7 se indican los valores de n óptimo para cada grupo según el valor del error dispuesto a admitir (d). Puede notarse que, en el caso de todas las muestras, el n utilizado indicaría que el error podría encontrarse entre el 1 y 10 %, es decir, que podría esperarse que el error que se está manejando con este tamaño de muestra se encuentre en este entorno.

Tabla 7: Valores de n óptimo calculados para cada grupo según los diferentes valores de error en la estimación de la media utilizando un rango de valores entre 0-100(d) utilizando los valores medio por sección para cada ejemplar (n=5). ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

d (%)	TOT L	TOT O	ZMC L	ZMC O	CNE L	CNE O	CNI L	CNI O	CCG L	CCG O
1	265.40	152.57	160.80	131.23	22.22	4.68	1.32	7.57	1.40	1.94
5	10.62	6.10	6.43	5.25	0.89	0.19	0.05	0.30	0.06	0.08
10	2.65	1.53	1.61	1.31	0.22	0.05	0.01	0.08	0.01	0.02
15	1.18	0.68	0.71	0.58	0.10	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01
20	0.66	0.38	0.40	0.33	0.06	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00
25	0.42	0.24	0.26	0.21	0.04	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
30	0.29	0.17	0.18	0.15	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00

Utilizando los valores por corte, en la Tabla 8 se indican los valores de n óptimo para cada grupo según el valor del error dispuesto a admitir. Puede notarse que, en el caso de todas las muestras, el n utilizado en este trabajo se encuentra entre los valores entre 1 y 5 %.

Tabla 8: Valores de n óptimo calculados para cada grupo según los diferentes valores de error en la estimación de la media utilizando un rango de valores entre 0-100(d). Los datos utilizados corresponden al número de núcleos para cada corte (Luz n=25, Oscuridad n=22). ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa,

CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

d (%)	TOT L	TOT O	ZMC L	ZMC O	CNE L	CNE O	CNI L	CNI O	CCG L	CCG O
1	413.7	224.7	220.4	180.2	55.1	60.6	6.3	20.5	3.7	2.5
5	16.5	9.0	8.8	7.2	2.2	2.4	0.3	0.8	0.1	0.1
10	4.1	2.2	2.2	1.8	0.6	0.6	0.1	0.2	0.0	0.0
15	1.8	1.0	1.0	0.8	0.2	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0
20	1.0	0.6	0.6	0.5	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0
25	0.7	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
30	0.5	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

6.2 NORMALIDAD DE LOS DATOS

La Normalidad de los datos para cada corte fue estudiada utilizando el test de Lilliefors. Los datos de los grupos ZMC, CNE y el número total de núcleos presentan una distribución Normal, mientras que los datos de CNI y CCG no se ajustarían a esta distribución (Tabla 9)

Tabla 9: Estadísticos y p-valores (L: n=25, O: n=22) obtenidos mediante test de Lilliefors para determinación de distribución Normal para el total de núcleos, así como para cada y ZMC para cada condición. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p < 0.05$).

	TOT L	TOT O	ZMC L	ZMC O	CNE L	CNE O	CNI L	CNI O	CCG L	CCG O
L	0.14	0.10	0.11	0.13	0.08	0.15	0.20	0.14	0.28	0.15
p	0.20	0.80	0.58	0.41	0.99	0.20	0.009*	0.29	0.0001**	0.16

6.3 HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

A continuación, se procedió a probar la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene, teniendo en cuenta la distribución Normal o no Normal de los datos (en caso de que la distribución fuera Normal, se utilizó el criterio de la media, mientras que, si los datos no se ajustaban a la Normalidad, se utilizó el criterio de la mediana). Dado que ninguno de los valores de p fue significativos, se concluye que todos los grupos presentan homogeneidad de varianza según el test de Levene (Tabla 10).

Tabla 10: p-valores obtenidos mediante test de Levene para determinación de homogeneidad de varianza para el total de núcleos, así como para cada y ZMC entre condiciones. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos.

	TOT	ZMC	CNE	CNI	CCG
p	0.37	0.74	0.79	0.07	0.99

6.4 VALIDACIÓN DEL MODELO LINEAL DE CORRELACIÓN ENTRE EL TAMAÑO CORPORAL Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA RETINA

Teniendo en cuenta que los datos a utilizar para estudiar la existencia de una relación son bivariantes, se utilizó un método de regresión funcional entre el largo corporal total y la cantidad de núcleos proliferativos BrdU+ de la retina (calculados como la media por corte para cada individuo) y se buscó determinar la existencia de una correlación entre ambas variables. Para esto, se utilizó un modelo de eje mayor reducido (RMA) en el software PAST. La validación de los modelos buscó determinar si la pendiente y el coeficiente de correlación de Pearson (r) presentaron valores significativos y que los errores presentaran distribuciones Normales.

En primer lugar, se utilizaron los datos de los individuos tanto de luz como de oscuridad con sus respectivas longitudes corporales totales. El análisis de regresión arrojó los valores estadísticos mostrados en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores y estadísticos ($n=10$) obtenidos mediante regresión funcional por modelo de eje mayor reducido (RMA) para los datos de número de núcleos BrdU+ (promedio por sección para cada individuo) y longitud corporal total para el conjunto de datos de ambos tratamientos.

Regresión			
Pendiente (a)	-5.96	Error.Std	1.57
	Test t	t=3.8021	p=0.005*
Intersección (b)	337.45	Error.Std	59.88
Correlación			
r	-0.67		
	Test t	t=-2.54	p=0.035*
r²:	0.45		

Los valores del test de t ($p<0.05$) tanto para el valor de la pendiente, como del coeficiente de correlación r , son significativos.

Asimismo, los valores de los residuos fueron analizados para determinar si su distribución corresponde a una distribución Normal. El análisis de los residuos (Fig. 36) mediante test de Lilliefors para determinar su Normalidad arrojó resultados no significativos ($L=0.25$, $p=0.067$), por lo que los residuos se ajustarían a una distribución Normal. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los valores son cercanos a la significancia.

Cabe destacar que los datos para cada variable se ajustaron a la Normalidad probada mediante test de Lilliefors (Longitud corporal total: $L=0.13$, $p=0.92$; Número de núcleos BrdU+: $L=0.16$, $p=0.63$), por lo que se cumple el supuesto de Normalidad para la utilización de una correlación mediante el estadístico de Pearson.

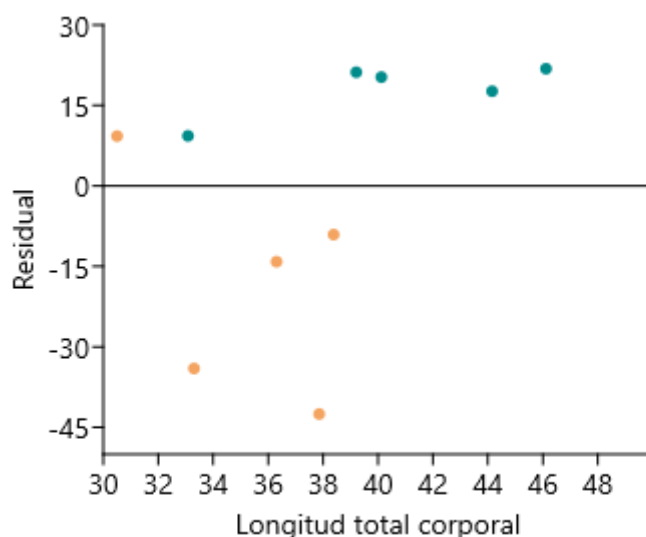


Fig. 36: Residuos de los valores los pares de datos de número de núcleos BrdU+ y longitud corporal total obtenidos mediante modelo de regresión funcional de eje mayor reducido.

Teniendo en cuenta que la mayor parte de los valores de correspondientes a la condición de luz se encontraron por debajo de la línea del modelo, es decir, que sus residuos fueron negativos, y que lo contrario sucedió para los datos de la condición de oscuridad, se analizaron los datos de cada tratamiento mediante regresión de manera separada.

En el caso de los datos de la condición de ciclo de luz natural, el modelo de regresión funcional arrojó un resultado significativo para el caso de la pendiente, pero no para el estadístico r . Sin embargo, es también importante notar que el valor de p fue cercano al límite de la significancia (Tabla 12).

Tabla 12: Valores y estadísticos ($n=5$) obtenidos mediante regresión funcional por modelo de eje mayor reducido (RMA) para los datos de número de núcleos BrdU+ (promedio por sección para cada individuo) y longitud corporal total para los datos de la condición de ciclo de luz natural.

Regresión			
Pendiente (a)	-10.45	Error.Std	3.15
	Test t	t=3.3194	p=0.045*
Intersección (b)	477.86	Error.Std	111.38
Correlación			
r	-0.85		
	Test t	t=-2.8317	p=0.066
r ² :	0.73		

Los residuos para esta condición (Fig. 37) no mostraron una tendencia clara, y su análisis mediante test de Lilliefors no mostró resultados significativos, por lo que corresponderían a una distribución Normal ($L=0.224$, $p=0.57$).

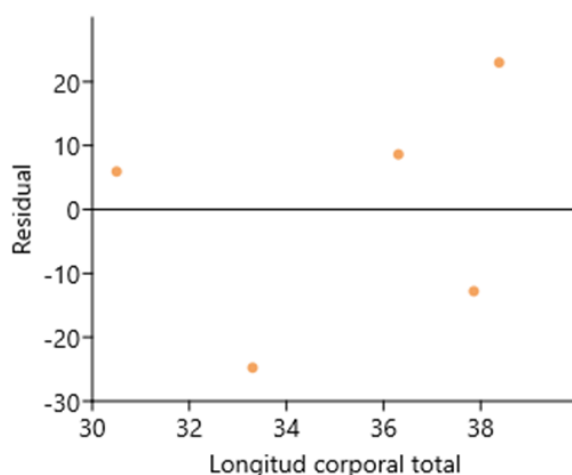


Fig. 37: Residuos de los valores los pares de datos de número de núcleos BrdU+ y longitud corporal total obtenidos mediante modelo de regresión funcional de eje mayor reducido para la condición de ciclo de luz natural.

A continuación, se procedió a realizar el mismo análisis para los datos del grupo de oscuridad permanente. Los estadísticos obtenidos por el modelo RMA mostraron valores significativos tanto para la pendiente, como para el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 13). Por otro lado, el análisis de los residuos (Fig. 38) mostró que estos se distribuyen de forma Normal ($L=0.224$, $p=0.57$).

Tabla 13: Valores y estadísticos ($n=5$) obtenidos mediante regresión funcional por modelo de eje mayor reducido (RMA) para los datos de número de núcleos BrdU+ (promedio por sección para cada individuo) y longitud corporal total para los datos del tratamiento de ciclo de oscuridad permanente.

Regresión			
Pendiente (a)	-5.22	Error.Std	0.38
	Test t	t=13.882	p=0.0008*
Intersección (b)	325.41	Error.Std	15.303
Correlación			
r	-0.99		
	Test t	t=-13.773	p=0.0008*
r ² :	0.98443		

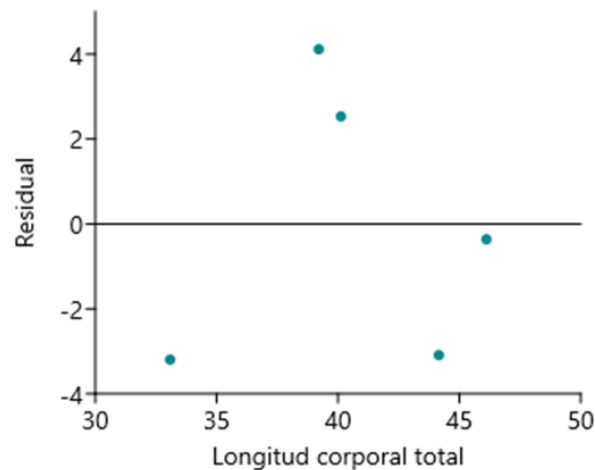


Fig. 38: Residuos de los valores los pares de datos de número de núcleos BrdU+ y longitud corporal total obtenidos mediante modelo de regresión funcional de eje mayor reducido para la condición de oscuridad permanente.

6.5 NORMALIDAD DE LOS DATOS POR ZONA

Los datos divididos por zonas fueron analizados mediante test de Lilliefors para determinar si estos se ajustaban a una distribución Normal (Tabla 14). Los datos de núcleos totales, ZMC y CNE para las zonas ventrales y dorsales se ajustaron a la Normalidad en ambas condiciones, mientras que el resto de los grupos no.

6.6 HOMOGENEIDAD DE VARIANZA DE LOS DATOS POR ZONA

La homogeneidad de la varianza para los datos de las tres zonas (dorsal, central y ventral, excepto para la ZMC donde solo puede considerarse las zonas dorsales y ventrales) fueron analizados mediante test de Levene para el total de datos, cada capa nuclear y ZMC dentro de cada condición (Tabla 15). El p-valor del test de Levene fue tomado considerando la distribución Normal o no Normal de los datos (en caso de que la distribución fuera Normal, se utilizó el criterio de la media, mientras que, si los datos no son Normales, se utilizó el criterio de la mediana).

De esta manera se constató la homogeneidad de varianza para la ZMC; CNE, y CCG para ambas condiciones, así como la CNI en el grupo de luz. Por otro lado, los núcleos totales y datos de CNI en OSC no mostraron homogeneidad de varianza

Adaptación a la oscuridad de la retina de peces anuales *A. charrua*

Tabla 14: p-valores (L: n=25, O: n=22) obtenidos mediante test de Lilliefors para determinación de distribución Normal para el total de núcleos, así como para cada capa y ZMC para cada condición. Los mismos se encuentran separados en las siguientes zonas: ventral (V), dorsal (D) y central (C). ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p < 0.05$).

		Condición	
Zona		L	O
TOT	V	1.54	0.72
	C	0.0001*	0.0001*
	D	0.24	0.10
ZMC	V	0.12	0.32
	D	0.75	0.52
	V	0.66	0.30
CNE	C	0.0001*	0.0001*
	D	0.82	0.32
	V	0.02*	0.01*
CNI	C	0.0001*	0.0001*
	D	0.002*	0.048*
	V	0.0001*	0.0001*
CCG	C	0.0001*	0.0001*
	D	0.0001*	0.0001*

Tabla 15: p-valores (L: n=25, O: n=22) obtenidos mediante test de Levene para determinación de homogeneidad de varianza entre zonas (dorsal, central y ventral) para el total de núcleos, así como para cada capa y ZMC para cada condición. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Se indican con un asterisco las diferencias significativas ($p < 0.05$).

Condición	TOT	ZMC	CNE	CNI	CCG
L	0.003*	0.91	0.57	0.18	0.24
O	0.02*	0.87	0.67	0.001*	0.05

Posteriormente, se realizó el mismo análisis, buscando determinar la homogeneidad de varianza, en este caso entre las zonas dorsal y ventral, a modo de probar los supuestos para la aplicación de test de t pareado (Tabla 16). De esta forma se constató homogeneidad de varianza en todos los casos.

Tabla 16: p-valores obtenidos mediante test de Levene para determinación de homogeneidad de varianza entre zonas (dorsal y ventral) para el total de núcleos, así como para cada y ZMC para cada condición. ZMC: Zona Marginal Ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total.

Condición	TOT	ZMC	CNE	CNI	CCG
L	0.47	0.91	0.95	0.78	0.86
O	0.45	0.87	0.22	0.36	0.52

El resultado de análisis de Normalidad y homogeneidad de varianza determinó que se optara por utilizar un test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la comparación entre las tres zonas elegidas (dorsal, central, ventral) para los núcleos totales y las capas nucleares. Se constataron diferencias significativas para el caso de los núcleos totales, CNE y CNI en ambas condiciones, pero no para la CCG (Tabla 17).

Tabla 17: Estadísticos obtenidos mediante test de Kruskal-Wallis para determinación de diferencias entre zonas (dorsal y ventral) para el total de núcleos, así como para cada capa en cada condición. CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Las diferencias significativas ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) entre condiciones se indican con (*), (**), (***) , respectivamente.

	TOT L	CNE L	CNI L	CCG L	TOT O	CNE O	CNI O	CCG O
H	46.24	20.6	14.35	2.09	42.52	6.05	18.97	4.04
p	8.9E-11 ***	3.2E-05 ****	0.0005 ***	0.2413	5.7E-10 ***	0.048*	5.0E-05 ***	0.06

A continuación, se sometieron los datos a análisis a posteriori de Dunn para determinar entre qué grupos existían diferencias significativas, los p-valores de las diferentes combinaciones se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: p-valores obtenidos mediante test de Dunn para determinación de diferencias entre zonas (dorsal, central y ventral) para el total de núcleos, así como para cada capa en cada condición. Se muestran los valores para cada combinación. D: Dorsal, C: Central, V: Ventral, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Las diferencias significativas ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) entre condiciones se indican con (*), (**), (***) , respectivamente.

L			O		
TOT V	TOT D	TOT C	TOT V	TOT D	TOT C

Adaptación a la oscuridad de la retina de peces anuales *A. charrua*

TOT V	0.97 3.4E-09 ***			TOT V	0.69 5.3E-08 ***		
TOT D	0.97		4.3E-09 ***	TOT D	0.69		5.3E-09 ***
TOT C	3.4E-09 ***	4.3E-09 ***		TOT C	5.3E-08 ***	5.3E-09 ***	
CNE V CNE D CNE C				CNE V CNE D CNE C			
CNE V		0.31	1.4E-05 ***	CNE V		0.81	0.045*
CNE D	0.31		0.0009 ***	CNE D	0.81		0.024*
CNE C	1.4E-05 ***	0.0009 ***		CNE C	0.045*	0.025*	
CNI V CNI D CNI C				CNI V CNI D CNI C			
CNI V		0.60	0.0004 ***	CNI V		0.77	6.54E-05 ***
CNI D	0.6015		0.0015 **	CNI D	0.77		0.0002 ***
CNI C	0.0004 ***	0.0015 **		CNI C	6.5E-05 ***	0.0002 ***	

De esta forma, se observa que no se observan diferencias significativas entre zonas dorsales y ventrales en ningún caso. Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas en todos los casos cuando se comparaban las zonas ventrales o dorsales con la zona central de la retina.

Asimismo, se cuenta con los valores para cada una de las secciones, por lo que es posible aplicar test pareados. Es así, que se sometió a una comparación pareada mediante test de t para determinar si hay diferencias entre la zona dorsal y ventral. De esta forma, solo se constataron diferencias significativas cuando se compararon los datos de la condición de oscuridad para el caso de la ZMC (Tabla 19).

Tabla 19: Estadísticos obtenidos mediante test de t pareado para determinación de diferencias entre zonas (dorsal y ventral) para el total de núcleos, así como para cada capa nuclear y ZMC en cada condición. ZMC: Zona marginal ciliar, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre condiciones se indican con (*).

	TOT L	ZMC L	CNE L	CNI L	CCG L	TOT O	ZMC O	CNE O	CNI O	CCG O
t	0.34	-0.90	1.36	0.46	-0.24	-1.32	-2.11	0.13	-0.34	-0.61
p	0.74	0.38	0.19	0.65	0.81	0.21	0.047*	0.90	0.74	0.55

A su vez, mediante test de Mann-Whitney, se ha analizado la existencia de diferencias entre condiciones para cada una de las zonas. Los valores estadísticos obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20:: Estadísticos obtenidos mediante test de Mann-Whitney para determinación de diferencias entre condiciones para cada zona (dorsal, central y ventral) para el total de núcleos, así como para cada capa en cada condición. D: Dorsal, C: Central, V: Ventral, CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de las células ganglionares, TOT: cantidad total de núcleos; L: tratamiento de ciclo de luz natural, O: Tratamiento de oscuridad total. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre condiciones se indican con (*).

		TOT	ZMC	CNE	CNI
	U	225.5	159.5	179.5	199.5
V	z	1.11	2.46	2.03	1.61
	p	0.27	0.01 *	0.04*	0.10
	U	274.5		204	252
C	z	0		1.52	0.54
	p	1		0.13	0.59
	U	178.5	156.5	220.5	205
D	z	2.05	2.52	1.1	1.50
	p	0.04*	0.01*	0.25	0.13

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathocleous, M., & Harris, W. A. (2009). From Progenitors to Differentiated Cells in the Vertebrate Retina. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 45–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113259>
- Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S., & Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: Types and regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.09.003>
- Ahmad, I., Tang, L., & Pham, H. (2000). Identification of Neural Progenitors in the Adult Mammalian Eye. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), 517–521. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2473>
- Alunni, A., & Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development*, 143(5), 741–753. <https://doi.org/10.1242/dev.122796>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Arai, Y. (2005). Role of Fabp7, a Downstream Gene of Pax6, in the Maintenance of Neuroepithelial Cells during Early Embryonic Development of the Rat Cortex. *Journal of Neuroscience*, 25(42), 9752–9761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2512-05.2005>
- Bastian, J., & Zakon, H. H. (2005). Plasticity of Sense Organs and Brain. In T. H. Bullock, C. D. Hopkins, A. N. Popper, & R. R. Fay (Eds.), *Electroreception* (pp. 195–228). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-28275-0_8
- Becker, C., Lust, K., & Wittbrodt, J. (2021). Igf signaling couples retina growth with body growth by modulating progenitor cell division. *Development*, 148(7), dev199133. <https://doi.org/10.1242/dev.199133>
- Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., & Raymond, P. A. (2007). Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Müller Glia That Function as Retinal Stem Cells. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 7028–7040. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007>
- Berois, N., Arezo, M., Papa, N., & Clivio, G. (2012). Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 595–602. <https://doi.org/10.1002/wdev.39>
- Berois, N., Arezo, M., & Sa, R. O. de. (2014). The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000136>
- Berrosteguieta, I. (2021). *Estudio de la neuroplasticidad en peces del género Austrolebias frente a cambios en la luminosidad*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Berrosteguieta, I., Passos, C., & Fernández, A. S. (2019). *Plasticidad neuroetológica en Austrolebias reicherti frente a cambios en la luminosidad*. 2ª Reunión. Biología del Comportamiento del Cono Sur, Montevideo, Uruguay.
- Berrosteguieta, I., Rosillo, J. C., Herrera, M. L., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Herranz-Pérez, V., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2022). Plasticity of cell proliferation in the retina of *Austrolebias charrua* fish under light and darkness conditions. *Current Research in Neurobiology*, 3, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100042>
- Berrosteguieta, I., Rosillo, J. C., Torres-Pérez, M., & Fernández, A. S. (2018). Caracterización histológica de adaptaciones de la retina de peces anuales *Austrolebias charrua* en relación a cambios en la luminosidad en su ciclo de vida. *Acta Microscopica*, 27(1), 8.
- Besharse, J. C., & Brandon, R. A. (1976). Effects of continuous light and darkness on the eyes of the troglobitic salamander *Typhlotriton spelaeus*. *Journal of Morphology*, 149(4), 527–545. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051490406>
- Bringmann, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), e77. <https://doi.org/10.2741/Bringman>

- Burnside, B., & Nagle, B. (1983). Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: Mechanisms and regulation. *Progress in Retinal Research*, 2, 67–109. [https://doi.org/10.1016/0278-4327\(83\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0278-4327(83)90004-4)
- Campos, V. S. de, Calaza, K. C., & Adesse, D. (2020). Implications of TORCH Diseases in Retinal Development—Special Focus on Congenital Toxoplasmosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.585727>
- Carter-Dawson, L. D., & Lavail, M. M. (1979). Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*, 188(2), 245–262. <https://doi.org/10.1002/cne.901880204>
- Chiu, J. F., Mack, A. F., & Fernald, R. D. (1995). Daily rhythm of cell proliferation in the teleost retina. *Brain Research*, 673(1), 119–125. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01411-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01411-A)
- Diotel, N., Vaillant, C., Kah, O., & Pellegrini, E. (2016). Mapping of brain lipid binding protein (Blbp) in the brain of adult zebrafish, co-expression with aromatase B and links with proliferation. *Gene Expression Patterns*, 20(1), 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2015.11.003>
- Donatti, L., & Fanta, E. (2007). Fine structure of the retinal pigment epithelium and cones of Antarctic fish *Notothenia coriiceps* Richardson in light and dark-conditions. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1), 33–40. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000100004>
- Ebbesson, L. O. E., & Braithwaite, V. A. (2012). Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *Journal of Fish Biology*, 81(7), 2151–2174. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03486.x>
- Ehlman, S. M., Sandkam, B. A., Breden, F., & Sih, A. (2015). Developmental plasticity in vision and behavior may help guppies overcome increased turbidity. *Journal of Comparative Physiology A*, 201(12), 1125–1135. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-1041-4>
- Evans, B. I. (2004). A Fish's Eye View of Habitat Change. In G. von der Emde, J. Mogdans, & B. G. Kapoor (Eds.), *The Senses of Fish: Adaptations for the Reception of Natural Stimuli* (pp. 1–30). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1060-3_1
- Fausett, B. V., & Goldman, D. (2006). A Role for 1 Tubulin-Expressing Muller Glia in Regeneration of the Injured Zebrafish Retina. *Journal of Neuroscience*, 26(23), 6303–6313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006>
- Feng, L., Hatten, M. E., & Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, 12(4), 895–908. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90341-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90341-7)
- Fernández, A. S., Rosillo, J. C., Casanova, G., & Olivera-Bravo, S. (2011). Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: Rivulidae): a comparative study. *Neuroscience*, 189, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.063>
- Field, A. (2005). *Discovering Statistics Using SPSS* (2nd Edition). SAGE Publications.
- Fischer, A. J. (2005). Neural regeneration in the chick retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(2), 161–182. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.07.003>
- Fischer, A. J. (2011). Müller Glia, Vision-Guided Ocular Growth, Retinal Stem Cells, and a Little Serendipity: The Cogan Lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(10), 7705–7710. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8330>
- Fischer, A. J., Bosse, J. L., & El-Hodiri, H. M. (2014). Reprint of: The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Experimental Eye Research*, 123, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.019>
- Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2377–2383. <https://doi.org/10.1242/jeb.02271>
- Frøen, R., Johnsen, E. O., Nicolaissen, B., Facskó, A., Petrovski, G., & Moe, M. C. (2013). Does the Adult Human Ciliary Body Epithelium Contain “True” Retinal Stem Cells? *BioMed Research International*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/531579>

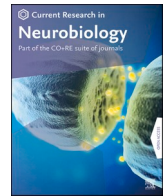
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433–1438.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>
- García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M. J., Casanova, G., Clivio, G., & Olivera, A. (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach: DIFFERENTIATION PATTERNS ANNUAL KILLIFISH. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(3), 620–635. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01303.x>
- Giachino, C., Basak, O., Lugert, S., Knuckles, P., Obernier, K., Fiorelli, R., Frank, S., Raineteau, O., Alvarez-Buylla, A., & Taylor, V. (2014). Molecular Diversity Subdivides the Adult Forebrain Neural Stem Cell Population. *STEM CELLS*, 32(1), 70–84. <https://doi.org/10.1002/stem.1520>
- Gomazkov, O. A. (2014). Neurogenesis as an adaptive function of the adult brain. *Biology Bulletin Reviews*, 4(2), 86–100. <https://doi.org/10.1134/S2079086414020029>
- Gorsuch, R. A., Lahne, M., Yarka, C. E., Petravick, M. E., Li, J., & Hyde, D. R. (2017). Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Experimental Eye Research*, 161, 174–192.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.05.012>
- Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 67–73. <https://doi.org/10.1038/35036235>
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. 9.
- Hartman, E. J., & Abrahams, M. V. (2000). Sensory compensation and the detection of predators: The interaction between chemical and visual information. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1443), 571–575.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1039>
- Haunerland, N. H., & Spener, F. (2004). Fatty acid-binding proteins – insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research*, 43(4), 328–349.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.001>
- Ito, H., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Yamamoto, N. (2007). Diversity of Brain Morphology in Teleosts: Brain and Ecological Niche. *Brain, Behavior and Evolution*, 69(2), 76–86.
<https://doi.org/10.1159/000095196>
- Jacobs, G. H. (1993). The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 68(3), 413–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1993.tb00738.x>
- Johns, P. R. (1977). Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *Journal of Comparative Neurology*, 176(3), 343–357. <https://doi.org/10.1002/cne.901760304>
- Johns, P. R., & Fernald, R. D. (1981). Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature*, 293(5828), Article 5828. <https://doi.org/10.1038/293141a0>
- Julian, D., Ennis, K., & Korenbrot, J. I. (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 394(3), 271–282.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980511\)394:3<271::AID-CNE1>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980511)394:3<271::AID-CNE1>3.0.CO;2-Z)
- Kröger, R. H. H., & Fernald, R. D. (1994). Regulation of eye growth in the African cichlid fish *Haplochromis burtoni*. *Vision Research*, 34(14), 1807–1814. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90305-0](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90305-0)
- Kröger, R. H. H., & Wagner, H.-J. (1996). The eye of the blue acara (*Aequidens pulcher*, Cichlidae) grows to compensate for defocus due to chromatic aberration. *Journal of Comparative Physiology A*, 179(6), 837–842. <https://doi.org/10.1007/BF00207362>
- Kubota, R., Hokoc, J. N., Moshiri, A., McGuire, C., & Reh, T. A. (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Developmental Brain Research*, 134(1–2), 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(01\)00287-5](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00287-5)

- Lahne, M., Piekos, S. M., O'Neill, J., Ackerman, K. M., & Hyde, D. R. (2019). Photo-regulation of rod precursor cell proliferation. *Experimental Eye Research*, 178, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.09.015>
- Lenkowski, J. R., Qin, Z., Sifuentes, C. J., Thummel, R., Soto, C. M., Moens, C. B., & Raymond, P. A. (2013). Retinal Regeneration in Adult Zebrafish Requires Regulation of TGFβ Signaling. *Glia*, 61(10), 1687–1697. <https://doi.org/10.1002/glia.22549>
- Lenkowski, J. R., & Raymond, P. A. (2014). Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 0, 94–123. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.007>
- Lindsey, B. W., Hall, Z. J., Heuzé, A., Joly, J.-S., Tropepe, V., & Kaslin, J. (2018a). The role of neuro-epithelial-like and radial-glial stem and progenitor cells in development, plasticity, and repair. *Progress in Neurobiology*, 170, 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.004>
- Lindsey, B. W., Hall, Z. J., Heuzé, A., Joly, J.-S., Tropepe, V., & Kaslin, J. (2018b). The role of neuro-epithelial-like and radial-glial stem and progenitor cells in development, plasticity, and repair. *Progress in Neurobiology*, 170, 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.004>
- Lledo, P.-M., & Gheusi, G. (2003). Olfactory processing in a changing brain: *NeuroReport*, 14(13), 1655–1663. <https://doi.org/10.1097/00001756-200309150-00001>
- Lledo, P.-M., & Valley, M. (2016). Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a018945. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018945>
- Loureiro, M., Borthagaray, A., Hernández, D., Duarte, A., Pinelli, V., & Arim, M. (2015). Austrolebias in space: Scaling from ponds to biogeographical regions. In N. Berois, G. Garcia, & R. O. de Sa (Eds.), *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (pp. 111–132). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19016>
- Loureiro, M., & Sa, R. O. de. (2015). Diversity of Aplocheiloidei. In N. Berois, G. Garcia, & R. O. de Sa (Eds.), *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (pp. 3–31). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19016>
- Lust, K., & Wittbrodt, J. (2018). Activating the regenerative potential of Müller glia cells in a regeneration-deficient retina. *ELife*, 7, e32319. <https://doi.org/10.7554/eLife.32319>
- Mack, A. F., & Fernald, R. D. (1993). Regulation of cell division and rod differentiation in the teleost retina. *Developmental Brain Research*, 76(2), 183–187. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90206-P](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90206-P)
- Mack, A. F., & Fernald, R. D. (1995). New Rods Move before Differentiating in Adult Teleost Retina. *Developmental Biology*, 170(1), 136–141. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1202>
- Mack, A. F., & Fernald, R. D. (1997). Cell movement and cell cycle dynamics in the retina of the adult teleost *Haplochromis burtoni*. *Journal of Comparative Neurology*, 388(3), 435–443. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971124\)388:3<435::AID-CNE6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971124)388:3<435::AID-CNE6>3.0.CO;2-1)
- Marc, R. E. (1998). The Structure of Vertebrate Retinas. In J. Toyoda (Ed.), *The Retinal Basis of Vision* (p. 16). Elsevier.
- Mercurio, S., Serra, L., & Nicolis, S. K. (2019). More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms20184540>
- Miles, A., & Tropepe, V. (2021). Retinal Stem Cell ‘Retirement Plans’: Growth, Regulation and Species Adaptations in the Retinal Ciliary Marginal Zone. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms22126528>
- Nagashima, M., Barthel, L. K., & Raymond, P. A. (2013). A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development (Cambridge, England)*, 140(22), 4510–4521. <https://doi.org/10.1242/dev.090738>

- Nieman, C. L., Oppliger, A. L., McElwain, C. C., & Gray, S. M. (2018). Visual detection thresholds in two trophically distinct fishes are compromised in algal compared to sedimentary turbidity. *Conservation Physiology*, 6(1), coy044. <https://doi.org/10.1093/conphys/coy044>
- Ortega-Perez, I., Murray, K., & Lledo, P.-M. (2007). The how and why of adult neurogenesis. *Journal of Molecular Histology*, 38(6), 555–562. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9114-5>
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., & Maekawa, M. (2008). Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS*, 26(7), 1663–1672. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0884>
- Otteson, D. C., D’Costa, A. R., & Hitchcock, P. F. (2001). Putative Stem Cells and the Lineage of Rod Photoreceptors in the Mature Retina of the Goldfish. *Developmental Biology*, 232(1), 62–76. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0163>
- Papa, N. G., Clivio, G. A., & Montagne, J. (2015). Husbandry, reproduction, and Embryo Culture of annual Fishes under Laboratory Conditions. In N. Berois, G. Garcia, & R. O. de Sa (Eds.), *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (pp. 99–107). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19016>
- Passos, C., Reyes, F., Jalabert, C., Quintana, L., Tassino, B., & Silva, A. (2021). Stress promotes reproduction in the annual fish *Austrolebias reicherti*. *Animal Behaviour*, 174, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.02.003>
- Passos, C., Reyes, F., Tassino, B., Rosenthal, G. G., & González, A. (2013). Female Annual Killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) Attend to Male Chemical Cues. *Ethology*, 119(10), 891–897. <https://doi.org/10.1111/eth.12129>
- Passos, C., Tassino, B., Loureiro, M., & Rosenthal, G. G. (2013). Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes*, 96, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.01.008>
- Passos, C., Tassino, B., Reyes, F., & Rosenthal, G. G. (2014). Seasonal Variation in Female Mate Choice and Operational Sex Ratio in Wild Populations of an Annual Fish, *Austrolebias reicherti*. *PLoS ONE*, 9(7), e101649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101649>
- Passos, C., Tassino, B., Rosenthal, G. G., & Reichard, M. (2015). Reproductive Behavior and Sexual Selection in Annual Fishes. In N. Berois, G. Garcia, & R. O. de Sa (Eds.), *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (pp. 207–229). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19016>
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25(11), 1463–1465. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp184>
- Ramamurthy, D., Lin Chua, S. Y., & Saw, S.-M. (2015). A review of environmental risk factors for myopia during early life, childhood and adolescence. *Clinical and Experimental Optometry*, 98(6), 497–506. <https://doi.org/10.1111/cxo.12346>
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., & Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, 6, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-36>
- Raymond, P. A., Bassi, C. J., & Powers, M. K. (1988). Lighting Conditions and Retinal Development in Goldfish: Photoreceptor Number and Structure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(1), 10.
- Raymond, P. A., & Rivlin, P. K. (1987). Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Developmental Biology*, 122(1), 120–138. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90338-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90338-1)
- Reinhardt, R., Centanin, L., Tavhelidse, T., Inoue, D., Wittbrodt, B., Concordet, J.-P., Martinez-Morales, J. R., & Wittbrodt, J. (2015). Sox2, Tlx, Gli3, and Her9 converge on Rx2 to define retinal stem cells in vivo. *The EMBO Journal*, 34(11), 1572–1588. <https://doi.org/10.15252/embj.201490706>

- Reuter, T., & Peichl, L. (2008). Structure and Function of the Retina in Aquatic Tetrapods. In J. G. M. Thewissen (Ed.), *Sensory Evolution on the Threshold: Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates* (pp. 148–172). California Scholarship Online.
<https://academic.oup.com/california-scholarship-online/book/19241/chapter/177737878>
- Ricatti, M. J., Battista, A. G., Zorrilla Zubilete, M., & Faillace, M. P. (2011). Purinergic Signals Regulate Daily S-Phase Cell Activity in the Ciliary Marginal Zone of the Zebrafish Retina. *Journal of Biological Rhythms*, 26(2), 107–117. <https://doi.org/10.1177/0748730410395528>
- Richardson, R., Tracey-White, D., Webster, A., & Moosajee, M. (2017). The zebrafish eye—A paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*, 31(1), 68–86.
<https://doi.org/10.1038/eye.2016.198>
- Rosillo, J. C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., & Fernández, A. S. (2010). Cell Heterogeneity of the telencephalic ventricular zone: A neurogenic brain region of *Austrolebias charrua*. *Acta Microscopica*, 19(2), 152–159.
- Rosillo, J. C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2016a). Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: Cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience*, 336, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.045>
- Rosillo, J. C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2016b). Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: Cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience*, 336, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.045>
- Salman, A., McClements, M. E., & MacLaren, R. E. (2021). Insights on the Regeneration Potential of Müller Glia in the Mammalian Retina. *Cells*, 10(8), 1957.
<https://doi.org/10.3390/cells10081957>
- Salvanes, A. G. V., Moberg, O., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Jensen, K. H., & Braithwaite, V. A. (2013). Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1767), 20131331.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1331>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schulz, E. J., Hoyer, M. V., & Canfield, D. E. (1999). An Index of Biotic Integrity: A Test with Limnological and Fish Data from Sixty Florida Lakes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128(4), 564–577. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1999\)128<0564:AIOBIA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1999)128<0564:AIOBIA>2.0.CO;2)
- Sherpa, R. D., & Hui, S. P. (2021). An insight on established retinal injury mechanisms and prevalent retinal stem cell activation pathways in vertebrate models. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), 189–203. <https://doi.org/10.1002/ame2.12177>
- Stenkamp, D. L. (2007). Neurogenesis in the Fish Retina. *International Review of Cytology*, 259, 173–224. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)59005-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)59005-9)
- Su, X., Tan, Q. S. W., Parikh, B. H., Tan, A., Mehta, M. N., Sia Wey, Y., Tun, S. B. B., Li, L.-J., Han, X.-Y., Wong, T. Y., Hunziker, W., Luu, C. D., Owada, Y., Barathi, V. A., Zhang, S. S., & Chaurasia, S. S. (2016). Characterization of Fatty Acid Binding Protein 7 (FABP7) in the Murine Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(7), 3397–3408.
<https://doi.org/10.1167/iovs.15-18542>
- Tarboush, R., Chapman, G. B., & Connaughton, V. P. (2012). Ultrastructure of the distal retina of the adult zebrafish, *Danio rerio*. *Tissue and Cell*, 44(4), 264–279.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.04.004>

- Thévenaz, P., & Unser, M. (2007). User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70(2), 135–146.
<https://doi.org/10.1002/jemt.20393>
- Thummel, R., Enright, J. M., Kassen, S. C., Montgomery, J. E., Bailey, T. J., & Hyde, D. R. (2010). Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Experimental Eye Research*, 90(5), 572–582.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.02.001>
- Tkatchenko, A. V., Walsh, P. A., Tkatchenko, T. V., Gustincich, S., & Raviola, E. (2006). Form deprivation modulates retinal neurogenesis in primate experimental myopia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4681–4686.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0600589103>
- Tkatchenko, T., Michurina, T., Tomarev, S. I., Nakaya, N., Enikolopov, G. N., & Tkatchenko, A. V. (2021). *Critical period for vision-dependent modulation of postnatal retinal neurogenesis* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2021.08.30.458213>
- Torres-Pérez, M., Rosillo, J. C., Berrosteguieta, I., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J. M., & Fernández, A. S. (2017). Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain Research*, 1673, 11–22.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.003>
- Tsingos, E., Höckendorf, B., Sütterlin, T., Kirchmaier, S., Grabe, N., Centanin, L., & Wittbrodt, J. (2019). Retinal stem cells modulate proliferative parameters to coordinate post-embryonic morphogenesis in the eye of fish. *ELife*, 8, e42646. <https://doi.org/10.7554/eLife.42646>
- Utne-Palm, A. C. (2002). Visual feeding of fish in a turbid environment: Physical and behavioural aspects. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(1–2), 111–128.
<https://doi.org/10.1080/10236240290025644>
- Vanhunsel, S., Bergmans, S., Beckers, A., Etienne, I., Van houcke, J., Seuntjens, E., Arckens, L., De Groef, L., & Moons, L. (2021). The killifish visual system as an in vivo model to study brain aging and rejuvenation. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 7(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41514-021-00077-4>
- Veleri, S., Lazar, C. H., Chang, B., Sieving, P. A., Banin, E., & Swaroop, A. (2015). Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models. *Disease Models & Mechanisms*, 8(2), 109–129. <https://doi.org/10.1242/dmm.017913>
- von Bernhardt, R., Eugénin-von Bernhardt, L. E., & Eugénin, J. (2017). What Is Neural Plasticity? In J. Eugénin, R. von Bernhardt, & K. J. Müller (Eds.), *The Plastic Brain* (pp. 1–15). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1
- Wehman, A. M., Staub, W., Meyers, J. R., Raymond, P. A., & Baier, H. (2005). Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Developmental Biology*, 281(1), 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.010>
- Wourms, J. P. (1972). The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 182(3), 389–414. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820310>
- Zar, J. H. (2014). *Biostatistical analysis* (5th edition, Pearson new international edition). Pearson Education Ltd.
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zupanc, G. K. H. (2001). Adult Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Central Nervous System of Teleost Fish. *Brain Behaviour and Evolution*, 58, 28.
- Zygar, C. A., Colbert, S., Yang, D., & Fernald, R. D. (2005). IGF-1 produced by cone photoreceptors regulates rod progenitor proliferation in the teleost retina. *Developmental Brain Research*, 154(1), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.10.009>



Plasticity of cell proliferation in the retina of *Austrolebias charrua* fish under light and darkness conditions

Inés Berrostequieta^{a,1}, Juan Carlos Rosillo^{a,f,1}, María Laura Herrera^{a,e}, Silvia Olivera-Bravo^b, Gabriela Casanova^c, Vicente Herranz-Pérez^d, José Manuel García-Verdugo^d, Anabel Sonia Fernández^{a,e,*}

^a Departamento Neurociencias Integrativas, Lab. Neurobiología Comparada, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Avenida. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay

^b Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE, Avenida. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay

^c Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay

^d Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universitat de València, CIBERNED, 46980, Paterna, Spain

^e Facultad de Ciencias, UdelaR, Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay

^f Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR. Avda. General Flores 2125, 11800, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Stem cell
Fish brain
Rods
Ciliary marginal zone

ABSTRACT

Austrolebias annual fishes exhibit cell proliferation and neurogenesis throughout life. They withstand extreme environmental changes as their habitat dries out, pressuring nervous system to adapt. Their visual system is challenged to adjust as the water becomes turbid. Therefore, this study focused on how change in photic environment can lead to an increased cell proliferation in the retina. We administered 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) at different temporal windows to detect cell proliferation in natural light and permanent darkness. Stem/progenitor cells were recognized as IdU+/CldU + nuclei co-labeled with Sox2, Pax6 or BLBP found in the ciliary marginal zone (CMZ). The expression pattern of BLBP + glial cells and ultrastructural analysis indicates that CMZ has different cell progenitors. In darkness, the number of dividing cells significantly increased, compared to light conditions. Surprisingly, CMZ IdU+/CldU + cell number was similar under light and darkness, suggesting a stable pool of stem/progenitor cells possibly responsible for retinal growth. Therefore, darkness stimulated cell progenitors outside the CMZ, where Müller glia play a crucial role to generate rod precursors and other cell types that might integrate rod-dependent circuits to allow darkness adaptation. Thus, the *Austrolebias* fish retina shows great plasticity, with cell proliferation rates significantly higher than that of brain visual areas.

1. Introduction

In contrast with mammals, teleost fishes grow throughout life, increasing massively in body size. The growth in size of the nervous system accompanies body growth and this process must therefore involve continuous generation of new cells, including neurons. The growth rates may vary between different regions of the nervous system depending on the biological characteristics of the individuals. In the case of the eye, and in particular of the retina, it has been seen that it is

capable of growing at a rate greater than that of the body (Johns and Easter, 1977; Kubota et al., 2002). These results imply a requirement for the rearrangement of the cytoarchitecture of the eye in order to maintain a balance between eye and body growth, as well as of the different tissues forming the retina that must somehow coordinate to expand at the same rate (Wan et al., 2016; Tsingos et al., 2019).

The retina is the light-sensitive part of the eye that consists of the neural retina that contains light-detecting cells (rods and cones), and the retinal pigmented epithelium, which supports these cells. Many studies conducted in teleosts showed that the retina grows throughout life and

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE), Avenida Italia 3318, Montevideo, 11600, Uruguay.

E-mail addresses: iberrostequieta@iibce.edu.uy (I. Berrostequieta), jrosillo@iibce.edu.uy (J.C. Rosillo), lherrera@iibce.edu.uy (M.L. Herrera), solivera@iibce.edu.uy (S. Olivera-Bravo), casanova@fcien.edu.uy (G. Casanova), vicente.herranz@uv.es (V. Herranz-Pérez), j.manuel.garcia@uv.es (J.M. García-Verdugo), anabelsonia@gmail.com, afernandez@iibce.edu.uy (A.S. Fernández).

¹ Both authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100042>

Received 4 March 2022; Received in revised form 18 May 2022; Accepted 23 May 2022

Available online 1 June 2022

2665-945X/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations

BLBP	Brain lipid binding protein
BrdU	5-bromo-2'- deoxyuridine
CE	ciliary epithelium
CMZ	ciliary marginal zone
CldU	5-chloro-2'-deoxyuridine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
GCL	ganglion cell layer
HuC	Hu-antigen C protein
IdU	5-iodo-2'-deoxyuridine
INL	inner nuclear layer
OLM	outer limiting membrane
ONL	outer nuclear layer
Pax6	Paired box protein Pax-6
PB	phosphate buffer
PBT	PB plus Triton X-100
PFA	paraformaldehyde
Sox2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2 Transcription Factor
TEM	transmission electron microscopy
XAP-2	HBV X-associated protein 2

that it is capable of regenerating all cell types after damage (Raymond and Hitchcock, 1997; Easter and Hitchcock, 2000; Otteson and Hitchcock, 2003; Stenkamp, 2007; Sun et al., 2018). Unlike in homeothermic vertebrates, the retina of fishes and amphibians grows continuously by adding rings of new cells at the periphery in a region described as a circumference of germinal tissue, called the ciliary marginal zone (CMZ) (Straznicky and Gaze, 1971; Johns and Easter, 1977; Kubota et al., 2002; Miles and Tropepe, 2021). The CMZ is located between the neural retina and the ciliary epithelium (CE). Unlike in other vertebrates, in fishes the CMZ is present in the mature retina and consists of a germinal zone of stem/progenitor cells (Perron and Harris, 2000; Reh and Fischer, 2001; Raymond et al., 2006; Fischer et al., 2014). The presence and diversity of stem/progenitor cells and their different rates of proliferation in the CMZ show characteristics that are common to the neurogenic niches described in the adult nervous system of vertebrates (Álvarez-Buylla et al., 2001; Ming and Song, 2005). However, the identity and features of the different kinds of progenitors in the CMZ are not yet well understood. One of the most intriguing discoveries in vertebrate neurogenic “niches” is that adult neural stem cells exhibit some properties of glial cells and that neurons in certain regions of the developing embryonic mammalian and in adult fishes, reptiles and avian brains derive from radial glia (Noctor et al., 2002; Doetsch, 2003; Zupanc and Clint, 2003; Mori et al., 2005; González-Granero et al., 2011). The Müller glia (MG) present in the embryonic and adult retina of fishes and other vertebrates are considered to be radial glia with stem/progenitor cells characteristics (Fischer and Reh, 2003; Raymond et al., 2006; Gallina et al., 2014; Gorsuch and Hyde, 2014; Lenkowski and Raymond, 2014). Müller glial cells in juvenile fishes are distributed in many regions of the retina including the CMZ (Bernardos et al., 2007). In zebrafish it was demonstrated that Müller glia cells re-enter the cell cycle, and that they can generate multipotent neuronal progenitors by asymmetrical division that regenerate the missing retinal cell types after damage (Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007; Kassen et al., 2009; Hamon et al., 2016; Nagashima et al., 2013, 2020; Powell et al., 2016; Sifuentes et al., 2016). Furthermore, it has been shown that some of these new neurons possess normal morphology and connectivity (McGinn et al., 2018). In addition, analysis of 5-bromo-2'- deoxyuridine (BrdU) uptake and label retention show that the cells in the extreme peripheral edge of the CMZ -that are presumably radial glia-divide slowly whereas the cells in the central part of the CMZ divide faster (Ohnuma et al., 1999; Perron and Harris, 2000;

Xue and Harris, 2012).

Outside the CMZ, in the outer nuclear layer (ONL), rod progenitor cells were described in many species of fishes (Morris et al., 2008). In normal conditions, these progenitors usually only produce rods, but in the presence of damage it was thought that rod progenitors were capable of generating all types of retinal neurons. The hypothesis that the rod progenitors are the primary source of regenerating retinal neurons has been challenged by work indicating that Müller glial cells respond to retinal damage by proliferating and producing the inner nuclear layer (INL) stem cells (Wu et al., 2001; Wan and Goldman, 2016; Sifuentes et al., 2016; Langhe and Pearson, 2020). It was also shown that dark-adaptation increases rod precursor cell proliferation in the ONL zebrafish retina (Lahne et al., 2019).

Fish with unique life history traits have provided opportunities for understanding plasticity of the visual system as a naturally adaptive mechanism (Stenkamp, 2007). Therefore, for the first time, we will describe the *Austrolebias* CMZ and its different cell progenitors by morphological characteristics, marker expression and dynamics of cell proliferation. We also show how cell proliferation increases in darkness conditions in all retinal layers where we think that MG play a fundamental role. Our question remains open: which cells are the progenitors in the retina at different layers, Müller glia? Or are there other progenitor cells? We don't know, but MG is the first candidate.

Annual fishes are a unique example of extreme environmental stress tolerance among vertebrates. They inhabit temporary savannah and pampa pools of Africa and South America that become dry when fishes are still in active reproduction (Wourms, 1972; Podrabsky et al., 2010; Berois et al., 2015). The species are maintained by embryonated eggs buried in the mud. Our model, *Austrolebias charrua*, is an annual fish species with a lifespan of 8 months that presents active and fast neurogenesis in several adult brain regions (Fernández et al., 2011). These fish live in temporary puddles of water that progressively lose luminosity as they dry when animals are still actively mating. Thus, we hypothesized that the demands for retinal cell proliferation increases as puddle luminosity decreases and the reproductive activity imposes the finding of couples to mate and preserve the species. In accordance, it has been shown that a greater number of rods will be necessary to improve vision under low luminosity (Locket, 1970; Wagner et al., 1976; Chiu et al., 1995; Ali et al., 1990).

In previous studies we have mapped and quantified cell proliferation in various brain regions along ventricular areas of *Austrolebias* (Fernández et al., 2011), estimated the proportion of different populations of proliferating cells and also the putative stem cells using two proliferation markers applied at different temporal windows (Rosillo et al., 2016; Torres-Pérez et al., 2017). Now, using the same methodological approaches, we have analyzed if the retina presents rapid neurogenesis to compensate decreased luminosity. We have also explored if there are related structural changes including the presence of stem/progenitor cells in other retinal regions besides the CMZ.

2. Material and methods

2.1. Animal collection, care and processing

Austrolebias charrua fish (Cyprinodontiformes-Rivulidae) are freshwater teleosts that inhabit temporary ponds. When the ponds dry, all adult fish die, but desiccation-resistant embryonated eggs remain buried into the mud in developmental arrests or “diapause” during 4 or 5 months. Once the ponds flood in the next rainy season, early in April, most embryos hatch. Fish employed in this study were collected during September to November in transient ponds close to the major rivers in Rocha, Uruguay (fishing permission by DINARA, abbreviation in Spanish of the name of the National Direction for Aquatic Resources). Therefore, fish used in experiments were males between 5 and 6 months of age and had an average length of 5 cm. Males were chosen for this study since *Austrolebias* fishes present phenotypic and behavioral sexual

dimorphisms (Berois et al., 2015). Moreover, differences in the nervous system between males and females could exist as reported in many other species (Dulac and Kimchi, 2007). Once the specimens were collected, they were kept in 30 L glass aquariums with aerated, de-chlorinated tap water (pH 7–7.5; 19 ± 1 °C) and exposed to natural light (14 h light/10 h darkness). Water was partially changed every 5 days. Fish were fed daily with live *Tubifex* sp. Feeding and housing was maintained in standard conditions since the capture until the processing. Before processing, fish were deeply anesthetized by adding a 1:1000 v/v solution 10% Eugenol (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) to the aquarium water until opercular movement ceased. After that, each fish was intracardially perfused with saline solution to wash the vascular system and then with specific fixative solutions according to the method employed (Rosillo et al., 2016). All procedures were approved by the local Committee for Animal Care and Research (CHEA, UdelaR and CEUA, IIBCE), which follows NIH guidelines for maintenance and use of laboratory animals.

2.2. Transmission electron microscopy and boraxic methylene blue staining

Transmission electron microscopy (TEM) was used to examine the ultrastructural features of the cell types in the neurogenic niches located in the ciliary marginal zone in the retina. Six fish (light) were perfused with 2.5% glutaraldehyde plus 2% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich Corporation) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). Eyes were removed and kept in the same fixative for 2 h at 4 °C. Then, tissue was transferred to PB overnight. The eyes of fish or 200 µm vibratome sections were post fixed in 2% osmium tetroxide for 1.5 h, rinsed with PB, dehydrated through ascending ethanol series (50, 75, 95 and 100%) and then with anhydrous acetone before final embedding with epoxy resin (Durcupan, Sigma-Aldrich). Semi-thin sections (1 µm) were obtained using a PowerTome XL ultramicrotome (RMC, Az) and stained with 1% boraxic methylene blue before being observed in a Nikon Eclipse E 200 microscope. Images were taken using a Nikon COOLPIX 8400 digital camera. Ultrathin (60 nm) sections were cut with a glass knife, mounted on Formvar-coated slot grids (2 × 1 mm) and contrasted with 2% uranyl acetate and lead citrate in accordance with Reynolds' method (Reynolds, 1963). Individual cell types were characterized by examination using both a Jeol 100CX-II and a Jeol JEM1010 TEM equipped with 4000 a.m. DVC and HAMAMATSU C-4742-95 digital cameras, respectively.

2.3. Temporal discrimination of cell proliferation: 5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU) application

The administration of different halogenated thymidine analogs that can be distinguished by specific primary antibodies together with careful timing between administrations allowed the discrimination of proliferating cell subpopulations in the brains of amniotes (Vega and Peterson, 2005; Llorens-Martín et al., 2010), anamniotes (Grandel et al., 2006; Alunni et al., 2010) and invertebrates (Sullivan et al., 2007). Therefore, to study dynamics of cell proliferation in the CMZ of the *Austrolebias charrua* retina, eighteen adult fish (9 for light and 9 darkness) were injected via intraperitoneal with two halogenated thymidine analogs (IdU, CldU, Sigma-Aldrich). Two fish were used as controls and were injected with 50 µl of saline solution (the same volume was injected with proliferation markers). The dark condition was obtained by putting the fish in aquariums with black walls. Under these conditions, only some light enters creating an ambient with much lower luminosity (~480 lux in light and ~40 lux in darkness, measured at 12 p.m.). The darkness group was conditioned in the dark aquarium during 4 days before the application of the first proliferation marker (IdU). Administration of IdU (57.5 mg/kg body weight) was at day 0 and that of CldU (42.5 mg/kg body weight) was 29 days later. At day 30 (1 and 29 days after CldU and IdU injection, respectively), fish were anesthetized

and fixed with 10% PFA (Fig. 1A). In all experiments, IdU was dissolved in 0.7% NaCl and 0.04 N NaOH and CldU in 0.7% NaCl, respectively. Six fish were injected with a single dose of BrdU (100 mg/kg, Sigma-Aldrich) and after 30 days were fixed. This marking would then be combined with an antibody that recognized the brain lipid binding proteins (BLBP) for detecting radial glial cells. In all cases, injections and animal processing were done at 12 p.m., to avoid interferences of the circadian cycle on the cell proliferation rate as reported in zebrafish (Akle et al., 2017).

2.4. Immunohistochemistry

After fixation, dissection and post-fixation, eyes were transferred to PB and maintained at 4 °C until processing. Fixed eyes were serially sectioned in parasagittal sections of 60 µm thickness in a Vibratome S1000 (Leica, Buffalo Grove, IL, USA). Finally, sections were transferred to multi-well plates for further free-floating immunohistochemistry processing.

Proliferation markers incorporated during the S-phase of the cell cycle were analyzed in tissue sections pretreated with 2 N HCl in PB containing 0.3% Triton X-100 (PBT) for 45 min at room temperature to break double-stranded DNA into single strands, as previously described in Fernández et al. (2011). After 3 washes of 10 min with PB, proliferating cells were recognized immunohistochemically using antibodies to detect BrdU, (DSHB Cat# G3G4; RRID: [AB_2618097](#); mouse, monoclonal) IdU (BD Biosciences Cat# 347580, RRID: [AB_10015219](#), mouse, monoclonal) or CldU (Accurate Chemical and Scientific Corporation Cat # OBT0030, RRID: [AB_2313756](#), Rat, monoclonal) (see Table 1). In addition, double immunolabeling against BrdU and the neuronal protein marker HuC, (Abcam Cat# ab78467, RRID: [AB_1566163](#); rabbit; polyclonal) or β III tubulin (Abcam Cat# ab41489, RRID: [AB_727049](#), chicken; polyclonal) was done to identify the proliferating cells that were differentiated into a neuronal phenotype, or double immunolabeling against BrdU and BLBP to detect radial glial cells. Incubation was made for 48 h at 4 °C. After rinsing with PB (3 × 10 min), recognition of each label was performed with secondary antibodies conjugated to the fluorescent markers Alexa 488 and Alexa 633 (Invitrogen, CA, USA), both diluted 1:1000 in PBT.

To visualize CldU and IdU, tissue sections were incubated 48 h at 4 °C with 1:500 dilutions of both rat anti-CldU/BrdU (Accurate, New York, USA) and mouse anti-IdU/BrdU (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Sections were rinsed in PB (3 × 10 min) and incubated in donkey anti-rat biotinylated secondary antibody at 1:500 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in PBT for 1 h. After that, sections were quickly washed 3x in PB and incubated in a mixture of streptavidin conjugated to Cy3 at 1:500 and donkey anti-mouse Alexa 488 at 1:500 in PBT for 90 min. Combinations of CldU and IdU together with anti-Pax6 (Abcam, Cat# ab135147, RRID: [AB_2891134](#), rabbit, polyclonal) and Sox2 (Abcam Cat# ab97959, RRID: [AB_2341193](#); rabbit, polyclonal) antibodies (both transcription factors of neurodevelopmental differentiation usually expressed in stem cells), or anti-BLBP were employed to identify progenitor and radial glial cells. All sections were mounted with glycerol with 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and imaged using a confocal FV300 Olympus microscope with Fluoview 5.0 software (Olympus Fluoview 300 Confocal Microscope, RRID: [SCR_020339](#)). Sequential imaging and multi-plane view analysis were done using 20x (0.50 N.A.), 40x (0.75 N.A.) and 60x (1.42 N.A.) lenses.

2.4.1. Primary antibodies used and controls

A summary of the antibodies employed appears in Table 1. All antibodies were previously validated by other researchers and ourselves or indicated by the manufacturer as able to be used in zebrafish, as is the case of the anti-BrdU antibody that was employed in many fishes including zebrafish (Grandel et al., 2006) and *Austrolebias* (Rosillo-Martí et al., 2010; Fernández et al., 2011). IdU and CldU antibodies were used in *Gymnotus omarorum* by Olivera-Pasilio et al. (2014). In all cases, to

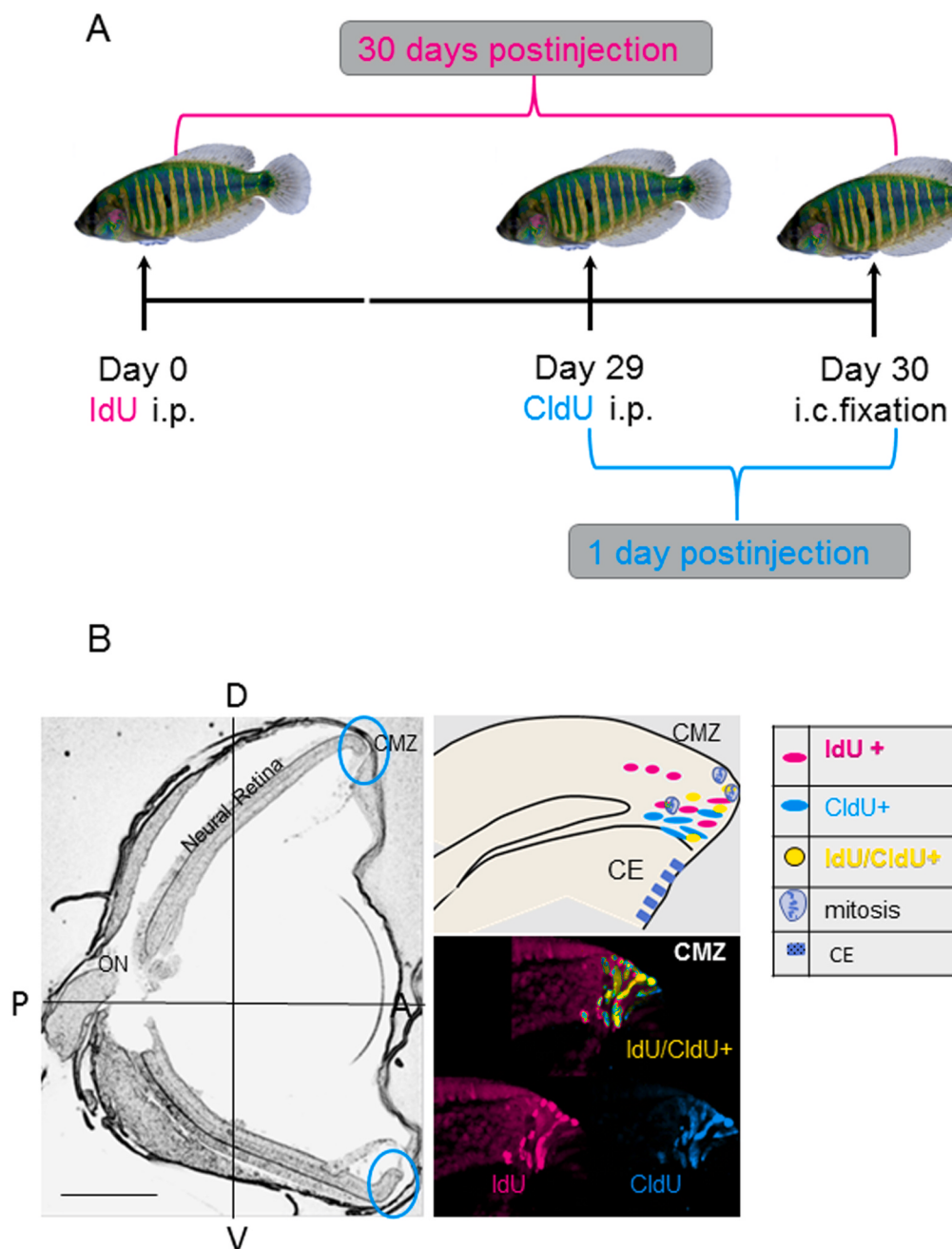


Fig. 1. Experimental design and proliferating cells analyzed. A: Schematic representation of the experimental design showing the time of intraperitoneal (i.p.) administration of IdU and CldU at day 1 and 29, respectively. Fish were processed by intracardiac (i.c.) fixation at 30 days post-injection of IdU and at 1 day post-injection of CldU. B: The microphotograph on the left shows a sagittal unstained section of the eye with the CMZ encircled in cyan. In the upper right panel, there is a schematic representation of the proliferative cellular types located in the CMZ with abundant mitotic figures and the CE. The bottom right panel shows a confocal image with cell nuclei labeled with both cell proliferating markers IdU (magenta) and CldU (cyan), and the merged image showing double labeled (IdU+/CldU+) cells in yellow. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CE-ciliary epithelium; ON- optic nerve; D-dorsal; V- ventral; P- posterior; A-anterior. Scale bar in B: 300 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

determine optimal conditions for antibody incubation, including its dilution, intestine sections from rats injected with BrdU, CldU, IdU or vehicle were used as positive or negative controls, respectively.

Among the antibodies used to recognize cell phenotypes in *Austrolebias*, the anti-BLBP antibody was employed by Wen et al. (2010) in *Trachinotus blochii* fish; the anti-HuC antibody that is able to be used in zebrafish as the manufacturer (Abcam) indicates was utilized by Arslan-Ergul et al. (2016), and the anti-Pax6 and anti-Sox2 antibodies that were used to recognize stem/progenitor cells were previously employed by Sakurai and Osumi (2008). For the recognition of rod photoreceptors,

we used an antibody from the Hybridoma Bank, the anti-Rod XAP-2 (DSHB Cat# XAP-2 (Clone 5B9), RRID: [AB_528087](#), mouse; monoclonal). In each case, we determined optimal concentration and incubation conditions by exposing *Austrolebias* and zebrafish brain sections at the same time in equal conditions.

2.5. Quantitation of proliferating cell number under light and darkness

The medial sections of the eye were selected for quantification, discarding the sections containing the poles where the configuration of the

Table 1
Antibodies, their antigens and manufacturer information.

Antibody	Immunogen	Manufacturer, catalog number, species, type	Dilution
Anti-HuC antibody	Synthetic peptide near the N terminus of human/rat/mouse HuC	Abcam Cat# ab78467, RRID: AB_1566163 , rabbit, polyclonal	1:100
Anti-beta III Tubulin antibody	Three different synthetic peptides conjugated to KLH. These synthetic peptides corresponded to different regions of the beta III Tubulin gene product, but are shared between human and rat.	Abcam Cat# ab41489, RRID: AB_727049 , chicken, polyclonal	1:1000
BrdU (Bromodeoxyuridine) antibody	5-bromo-2'-deoxyuridine-BSA	DSHB Cat# G3G4, RRID: AB_2618097 , mouse, monoclonal	1:80
BrdU antibody, Clone BU1/75 (ICR1) (Used to detect CldU)	The details about of the immunogen are not available in the Datasheet of the company.	Accurate Chemical and Scientific Corporation Cat #OBT0030, RRID: AB_2313756 , rat monoclonal	1:500
BrdU antibody, Clone B44. (Used to detect IdU)	Derived from hybridization of Sp2/0-Ag14 mouse myeloma cells with spleen cells from BALB/c mice immunized with iodouridine conjugated ovalbumin	BD Biosciences Cat# 347580, RRID: AB_10015219 , mouse, monoclonal	1:500
Anti-BLBP antibody	Synthetic peptide corresponding to Human BLBP (C terminal) conjugated to Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH).	Abcam Cat# ab110099, RRID: AB_10866432 , goat, polyclonal	1:500
Anti-PAX6 antibody	Synthetic peptide corresponding to a region within the internal amino acid sequence of Human PAX6	Abcam, Cat# ab135147, RRID: AB_2891134 , rabbit, polyclonal	1:250
Anti-SOX2 antibody	Synthetic peptide. This information is proprietary to Abcam and/or its suppliers	Abcam Cat# ab97959, RRID: AB_2341193 , rabbit, polyclonal	1:500
Mouse Anti-Xenopus XAP-2 Photoreceptor, rods only Monoclonal Antibody, Unconjugated	Immunosuppressed against Xenopus embryos, immunized with Xenopus tadpole optic nerves and retinae	DSHB Cat# XAP-2 (Clone 5B9), RRID: AB_528087 , mouse, monoclonal	1:20

ciliary marginal zone is missing. The number of the sections counted in each eye was eighteen. CldU positive and IdU positive nuclei present in retinal sections were counted in six pairs of eyes. To do this, image stacks of 30 μm with steps of 1 μm were obtained to quantitate cells labeled either with one or both proliferation markers. The total numbers, as well as the percentage of CldU (cyan), IdU (magenta) and IdU/CldU (yellow) cells in each region per fish were counted for light and dark conditions. Recognition of positive cells was done using the ImageJ free software (ImageJ, RRID: [SCR_003070](#)). Descriptive statistics, comparisons among groups and plotting were done by using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad

Prism, RRID: [SCR_002798](#)). Non-parametric Kruskal Wallis test followed by Dunn's comparison was employed to compare the data among different groups. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. Significant statistical difference was determined at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cytoarchitecture of the CMZ by TEM

The vertebrate eye consists of the neural retina and the retinal pigmented epithelium. In the adult fish and amphibians, retinal tissues continue growing from a ring-shaped stem cell niche located in the retinal periphery, the CMZ. The semi-thin sections allow us a panoramic view of the whole neural retina with the CMZ located in an edge limiting with the pigmented epithelium that covers the retina and continues covering the single cell row of the non-pigmented CE (Fig. 2B). The electron microscopy analysis of the CMZ of *A. charrua* fish showed a regionalization consistent with the compartmentalization described for zebrafish CMZ after using various molecular expression techniques (Raymond et al., 2006) (Fig. 2A). Our data showed the three CMZ regions (Central, Middle and Peripheral) bearing cell types with different morphologies (Fig. 2B). A fourth region formed by the row of non-pigmented CE cells presents cell proliferation and expression of neural stem cell markers.

The CMZ-Peripheral has the most elongated cells, with 7–18 μm of length in their major axis, scanty cytoplasm and nuclei with condensed chromatin denoting significant proliferative activity (Fig. 3A). These cells differentiate from the other progenitor cells because they have little cytoplasm and are similar to neighboring cells except for the space between them, which may evidence that they are moving toward the retinal layers (Fig. 3E). The CMZ-Middle cells have major axis between 6 and 12 μm and are larger than those located in CMZ-Central. The most relevant feature of the CMZ-Middle is that all cells appear to be at some stage of mitosis as suggested by the appearance of chromatin and mitotic figures in many cells (Fig. 3B). The CMZ-Central that borders the rest of the neural retina shows the smallest progenitor cells of 5–8 μm with different sizes and shapes. They have irregular shapes and nuclei with dense chromatin, few cytoplasm and some space between them (Fig. 3C).

The ciliary epithelium continues outside the neural retina and is made up of two layers of cells: the pigmented and the non-pigmented. The pigmented CE contains round pigments and is located externally to the non-pigmented ciliary epithelium. The non-pigmented ciliary epithelium shows particular characteristics. The cells have rectangular shape and possess multiple cytoplasm invaginations on the free edge. On the outside of the free edge, a basal membrane can be seen (Fig. 3D). The cytoplasm containing invaginations is attached to a basal membrane while the borders attached to the pigimentary epithelium are free of invaginations. (Fig. 3F).

3.2. Immunohistochemistry of Sox2, Pax6 and cell proliferation markers

Some eye sections from animals injected with IdU and CldU were incubated with antibodies against Sox2 or Pax6. Sox2 is a transcription factor that is essential for maintaining self-renewal, or pluripotency, of undifferentiated embryonic stem cells (Okuda et al., 2006). This factor was expressed in cell proliferating regions co-localized with CldU/IdU. Many of the double labeled cells (yellow) co-localized with Sox2 in the CMZ-Middle. Sox2 was also expressed in the first segment next to the CMZ-Central at the top of the inner nuclear layer, as well as in the CE where it co-localized with IdU label (Fig. 4A, B, E). Sox2 did not co-localize with BLBP + cells in the CMZ and its expression was not observed in the CMZ-Peripheral, where BLBP was slightly expressed (Fig. 4F). Furthermore, Pax6, a transcription factor with key functions in the development of the eye (Macdonald and Wilson, 1997), also had an important expression in the three regions of CMZ, co-localizing with

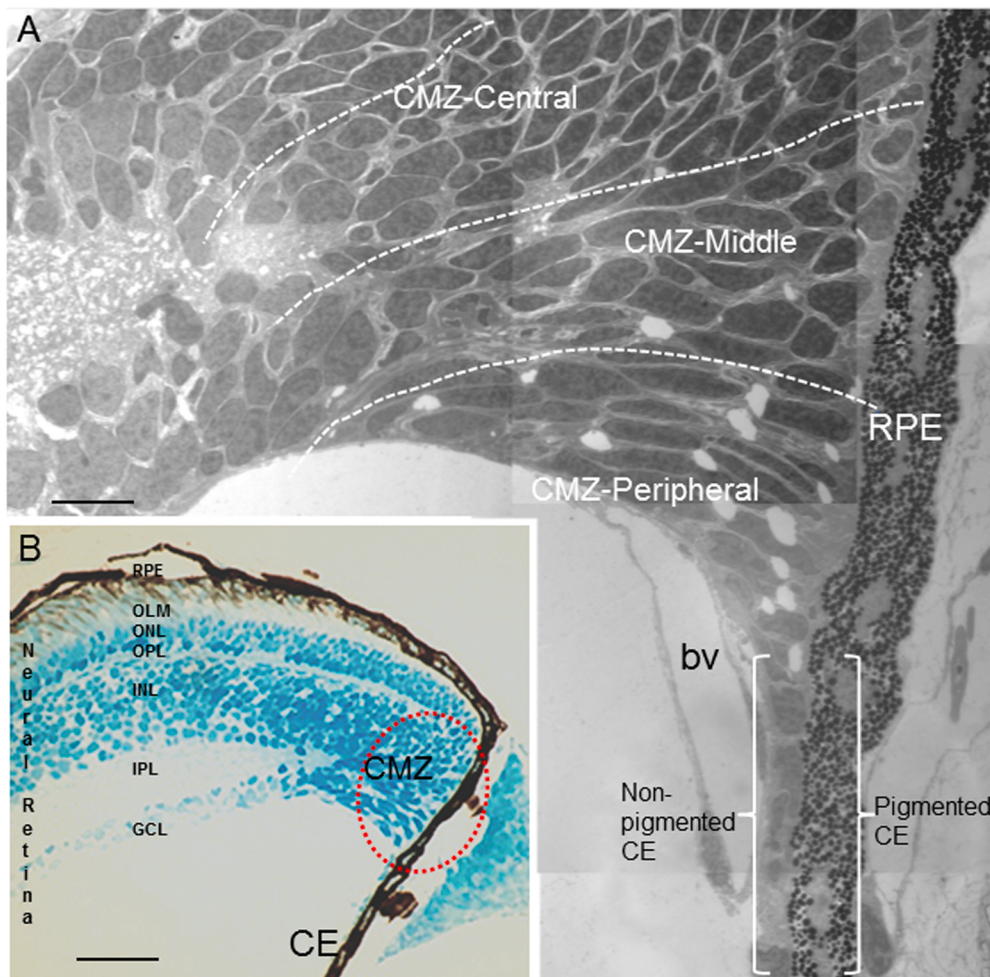


Fig. 2. Transmission electron microscopy images of the CMZ. A: The image shows a photocomposition that allowed the reconstruction of the CMZ. Dashed white lines define the histological landmarks of the three areas identified in the CMZ (Peripheral, Middle, Central) and a fourth zone consisting of the non-pigmented CE attached to the pigmented CE, that are continuous with the retina. B: Part of the retina, including the CMZ, stained with borax methylene blue. The region analyzed in the electron microphotography is framed in red dotted lines. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CE-ciliary epithelium; RPE- Retinal pigmented epithelium; OLM-outer limiting membrane; ONL-outer nuclear layer; OPL-outer plexiform layer; INL-inner nuclear layer; IPL-inner plexiform layer; GCL-ganglion cellular layer; bv: blood vessel. Scale bar in A: 15 μ m; in B: 100 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

proliferative round yellow (IdU/CldU) nuclei, as shown in the orthogonal planes from confocal images (Fig. 5). However, unlike Sox2 expression, Pax6 was found diffusely in many other regions of the retina. In summary, the findings showing that Sox2 and Pax6 co-localize in the IdU/CldU nuclei and are strongly expressed in the CMZ indicate that this region is an active neurogenic niche.

3.3. Retinal glial cells and neurogenesis

We performed some experiments injecting 6 adult fish with a single dose of BrdU and allowing 30 days of survival under normal light conditions. In samples from these experiments, anti-BrdU recognition was combined with antibodies against radial glial markers, such as BLBP, or neuronal markers, such as HuC and β III tubulin, to detect neurogenesis. BrdU detection under normal light conditions showed a clear cell proliferation in the outer nuclear layer of the retina and in the peripheral, middle and central regions of the CMZ (Fig. 6A). Surprisingly, BLBP expression was strongly observed throughout the retina but with a very clear predominance in the region close to the CMZ up to $\sim$ 200–400 μ m, decreasing towards to the center of the retina. There is also strong expression at the level of the optic nerve outlet. BLBP + cells were found in the CMZ-Central, little BLBP expression was seen in the CMZ-Peripheral, but was absent in CMZ-Middle. BLBP + cells were observed in the CMZ-Central co-localizing with BrdU (Fig. 6). The biggest BLBP + cell bodies were found in the INL, consistent with the description of the morphology of Müller radial glia. The BLBP + radial glial somas were located at different levels of the INL (level 2 in Fig. 6B and C) and had different morphology. The sizes of cell bodies were

variable between 8 and 20 μ m in their major axis, with their processes reaching all layers of the retina. The apical processes showed small terminal triangular feet aligned beyond the ONL (level 1 in Fig. 6B and C) as a closure integrated to the outer limiting membrane (OLM) (Fig. 6, small arrows). At the ONL level, small cells with BrdU + round nuclei were enwrapped by thin BLBP + processes. These BrdU + cells could be progenitors generated by asymmetric division from Müller glia in the INL (Morris et al., 2008). Robust BLBP + terminal cell processes were found at the bottom of the ganglion cell layer (GCL) and seemed to envelope flattened nuclei cells (level 3 in Fig. 6B and C) with elongated nuclei (Fig. 6C, inset). Few of these cells were BrdU+ (Fig. 6A, C, white arrow). Cells with slight BLBP expression were also found in the ciliary epithelium (Fig. 6). Triple label of CldU/IdU/BLBP performed in fishes in permanent darkness showed that BLBP + cells are a proliferating population that co-localizes with some CldU/IdU yellow cells or only with CldU or IdU + nuclei (data not shown). Therefore, MG respond to darkness by increasing cell proliferation.

Neurogenesis in the retina was demonstrated by immunolabeling against the ribosomal neuronal marker HuC. This marker was strongly expressed in the GCL and the INL, whereas there was no expression in the ONL. Double label HuC/BrdU was found in the CMZ-Central and -Middle. HuC was expressed in neuroblasts and in mature neurons. The β III tubulin antibody recognizes the axonal microtubules and is strongly present in differentiating neurons. Double label signals of β III tubulin together with BrdU were found in the central and middle region of the CMZ, the ONL, the INL and the GCL (Fig. 7).

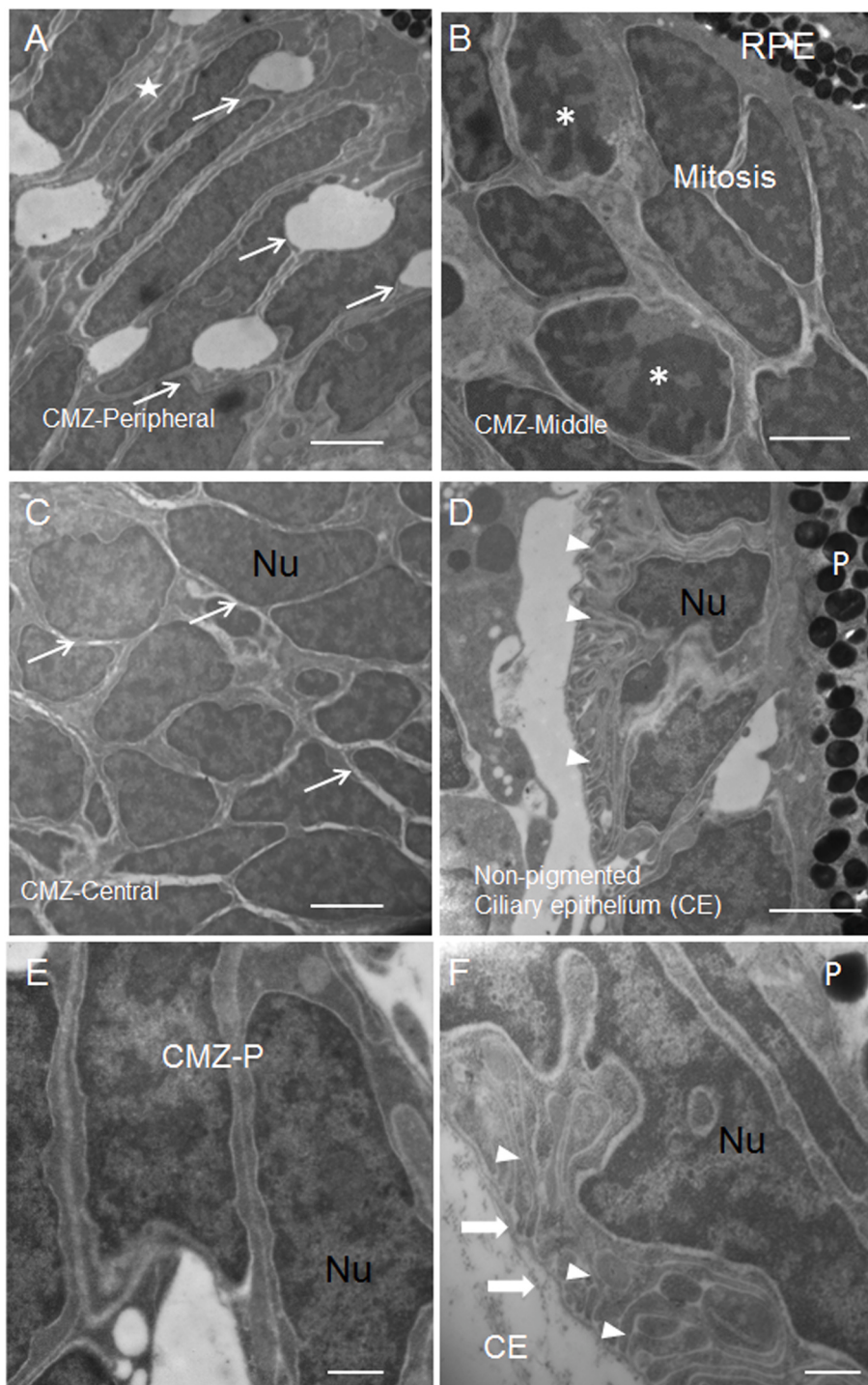


Fig. 3. Transmission electron microscopy images of cell types in the CMZ. A: The CMZ-Peripheral contains elongated cells with scanty cytoplasm, elongated nuclei and large intercellular spaces (white arrows). The star indicates the intricate cytoplasm interdigitations. B: Many cells in the CMZ-Middle present a proliferative phenotype with very condensed chromatin. Abundant cells in this region are in some phase of mitosis with visible condensed chromosomes (asterisks). C: Cells from the CMZ-Central possess polygonal shapes and show thin spaces between them (white arrows). D: The cells from the non-pigmented CE show a peculiar cytoplasm with plenty of interdigitations (white arrowheads) and irregular nuclei. E: A higher magnification of the elongated cells in the CMZ-Peripheral. F: A higher magnification of CE cells showing deep foldings in the cytoplasm membrane (arrowheads), which are in contact with the basal lamina (white arrows). Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CE-ciliary epithelium; RPE-Retinal pigmented epithelium; P- pigments; Nu-cellular nuclei. Scale bars in A–D: 2 μ m; in E, F: 1 μ m.

3.4. CldU/IdU double labeling in CMZ under normal light and darkness conditions

We used CldU and IdU labeling to obtain information about the origin, dynamics and migration of proliferating cells. Short (1 day, CldU) and long (30 days, IdU) experiments (Fig. 1) showed the temporal discrimination of the proliferating cell populations in the retina. Three populations of proliferative cells were identified: 1) CldU+ (cyan) fast cycling cells that were located in the three regions of the CMZ but less in the CMZ-Peripheral. No CldU + nuclei were found in the non-pigmented ciliary epithelium; 2) IdU+ (magenta) nuclei were found in all regions of the CMZ with less presence in the CMZ-Middle and frequently located in

the non-pigmented ciliary epithelium. IdU + cells were also found outside the CMZ, such as in the ONL and the GCL. As IdU + cells were recognized 30 days after IdU application, it is possible that these cells were found in the ONL and GCL due to their migration from their origin in the CMZ or to in situ generation; 3) CldU+/IdU+ (yellow) slow proliferating cells that do not migrate but reenter the cell cycle after 29 days as indicated by the uptake of the second proliferation marker (Fig. 8A). The analysis of confocal planes of retinal serial sections demonstrated the precise co-localization of CldU/IdU markers, yellow stained cells, that were mostly confined into the CMZ and very few were found in other regions of the neural retina. Some of the yellow cells co-localized with the stem cell markers Sox2 and Pax6 showed before

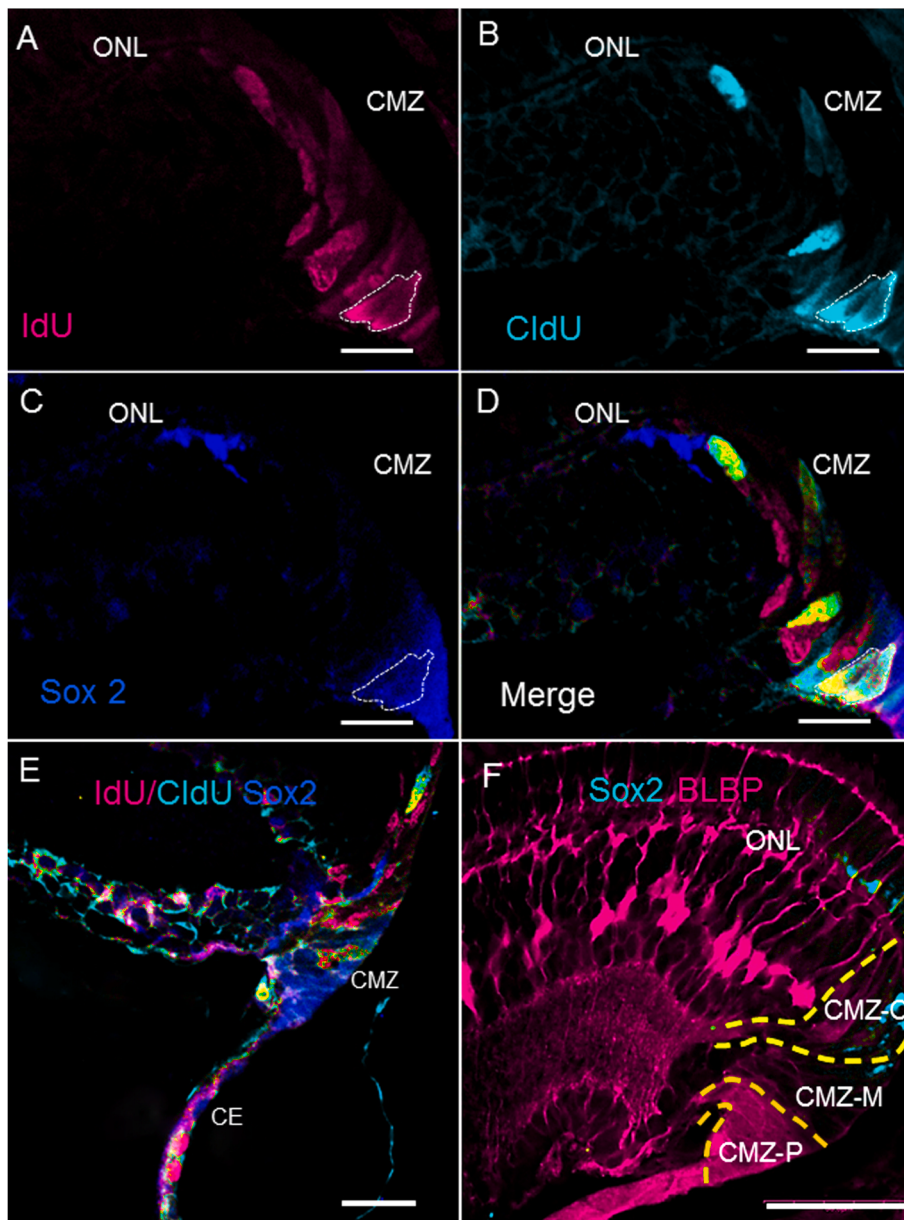


Fig. 4. IdU/CldU/Sox2 triple labeling. A–C: Immunohistochemistry against IdU (magenta), CldU (cyan) and Sox2 (blue) in the CMZ. Dotted white lines show a couple of cells with triple labelling. D: Merged images of A–C showing the co-localization of IdU, CldU and Sox2 (white) confirming the presence of stem/progenitor cells in the CMZ-P region. E: Confocal image of triple immunolabeling against IdU (magenta), CldU (cyan) and Sox2 (blue), showing Sox2 expression in the CMZ-C and part of the CMZ-P co-localizing with both cell proliferation markers. In the ciliary epithelium, Sox2 co-localizes with IdU + nuclei. F: Photomicrography showing BLBP (magenta) and Sox2 (cyan) double labeling without co-localization. Note that Sox2 signal is in the CMZ-C and in the adjacent retina in the ONL, whereas BLBP is strongly expressed in CE but negative in CMZ-M. Dashed yellow lines indicate the different CMZ regions. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CMZ-P- CMZ-Peripheral; CMZ-M- CMZ-Middle; CMZ-C- CMZ-Central; CE-ciliary epithelium; ONL-outer nuclear layer. Scale bars: in A–D: 10 μ m; in E: 100 μ m; in F: 30 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 5).

Quantitation of the three cell populations identified showed a permanent cell proliferation activity in the CMZ under light conditions. The IdU + cell population (magenta) represents more than twice that of CldU+ (cyan), which is reasonable given that they could have divided more than once during the 30 days after IdU application. There is a significant proportion of CldU+/IdU + cells (yellow) that are around 36% of the total population of proliferative cells (Fig. 8C, plain columns).

The experiments performed in darkness conditions showed a statistically significant increase in cell proliferation. Unlike what happens under normal light conditions, in darkness, cell proliferation was found in other retinal layers (Fig. 8A). Cell proliferation was found in the bipolar cell layer and GCL, but predominantly in the outer nuclear layer corresponding to the photoreceptor nuclei (Fig. 8B). Quantitation of the total number of IdU+ (magenta) and CldU+ (cyan) cells showed statistically significant increases in darkness over light conditions (Fig. 8C). However, the number of double-marked cells (IdU+/CldU+, yellow nuclei) did not show significant differences between light and dark

experimental conditions (Fig. 8C). Therefore, we propose that there is a constant population of proliferating double labeled cells (yellow) that include the stem/progenitor cells in the CMZ.

Analysis of rod photoreceptors using the XAP-2 antibody, and comparing the retina of fish exposed to light versus darkness, showed more rod rows in darkness, coincident with an increased cell proliferation in the ONL (Fig. 9A, C).

Analysis of cell proliferation in different retinal cell layers in light and dark conditions show significant increased number of BrdU + nuclei in the ONL as well as in other retinal layers (Fig. 10A and B). Semi-thin sections also revealed differences in the retinal cytoarchitecture with the ONL being ~30% thicker in darkness with respect to light. Under light conditions, the ONL shows a row of irregular cells with nuclei intensely stained with boraxic methylene blue that are intercalated among the nuclei of rods and cones. In darkness, the amount of these intensely stained cells tripled (Fig. 10C and D). Transmission electron microscopy in the region of rods and cones clearly show a higher density of rods in retinas from dark conditions, whereas in light, cones are the predominant cell type (Fig. 10E and F).

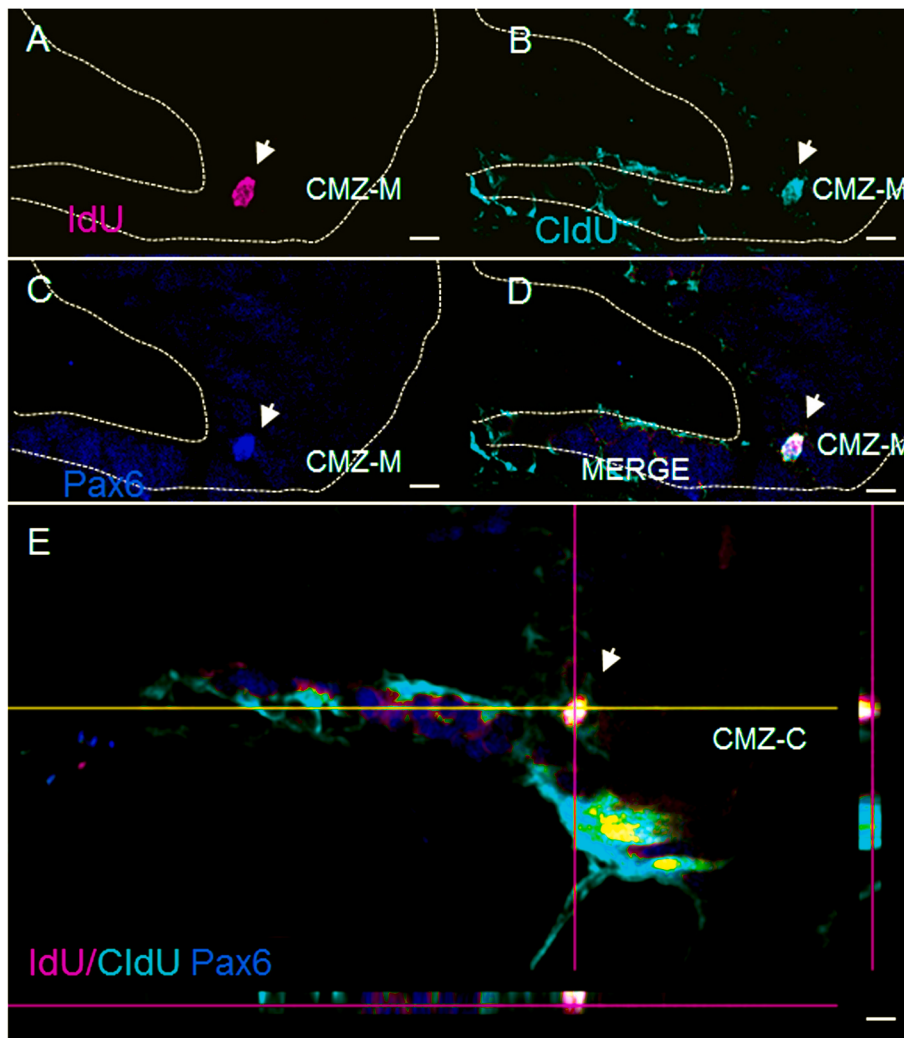


Fig. 5. IdU/CldU/Pax6 triple labeling. A–C: Immunohistochemistry against IdU (magenta), CldU (cyan) and Pax6 (blue) in the CMZ. D: Merged images of A–C showing the co-localization of IdU, CldU and Pax 6. White arrows point to a nucleus that was labeled with the three markers. White dotted lines frame the CMZ region and surroundings. E: Orthogonal planes of a 30 µm stack of the CMZ at the level of the triple labeled nucleus confirming co-localization of the three markers. This demonstrated the presence of a stem/progenitor cell in the CMZ-C. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CMZ-C- CMZ-Central. Scale bars: 5 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

4. Discussion

In this study we have addressed two main aspects of retinal plasticity: the regionalization of CMZ progenitor cells by morphological and molecular characteristics, and retinal cell proliferation dynamics under light and permanent darkness to simulate the light context of drying temporary puddles. Comparison of cell proliferation in the same animals under light conditions showed that the retina has greater proliferative activity than brain visual areas. In addition, CMZ has a stable population of stem cell candidates that is three times that of those previously detected in brain regions involved in visual processing (data previously published in [Torres-Pérez et al., 2017](#)). In darkness, proliferating cells in the layers of the differentiated retina (ONL, INL, and GCL) were abundant, while in the CMZ no significant changes were observed.

4.1. Identification of retinal cell progenitors

The analysis by electron microscopy allowed morphological identification of four types of retinal progenitor cells: three in the CMZ and a fourth in the CE, all mostly differentiable by their distinctive morphology and expression of markers as indicated by immunolabelling ([Fig. 12](#)). The regionalization of the *Austrolebias* CMZ found in this work seems consistent with the data reported by Raymond's group (2006), who demonstrated, by gene expression analysis of the CMZ zebrafish, a regional compartmentalization in three sectors with different progenitor cells that express different proneural and stem cell genes. Molecular

studies reveal that cells from peripheral to central CMZ have different expression profiles of transcription factors, signaling molecules and cell cycle genes ([Agathocleous and Harris, 2009](#); [Cervený et al., 2012](#); [Johns and Easter, 1977](#); [Raymond et al., 2006](#)). The clonal analysis and imaging studies in adult zebrafish retina show that stem/progenitor cells reside at the extreme peripheral edge of the CMZ, and that, as the retina develops, they divide increasingly asymmetrically in the radial orientation in the same way that occurs in the embryo ([Wan et al., 2016](#)).

Another site recognized as a neurogenic niche is the ciliary non pigmented epithelium ([Otteeson and Hitchcock, 2003](#); [Raymond et al., 2006](#); [Bernardos et al., 2007](#)). The cells in the *Austrolebias* CE have a very peculiar morphology. They proliferate and express Sox2, Pax6 as well as BLBP, suggesting they can be stem cells as proposed by [Raymond et al. \(2006\)](#). The cells in the CMZ-Peripheral are elongated, proliferate, and express Sox2, Pax6 and a slight BLBP signal ([Figs. 4, 5 and 12](#)). These cells are the putative stem cells that divide slowly and maintain the stem cell progeny ([Miles and Tropepe, 2021](#)). Between the elongated cells there are spaces that could be interpreted as resulting from the movements produced by cell proliferation and migration or as spaces through which signals flow to maintain the normal activity of the neurogenic niche. These spaces only appeared in the CMZ-Peripheral and were consistently found in all fish analyzed. Similar spaces between cells in movement were previously described in different neurogenic niches through diverse species ([Álvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002](#)). Elongated cells from the CMZ-Peripheral remind of the neuroepithelial-like cells described in stem cell compartments of the

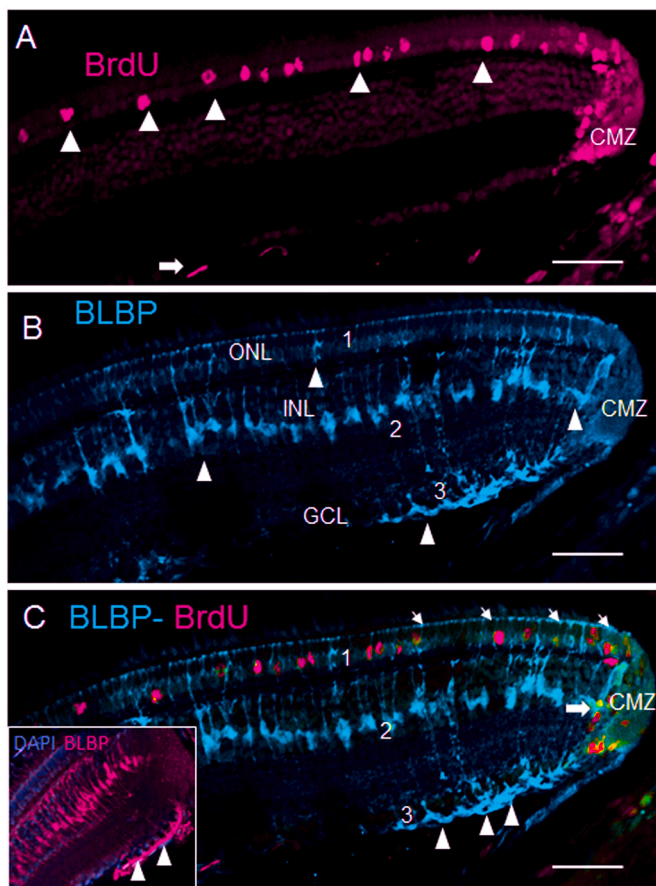


Fig. 6. Immunohistochemistry of BrdU and BLBP in Müller glia cells under light condition. A: Confocal image of retina at 30 days after BrdU injection. Many BrdU + nuclei (magenta, white arrowheads) are present in the CMZ and ONL. A flat nucleus positive to BrdU is found at the level of the GCL (white arrow). B: BLBP expression (cyan) was observed in the whole retina except in the CMZ-Central and CMZ-Peripheral. In level 1 there are BLBP processes that surround photoreceptor cell bodies (white arrowhead) and end contributing to the OLM layer. In level 2 there are the typical large cell bodies of Müller glia in the INL (white arrowheads) and in level 3 there are flattened cells surrounded by strong BLBP + processes (arrowhead). C: Merge from A and B images. Yellow color indicates co-localization of both markers some at the ONL level (1) but mainly in the CMZ-Peripheral. Small white arrows show the BLBP end processes contributing to the OLM layer. Inset shows double BLBP/DAPI (magenta/cyan) labeling to evidence the presence of cell bodies adjacent to the GCL (white arrowheads). Note that strong BLBP + processes surround flat nuclei. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; OLM-outer limiting membrane; ONL-outer nuclear layer; INL-inner nuclear layer; GCL-ganglion cell layer. Scale bars in A–C: 50 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

adult zebrafish brain that were postulated by Lindsey's group as “primed to modulate their cellular behavior upon change of the environment or sensory stimuli compared with radial glial cells” (Lindsey and Tropepe, 2014; Lindsey et al., 2019).

In *Austrolebias*, elongated cells with morphology similar to neuroepithelial-like cells, are present in many neurogenic niches of the brain related to growth of structures, like the dorsal and ventral extremes of the Tectum Opticum or transitional places between two brain structures such as that of the Telencephalon-olfactory bulb (Rosillo et al., 2016; Torres-Pérez et al., 2017). These cells seemed to be more proliferative compared to radial glia (Raymond and Rivlin, 1987; Otteson et al., 2001; Fernández et al., 2002; Lindsey et al., 2019). The CMZ-Middle is the highest proliferative region, with long-round cells in which CldU/IdU co-localize with Sox2 or Pax6. In the CMZ-Central there

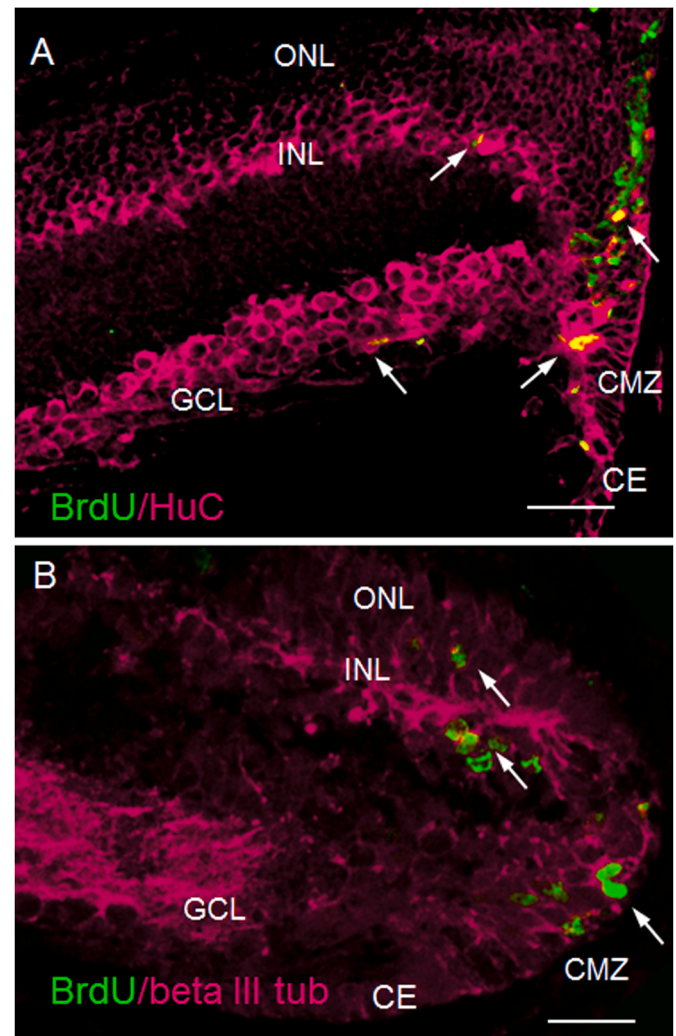


Fig. 7. Neurogenesis in the retina. A: Confocal image showing the double immunostaining of BrdU (green) and the neuronal marker HuC (magenta) at 30 days after BrdU injection. Double-labeling evidences newly born neurons in the INL, CMZ-Central and in the GCL (white arrows). B: Co-immunolabeling against BrdU (green) and the early neuronal marker beta III tub (magenta). The image shows the co-localization of both signals in the CMZ, ONL and INL as pointed by white arrows. Abbreviations: beta III tub-beta III tubulin; CMZ-ciliary marginal zone; ONL-outer nuclear layer; INL-inner nuclear layer; GCL-ganglion cell layer. Scale bars in A: 30 µm; in B: 20 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

is strong expression of BLBP that co-localizes with BrdU (Fig. 6). CMZ-Central contains the cells that are the most similar to the rest of the retina, strongly suggesting that the newly generated cells in CMZ-C provide the cells that will integrate the different cell layers.

4.2. Müller glia of the adult *Austrolebias* retina

The annual fishes of the *Austrolebias* genus increase their body size many times in a short period of time. The nervous system growth is accompanied by cell proliferation, where radial glial cells play a crucial role, as we previously detected (Torres-Pérez et al., 2017). Now, we found that in the retina of adult *Austrolebias* fish there is an essential presence of BLBP + radial glial cells not only in the central and peripheral CMZ but also widely distributed in most of the retina. However, in the zebrafish, after two months of life the BLBP + Müller glia is reduced and observed only in the CMZ (Johns and Fernald, 1981; Raymond et al., 2006). The comparative analysis among vertebrates shows

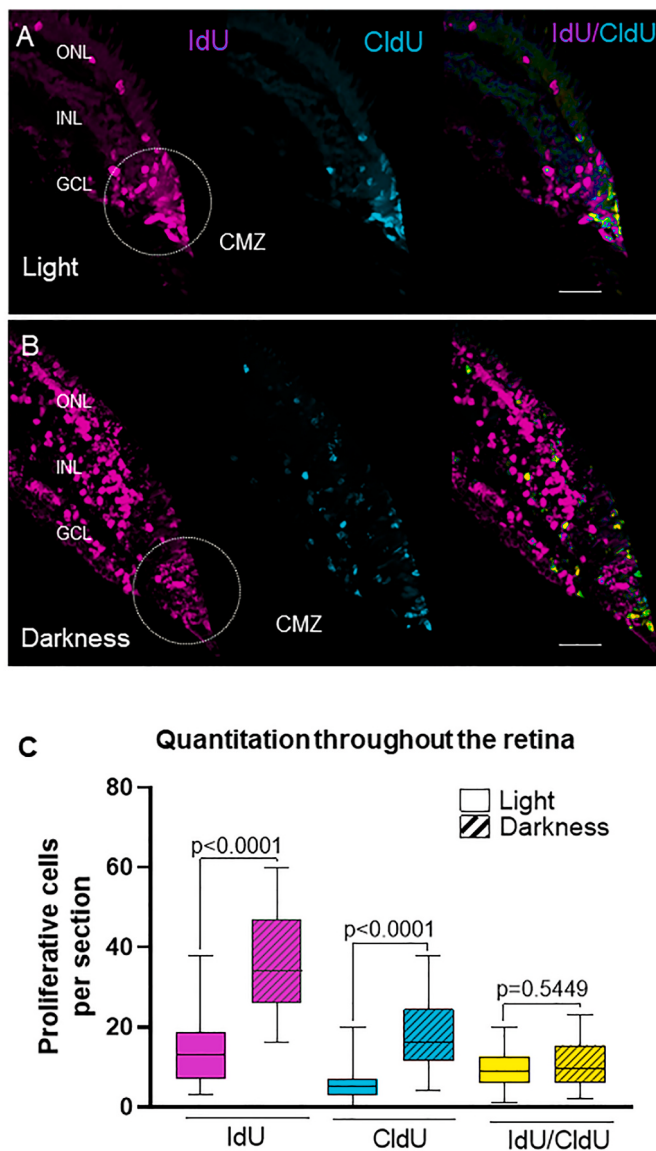


Fig. 8. IdU/CldU double labeling experiments under light and darkness. A: Confocal images of a 30 µm stack showing IdU+ (magenta) and CldU+ (cyan) nuclei as well as the merged (yellow) image in normal light conditions. Note that cell proliferation is predominantly found in the CMZ (dashed white circle), but there are some proliferating nuclei in the ONL. B: Confocal images of a 30 µm stack showing IdU+ (magenta), CldU+ (cyan) and IdU+/CldU+ (yellow) nuclei under darkness, evidencing that cell proliferation is widespread in all cell layers of the retina. C: The chart shows the averaged total number of IdU+, CldU+ and IdU+/CldU+ nuclei under light and darkness conditions throughout the retina. Under light conditions, the quantitation shows an important population of progenitor yellow cells that remains inside the CMZ and reenters the cell cycle in a month. In darkness, there were statistically significant increases in IdU and CldU cells in all the retinal cellular layers but double-labeled cells remained unchanged in both conditions. The p values were determined with Kruskal Wallis test (Statistic = 50.87) and Dunn's multiple comparisons among different experimental groups. Significance level was determined at $p < 0.05$. Abbreviations: ONL-outer nuclear layer, INL-inner nuclear layer, GCL-ganglion cell layer; CMZ-ciliary marginal zone. Scale bar in A-B: 50 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

that the CMZ has been gradually diminished during vertebrate evolution (Kubota et al., 2002). Probably *Austrolebias* fishes are challenged by environmental conditions and this implies an accelerated growth to complete their short life cycle in a very changing habitat. Thus, we

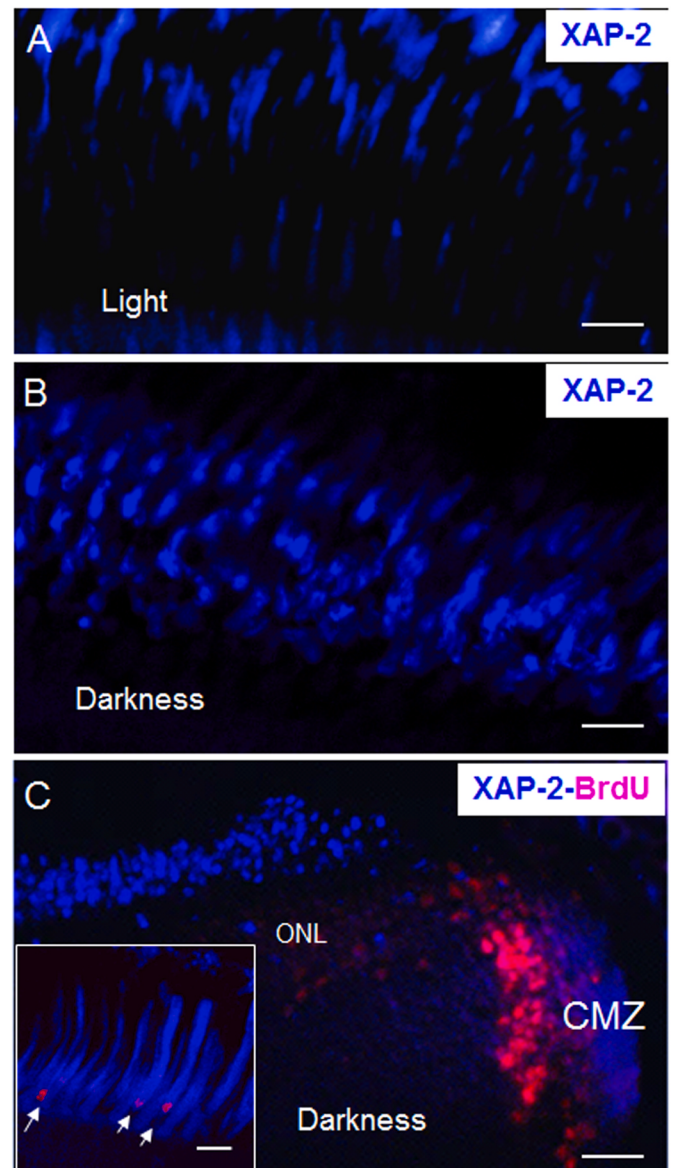


Fig. 9. Darkness induced increased density of rod photoreceptors. A: Representative confocal image showing the immunoreactivity against the rod photoreceptor cell type specific marker XAP-2 (blue) under light conditions. B: Confocal image of the same marker under darkness evidencing stronger signal and increased density of rod photoreceptors. C: Co-immunostaining of XAP-2 (blue) and BrdU (magenta) under dark conditions evidencing increased cell proliferation in the CMZ and in other retinal regions. Inset: XAP2+ rods (blue) that show BrdU + nuclei (magenta) indicating the generation of new rods (arrows). Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; ONL-outer nuclear layer. Scale bars: in A, B: 50 µm, C: 100 µm, inset: 10 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

propose that glial cells act as neuronal progenitors that might be in a latent proliferative state, contributing to growth and responding to environmental demands as has been previously reported in zebrafish (Fausett and Goldman, 2006). It could also be possible that there is a population of latent pluripotent stem cells (double label “yellow nuclei”, not identified yet, some with BLBP + cells), as has been proposed for the adult zebrafish retina by Cameron (2000).

We found BLBP + cell bodies in the central and peripheral CMZ and in the INL at different levels. BLBP expression was found around cell somas in ONL, which can be cell processes that terminate over the ONL, forming the outer limiting membrane and contributing to the strong

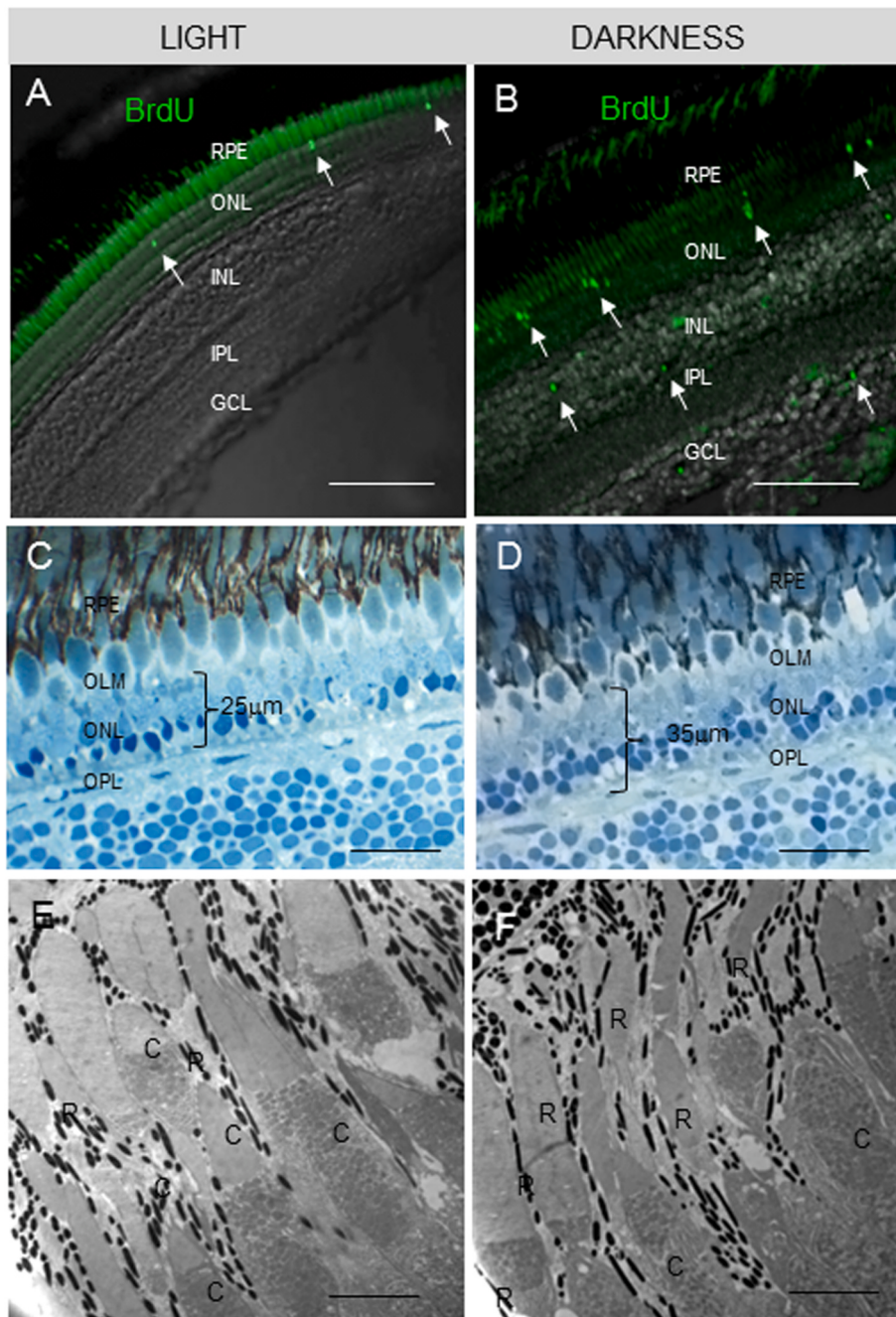


Fig. 10. Differences in cell proliferation and in the cytoarchitecture of the retina in light and darkness. A, B: Representative confocal images showing a single focal plane of BrdU immunofluorescence (green) together with differential interference contrast illumination in equivalent sections of the retina in light (A) and darkness (B) experiments. Under light conditions few nuclei positive to BrdU are found only in the ONL. In darkness, there are more abundant BrdU + nuclei in the ONL and also in the INL and the GCL (white arrows). C,D: Semi-thin sections stained with borax methylene blue to evidence the retinal cytoarchitecture under light (C) and darkness (D) conditions. Note that in darkness, the retinal ONL layer is around 30% thicker than in light. In darkness, the ONL also has two or three rows of cells with more intensely stained nuclei than in light conditions. E,F: Electron microphotograph of the retina at the level of cones (C) and rods (R) showing a different distribution of both cell types under light (E) and darkness (F) with a prevalence of cones in light and of rods in darkness. RPE pigments are seen as dark grains surrounding the outer segment of rods and cones. Abbreviations: RPE- Retinal pigmented epithelium; ONL-outer nuclear layer; OPL-outer plexiform layer; OLM-outer limiting membrane; INL-inner nuclear layer; IPL-inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars in A, B: 100 μ m; in C,D: 30 μ m, in E, F: 5 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

linear density of OLM adherent junctions. Small BLBP + cells found in the ONL might be cell progenitors (rod precursors) originated from Müller glia in the INL that migrated to the ONL as described previously in zebrafish (Fausett and Goldman, 2006). Müller glial cells have been shown to be also able to undergo a reprogramming process to reacquire a stem/progenitor state, allowing them to proliferate and generate new neurons for repair following retinal damages, a process that is more common in fishes than in mammals (Otterson and Hitchcock, 2003; Fausett and Goldman, 2006; Bibliowicz and Gross, 2009; Gorsuch et al., 2017). Comparison of the Müller glia of zebrafish with the regenerative capacity of mouse Müller glia suffering retinal degeneration revealed several new categories of biologic responses that could promote endogenous retinal regeneration, including Wnt, NF- κ B signaling, PGE2 synthesis, expression of central clock genes and signaling metabolic pathways associated with stem cells, which are shared in both biological

models (Hamon et al., 2016; Sifuentes et al., 2016). Unlike that of mammals, the zebrafish retina responds to neuronal damage by proliferation of Müller glia, which can replace all neuron types, including photoreceptors. Müller glia are located so that they can monitor the entire retina and contribute to retinal structure and function (Wan and Goldman, 2016; Iribarne, 2019). In adult *Austrolebias*, BLBP + Müller cells are much more abundant than in adult zebrafish. In this context it is possible that *Austrolebias* Müller glia might be the stem/cell progenitors that can activate and respond to demands associated to lower luminosity, which facilitates and increases the proliferation in INL, ONL and GCL. The immunohistochemical detection of CldU/IdU + positive cells in INL together the BLBP+ was frequently found in darkness condition (data not shown). Recent data from adult zebrafish dark-adapted retinas have shown increased rod precursor cell proliferation while the number of proliferating Müller glia did not significantly change (Lahne et al.,

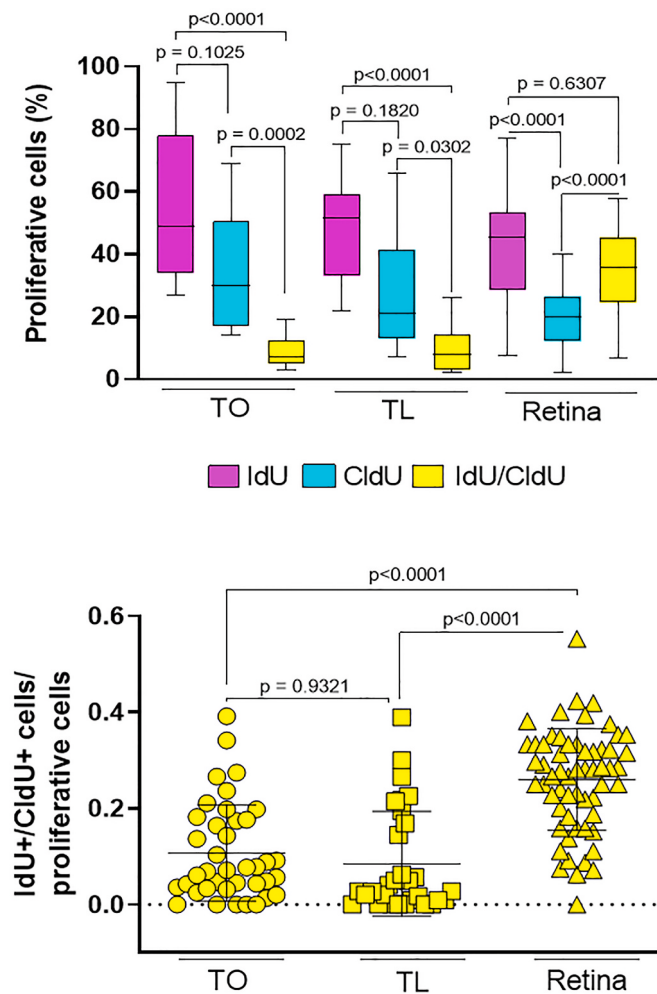


Fig. 11. Quantitative analysis and comparison of cell proliferation in TO, TL and retina. A: Different proportions of the proliferative cell populations in the TO, TL and retina, showing that TO and TL have the same distribution among IdU+ (magenta), CldU+ (cyan) and double labeled cells (yellow). However, in the retina, the population of double labeled cells (yellow) is larger, denoting that a significantly higher percentage of cells re-enter the cell cycle and uptake both markers. B: Analysis of the double marked cell population (yellow) in TO, TL and retina. Note that mean values in retina almost reached 40%, more than three times that of the brain regions analyzed (around 10%). It is important to consider that the analysis in all regions was performed on the same animals. Significant differences and p values were determined by Kruskal Wallis test (Statistic = 149.5) with Dunn's comparisons among groups. Abbreviations: TO- Tectum Opticum; TL- Torus Longitudinalis. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2019). Our results indicate that there is an increase in cell proliferation in the ONL in dark conditions. It is likely that rod precursors are the proliferating population that increases the thickness of the ONL observed in the semi-thin sections. However, we also believe that in the INL there is an increase in the proliferation of BLBP + glia that gives rise to new rod precursors.

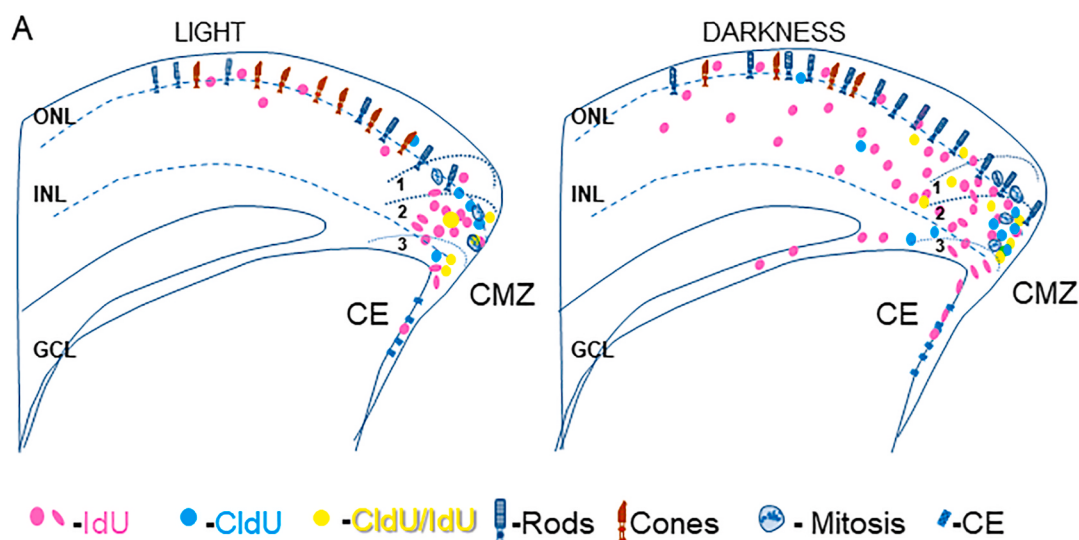
4.3. Retinal cell proliferation dynamics under light and darkness

Under normal light conditions we found that *Austrolebias* CMZ was almost the exclusive proliferation zone, with spare cell proliferation in the INL, ONL and GCL. In normal light conditions scanty cell proliferation was reported in the INL of the mature retina in rainbow trout *Onchoryncus mykiss* (Julian et al., 1998). In *Austrolebias*, proliferating

cells were found in all CMZ regions with a predominance of double IdU+/CldU+ cells in the CMZ- Middle. Under permanent darkness, we found a greater number of proliferative cells throughout all retinal cell layers with significant increases in total number of IdU+ and CldU+ cells (Fig. 8). However, the proportion of the yellow proliferative cells (putative stem/progenitor cells) in the CMZ was stable and had the same absolute number that under light conditions, implying that the pool of candidates to be the stem/progenitor cells in CMZ seemed constant. Remarkably, in darkness, we also found cell proliferation in all layers of the retina with special emphasis on the ONL and INL, sustaining the idea that the greater generation of rods found (Figs. 9 and 10) may compensate higher demands when luminosity decreases. This is in accordance with many studies conducted in different species demonstrating that a greater number of rods is necessary to improve vision under low luminosity (Locket, 1970; Wagner et al., 1976; Chiu et al., 1995; Ali et al., 1990; Nag and Bhattacharjee, 2002; Lahne et al., 2019). As an example, the *Haplochromis burtoni* fish showed a daily rhythm in the retinal cell proliferation, being higher at night and in dark conditions (Chiu et al., 1995). Our results from darkness experiments suggest that the demand of rods increases to compensate for the low level of ambient light and consequently the cell proliferation in all the layers of the retina increases to complete the neural circuits that allow for the proper functioning of the rods. Therefore, we can suggest that retinal plasticity in *Austrolebias* is latent and could mainly rely on other neurogenic niches different from the CMZ, such as the Müller glia in the INL or progenitor cells from the ciliary non pigmented epithelium. Behavioral studies carried out by our group in other species of *Austrolebias* (*A. reicherti*) showed that females kept for 4 months in the dark improved visual acuity at the time of selecting the male for mating (Berrosteiguieta Rodríguez, 2020). On the other hand, the analysis of the adult retina by electron microscopy of *A. charrua* shows a distribution of the melanosomes of the pigmented epithelium around the photoreceptors presenting characteristics of both dark- and light-adapted fishes. This provides an additional element that helps to understand the adaptive plasticity at different levels that *Austrolebias* species exhibit under the pressure of their changing environment (Berrosteiguieta et al., 2018). In the mammalian ciliary epithelium, cells can be induced to acquire restricted progenitor cell-like characteristics in response to exogenous signals (Fischer et al., 2014; Sifuentes et al., 2016). Several studies show that the mature retina may have a conserved propensity for homeostatic growth and plasticity in response to adaptation and response to damage or dysfunction, thanks to the regulatory activity of the CMZ (Miles and Tropepe, 2021).

4.4. Comparison of proliferation rates between brain visual regions and CMZ of *Austrolebias charrua* fish

We have evaluated cell proliferation and different populations of proliferating cells under normal light conditions in the CMZ and brain regions related to visual information processing (Torus Longitudinalis and Tectum Opticum) in the same experimental animals. Results obtained showed a brain population of putative stem/progenitor cells (IdU+/CldU+ cells) of about 10% of all detected proliferating cells. This proportion was maintained in different regions of the brain (Torres-Pérez et al., 2017). Analysis of the same proliferative cell populations in the retina showed that stem/progenitor cell candidates were more than 35% of the total proliferating cells in the CMZ (Fig. 11). Therefore, cell proliferation rate in the ciliary marginal zone is more than three times higher than that found in the brain neurogenic niches responsible for the processing of visual information. We suggest that increased CMZ cell proliferation rates may account for higher retinal growth rates when compared to the rest of the body including the brain. Further studies are directed to analyze the response of brain visual areas to decreased luminosity. These results will collaborate to the understanding of retinal plastic and eventually reparative capabilities. In Fig. 12 the most relevant data of this work is summarized.



B Summary

	Cell morphology	BrdU	CldU	IdU	CldU/IdU	BLBP	Sox2	Pax6
1 CMZ-Middle	Long, 6-12 μ m	+++	+++	++	+++	--	++	++
2 CMZ-Central	Round, 5-8 μ m	++	++	+	+	+++	+	-
3 CMZ-Peripheral	Long, 7-18 μ m	++	++	+	+	+	+	++
Non-pigmented CE	Square, 6 μ m	+	--	++	+	+	+	+
ONL	Long, 25-30 μ m	++	+	++	+	-	++	+
INL	Round, 6-8 μ m	+	+	+	+	+++	-	-
GCL	Round, 10-12 μ m	+	-	+	-	++	-	-

Fig. 12. Summary of the main results obtained. A: Schemes show the differences found in the retina when comparing dark with light conditions. Note the increased cell proliferation in all layers of the retina, as well as more rods in the ONL. Colors represent different labeled nuclei: IdU (magenta), CldU (cyan) and double labeled cells IdU/CldU (yellow). Abundant mitotic figures were found in the CMZ-Middle. Square cells are found in the non-pigmented CE. B: Table summarizing the main cell features in each retinal zone, and a semiquantitative evaluation (labeled by + and - indicating level of expression) of stem/progenitor cells and cell proliferation under light condition. In darkness, increased cell proliferation was the main change observed. Abbreviations: CMZ-ciliary marginal zone; CE-ciliary epithelium; INL-inner nuclear layer; ONL-outer nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

5. Conclusion

We can conclude that the retina of adult *Austrolebias charrua* has several potential places where cell proliferation could occur. The CMZ is a neurogenic niche par excellence that has a higher proliferation rate than the brain; it retains a stable stem cell population, responsible for retina growth. The great plasticity of the retina is evident when the demand for more photoreceptors is urgent. In this case, the radial glia outside the CMZ may act as active progenitors capable of generating new rod precursors and cells reinforcing rod-circuits in other retinal layers. These processes may occur in dark puddles when reproduction is crucial to preserve the species before the puddles are completely dry.

This may explain why, in adult retina of *Austrolebias* fish, the radial glia is highly present: they are capable of reactivating to generate all types of cells when the environmental pressure requires so. This speaks of a peculiar plasticity in the retina at the service of a species pressed by time as annual *Austrolebias charrua* fish are. Finally, our studies may collaborate to the better understanding of retinal cell proliferation plastic response once challenged by environmental light variations.

Data accessibility statement

Data are available upon substantiated request to the corresponding authors.

CRediT authorship contribution statement

Inés Berrosteiguieta: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Validation, Writing – review & editing, preparation, Visualization, Software. **Juan Carlos Rosillo:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Validation, Writing – review & editing, preparation, Visualization, Software. **María Laura Herrera:** Investigation, Methodology, Data curation, Validation, Writing – review & editing, preparation, Visualization, Software. **Silvia Olivera-Bravo:** Conceptualization, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, preparation, Writing – review & editing, Visualization, Software. **Gabriela Casanova:** Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Visualization, Software. **Vicente Herranz-Pérez:** Writing – original draft, Writing – review & editing. **José Manuel García-Verdugo:** Writing – original draft, Writing – review & editing. **Anabel Sonia Fernández:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are very grateful to Drs. Angel Caputi and Pedro Aguilera for their help in measuring light intensity. We also thank Sworn Translator Laura Astorga for English technical support. This work was supported by PEDECIBA (Basic Sciences Development Program), ANII (National Agency for Research and Innovation), UdelaR (Universidad de la República) and Ministerio de Educación y Cultura (MEC), URUGUAY.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100042>.

References

- Alunni, A., Hermel, J.M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., Joly, J.S., 2010. Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* 70 (10), 693–713. <https://doi.org/10.1002/dneu.20799>.
- Agathocleous, M., Harris, W.A., 2009. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 45–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113259>.
- Akle, V., Stankiewicz, A.J., Kharchenko, V., Yu, L., Kharchenko, P.V., Zhdanova, I.V., 2017. Circadian kinetics of cell cycle progression in adult neurogenic niches of a diurnal vertebrate. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 37 (7), 1900–1909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3222-16.2017>.
- Ali, M.A., Sakurai, S., Collin, S.P., 1990. Adaptive radiation of the retina in galaxiidae (salmoniformes). *Aust. J. Zool.* 38, 173–186. <https://doi.org/10.1071/ZO9900173>.
- Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22 (3), 629–634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002>. PMID: 11826091; PMCID: PMC6758521.
- Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D., 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (4), 287–293. <https://doi.org/10.1038/35067582>.
- Arslan-Ergul, A., Erbab, B., Karoglu, E.T., Halim, D.O., Adams, M.M., 2016. Short-term dietary restriction in old zebrafish changes cell senescence mechanisms. *Neuroscience* 334, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.033>.
- Bernardos, R.L., Barthel, L.K., Meyers, J.R., Raymond, P.A., 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J. Neurosci.* 27 (26), 7028–7040. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007>.
- Berois, N., García, G., de Sa, R.O., 2015. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19016>.
- Berrosteiguieta, I., Rosillo, J.C., Torres-Pérez, M., Fernández, A.S., 2018. Caracterización Histológica de Adaptaciones de la Retina de Peces Anuales *Austrolebias charrua*, en Relación a Cambios en la Luminosidad en su Ciclo de Vida. *Acta Microsc.* 27 (1), 45–52, 2018.
- Berrosteiguieta Rodríguez, I., 2020. Estudio de la neuroplasticidad en peces del género *Austrolebias* frente a cambios en la luminosidad. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA (Ed: colibri.udelar.edu.uy).
- Bibliowicz, J., Gross, J.M., 2009. Expanded progenitor populations, vitreo-retinal abnormalities, and Müller glial reactivity in the zebrafish leprechaun/patched 2 retina. *BMC Dev. Biol.* 9 (1), 52. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-52>.
- Cameron, D.A., 2000. Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. *Vis. Neurosci.* 17 (5), 789–797. <https://doi.org/10.1017/s0952523800175121>.
- Cerveny, K.L., Varga, M., Wilson, S.W., 2012. Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev. Neurobiol.* 72 (3), 328–345. <https://doi.org/10.1002/dneu.20917>.
- Chiu, J.F., Mack, A.F., Fernald, R.D., 1995. Daily rhythm of cell proliferation in the teleost retina. *Brain Res.* 673 (1), 119–125. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01411-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01411-A).
- Doetsch, F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 6 (11), 1127–1134. <https://doi.org/10.1038/nn1144>.
- Dulac, C., Kimchi, C., 2007. Neural mechanisms underlying sex specific behaviors in vertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.009>.
- Easter Jr., S.S., Hitchcock, P.F., 2000. Stem cells and regeneration in the retina: what fish have taught us about neurogenesis. *Neuroscientist* 6 (6), 454–464. <https://doi.org/10.1177/10738584000600608>.
- Fausett, B.V., Goldman, D., 2006. A role for α 1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J. Neurosci.* 26 (23), 6303–6313.
- Fernández, A.S., Rosillo, J.C., Casanova, G., Olivera-Bravo, S., 2011. Proliferation zones in the brain of adult fish *Austrolebias* (Cyprinodontiform: rivulidae): a comparative study. *Neuroscience* 189, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.063>.
- Fernández, A., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., 2002. Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J. Comp. Neurol.* 453 (2), 131–144. <https://doi.org/10.1002/cne.10388>.
- Fimbel, S.M., Montgomery, J.E., Burket, C.T., Hyde, D.R., 2007. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J. Neurosci.* 27 (7), 1712–1724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5317-06.2007>.
- Fischer, A.J., Bosse, J.L., El-Hodiri, H.M., 2014. The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp. Eye Res.* 123, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.019>.
- Fischer, A.J., Reh, T.A., 2003. Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 43 (1), 70–76. <https://doi.org/10.1002/glia.10218>.
- Gallina, D., Todd, L., Fischer, A.J., 2014. A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp. Eye Res.* 123, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.019>.
- González-Granero, S., Lezameta, M., García-Verdugo, J.M., 2011. Adult neurogenesis in reptiles. In: *Neurogenesis in the Adult Brain*. I. Springer, Tokyo, pp. 169–189. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53933-9-6>.
- Gorsuch, R.A., Hyde, D.R., 2014. Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina. *Exp. Eye Res.* 123, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.012>.
- Gorsuch, R.A., Lahne, M., Yarka, C.E., Petravick, M.E., Li, J., Hyde, D.R., 2017. Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Exp. Eye Res.* 161, 174–192. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.05.012>.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295 (1), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040>.
- Hamon, A., Roger, J.E., Yang, X.J., Perron, M., 2016. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: an overview across vertebrate model systems. *Dev. Dynam.* 245 (7), 727–738. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>.
- Iribarne, M., 2019. Zebrafish photoreceptor degeneration and regeneration Research to understand hereditary human blindness. In: *Visual Impairment and Blindness-What We Know and What We Have to Know*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88758>.
- Johns, P.R., Easter Jr., S.S., 1977. Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J. Comp. Neurol.* 176 (3), 331–341. <https://doi.org/10.1002/cne.901760303>.
- Johns, P.R., Fernald, R.D., 1981. Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature* 293 (5828), 141–142. <https://doi.org/10.1038/293141a0>.
- Julian, D., Ennis, K., Korenbrot, J.I., 1998. Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J. Comp. Neurol.* 394 (3), 271–282. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980511\)394:3<271::AID-CNEI>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980511)394:3<271::AID-CNEI>3.0.CO;2-Z).
- Kassen, S.C., Thummel, R., Campochiaro, L.A., Harding, M.J., Bennett, N.A., Hyde, D.R., 2009. CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Müller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Exp. Eye Res.* 88 (6), 1051–1064. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.01.007>.
- Kubota, R., Hokok, J.N., Moshiri, A., McGuire, C., Reh, T.A., 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Dev. Brain Res.* 134 (1–2), 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(01\)00287-5](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00287-5).
- Langhe, R., Pearson, R.A., 2020. Rebuilding the retina: prospects for Müller glial-mediated self-repair. *Curr. Eye Res.* 45 (3), 349–360. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1669665>.
- Lahne, M., Piekos, S.M., O'Neill, J., Ackerman, K.M., Hyde, D.R., 2019. Photo-regulation of rod precursor cell proliferation. *Exp. Eye Res.* 178, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.09.015>.
- Lenkowski, J.R., Raymond, P.A., 2014. Müller glia: stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog. Retin. Eye Res.* 40, 94–123. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.007>.
- Lindsey, B.W., Aitken, G.E., Tang, J.K., Khabooshan, M., Douek, A.M., Vandestadt, C., Kaslin, J., 2019. Midbrain tectal stem cells display diverse regenerative capacities in zebrafish. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40734-z>.
- Lindsey, B.W., Troppe, V., 2014. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Dev. Neurobiol.* 74 (11), 1053–1077. <https://doi.org/10.1002/dneu.22183>.
- Lockett, N.A., 1970. Deep-sea fish retinas. *Br. Med. Bull.* 26 (2), 107–111. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a070759>.
- Llorens-Martín, M., Tejeda, G.S., Trejo, J.L., 2010. Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLoS One* 5 (8), e12188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012188>.
- Macdonald, R., Wilson, S.W., 1997. Distribution of Pax6 protein during eye development suggests discrete roles in proliferative and differentiated visual cells. *Dev. Gene.* 206 (6), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s004270050065>.
- McGinn, T.E., Mitchell, D.M., Meighan, P.C., Partington, N., Leoni, D.C., Jenkins, C.E., Varnum, M., Stenkamp, D.L., 2018. Restoration of dendritic complexity, functional connectivity, and diversity of regenerated retinal bipolar neurons in adult zebrafish. *J. Neurosci.* 38 (1), 120–136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3444-16.2017>.
- Ming, G.L., Song, H., 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>.
- Miles, A., Troppe, V., 2021. Retinal stem cell 'retirement plans': growth, regulation and species adaptations in the retinal ciliary marginal zone. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (12), 6528. <https://doi.org/10.3390/ijms22126528>.
- Mori, T., Buffo, A., Götz, M., 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 69, 67–99. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)69004-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)69004-7).

- Morris, A.C., Scholz, T., Fadool, J.M., 2008. Rod progenitor cells in the mature zebrafish retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 613, 361–368. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4-42>.
- Nag, T.C., Bhattacharjee, J., 2002. Retinal cytoarchitecture in some mountain- stream teleosts of India. *Environ. Biol. Fish.* 63, 435–449. <https://doi.org/10.1023/A:101498221834>.
- Nagashima, M., Barthel, L.K., Raymond, P.A., 2013. A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development* 140 (22), 4510–4521. <https://doi.org/10.1242/dev.090738>.
- Nagashima, M., D'Cruz, T.S., Danku, A.E., Hesse, D., Sifuentes, C., Raymond, P.A., Hitchcock, P.F., 2020. Midkine-a is required for cell cycle progression of müller glia during neuronal regeneration in the vertebrate retina. *J. Neurosci.* 40 (6), 1232–1247. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1675-19.2019>.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R., 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 22 (8), 3161–3173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03161.2002>.
- Ohnuma, S.I., Philpott, A., Wang, K., Holt, C.E., Harris, W.A., 1999. p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* 99 (5), 499–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81538-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81538-X).
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H., Kamachi, Y., 2006. Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev. Dynam.: Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235 (3), 811–825. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20678>.
- Olivera-Pasilio, V., Peterson, D.A., Castelló, M.E., 2014. Spatial distribution and cellular composition of adult brain proliferative zones in the teleost, *Gymnotus omarorum*. *Front. Neuroanat.* 8, 88. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00088>.
- Otteson, D.C., D'Costa, A.R., Hitchcock, P.F., 2001. Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev. Biol.* 232 (1), 62–76. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0163>.
- Otteson, D.C., Hitchcock, P.F., 2003. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vis. Res.* 43 (8), 927–936.
- Perron, M., Harris, W.A., 2000. Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* 22 (8), 685–688. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(02\)00400-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(02)00400-5).
- Podrabsky, J.E., Tingaud-Sequeira, A., Cerdá, J., 2010. Metabolic dormancy and responses to environmental desiccation in fish embryos. In: *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 203–226. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12422-8-12>.
- Raymond, P.A., Hitchcock, P.F., 1997. Retinal regeneration: common principles but a diversity of mechanisms. *Adv. Neurol.* 72, 171–184.
- Powell, C., Cornblath, E., Elsaiedi, F., Wan, J., Goldman, D., 2016. Zebrafish Müller glia-derived progenitors are multipotent, exhibit proliferative biases and regenerate excess neurons. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep24851>, 24851.
- Raymond, P.A., Barthel, L.K., Bernardos, R.L., Perkowski, J.J., 2006. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 6 (1), 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-36>.
- Raymond, P.A., Rivlin, P.K., 1987. Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev. Biol.* 122 (1), 120–138. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90338-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90338-1).
- Reh, T.A., Fischer, A.J., 2001. Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav. Evol.* 58 (5), 296–305. <https://doi.org/10.1159/000057571>.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 (1), 208. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.
- Rosillo-Martí, J.C., Larrosa, G.C., Bravo, S.O., Fernández, A., 2010. Heterogeneidad celular en la zona ventricular telencefálica: una región neurogénica del cerebro de *Austrolebias charrua*. *Acta Microsc.* 19 (2), 152–159.
- Rosillo, J.C., Torres, M., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2016. Telencephalic-olfactory bulb ventricle wall organization in *Austrolebias charrua*: cytoarchitecture, proliferation dynamics, neurogenesis and migration. *Neuroscience* 336, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.045>.
- Sakurai, K., Osumi, N., 2008. The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *J. Neurosci.* 28 (18), 4604–4612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5074-07.2008>.
- Sifuentes, C.J., Kim, J.W., Swaroop, A., Raymond, P.A., 2016. Rapid, dynamic activation of Müller glial stem cell responses in zebrafish. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (13), 5148–5160. <https://doi.org/10.1167/iov.16-19973>.
- Stenkamp, D.L., 2007. Neurogenesis in the fish retina. *Int. Rev. Cytol.* 259, 173–224. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)59005-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)59005-9).
- Straznický, K., Gaze, R.M., 1971. The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *Development* 26 (1), 67–79.
- Sullivan, J.M., Sandeman, D.C., Benton, J.L., Beltz, B.S., 2007. Adult neurogenesis and cell cycle regulation in the crustacean olfactory pathway: from glial precursors to differentiated neurons. *J. Mol. Histol.* 38 (6), 527–542. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9112-7>.
- Sun, C., Mitchell, D.M., Stenkamp, D.L., 2018. Isolation of photoreceptors from mature, developing and regenerated zebrafish retinas, and of microglia/macrophages from regenerating zebrafish retinas. *Exp. Eye Res.* 177, 130–144. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.08.002>.
- Torres-Pérez, M., Rosillo, J.C., Berrosteiguieta, I., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., García-Verdugo, J.M., Fernández, A.S., 2017. Stem cells distribution, cellular proliferation and migration in the adult *Austrolebias charrua* brain. *Brain Res.* 1673, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.003>.
- Tsingos, E., Hoeckendorf, B., Suetterlin, T., Kirchmaier, S., Grabe, N., Centanin, L., Wittbrodt, J., 2019. Retinal stem cells modulate proliferative parameters to coordinate post-embryonic morphogenesis in the eye of fish. *Elife* 8, e42646. <https://doi.org/10.7554/eLife.42646.001>.
- Vega, C.J., Peterson, D.A., 2005. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat. Methods* 2 (3), 167–169. <https://doi.org/10.1038/nmeth741>.
- Wagner, H.J., Menezes, N.A., Ali, M.A., 1976. Retinal adaptations in some Brazilian tide pool fishes (teleostei). *Zoomorphologie* 83, 209–226. <https://doi.org/10.1007/BF00993510>.
- Wan, Y., Almeida, A.D., Rulands, S., Chalour, N., Muresan, L., Wu, Y., Harris, W., 2016. The ciliary marginal zone of the zebrafish retina: clonal and time-lapse analysis of a continuously growing tissue. *Development* 143 (7), 1099–1107. <https://doi.org/10.1242/dev.133314>.
- Wan, J., Goldman, D., 2016. Retina regeneration in zebrafish. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 40, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.cde.2016.05.009>.
- Wen, C.M., Wang, C.S., Chin, T.C., Cheng, S.T., Nan, F.H., 2010. Immunohistochemical and molecular characterization of a novel cell line derived from the brain of *Trachinotus blochii* (Teleostei, Perciformes): a fish cell line with oligodendrocyte progenitor cell and tanyocyte characteristics. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 156 (2), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.003>.
- Wourms, J.P., 1972. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *J. Exp. Zool.* 182 (3), 389–414. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820310>.
- Wu, D.M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., Raymond, P.A., 2001. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (9), 2115–2124.
- Xue, X.Y., Harris, W.A., 2012. Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the *Xenopus* retina. *Dev. Neurobiol.* 72 (4), 475–490. <https://doi.org/10.1002/dneu.20887>.
- Zupanc, G.K., Clint, S.C., 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia* 43 (1), 77–86. <https://doi.org/10.1002/glia.10236>.