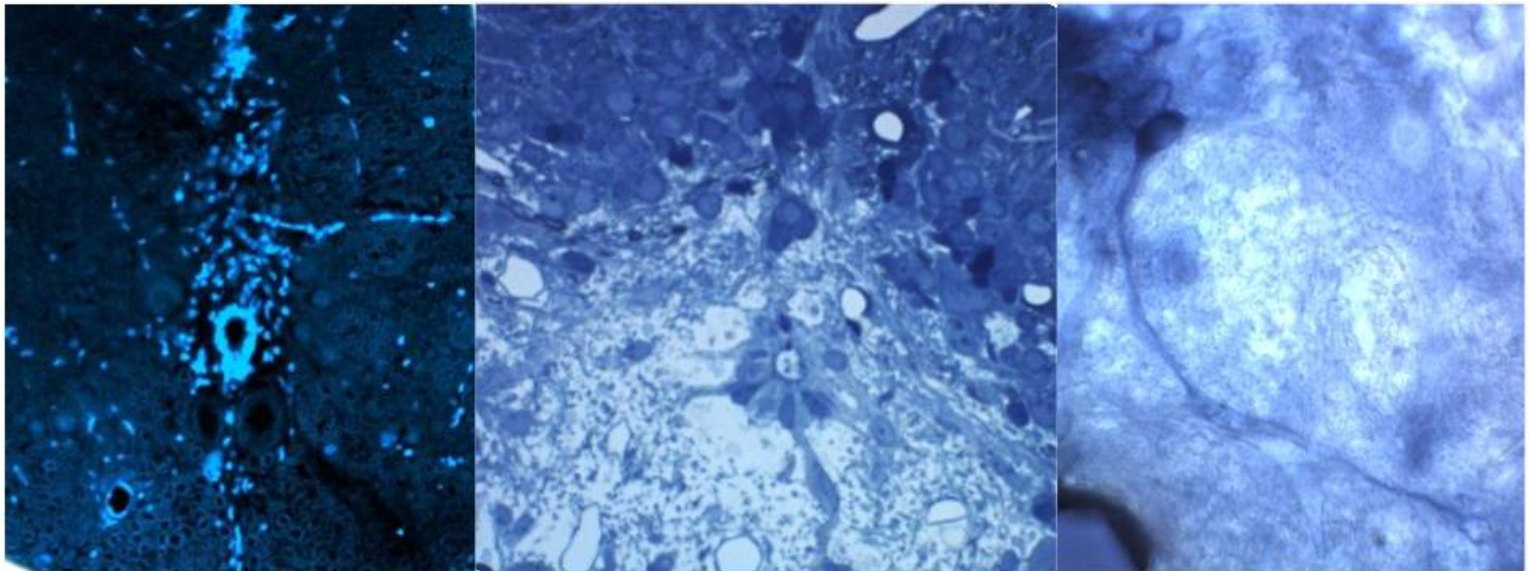


Estudio de la anatomía y la neurogénesis en la médula espinal de Austrolebias charrua desde un abordaje dimórfico

Tesina final de Grado para la obtención del título en la Licenciatura en Ciencias
Biológicas, Facultad de Ciencias, UdelaR 2023



Bach. Stephanie Silva Jaureguiberry

**Orientadora: Anabel Fernández
Co-Orientador: Juan Carlos Rosillo**

**Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales,
Laboratorio de Neurobiología comparada, IIBCE.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi tutora Anabel que me acompañó durante el proceso que implicó esta tesis, transitando juntas los logros y frustraciones. A Juan Carlos por siempre encontrar en los detalles la forma de mejorar este trabajo. A mis queridísimas Inés y Laura, compañeras en laboratorio y sobre todo amigas que me apoyaron (y a veces arrastraron) en los baches, claramente fueron la de arena que me permitió sacar adelante el proyecto. Al Instituto de Investigaciones Clemente Estable por abrirme las puertas para realizar este trabajo, en el cual aprendí mucho de lo que implica hacer ciencia en Uruguay. Al tribunal, Adriana Migliaro y Omar Trujillo-Cenoz por acceder a corregir este trabajo.

A mis padres y mis padrinos que me acompañaron y supieron entender los altibajos que conlleva la carrera, sin dudar de que iba a poder.

A mis amigas Cami, Lu y Vale, con las que he compartido la licenciatura desde la primera semana introductoria, hasta el último día. Con ellas los puentes eternos entre teóricos del primer semestre y los dramas e incertidumbres del final no estuvieron tan mal, son de lo mejor que me dejó la carrera.

No quiero dejar de mencionar en estos agradecimientos a las mujeres que me rodean y han sido para mí un ejemplo de fortaleza en distintos ámbitos de la vida, para mis abuelas y tías abuelas, para mis primas, para Iris y Amaita mis más sinceros agradecimientos. A todos los que han recibido un “tengo examen” o “no puedo, estoy con la tesis”, gracias.

RESUMEN

Los peces anuales presentan un marcado dimorfismo en tamaño y diseño corporal que acompaña su complejo comportamiento durante el cortejo y reproducción. La estructura de la médula espinal refleja aspectos motores y sensoriales esenciales para la destreza comportamental de los individuos en su medio ambiente.

Considerando dichas observaciones se plantea como hipótesis la existencia de diferencias anatómicas e histológicas en la médula entre machos y hembras. Además, teniendo en cuenta el alto potencial plástico que exhibe el encéfalo de esta especie se propone la presencia de proliferación celular y neurogénesis en la médula bajo condiciones fisiológicas.

Este estudio tiene como objetivo analizar de forma descriptiva la médula espinal de peces *A. charrua* a nivel de cinco segmentos, evaluando sus características anatómicas, morfométricas e histológicas entre los dos sexos, así como la capacidad proliferativa de la especie.

El análisis morfológico mostró diversidad estructural a lo largo de todo el eje rostro-caudal entre los segmentos analizados que se mantienen en ambos sexos y diferencias entre machos y hembras en el segmento SIII. Particularmente este segmento se vio asociado a la región de la aleta dorsal. El estudio histológico mediante la detección de las células NADPHd+ permitió analizar las características generales de este sistema en la médula espinal de la especie de interés y reveló diferencias en cuanto a la distribución y morfología celular en los distintos segmentos entre machos y hembras. El análisis de la proliferación celular evidenció la existencia de neurogénesis sostenida en todos los segmentos analizados en ambos sexos. La proliferación encontrada no estuvo asociada únicamente a la región del epéndimo, sino que fue observada en otras regiones de la sustancia gris y blanca.

Este estudio ofrece un marco para la asociación de fenotipos conductuales particulares para cada sexo con diferencias citoarquitectónicas y proliferativas en distintas regiones medulares y contribuye a la descripción general de la especie a distintos niveles.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
1.1 Dimorfismos estructurales de la médula espinal	7
1.2 Diversidad morfológica de la médula espinal	7
1.3 Descripción estructural y citoarquitectural de la médula espinal	8
1.4 La médula espinal de los peces teleósteos	9
1.5 Generalidades de la neurogénesis postnatal	10
1.6 Neurogénesis postnatal en la médula espinal	11
1.7 Peces anuales como modelo de estudio	12
1.8 Hipótesis	13
1.9 OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
METODOLOGÍA	14
2.1 Colecta y mantenimiento de los peces	14
2.2 Análisis Morfométrico	15
Análisis estadísticos	17
2.3 Análisis citoarquitectural	17
NADPH diaforasa	17
2.4 Análisis de la proliferación celular y neurogénesis	18
Tratamiento con 5'bromo-2'desoxiuridina (BrdU)	18
Detección mediante inmunohistoquímica de fluorescencia	18
Detección mediante inmunohistoquímica con HRP	19
Controles	20
RESULTADOS	22
3.1 Relación largo corporal - largo medular	22
3.2 Análisis de la variación dimensional en las secciones transversales a lo largo del eje rostro-caudal.	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	29
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	38

RESULTADOS	43
4.1 Localización de los núcleos BrdU+	43
4.2 Descripción morfológica de las células BrdU+	45
4.3 Identificación de la identidad de las células BrdU+ utilizando marcadores de estirpe celular	48
DISCUSIÓN	51
BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

Gran parte de los avances relevantes para el desarrollo del conocimiento básico y aplicado en distintas áreas de la investigación biológica, incluyendo la fisiología, farmacología y neurociencias han sido posibles gracias al empleo de diversos modelos biológicos (Teixeira de Mello, 2019). Beneficiándose de las homologías entre especies los investigadores han podido extrapolar ciertos conocimientos y supuestos desde un modelo biológico a otras especies con el fin de anticipar las respuestas producidas por estímulos externos o tratamientos, e incluso redirigir estrategias empleadas en el sistema original, adaptándolas para cumplir nuevas funciones en otros. Mayormente estas investigaciones han utilizado ejemplares de sexo masculino como representantes de la especie de interés, asumiendo que sus características permanecen invariables en el sexo opuesto. Particularmente, en el área de neurociencias, por cada artículo que utiliza exclusivamente hembras, existen 5.5 donde se utilizan machos (Blach & Giri, 2019). Dado que existen dimorfismos sexuales en todos los niveles de organización, en muchos de estos casos la exclusión de las hembras ya sea por razones metodológicas, económicas o conceptuales representa un fuerte sesgo.

Los caracteres sexualmente dimórficos son observables en aspectos morfológicos, fisiológicos, adaptativos y comportamentales en la mayoría de los clados de vertebrados (Mori et al., 2017) . Los individuos de una misma especie ejecutan comportamientos sexo-específicos que incluyen exhibiciones sociales y sexuales coordinadas, fundamentales para asegurar una exitosa estrategia reproductiva (Dulac & Kimchi, 2007). En la base de las ejecuciones comportamentales divergentes se encuentran los componentes sensoriales, neurales y motores del individuo (Kelley, 1988) .

Recientemente se ha asociado el control de las hormonas gonadales, divergente entre sexos, como factor importante implicado en el desarrollo de marcadas variaciones funcionales y estructurales en el sistema nervioso central (Forger & Breedlove, 1986). En esencia, el sistema nervioso admite y refleja la interacción de los distintos componentes internos de un individuo, entre sí y con el ambiente. Esta interacción permite generar respuestas acordes a los distintos estímulos recibidos, según proponía Santiago Ramón y Cajal '*al servicio de la conservación de la vida y la especie*' (revisado en Freire, 2007). Es por lo tanto coherente que sus características anatómicas, histológicas y morfológicas, incluyendo su extensión y disposición, se expliquen en parte por las propiedades de la especie y las estructuras con las que está en estrecha relación.

1.1 *Dimorfismos estructurales de la médula espinal*

Si bien existen algunos estudios sobre los caracteres anatómicos dimórficos expresados en el encéfalo (Cachero et al., 2010; Sacher et al., 2013; Shah et al., 2004), cuando se trata de la médula espinal los antecedentes son acotados, y están enfocados a regiones puntuales y sobre todo en modelos mamíferos. Trabajos previos reportan diferencias en humanos en cuanto a la dimensión de las motoneuronas en los niveles C5 y L3, donde se observan valores superiores en machos (Yuan et al., 2000). Asimismo, la proporción de las motoneuronas en núcleo de Onuf, centro relacionado con el comportamiento copulatorio, es también superior en este sexo, característica que se ve conservada en perros (Forger & Breedlove, 1986). Por otra parte, similares resultados se han encontrado en el núcleo espinal bulbocavernoso de ratas, donde el tamaño de las motoneuronas es mayor en machos, mientras que en hembras este centro se observa disminuido o ausente (Marc Breedlove & Arnold, 1981). Este resultado es congruente con la función del centro debido a que se postula como encargado de la inervación de los músculos estriados perineales. Se propone que su naturaleza dimórfica está dada por la interacción de los andrógenos con sus receptores en las primeras etapas del desarrollo (Marc Breedlove & Arnold, 1981).

Partiendo de estos escasos precedentes se introducirá a continuación las generalidades de la médula espinal.

1.2 *Diversidad morfológica de la médula espinal*

La diversidad anatómica e histológica de la médula espinal acompaña la gran variedad que existe entre los vertebrados. La misma atiende a las características corporales generales de cada especie, el grado de complejidad comportamental y la relación con su medio ambiente.

La médula espinal representa la porción más caudal del sistema nervioso central. Su longitud difiere entre los vertebrados, abarcando el total del canal vertebral en la mayoría de los teleósteos, anfibios urodelos, reptiles saurópsidos y aves, o parte del mismo en mamíferos y anfibios anuros (Uehara et al., 2015). A pesar de que en general a lo largo de la evolución se mantiene una forma cilíndrica conservada, heredada a partir del tubo neural y una organización segmentada, pueden existir variaciones estructurales, así como en el número de segmentos entre las especies (Nieuwenhuys, 1964)(Figura 1). A cada segmento se asocian dos raíces dorsales y dos ventrales formando un par de nervios mixtos, que en conjunto con los nervios craneales, dan lugar al sistema nervioso

periférico. Al igual que los segmentos, la cantidad de nervios puede diferir, desde 10 pares en anfibios sin cola hasta 500 en serpientes (Nieuwenhuys, 1964) .

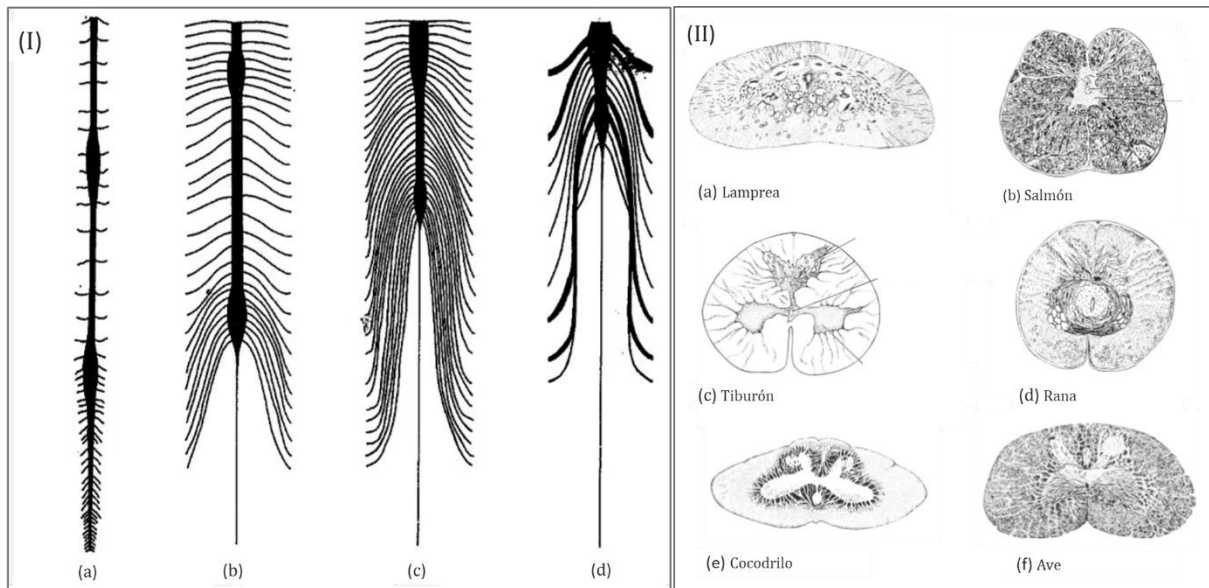


Figura 1. (I) Representación esquemática de la morfología externa de la médula espinal y sus nervios espinales de (a) tortuga (b) humano (c) ballena, (d) rana tomada de Nieuwenhuys, 1964. (II) Representación esquemática comparativa de la organización citoarquitectural de la médula espinal en vista transversal.

1.3 Descripción estructural y citoarquitectural de la médula espinal

La médula espinal actúa fundamentalmente como centro de relevo entre el sistema nervioso periférico y los centros superiores de procesamiento en el cerebro (Nieuwenhuys, 1964). Es esencial para la integración entre las entradas sensoriales y el comportamiento motor, gestando respuestas voluntarias e involuntarias, dentro de las cuales se incluyen la formación de los actos reflejos, la activación de circuitos de escape frente a situaciones de peligro y la ejecución de los patrones de cortejo y reproducción, según las necesidades de cada especie en su ambiente (Brown, 2012).

Estructuralmente se pueden diferenciar dos regiones de composición y función diferente en la médula espinal: la sustancia gris y la blanca. La sustancia gris se compone de neuronas sensoriales, dispuestas dorsalmente y neuronas motoras en la región ventral. Estas coexisten con interneuronas mediando la comunicación entre los dos tipos neuronales, fibras amielínicas y diversas glías (Brown, 2012).

La disposición y características histológicas de la sustancia gris son variadas entre los grupos de vertebrados. En los clados más basales como los anfibios, está representada por una capa celular delgada y rudimentaria que se complejiza en composición, heterogeneidad celular y distribución a medida que se asciende a órdenes más recientes,

alcanzando la máxima expresión en aves y mamíferos (revisado en Freire, 2007). La sustancia gris se encuentra rodeada por la sustancia blanca, que recibe su nombre del color blanquecino característico de las fibras mielínicas que la componen (Nieuwenhuys, 1964).

En el eje longitudinal de la médula se extiende el canal central, una pequeña cavidad por donde circula el líquido cefalorraquídeo que constituye particularmente el remanente de la cavidad ventricular del tubo neural. Este se encuentra revestido por células endoteliales de gran heterogeneidad morfológica, funcional y grado de maduración. Entre las principales funciones de las células que componen al canal central se encuentran el soporte celular e intercambio con el líquido cefalorraquídeo. Adicionalmente se postula que las endotelias radiales, una población celular componente de esta región, tendrían un importante rol en la neurogénesis y regeneración de la médula espinal (Tanaka et al., 2009)

1.4 La médula espinal de los peces teleósteos

Las diferentes especies de peces teleósteos manifiestan características particulares en su médula incluyendo la proporción y distribución de las sustancias blanca y gris, pudiendo encontrarse las mismas claramente separadas o entremezcladas (Nieuwenhuys, 1964).

Entre los caracteres macroscópicos conservados en este grupo se destaca la presencia de un surco ventral en el eje de la línea media, formado por el pliegue de la pia madre y un tabique dorsal. A nivel transversal la sustancia gris se ve representada por dos astas ventrales (anteriores) y un cuerno dorsal (posteriores), y la sustancia blanca por paquetes o funículos de axones mielínicos de diversos calibres agrupados y separados entre sí por tabiques transversales. Según su posición se han descrito estas estructuras como el funículo ventral, lateral y dorsal.

El asta dorsal en teleósteos se define como una sustancia gelatinosa (Nieuwenhuys, 1964) integrada por neuronas de distintos tamaños, muchas de ellas enviando sus prolongaciones al surco ventral. Esta región actúa como sitio de recepción de las aferencias enviadas por las neuronas ganglionares cuyas terminales axónicas contactan con las neuronas fusiformes y granulares de dicha asta y con las motoneuronas e interneuronas de posición ventrolateral.

A nivel histológico las motoneuronas del asta ventral se caracterizan por ser células grandes y multipolares de morfología fusiforme, piriforme, triangular o estrellada y poseer extensas prolongaciones dendríticas que se extienden hacia el asta dorsal, así como hacia la sustancia blanca. Adicionalmente este tipo neuronal de naturaleza colinérgica puede en teleósteos clasificarse en motoneuronas primarias o secundarias (Clemente et al., 2004; Sandri et al., 1976; Tsuji, 1975). Las primarias se distinguen por

ser de mayor tamaño, ocupar posiciones dorsomediales e inervar la musculatura del tronco encargada de las respuestas rápidas y las secundarias por ser de menor tamaño, localizarse ventralmente e inervar la musculatura lenta del tronco y las aletas.

En la región ventral de la médula espinal de la mayoría de los teleósteos se pueden distinguir dos axones de gran calibre pertenecientes a las células de Mauthner. Este par de neuronas reticuloespinales son responsables del patrón de escape en C, característico de los peces y larvas de anfibios. Estas células presentan sus somas en el romboencéfalo a nivel del par craneal VIII, del que reciben aferencias y envían sus axones colateralmente a lo largo de toda la médula espinal (Diamond, 1971; Sillar, 2009). Por debajo de estos haces se ubica la comisura accesoria, correspondiente al entrecruzamiento de axones de neuronas comisurales que se dirigen hacia los cordones anterolaterales (revisado en Freire, 2007).

La médula espinal constituye un componente primordial dentro del sistema nervioso y exhibe gran heterogeneidad a lo largo de los ejes dorsoventral y rostrocaudal, condición que le permite ejecutar funciones distintas según la región que inerva. Esta particularidad funcional se encuentra fuertemente vinculada y modulada por las características plásticas del sistema nervioso.

1.5 Generalidades de la neurogénesis postnatal

La neurogénesis constituye un pilar fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, la plasticidad estructural y funcional, así como de la adaptación frente a ciertos cambios en el sistema nervioso, sin embargo, son pocos los trabajos acerca de este tópico enfocados en la médula espinal en condiciones fisiológicas (Frisén, 2016).

Actualmente, la neurogénesis adulta en el sistema nervioso central es aceptada y respaldada por una amplia diversidad de estudios científicos en vertebrados e invertebrados (Altman, 1962; Cayre et al., 1994, 2002; Eriksson et al., 1998; A. S. Fernández et al., 2011; Kaplan & Hinds, 1977; Lindsey & Tropepe, 2006; Torres-Pérez et al., 2017). Este proceso ha sido probado en distintas regiones del sistema nervioso central tanto en condiciones fisiológicas como reparativas y adaptativas, asociado entre otros a procesos de memoria y aprendizaje (van Praag et al., 1999) y modulando procesos como el cambio estacional del canto en las aves (Nottebohm et al., 1987) o la adaptación de la retina frente a cambios lumínicos en teleósteos (Berrosteguieta, 2020; Berrosteguieta et al., 2022; Herrera Astorga, 2022). Este fenómeno implica la génesis, diferenciación, migración e integración de nuevas neuronas funcionales a circuitos preexistentes a partir de células madre neurales (Bjornsson et al., 2015). Se conoce especialmente que este proceso se desarrolla en sitios especializados del tejido nervioso que expresan características moleculares embrionarias, denominados nichos neurogénicos (Álvarez-Buylla & Lim, 2004; García-Verdugo et al., 2002). A pesar de que

la neurogénesis está filogenéticamente conservada, los reservorios celulares responsables de la proliferación exhiben características particulares en las distintas especies, en cuanto su potencial proliferativo, abundancia, ubicación y composición celular (Zupanc, 2001).

Los análisis comparativos muestran pronunciadas diferencias respecto al potencial proliferativo de los grupos vertebrados, observándose las mayores tasas de proliferación en peces teleósteos y las menores, muy por debajo del resto de los vertebrados, en mamíferos (A. S. Fernández et al., 2011; Zupanc & Sîrbulescu, 2011). Por otra parte, este proceso es además dependiente de las condiciones intrínsecas del individuo como la edad, condición fisiológica, sexo entre otros (Arias-Carrión et al., 2007; Cayre et al., 2002).

1.6 Neurogénesis postnatal en la médula espinal

Trabajos previos con la médula espinal como modelo reportan una marcada disminución de la neurogénesis en mamíferos adultos. Esta capacidad proliferativa limitada representa un gran impedimento para la renovación celular en situaciones fisiológicas y el reemplazo frente a lesiones o enfermedades neurodegenerativas (Chapouton, 2007). En contraste, la neurogénesis y regeneración medular es persistente en anfibios (Clorfene & Pollack, 1994), reptiles (A. Fernández et al., 2002) y particularmente en peces teleósteos, convirtiéndolos en buenos modelos para estudiar las claves funcionales de este proceso (Birse et al., 1980).

Debido a evidencias previas que destacan su actividad proliferativa, el nicho neurogénico reconocido por excelencia en la médula espinal es la gelatinosa central o región endimaria (Reimer et al., 2008; Stilling & Wallach, 1842). La región endimaria representa la porción de la sustancia gris en torno al canal central, y se caracteriza por alojar una alta heterogeneidad en cuanto a la estirpe y estado madurativo de sus células, además de una baja proporción de glía mielinizante. Específicamente, se han descrito a las glías epéndimo-radiales como fuente de nuevas neuronas durante la regeneración en la médula espinal, característica compartida con el encéfalo (Lacroix et al., 2014). Las glías epéndimo-radiales presentan un soma que contribuye al revestimiento endimario, un único cilio apical que proyecta al lumen y largos procesos radiales (Reimer et al., 2008, 2009). Se propone que estas células podrían haber conservado, al menos en parte, la señalización molecular propia de la embriogénesis, proporcionándoles características de precursores primordiales (Tanaka & Ferretti, 2009).

En peces teleósteos, tanto la región endimial como el parénquima medular, admiten el nacimiento de nuevas neuronas (Zupanc & Sîrbulescu, 2011). Se reporta sobre todo la presencia de proliferación celular asociada al canal central y en regiones dorsales

(Grandel et al., 2006). Estos procesos pueden ser activados y modulados frente a diferentes estímulos, incluyendo una lesión (Dervan & Roberts, 2003).

1.7 Peces anuales como modelo de estudio

Los peces anuales son teleósteos de agua dulce pertenecientes al orden Cyprinodontiformes, conocidos por su extraordinaria capacidad de afrontar condiciones adversas generando estrategias adaptativas únicas entre los vertebrados. Estas incluyen la resistencia al estrés hídrico, a la hipoxia, así como a grandes variaciones de temperatura a las cuales están expuestos. Su breve ciclo de vida (de aproximadamente nueve meses) se lleva a cabo en cuerpos de agua temporales de desecación estival en América del Sur y África (Berois et al., 2015). Con el fin de mantener la viabilidad de la especie, los juveniles deben alcanzar la madurez sexual en un breve periodo de tiempo (entre ocho y doce semanas). A partir de este momento las hembras serán capaces de poner entre veinte y cien huevos por día hasta su senescencia. Los huevos permanecen enterrados en el sustrato del charco durante las estaciones secas, pasando por tres diapausas características y necesarias para su desarrollo. Es por esto por lo que resulta imprescindible que sean capaces de resistir la desecación mediante una gruesa y ornamentada capa coriónica (Berois et al., 2015).

Su comportamiento reproductivo está estrechamente vinculado a su característico ciclo de vida y marcado dimorfismo sexual. En estas especies los machos se distinguen por presentar colores llamativos y patrones bandeados, mientras que las hembras poseen una coloración parda con manchas oscuras. El cortejo consta de un patrón motor complejo y estereotipado, que tiene como desenlace el entierro de la pareja en el sustrato, donde depositará los gametos (Berois et al., 2015; García, 2013; García-Segura, 2008). Este proceso, altamente regulado, presenta sus bases en la ejecución de movimientos gobernada por la médula espinal. Actualmente no se reportan antecedentes sobre la estructura y capacidad proliferativa de la médula espinal en *A. charrua* y lo que se sabe sobre peces en general es muy escaso.

Los peces anuales constituyen un valioso modelo para tener en cuenta, debido a sus importantes capacidades proliferativas y adaptaciones peculiares. En particular, se ha demostrado que los peces anuales del género *Austrolebias* poseen una activa proliferación neuronal en numerosas zonas del cerebro, haciéndolos muy buenos modelos para el estudio de la neurogénesis postnatal (A. S. Fernández et al., 2011; Torres-Pérez et al., 2017).

Comprender los fenómenos de plasticidad y regeneración del sistema nervioso con una mirada comparativa y evolutiva en diferentes modelos experimentales, puede proporcionar importantes aportes para el entendimiento básico y posiblemente práctico de los mismos.

1.8 Hipótesis

- 1 Dadas las características particulares de los peces anuales como modelo biológico referente a su elaborado patrón comportamental durante el cortejo y su marcado dimorfismo corporal, se plantea **que la médula espinal de machos y hembras refleje diferencias anatómicas e histológicas en especímenes adultos.**
- 2 Considerando el alto potencial plástico del sistema nervioso de *A. charrua* observado en trabajos previos de este grupo, así como los antecedentes reportados en otros modelos de peces teleósteos se **propone la existencia de proliferación celular y neurogénesis a lo largo de su médula espinal intacta.**

1.9 OBJETIVOS

Objetivo general

Describir la médula espinal de *A. charrua* a tres niveles: morfológico, histológico y proliferativo, enfatizando en la comparación entre machos y hembras en los dos primeros niveles.

Objetivos específicos

1. Adquirir las bases metodológicas para la captura, mantenimiento y manejo en el laboratorio de peces de la especie *A. charrua* para ser utilizados como modelo de experimentación.
2. Describir la morfología y anatomía de la médula espinal de machos y hembras de *A. charrua* mediante el uso del programa bioinformático Fiji.
3. Diseñar un patrón de medida para describir la morfología de las secciones transversales a diferentes niveles de la médula para comparar morfométricamente, segmentos entre los dos sexos.
4. Determinar neuronas NADPH-diaphorasa a través de la tinción histoquímica. A los efectos de comparar con otros estudios en peces con la misma técnica.
5. Detectar la proliferación celular en la médula espinal de *A. charrua* a través del marcador de proliferación 5'bromo 2'desoxiuridina (BrdU) y el revelado con dos técnicas inmunohistoquímica, con fluoróforos como cromógeno como la peroxidasa del rábano revelada con Diaminobencidina.
6. Detectar la presencia de neurogénesis y gliogénesis combinando el BrdU con marcadores de estirpe celular.

METODOLOGÍA

2.1 Colecta y mantenimiento de los peces

Durante este estudio se emplearon un total de veintiséis ejemplares de la especie *A. charrua* adultos (Figura 2 a y b) de aproximadamente 5 meses, trece hembras y trece machos. Los peces fueron colectados a partir de un mismo charco temporal en La Coronilla, Rocha (Figura 2) y se mantuvieron en peceras reproductoras con turba en el fondo, en bioterio de poiquilotermos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para minimizar el estrés producido por la manipulación y el importante cambio ambiental se realizó un acondicionamiento gradual según lo aconseja (Papa & Montagne, 2015)

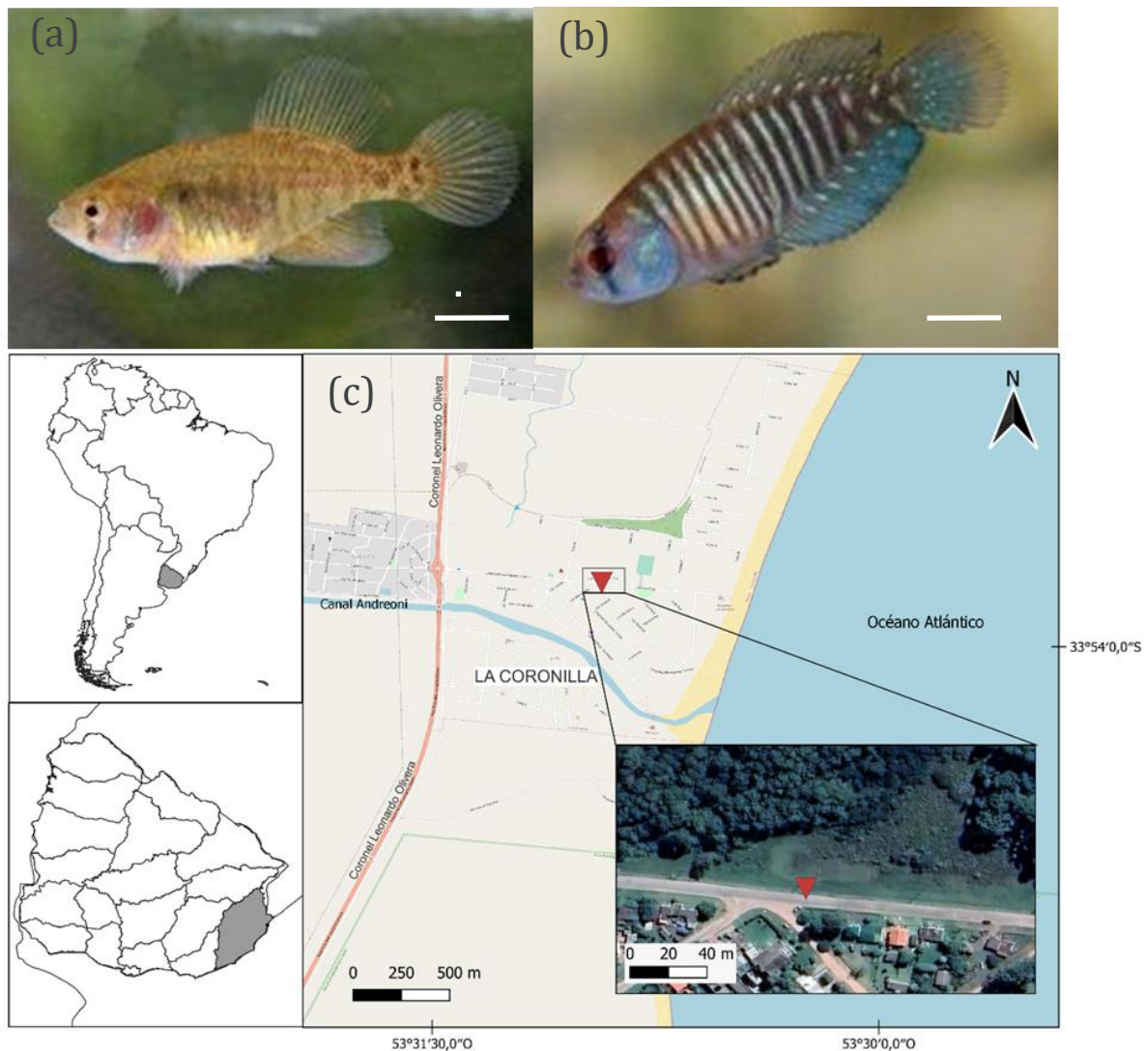


Figura 2. Imágenes de dos individuos adultos de la especie *A. charrua*, macho (a) y hembra (b) correspondientes a la colecta del año 2022. (c) Mapa físico del sitio de colecta en La Coronilla, Rocha. Fotografías tomadas por Marcelo Casacuberta. Barras de calibración: 1 cm.

Durante el proceso de experimentación los individuos se mantuvieron en peceras de 10L, en una relación de un macho cada dos hembras con condiciones de temperatura (20°), conductancia (250/300 mS) y aireación constante y se alimentaron diariamente con *Tubifex tubifex* (*Tubifex rivolorum*).

Del total, diez de los ejemplares fueron utilizados para el estudio morfométrico (de cada sexo), diez para el análisis proliferativo (misma relación), y dos para el análisis histológico y citoarquitectural (un macho y una hembra para la técnica de NADPH).

Las metodologías empleadas en este estudio, descritas en Fernández, et al. (2011), se encuentran enmarcadas en el protocolo de experimentación N° 240011-001221-16, evaluado y aprobado por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA), Facultad de Ciencias.

2.2 Análisis Morfométrico

Para el estudio morfométrico de la médula espinal de *A. charrua* se utilizaron cinco ejemplares adultos de cada sexo. Los mismos fueron anestesiados profundamente con una solución de Eugenol 10% en una dilución 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO, USA) en el agua de la pecera evaluando la desaparición de los indicadores de actividad como el movimiento opercular y el reflejo de escape frente a estímulos externos. Posteriormente los individuos anestesiados fueron intervenidos para exponer la cavidad ventral y acceder al corazón. Con el objetivo de lavar los vasos sanguíneos de glóbulos rojos se realizó una transfusión inicial de solución salina con citrato de sodio 1% (anticoagulante) y nitrito de sodio 2% (vasodilatador) para luego fijarlos por perfusión intracardíaca con Paraformaldehído (PAF) al 10% (preparado en buffer fosfato (PB) 0,1M, pH 7,2-7,4) y garantizar así la preservación del tejido postmortem.

Los individuos fijados fueron medidos en largo, desde la boca hasta la punta de la aleta caudal y posteriormente disecadas las médulas espinales, desde el inicio tomando como referencia el par craneal X (nervio vago), hasta el final de su extensión en el margen anterior de dicha aleta (Figura 3).

La médula disecada fue lavada con PB durante 24 horas, medida y seccionada en cinco segmentos de igual longitud. Estos segmentos fueron encastrados de forma paralela entre sí y perpendicular a la cara de corte en bloques de gelatina-albúmina 1:2 (1,5 y 45 % respectivamente, disueltas en solución salina de Cloruro de Sodio 0,9%) para realizar cortes seriados y transversales de 50 µm de grosor en Vibrátomo S100 (Leica Buffalo Grone, IL, USA).



Figura 3. SNC disecado de *A. charrua*. Se observa el cerebro y médula espinal de macho en el margen superior y de la hembra en el margen inferior. Barra de calibración: 3mm

Para este análisis se tomaron los primeros veinte cortes de cada segmento sin tratamiento ni tinción, de los cuales se seleccionaron dos al azar para realizar las mediciones correspondientes al área, utilizando el programa bioinformático Fiji (Schindelin et al., 2012). Este parámetro fue normalizado utilizando el largo medular.

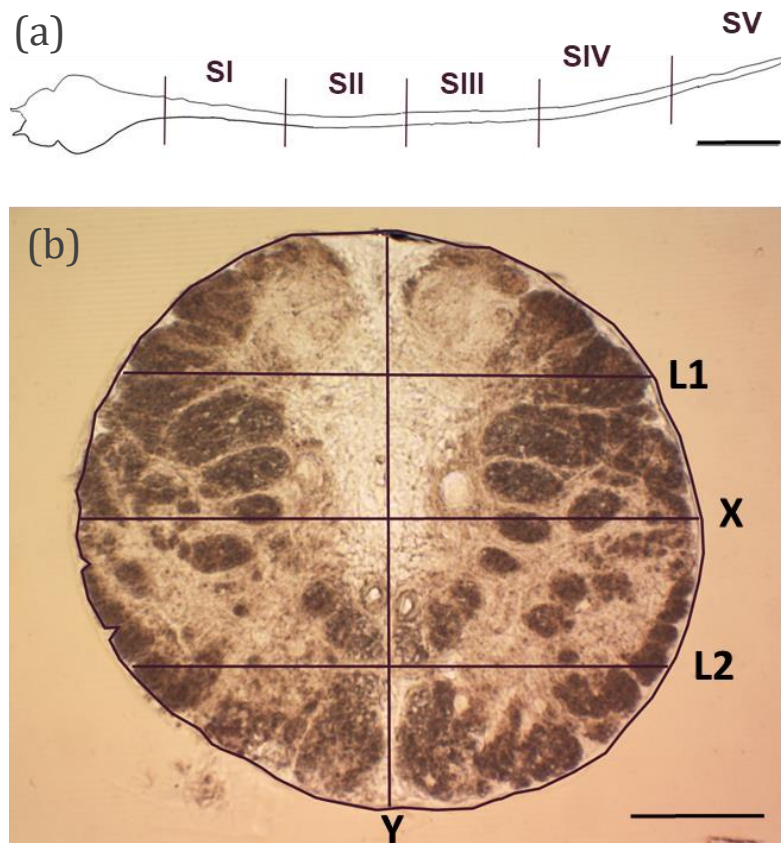


Figura 4. **a**-Representación esquemática de la médula espinal de *A. charrua* señalando los límites de los segmentos utilizados para los tres análisis planteados. Barra de calibración: 3 mm **b**- Sección transversal del segmento medular SI de un ejemplar macho donde se especifican los sitios de medida utilizados para el análisis morfométrico. Se determina Y Desde el polo dorsal hasta el ventral pasando por el centro del canal central, X en la mitad del eje Y desde el extremo

derecho al izquierdo y L1 y L2 a uno y tres cuartos de Y respectivamente. Barra de calibración: 20µm.

Por otra parte, para la descripción de la forma de las secciones transversales se diseñó un patrón de medida (Figura 4b) con el fin de obtener dos índices complementarios (If1 e If2). En este sentido, If1 refleja la relación entre L1 y L2 (Figura 4a) y es utilizado para asociar la sección transversal del corte a un círculo, óvalo (igual o similar a uno), o triángulo (menor a uno). Además, para diferenciar entre círculos y óvalos se emplea If2 que expresa la relación entre los ejes X e Y. En el caso de obtener valores de If2 cercanos a uno se asociará la forma a un círculo y menores a un óvalo.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del análisis morfométrico fueron analizados utilizando los programas bioestadísticos **Past** y **Graphpad Prism 6** para evaluar las posibles diferencias dimórficas.

2.3 Análisis citoarquitectural

NADPH diaforasa

Para la detección de neuronas con actividad NADPH-diaforasa se siguió el protocolo planteado por Valtschanoff et al., (1992). Fueron anestesiados (**ver métodos 1.0**) y perfundidos un ejemplar de cada sexo con glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 0,5% en buffer fosfato pH 7,3. Al igual que para el análisis morfométrico se mantuvieron invariantes los segmentos de interés a partir de los cuales se realizaron cortes de 50 µm en vibrátomo. Posteriormente se incubaron las secciones obtenidas con una solución de 5 ml Buffer Tris con 12µl de Tritón X-100 (0,3%) durante 10 minutos. Sucesivamente se transfirieron los cortes al medio de incubación, una mezcla de *nitroblue* de Tetrazolio (2mg) y beta-NADPH (5 mg) disueltos en 5 ml de agua bidestilada. Finalmente, los cortes se mantuvieron a 37°C durante 8 horas, luego de las cuales fueron lavados en PB y montados con glicerol para su posterior visualización en microscopio de luz Nikon Eclipse E200.

2.4 Análisis de la proliferación celular y neurogénesis

Para la observación y análisis de la proliferación celular a lo largo de la médula espinal se empleó como marcador de proliferación al 5' bromo-2' desoxiuridina (BrdU) (Figura 5). El BrdU es un análogo sintético de la timidina, capaz de integrarse en las células en fase de síntesis (fase S) del ciclo celular. Es por esta razón que ha sido ampliamente utilizado como marcador de proliferación celular, permitiendo además confirmar la neurogénesis postnatal como un proceso natural en diferentes regiones del sistema nervioso en distintos grupos zoológicos, incluyendo mamíferos.

Tratamiento con 5'bromo-2'desoxiuridina (BrdU)

Un total de diez individuos (cinco hembras y cinco machos) fueron inyectados intraperitonealmente con una única dosis (100 mg/kg de peso corporal) de BrdU (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) disuelto en 0.6% de cloruro de sodio. Luego de una semana de sobrevida, los peces fueron anestesiados y fijados por perfusión al igual que en métodos 1.0. Posteriormente los cuerpos se post fijaron por inmersión durante 24 horas en PAF 10% y se lavaron durante 2 horas en PB. Se disecó y seccionó la médula espinal de los ejemplares manteniendo el patrón de segmentación y método de corte utilizado para el análisis morfológico (ver métodos 1.0).

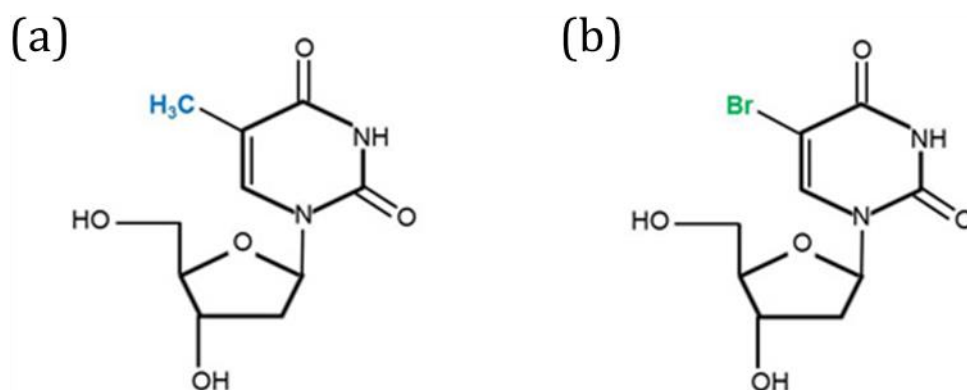


Figura 5. Esquema representativo de las diferencias estructurales entre una molécula de timidina (a) y su análogo BrdU (b).

Detección mediante inmunohistoquímica de fluorescencia

Para la detección de aquellas células que incorporaron el BrdU en la fase de síntesis, así como para discriminar su identidad con marcadores de estirpe celular, se incubaron los cortes en una solución de HCl 2N y Tritón X-100 0,3% disuelto en PB (PBT) durante 35 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento resulta en la desnaturalización de

las hebras de ADN y permeabilización de las membranas celulares, permitiendo así el ingreso de los anticuerpos al interior celular y reconocimiento de su epítipo específico.

A continuación, los cortes fueron lavados tres veces con PB y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-BrdU en una dilución 1:80 (Hybridoma Bank) durante 24 a 48 horas a 4°C. Posteriormente se hicieron otros tres lavados con PB y se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 1) conjugado a un fluoróforo verde (Abcam, Alexa fluor 488).

Además, algunos de estos cortes fueron seleccionados para combinar la marca de la proliferación celular dada por el BrdU con anticuerpos específicos para determinar estirpe glial o neuronal. Para detectar neurogénesis se empleó un anticuerpo anti-HuC, un marcador capaz de detectar una proteína ribosomal específica de neuroblastos y neuronas maduras, mientras que para evidenciar gliogénesis se utilizó un anticuerpo específico para S-100, un marcador de glías tempranas, habitualmente consideradas progenitores neurales. Estos cortes fueron lavados una vez con PB durante 5 a 10 minutos e incubados por 48 horas con anticuerpos primarios (Tabla 1). A continuación, se incubaron los cortes con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos por 1 hora (Tabla 1).

Detección	AC 1	Marca y código	Dilución	AC 2	marca	Dilución
HuC	Anti-HuC	Abcam, ab78467, Conejo, Policlonal	1:100	Alexa 488, Anti Conejo	Abcam	1:1000
BrdU	Anti-BrdU	Hybridoma Bank, G3G4, Ratón, monoclonal	1:80	Alexa 488 Alexa 546 Anti Ratón	Abcam	1:1000
S-100	Anti-S100	Sigma-Aldrich, S2644, Conejo, policlonal	1:300	Anti Ratón HRP	Abcam	1:300

Luego de este proceso las secciones fueron montadas con glicerol-DAPI en portaobjeto, observados y fotografiados en el microscopio confocal Olympus FV300 del Instituto Clemente Estable.

Detección mediante inmunohistoquímica con HRP

Para el revelado del BrdU incorporado mediante HRP, los cortes fueron procesados como se describe anteriormente e incubados con anticuerpos primarios anti-BrdU. Posteriormente, los cortes fueron incubados con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano (Tabla1) durante 1h. A continuación, la actividad de peroxidasa fue visualizada mediante adición de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) de acuerdo con Fernández et al. (2011).

Controles

Controles del BrdU

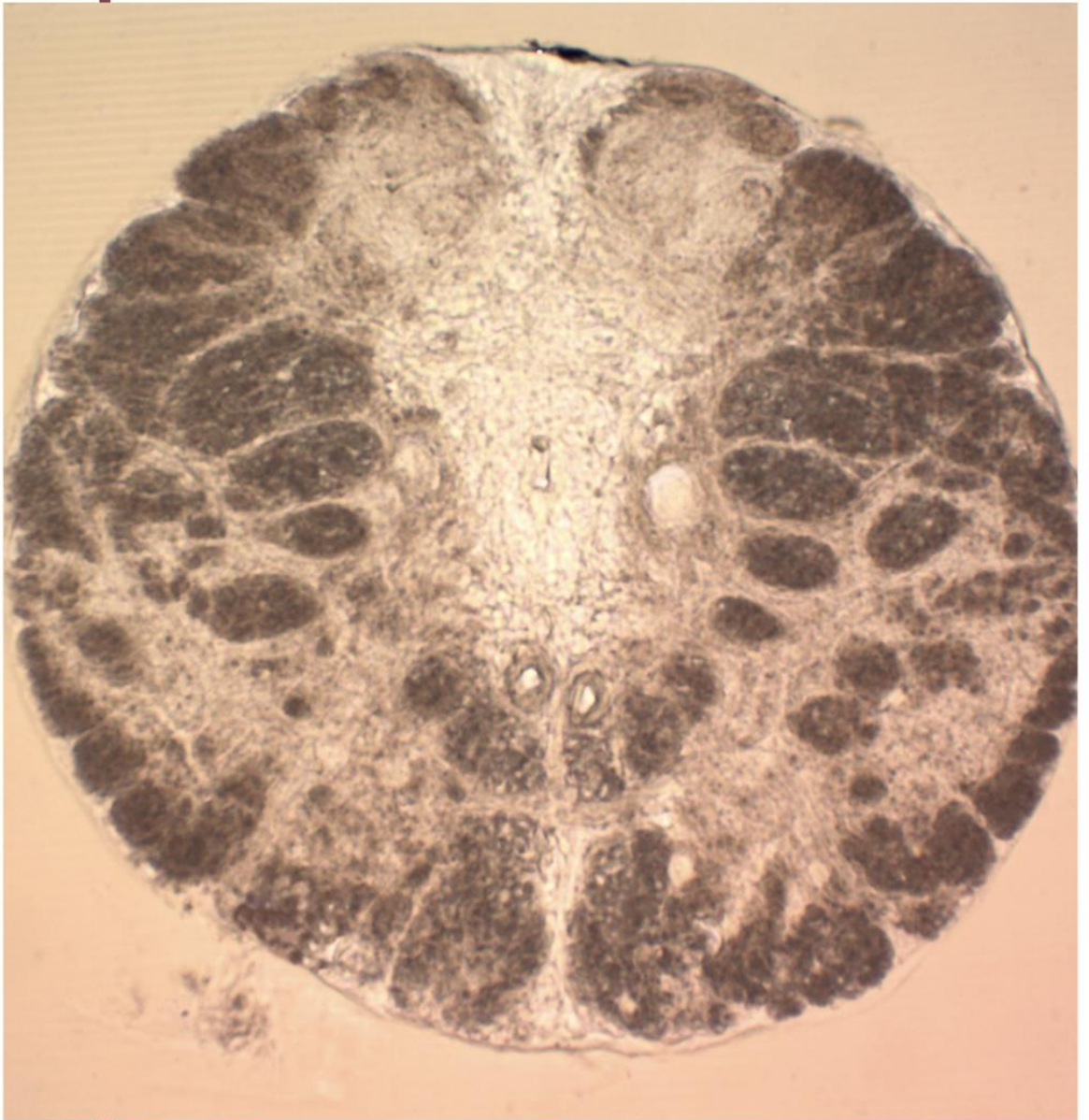
Como control positivo del tratamiento con BrdU, se utilizaron muestras de tejido intestinal de rata, por ser tejidos con alta capacidad proliferativa. Como control negativo, se incubaron cortes de médula únicamente con anticuerpo primario, y otros solo con el secundario, esperando no obtener ningún tipo de señal fluorescente en el revelado del tejido.

Control de otros anticuerpos

Para el resto de los anticuerpos se siguieron los mismos procedimientos que para los controles positivos y negativos del BrdU, utilizando tejidos de la rata, donde los anticuerpos han sido testeados por el proveedor.

Análisis estructural y morfométrico

CAPÍTULO I



RESULTADOS

Con el fin de abordar el objetivo específico número 2 se analizaron diferentes aspectos morfométricos macroscópicos de la médula espinal de *A. charrua*. Entre ellos se encuentra el largo medular en relación con el largo corporal, el área y forma a partir de cortes transversales en los distintos segmentos de interés utilizando diferentes parámetros.

3.1 Relación largo corporal - largo medular

Los valores de largo medular y corporal correspondientes a cada individuo muestreado fueron analizados con el objetivo de establecer una relación entre ambos parámetros. En primer lugar, dichos datos fueron comparados considerados como parte de un único grupo de estudio utilizando una regresión lineal simple. La misma mostró una relación positiva entre ambos parámetros con una pendiente de 0.62058 ± 0.020 , siendo esta significativamente diferente de 0 ($p < 0.0001$). Por otra parte, se obtuvo un r^2 igual a 0.967 indicando que aproximadamente el 97% de la variación observada en el largo medular se ve explicada por el largo corporal (Figura 6).

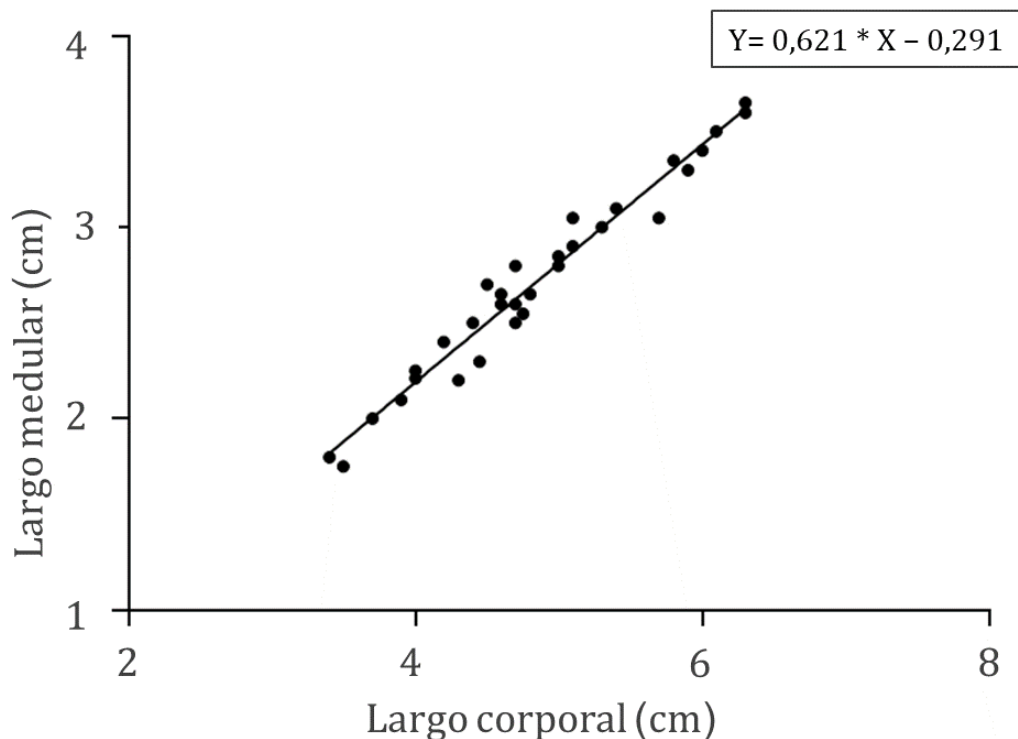


Figura 6. Regresión lineal entre el largo corporal (eje x) y el largo medular (eje y) en cm considerando todos los datos muestreados sin discriminarlos por sexo. Se muestra en el margen superior derecho la ecuación de la recta.

A continuación, se realizó el mismo análisis discriminando los datos por sexo para determinar las posibles diferencias correspondientes a dicha característica. A partir de

este análisis se observó una gran similitud entre las pendientes en ambos grupos, siendo ambas significativamente distintas de 0 (0.631 ± 0.023 en hembras y 0.612 ± 0.042 en machos) y con valores de $p < 0.0001$. La comparación entre las pendientes no mostró diferencias significativas ($F = 0.103$, $p = 0.902$) (Figura 7).

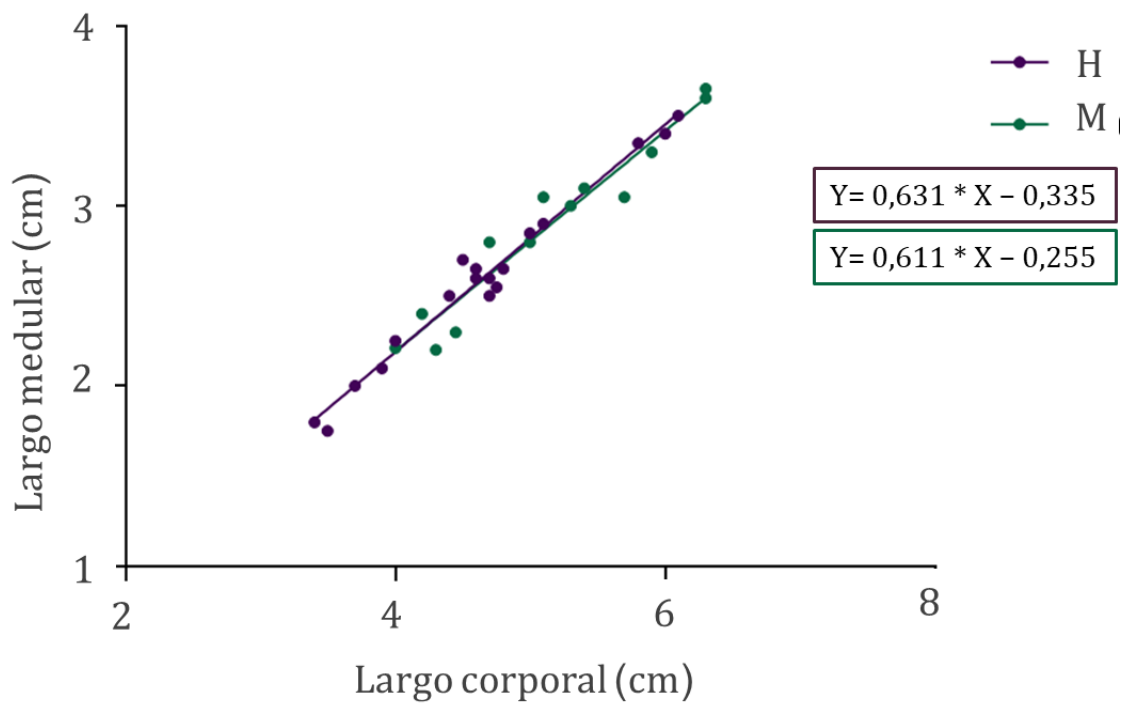


Figura 7. Regresión lineal entre el largo corporal (eje x) y el largo medular (eje y) en cm discriminando los datos entre machos (M) y hembras (H). Se muestra en el margen superior derecho la ecuación de la recta.

3.2 *Análisis de la variación dimensional en las secciones transversales a lo largo del eje rostro-caudal.*

Otro de los componentes estudiados para el análisis estructural de los segmentos de interés fue el área de las secciones transversales, normalizada por el largo corporal. En primera instancia se comparó este parámetro entre los distintos segmentos en cada sexo y luego entre ellos.

El estudio mediante test de Friedman reveló diferencias significativas entre los segmentos para cada sexo ($\chi^2=40$, $p=4,582E-8$, $df=4$ en machos y $\chi^2= 38.72$, $p=8.415E-8$, $df=4$ en hembras). El análisis a posteriori mediante test pareado de Wilcoxon mostró diferencias significativas entre todos los segmentos para machos y entre todos menos SII y SIII para hembras.

Posteriormente se realizó la comparación del área normalizada correspondiente a cada segmento entre machos y hembras. A partir de la misma se obtuvieron valores significativamente mayores en machos en los segmentos **SII** ($U=15$, $z=2.608$, $p=0.009$, $r=0.583$), **SIV** ($U=16$, $z=2.532$, $p=0.011$, $r=0.566$) y **SV** ($U=22$, $z=2.079$, $p=0.038$, $r=0.46$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los segmentos **SI** ($U=50$, $z=0.038$, $p=0.970$, $r=0.009$) y **SIII** ($U=36$, $z=1.020$, $p=0.307$, $r=0.228$) (Figura 8).

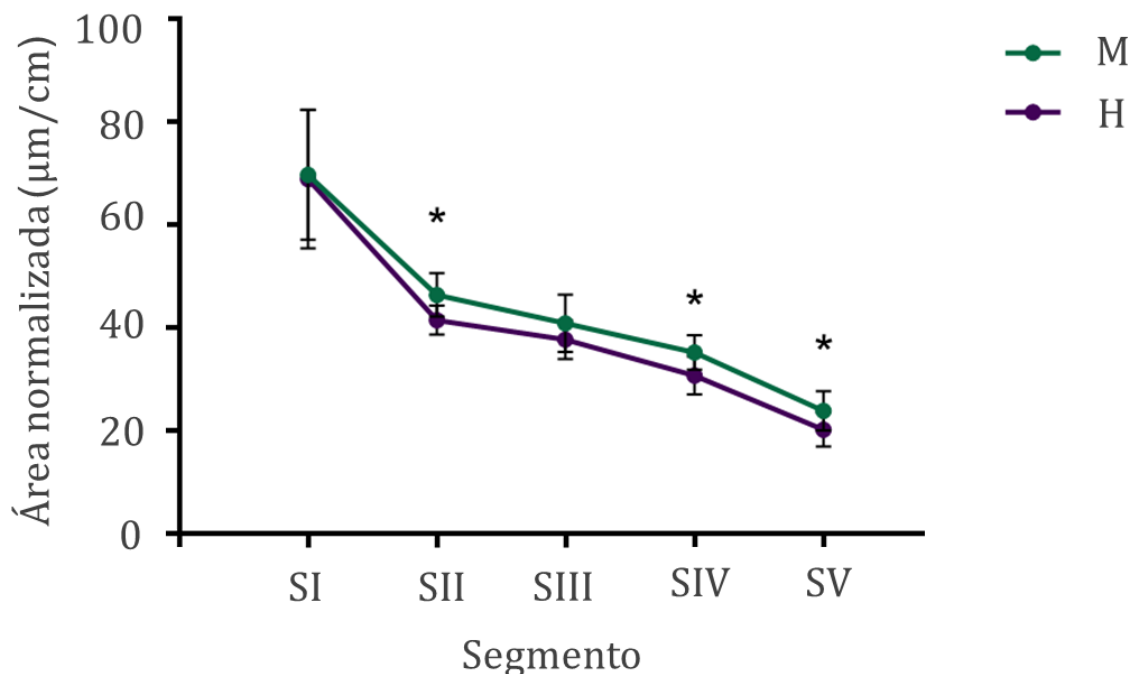


Figura 8. Área de cada segmento medular normalizada por el largo corporal. Se expresan con (*) las diferencias significativas entre machos (M) y hembras (H).

Además, para el estudio descriptivo y comparativo de la diversidad de formas encontradas, en las secciones transversales correspondientes a cada segmento (Figura 9) fueron utilizados dos índices, **If1** (utilizado para asemejar la forma a un círculo, óvalo (igual o similar a uno), o triángulo (menor a uno)) e **If2** (utilizado para expresar la relación entre los ejes X e Y para discriminar entre óvalos si los valores obtenidos fueran menores a uno y círculos con valores cercanos a uno).

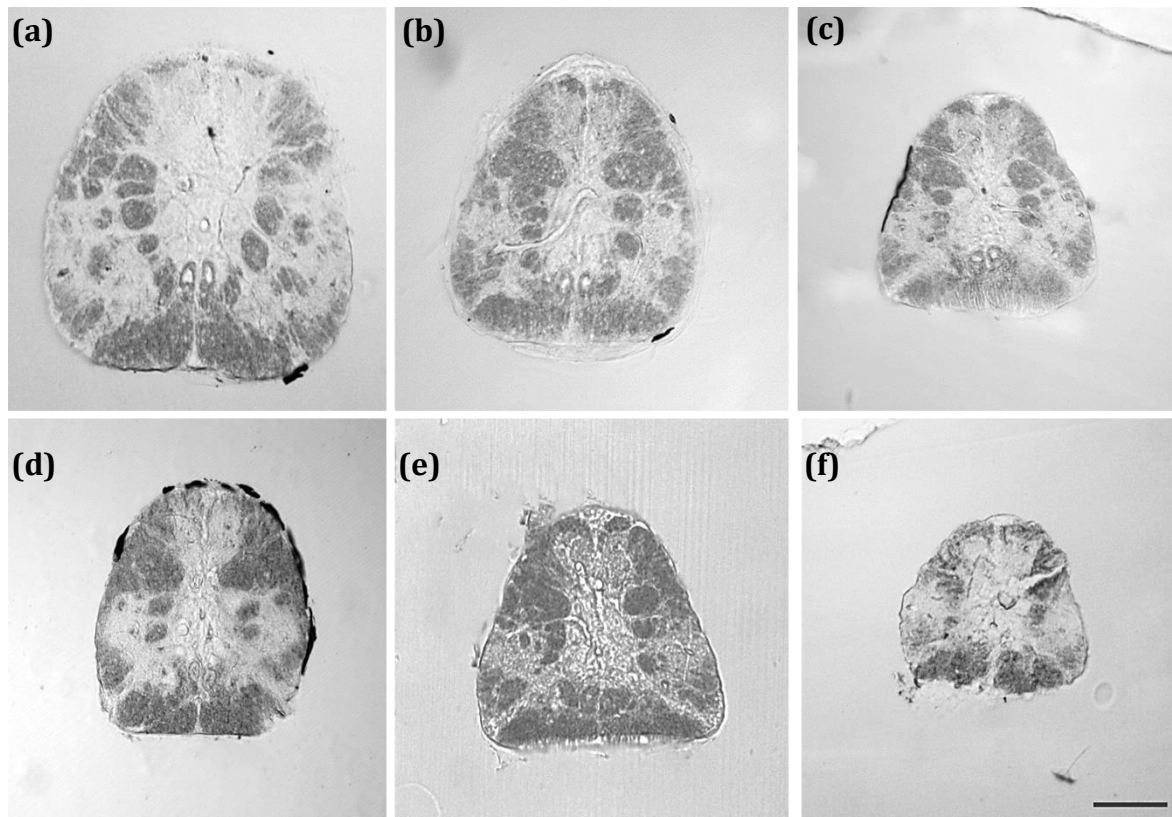


Figura 9. Secciones transversales de médula espinal de *A. charrua* de 50 μm de espesor donde se refleja la diversidad anatómica de la misma correspondiente a los segmentos I (a), II (b), III (c), IV (d) y V (e) de hembra y III de macho (f) sin tinción en microscopio fotónico. Barra de calibración: 50 μm .

Distintivamente, la comparación mediante test de Mann-Whitney de los datos obtenidos de I_{f1} para machos y hembras reveló diferencias significativamente en el segmento III. Particularmente este segmento expresó valores significativamente mayores en machos ($U=11$, $z=2.910$, $p=0.002$, $r=0.65$), específicamente más cercanos a 1, indicando de esta forma una tendencia circular en el mismo. Al expresar las hembras sobre todo valores menores a 1 es que se puede asemejar su forma a un triángulo.

El resto de los segmentos no exhibieron diferencias significativas entre sexos (SI: $U=46$, $z=0.265$, $p=0.796$, $r=0.059$; SII: $U=44$, $z=0.416$, $p=0.688$, $r=0.093$; SIV: $U=47$, $z=0.189$, $p=0.851$, $r=0.042$; SV: $U=47$, $z=0.189$, $p=0.853$, $r=0.042$).

De forma característica en el segmento SI de ambos sexos se observaron valores más próximos a 1 con respecto al resto de los segmentos, denotando una tendencia circular. A diferencia de esto, tanto el segmento SII como el SIV expresan valores de medianas bastante por debajo de 1 sugiriendo una notable asociación a la forma triangular u ovalada. En cuanto al segmento SV se observaron valores de medianas próximos a 1 (circular) en hembras y más alejados (triangular) en machos, en ambos casos expresando una gran variación entre grupos (Figura 10).

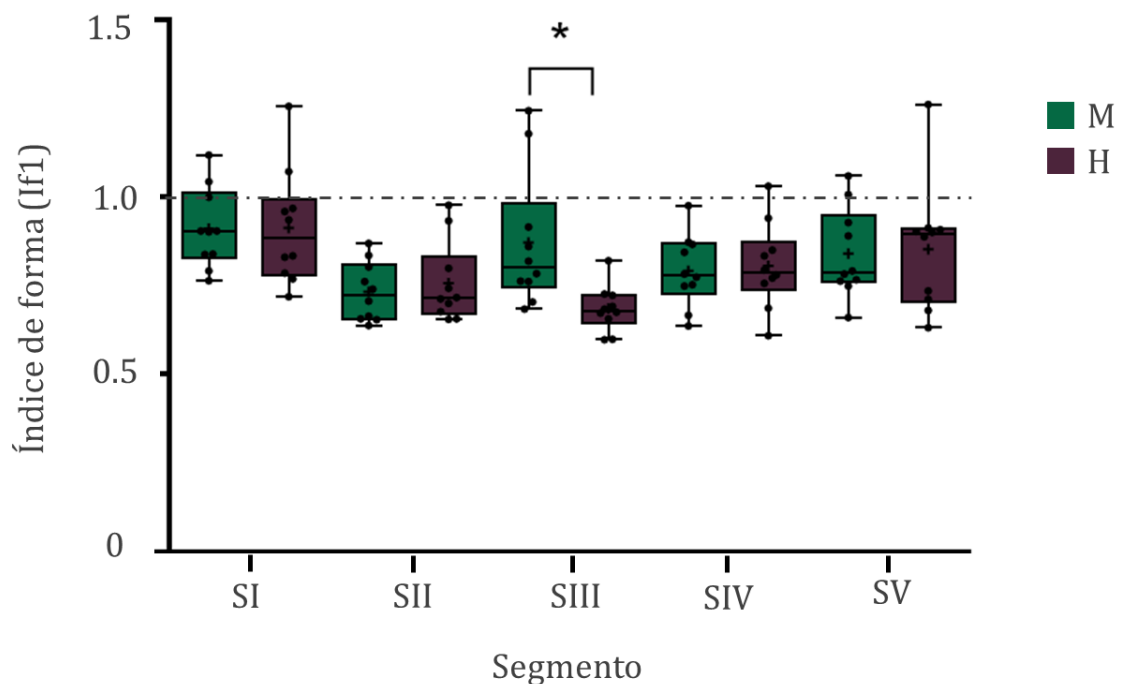


Figura 10. Índice de forma (If1) para cada segmento medular y cada sexo Se expresa el grado de semejanza a la forma circular o triangular según el valor de If 1(triangular \neq 1, circular \approx 1). Se expresan con (*) las diferencias significativas entre machos (M) y hembras (H).

En cuanto a la comparación entre sexos de If2 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los segmentos analizados (SI: $U=50$, $z=0.0378$, $p=1$, $r=0.008$; SII: $U=29$, $z=1.250$, $p=0.121$, $r=0.280$; SIII: $U=47$, $z=0.189$, $p=0.858$, $r=0.042$; SIV: $U=38$, $z=0.867$, $p=0.396$, $r=0.194$; SV: $U=36$, $z=1.020$, $p=0.312$, $r=0.228$), observándose en todos los casos valores de medianas cercanos a 1 sugiriendo una baja proporción de figuras ovaladas (Figura 11).

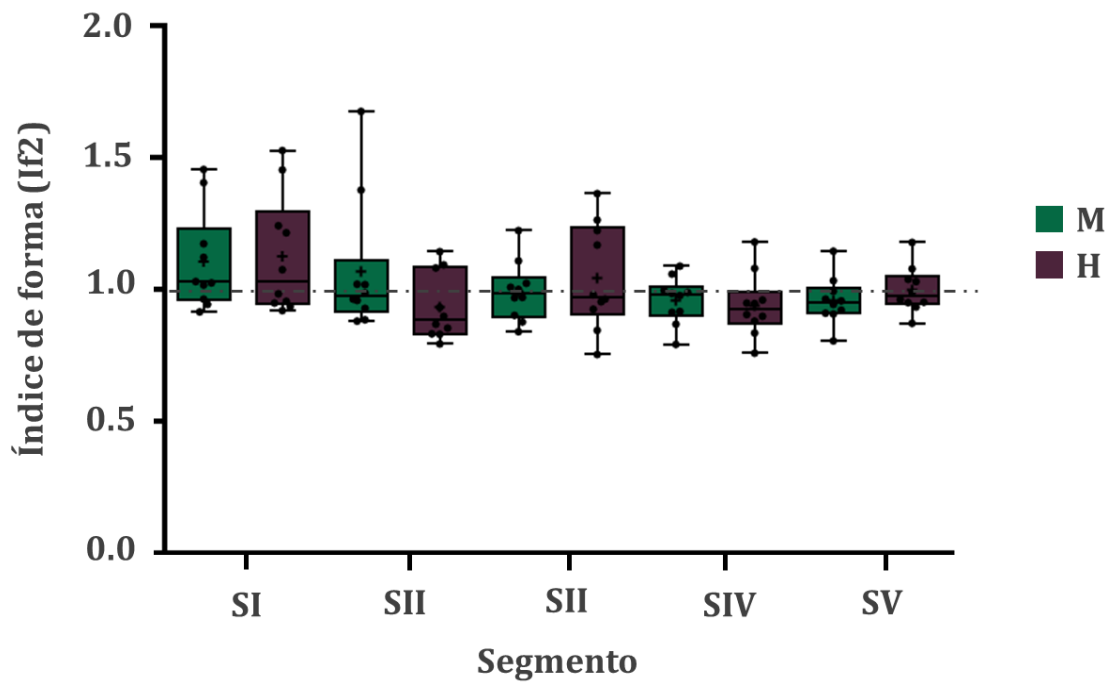


Figura 11. Índice de forma (If2) para cada segmento medular y cada sexo Se expresa el grado de semejanza a la forma ovalada según el valor de If 2 (ovalo \neq 1, circular \approx 1). No se observan diferencias significativas entre machos (M) y hembras (H).

DISCUSIÓN

Distintas especies de vertebrados han sido ampliamente utilizadas para estudios comparativos frente a diferentes condiciones y procesos, incluyendo varios modelos de patologías. La descripción anatómica y morfológica en estado fisiológico del órgano de interés constituye una herramienta fundamental para esto (Weinhardt et al., 2018).

Se conoce además que las condiciones divergentes a las que machos y hembras se encuentran sometidos, incluyendo la influencia hormonal, la información sensorial (Berrostequieta, 2020; Berrostequieta et al., 2022; Herrera Astorga, 2022), ciertos factores genéticos y epigenéticos, así como las distintas presiones de selección (selección sexual, competencia intersexual por el alimento y división de roles dentro del cortejo y reproducción), producen dimorfismos morfológicos y comportamentales (Kotrschal et al., 2012).

Es en relación con este hecho que se plantea estudiar los parámetros estructurales básicos de la médula espinal de *A. charrua*, comprendiendo la forma, área y extensión en relación con el largo corporal como forma de caracterizar macroscópicamente este órgano, enfatizando en las diferencias entre machos y hembras.

A partir de los resultados obtenidos se determina que el largo medular en la especie de interés se ve explicado en un 97% por el largo corporal, dato para el cual no se encuentran diferencias significativas entre sexos.

En cuanto al área de los segmentos se observa para machos una disminución significativa y progresiva hacia la región caudal. En cambio, las hembras muestran en los segmentos medios del tronco una curva más aplanada, sin diferencias significativas entre SII y SIII, denotando una disminución menos marcada en esta región. En la comparación entre sexos se observaron valores superiores en machos en todos los segmentos analizados, excepto en SI y el SII. Para el SI se puede observar un gran desvío reflejando la gran variedad que presenta este segmento. Esto se explica ya que variando pocas micras en el eje rostro-caudal se observa una rápida disminución del área transversal. El segmento SIII coincide particularmente con la posición de la aleta dorsal. La ausencia de diferencias significativas con los machos significaría en las hembras una mayor proporción del área de este segmento con relación al resto. Esto podría estar implicado en el uso diferencial de la misma durante el cortejo y reproducción donde las aletas son fundamentales durante el complejo patrón motor desplegado.

Por otra parte, se consideró además la forma transversal de los segmentos mediante el empleo de dos índices de forma. Es importante destacar que se diseñó en este trabajo un patrón de medidas capaz de detectar diferencias estructurales de forma simple y aplicable a otros modelos.

A partir de estos se determinó un perfil mayormente circular, encontrándose diferencias significativas únicamente en el SIII, donde se pudo observar en machos contornos sobre todo circulares y en hembras triangulares. Esto implica una región dorsal más desarrollada en machos en comparación con las hembras.

Es interesante mencionar que a pesar de no haber diferencias significativas en el SV las medianas de ambos grupos experimentales se alejan considerablemente según puede observarse en la (Figura 10). La falta de diferencia puede explicarse por la gran variación que hay en ambos grupos.

Es valioso destacar que en este trabajo no se reduce a una región específica de la médula, como sucede sobre todo con los trabajos que abordan el dimorfismo en la médula espinal (Forger & Breedlove, 1986; Marc Breedlove & Arnold, 1981; Yuan et al., 2000), sino que intenta exponer su gran diversidad morfológica mediante un muestreo en 5 regiones equidistantes. Es a partir de este diseño experimental que se demuestra la amplia diversidad que aloja la médula espinal de *A. charrua* (Figura 4b), posiblemente asociada a su funcionalidad y la relación espacial con otros órganos internos.

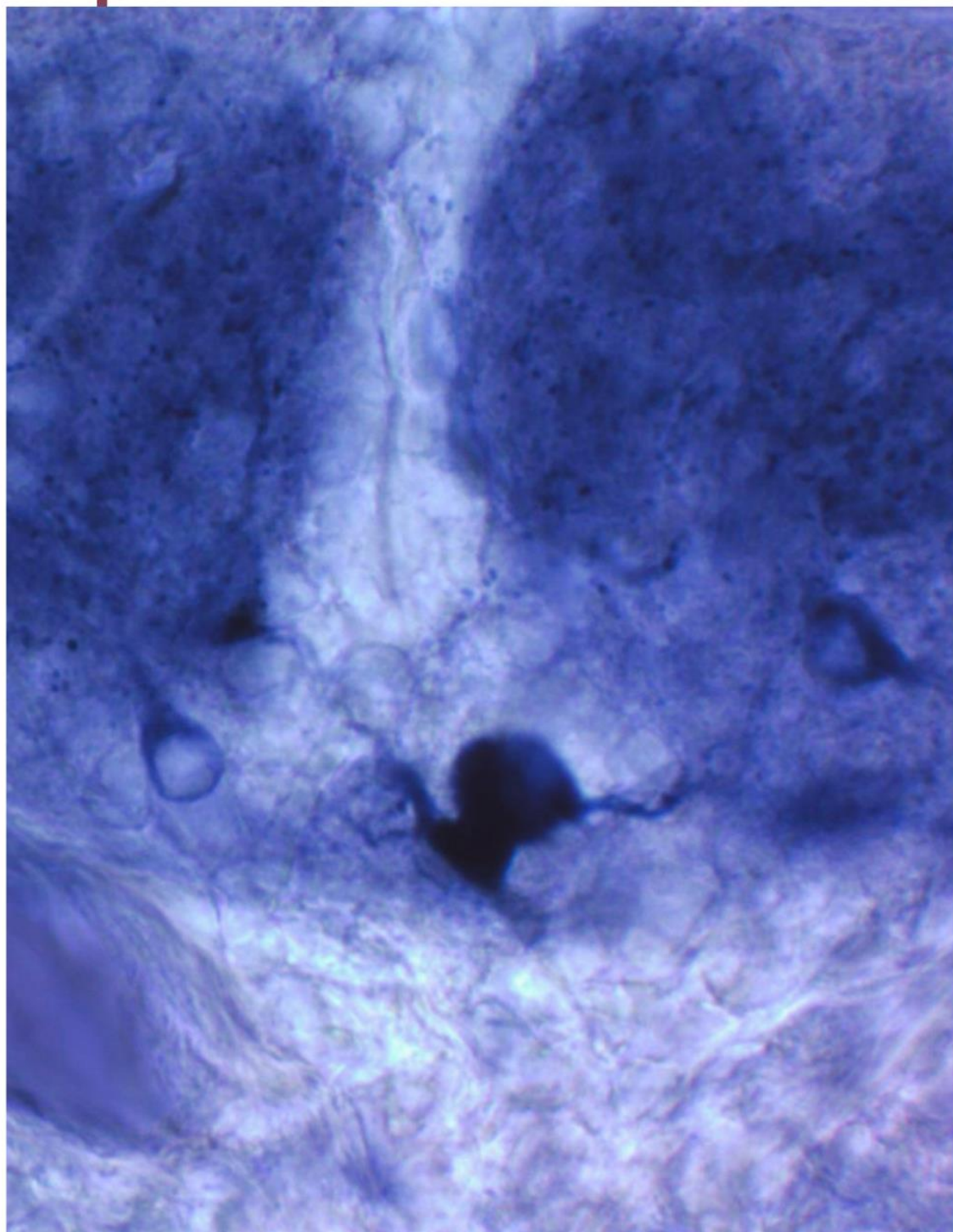
CONCLUSIONES

El estudio morfológico de la médula espinal de *A. charrua* realizado en este trabajo ofrece una referencia estructural del modelo para futuros estudios comparativos tanto en otros modelos animales, así como entre individuos de la misma especie tratados diferencialmente. Además, al no existir antecedentes sobre el tema en la bibliografía actual este reporte contribuye a la caracterización general del modelo.

Los peces anuales presentan un marcado dimorfismo en tamaño y diseño corporal que acompaña su complejo comportamiento durante el cortejo y reproducción. A pesar de que no se reportan antecedentes sobre las características estructurales de la médula espinal en este grupo, a partir de este trabajo se propone que las diferencias corporales entre sexos se reflejan en la anatomía de la médula espinal, en particular asociada a las características distintivas del desarrollo de las aletas y el desempeño de las mismas durante el cortejo.

Análisis histológico

CAPÍTULO II



RESULTADOS

Con el objetivo de realizar una primera descripción funcional de los componentes celulares de la médula espinal del modelo de estudio es que se utilizó una técnica histoquímica para el revelado de neuronas con actividad enzimática NADPH diaforasa positiva (NADPHd+). La NADPH diaforasa es una óxidonítrico sintasa, capaz de producir óxido nítrico a partir de L-arginina (Tuteja et al., 2004). Este gas inorgánico de alto potencial difusible actúa como neuromodulador en muchas funciones fisiológicas, entre las que se encuentran los procesos de memoria, la coordinación entre la actividad neural, flujo sanguíneo, y particularmente en la médula espinal se lo ha relacionado con los mecanismos reguladores de la nocicepción, la sensibilización central y la hiperalgesia (Choi et al., 1996; Radmilovich et al., 1997). Es debido a esto que la actividad NADPH diaforasa ha sido ampliamente utilizada para reconocer entre otros, a los circuitos sensoriales en la médula espinal.

En este trabajo se ha observado una amplia distribución de células NADPHd+ a partir de las secciones transversales analizadas, pudiéndose observar características conservadas entre los segmentos, así como particularidades propias de los mismos. A continuación, se describen las células marcadas en morfología, dimensión y localización.

Asta dorsal. En todos los segmentos de ambos sexos fueron encontrados dos centros neuropilicos teñidos fuertemente, con presencia de células marcadas situados en la región dorsal. De forma característica estas regiones representan sitios de interconexión neuronal, con una marcada presencia de proyecciones axonales. Se observó además que estas regiones comprenden gran parte de los somas de las células NADPHd+. Dichos centros ocupan alrededor del 10% del área medular en todos los segmentos analizados y se encuentran separados por una sección negativa que transcurre sobre la línea media (Figura 12). Según lo determinado cualitativamente esta sección disminuye a lo largo del eje rostro caudal con forme al área del segmento.

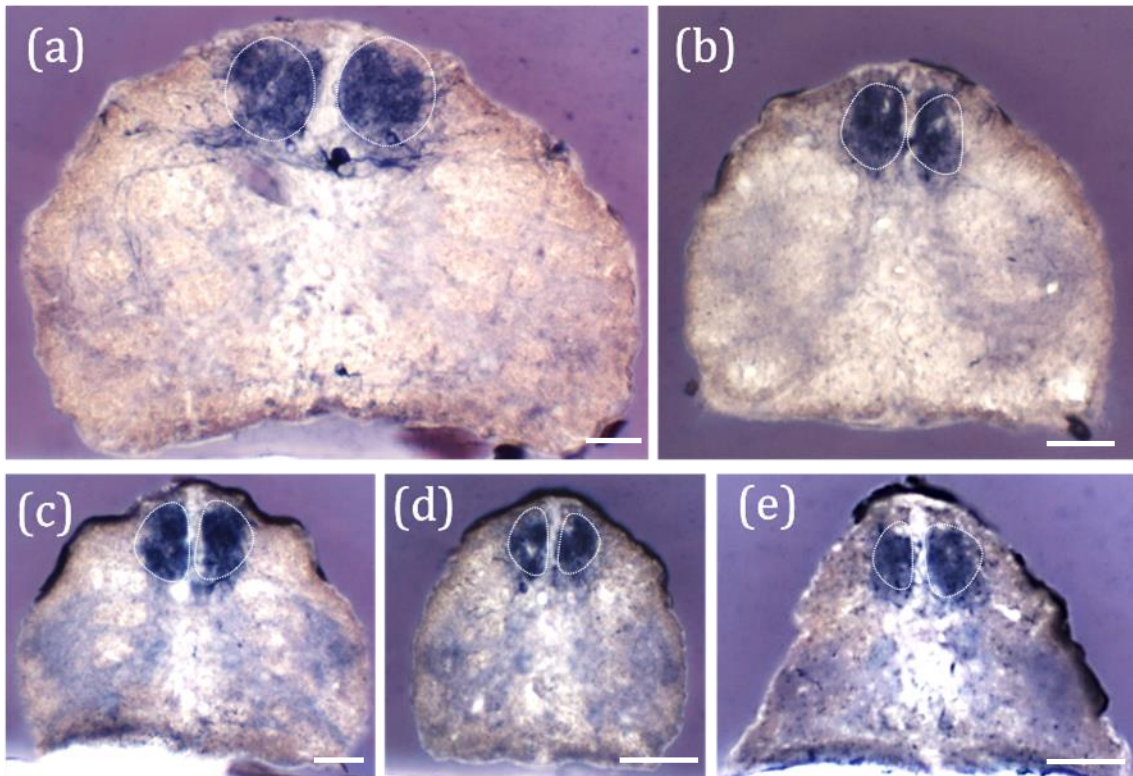


Figura 12. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales de la médula espinal de un ejemplar macho de la especie *A. charrua* correspondiente al segmento SI (a), SII (b), SIII (c), SIV (d), SV (e) tratadas para detectar la distribución y características morfológicas de las células NADPHd+. Se marcan con línea punteada los centros neuropílicos de la región dorsal para cada segmento. Barra de calibración (a,b,c,d,e): 60 μm

En ambos sexos se ha observado una conformación celular heterogénea en los centros, en cuanto a forma y tamaño, observándose células de somas redondeados, fusiformes u ovalados, en su mayoría con largos y delgados procesos. Estos procesos parecieran extenderse hacia regiones laterales y ventrales de la sustancia gris, así como hacia la periferia medular por los fascículos axonales que atraviesan la sustancia blanca (Figura 13b). Gran proporción de las células localizadas en los centros neuropílicos corresponden a células pseudounipolares (Figura 13a) o bien unipolares (Figura 13b), de distintos tamaños sobre todo intermedias (10 a 14 μm) y pequeñas (8 a 10 μm).

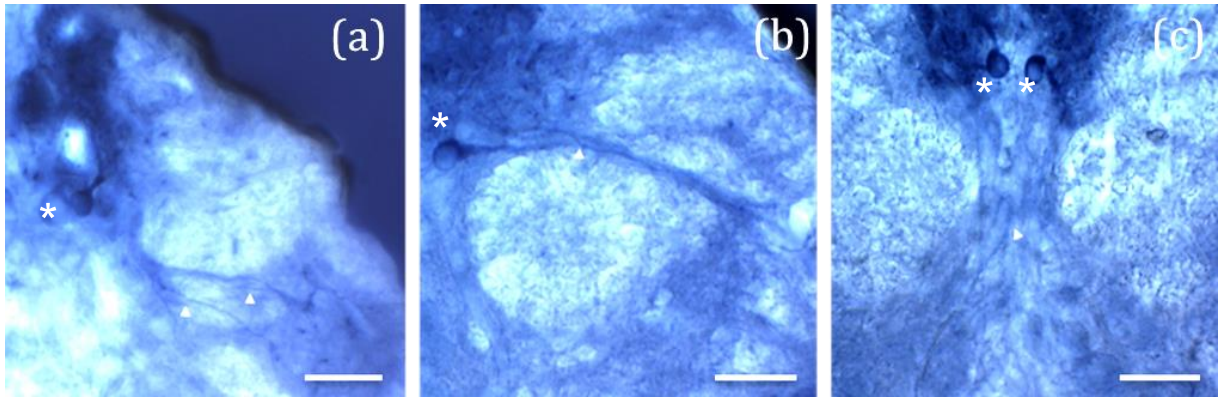


Figura 13. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales ampliadas de la médula espinal correspondiente a los segmentos (a) SIV♂, (b) SI♀ (c) SII♀. Se destacan con punta de flecha las delgadas prolongaciones marcadas que invaden la sustancia blanca. Se denotan con * los somas de las células NADPHd+ donde se observa su naturaleza unipolar (b) y pseudounipolar (c). Barra de calibración: 25 μ m.

Entre estas células se han podido distinguir algunas de pequeño tamaño (8 μ m), de única prolongación y escaso pericarion redondeado, viéndose el mismo como un delgado aro violeta alrededor del núcleo claro (Figura 14a). Otras fusiformes bipolares, de mayores dimensiones (18 μ m) y fuertemente teñidas, se han encontrado sobre todo en el margen ventral de estos centros extendiendo sus prolongaciones, algunas horizontalmente (Figura 14c) terminando en arborizaciones con muchos botones sinápticos y otras verticalmente (Figura 14b).

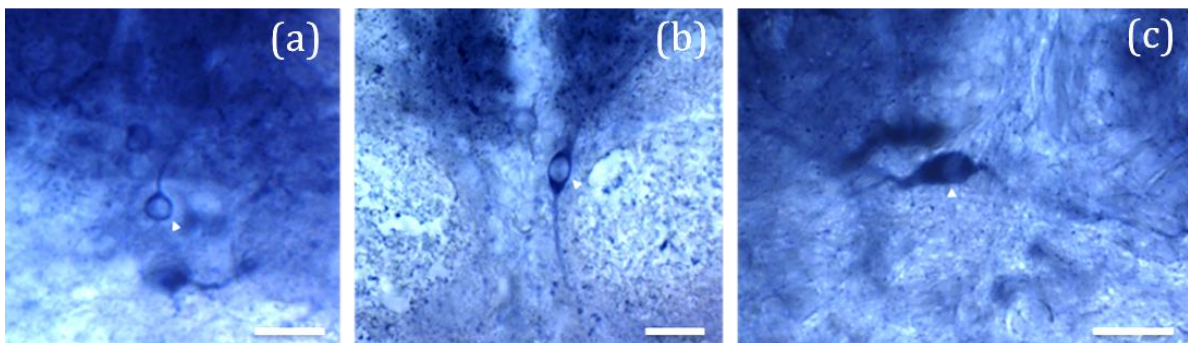


Figura 14. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales ampliadas de la médula espinal correspondiente a los segmentos (a) SI♀, (b) SII♀ (c) SI♀. Se destaca en con punta de flecha las células marcadas con actividad NADPHd+ para cada imagen resaltando las diversas morfologías observadas además de las características particulares de los somas y grado de marcado. Barras de calibración: 20 μ m.

Particularmente se ha observado en el SI una mayor proporción de células con respecto al resto de los segmentos. Además, se ha visto sobre todo en machos, una frecuente aparición de células de gran tamaño (entre 13 y 15 μ m para hembras y entre 15 y 18 μ m para machos) dispuestas sobre la línea media. Esta característica se comparte en menor medida con el SII. Morfológicamente, estas células presentan un soma redondeado o fusiforme y dos gruesas y largas (2-3 μ m) prolongaciones que se extienden hacia ambos centros donde se arborizan (Figura 15c).

En el **SII** aparece distintivamente un tipo celular que se mantiene en el **SIII** de ambos sexos. Estas células son de tipo unipolar, presentan un soma ovalado y extienden su única, delgada y larga prolongación hacia la región ventral, invadiendo la sustancia blanca, lugar donde se bifurca (Figura 15 a y b).

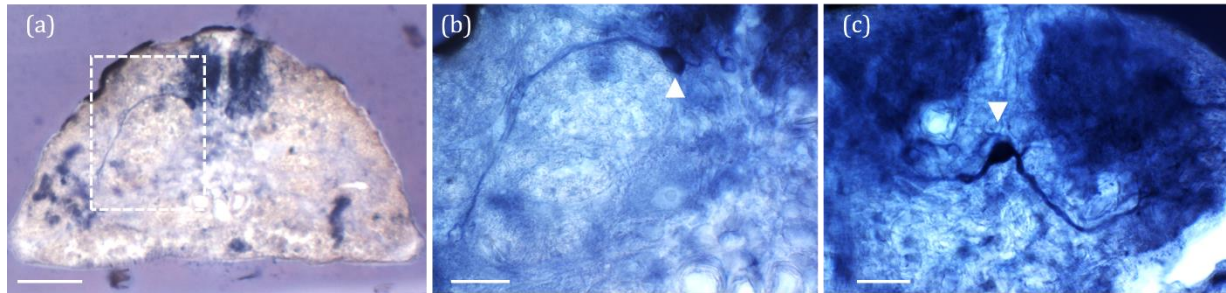


Figura 15. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales de la médula espinal correspondiente a los segmentos (a y b) SIII ♂, (c) SI ♂. En (b) Se observa una visión aumentada de la sección aumentada delimitada con línea punteada del corte observado en (a). Se destaca en con punta de flecha las células marcadas con actividad NADPHd+ para cada caso destacando la dimensión y ubicación de un grupo específico encontrado en los segmentos SII y SIII. Barras de calibración: (a): 60 μm . (b): 20 μm , (c):30 μm .

De forma particular, se observa una marcada disminución de la cantidad de células positivas que componen estos centros en los segmentos SIV y SV, no así viéndose afectado el tamaño de este en relación con el área transversal de la médula.

Asta ventral. A diferencia de la región dorsal, la ventral se caracteriza por una marcación mucho menor y discreta, observándose 4 tipos celulares diferentes que en su mayoría fueron encontrados aislados. Especialmente en el segmento SIII han sido observadas en posición ventromedial, entre el canal endimario y los axones de las células de Mauthner, células NADPHd+, de soma redondeado, tamaño intermedio (12 μm) y prolongaciones delgadas (Figura 16a).

Células de gran tamaño (15 μm), soma alargado y prolongación densamente teñida (2 μm) fueron encontradas en una posición similar en los segmentos SIV y SV (Figura 16 a y b). Dichas prolongaciones parecen bifurcarse cerca del cuerpo neuronal y continuar ipsilateralmente hacia regiones más ventrales del segmento. Cualitativamente se ha visto una mayor representación en el segmento SV con respecto al SIV en ambos sexos. De igual forma la presencia de estas células parece ser mayor el SIV de machos que en el de hembras.

Situadas ventrolateral se encontraron células de dimensión similar a las anteriores, pero con somas ahusados. Estas se encuentran en el segmento SIV, particularmente de machos y presentan largos y densos procesos diagonales (Figura 16c).

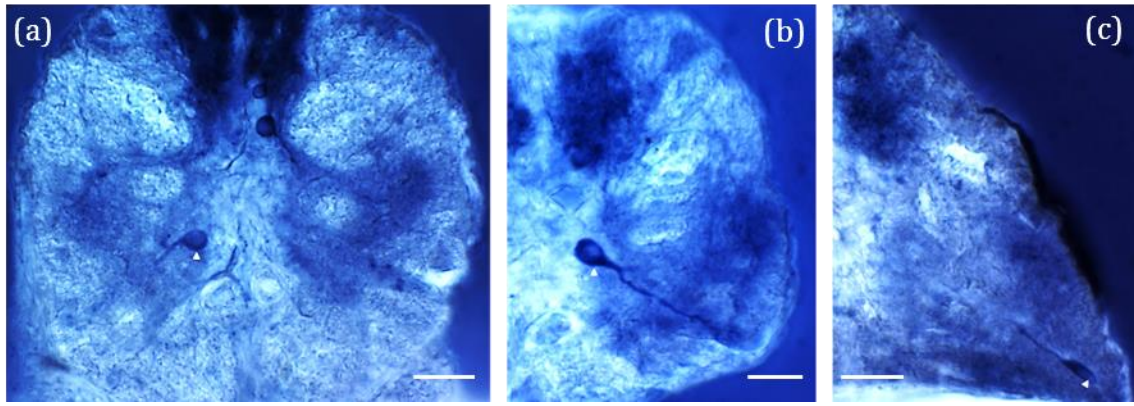


Figura 16. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales de la médula espinal teñidas para detectar la presencia de células con actividad NADPHd+ correspondiente a los segmentos (a) SIII ♀, (b) SV ♂, (c) SV ♀. Se destacan con puntas de flechas las células NADPH+ descritas en posición ventral para los segmentos V y IV. Barras de calibración (a): 40 μ m, (b): 35 μ m, (c): 30 μ m.

Dentro de la sustancia blanca en posición ventral al canal endimario, sobre la comisura accesoria se pudo observar un tipo celular particular, de soma redondeado, tamaño intermedio (9 μ m) y prolongaciones peculiares (Figura 17). Según lo observado, estas prolongaciones contactan al epéndimo en distintos niveles y se caracterizan por ser sumamente delgadas y presentar varicosidades (correspondientes a los sitios de sinapsis). Estas células o sus prolongaciones han sido observadas en hembras, donde se encuentran en todos los segmentos, pero también se pueden observar en menor medida en los segmentos SI, SII y SIII de machos.

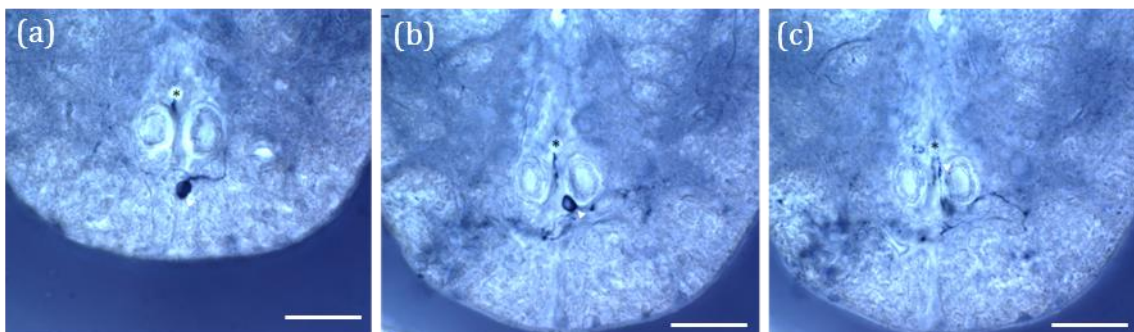


Figura 17. Imágenes de microscopio fotónico de una sección transversal de la médula espinal correspondiente a al segmento SIII ♀ en diferentes planos focales. Se destaca con punta de flecha las células marcadas con actividad NADPHd+ con prolongaciones que contactan el canal central. Se indica con (*) el canal central. Barra de calibración: 40 μ m

Región endimaria. Únicamente se encontraron células NADPH positivas en el segmento SI de hembras, con una morfología clásica de célula endimaria, una única proyección larga, delgada y dorsal (Figura 18).

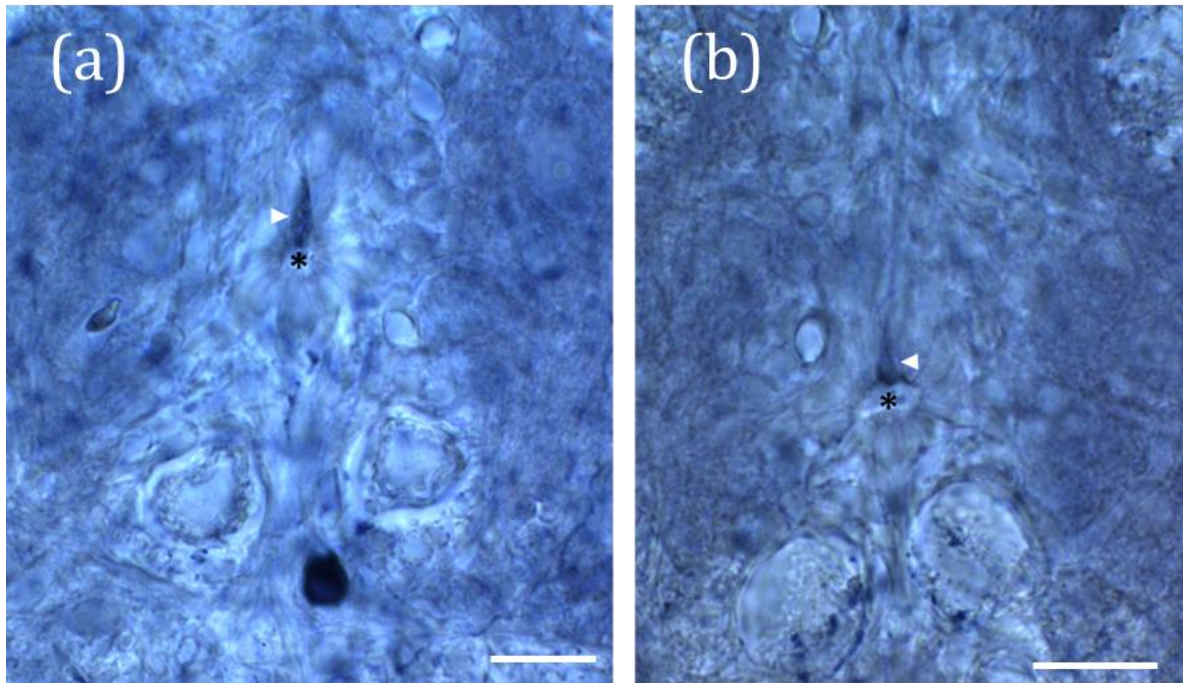


Figura 18. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales de la médula espinal correspondiente a al segmento SI ♀. Se destaca con punta de flecha las células marcadas con actividad NADPHd+ el canal central. Se indica con (*) el canal central. Barra de calibración: 20 μ m

Generalidades. Independientemente del sexo, segmento y posición dentro de la médula, fueron encontradas células marcadas en asociación o estrecha cercanía a los vasos sanguíneos. En dichas regiones se observaron células de somas redondeado o caliciforme, sobre todo de tamaño intermedio y pequeño entre 9 y 12 μ m (Figura 19).

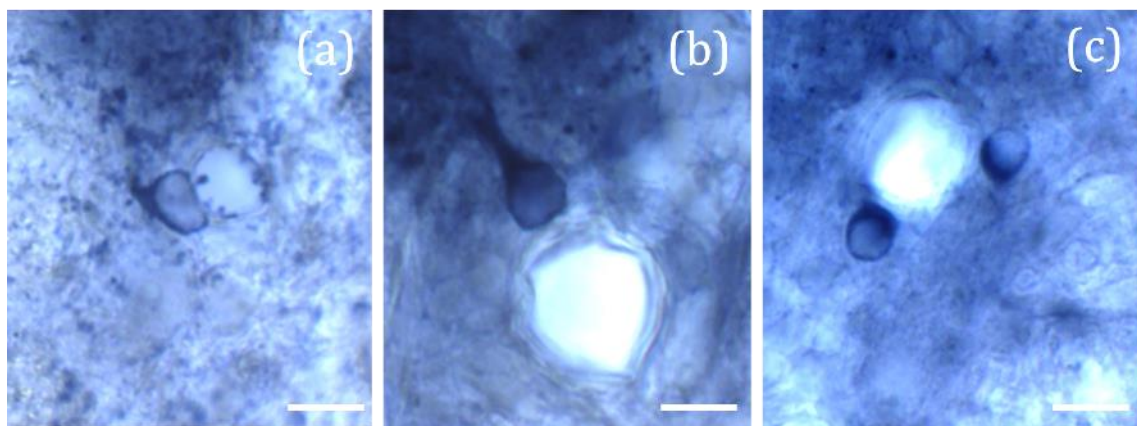


Figura 19. Imágenes de microscopio fotónico de secciones transversales de la médula espinal correspondiente a al segmento (a): SI ♂. (b): SIII ♂, (b): SV ♀. Se observan células NADPHd+ asociadas a vasos sanguíneos. Se destaca la presencia de estas en distintos segmentos para ambos sexos. Barra de calibración: 10 μ m.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS






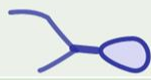


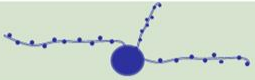



Morfotipo celular	Clasificación	Segmento	Ubicación	Tamaño del soma	Tipo de prolongaciones
	Unipolar	Todos	Dorsal	8 μm ♀ 10 μm ♂	Delgadas
	Bipolar	Todos	Dorsal	16-18 μm	Delgadas
	Bipolar	Todos	Dorsal	16-18 μm	Delgadas
	Bipolar	SI; SII (♂ > ♀)	Dorsal	15 μm ♀ 18 μm ♂	Gruesas (2-3 μm)
	Unipolar	SII	Dorsal	13 μm ♀ 15 μm ♂	Delgadas
	Pseudo-unipolar	SIII	Ventro-lateral	12 μm	Gruesas
	Unipolar	SIV (♂ > ♀)	Ventral	16 μm	Gruesas
	Pseudo-unipolar	SVI;SV	Ventro-lateral	15 μm	Gruesas (2 μm)
	Multipolar	♀ SI-SV ♂ SI-SII	Ventral	9 μm	Delgadas con ensanchamientos
	Ependimaria	♀ SI	Epéndimo	9 - 10 μm	Delgadas
	Unipolar	Todos	Asociadas a vasos	9-12 μm	Delgadas
	Unipolar	Todos	Asociadas a vasos	9-12 μm	Delgadas

Figura 20. Resumen de los resultados encontrados para el análisis de la distribución y las características morfológicas de las células NADPHd+

DISCUSIÓN

Este estudio pone en manifiesto la amplia distribución de las células NADPHd+ a lo largo de la médula espinal de *A. charrua*. A partir de las observaciones realizadas, se discuten las características y localización de estas células de forma comparativa con las observaciones reportadas en otros peces y distintos grupos de vertebrados (Schmidt et al., 1992). También se mencionan a continuación las posibles funciones fisiológicas asociadas a estas poblaciones celulares en esta especie, además de discutir su distribución de forma comparativa entre machos y hembras.

Al analizar los patrones de distribución en machos y hembras se observan interesantes diferencias en cuanto al número y disposición de las células NADPHd+ en los distintos segmentos. Entre las diferencias reportadas se destaca para el segmento SIV, así como para el SV una mayor representación de las células descritas en posición ventral (ver Figura 16), en machos. Por otra parte, otro grupo que expresó diferencias en este aspecto son las células que contactan al canal endimario, observándose en hembras en mayor proporción (Figura 17). Además, la distribución en la médula espinal de este grupo fue también diferencial, encontrándose en todos los segmentos de las hembras, mientras que en machos solo han sido vistos en los segmentos centrales (SII, SIII, SIV). Es importante destacar que estas conclusiones parten de la observación, ya que no fueron realizadas aproximaciones cuantitativas.

Comparación con otros teleósteos

En relación con lo reportado en otras especies de teleósteos existen algunas características conservadas en cuanto a distribución y morfología, permitiendo así hipotetizar sobre una posible analogía funcional.

Se destaca entre las especies de peces más utilizadas en ensayos similares a *Carassius auratus* (Brüning et al., 1995). En base a trabajos previos en esta especie se pueden destacar varios aspectos conservados con *A. charrua*, incluyendo la disposición espacial general, así como ciertas características morfológicas de las células positivas. En cuanto a la primera condición, la distribución en el plano transversal en *Carassius auratus* se vio asociada sobre todo al asta dorsal, próximas a la línea media. De igual forma que en *A. charrua*, estas células son de dimensión pequeña (10µm) y soma principalmente redondeado (Figura 14a).

En relación con el segundo carácter se han visto al menos dos poblaciones celulares de características similares. Brüning et al., (1995) describe un grupo de posición ventral dentro del asta dorsal, de fuerte coloración y grandes dimensiones en comparación al resto de las células marcadas que recuerdan a las encontradas en los márgenes ventrales de los centros neuropílicos descritos para *A. charrua* (Figura 15).

Por otra parte, células son de soma redondeado, tamaño intermedio (12 µm) y prolongaciones delgadas se han visto conservadas en una posición ventro-lateral sobre todo en segmentos anteriores de la médula espinal de *Carassius auratus* (Brüning et al., 1995), características similares a las descritas para el segmento SIII, de *A. charrua* (Figura 16a).

A diferencia de lo observado en *A. charrua* y *Carassius auratus*, la localización de las células NADPHd+ en ejemplares de *Tinca tinca* se encontró sobre todo asociada al asta ventral y en menor medida a regiones laterales del asta dorsal (Arévalo et al., 1995). Las células detectadas en la región ventral se describen intensamente teñidas, grandes y piriformes, con hasta tres dendritas identificables. Entre ellas coexiste otra población de neuronas más pequeñas, somas redondeados o alargados y con hasta tres prolongaciones.

En la misma línea de antecedentes, en estudios realizados para la detección por inmunohistoquímica de Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en distintas etapas del desarrollo post eclosión de *Labeo rohita* (Biswas et al., 2015), se describe una población de células marcadas en el núcleo motor en la región ventral que se mantiene en todos los estadios analizados. Los autores asocian dicha marcación con un posible rol del NO en el control motor durante el desarrollo temprano de esta especie. No se reportan antecedentes sobre la distribución en adultos, por lo que surge como posibilidad la modificación de los circuitos nitrinergicos de los ejemplares en desarrollo y la forma adulta, modulando en cada estadio funciones distintas.

Comparación con otros vertebrados

El análisis de la distribución de la enzima NADPH diaforasa en diversas estructuras del sistema nervioso central ha sido ampliamente extendido a distintas especies de vertebrados incluyendo anfibios anuros, reptiles e incluso mamíferos, (Anderson, 1992; Brüning, 1992; Jiang & Terashima, 1996; Muñoz et al., 1996; Valtschanoff, Weinberg, & Rustioni, 1992) siendo en gato y rata las especies donde se concentra la mayor parte de reportes.

Estudios realizados en el anfibio *Pelophylax perezi* (Muñoz et al., 1996) reportan la presencia de una densa región neuropilica positiva en la región dorsal de la médula espinal, más marcada en niveles cervicales. Si bien esta característica se observa también en *A. charrua*, no se ha visto una disminución en ningún nivel en particular, manteniéndose la intensidad constante entre los segmentos. De igual forma se ha visto una organización similar en trabajos realizados en rata por Valtschanoff et al., (1992) en las láminas I y II de la sustancia gris dorsal.

Las características de los procesos celulares de las células NADPHd+ descritos en *A. charrua* (Figura 13), también se observaron en células de la médula espinal ratas, siendo estos, extensos y delgados, mayormente de trayectos rectos y en algunos casos con varicosidades finales. Estos están presentes en todos los segmentos analizados, atravesando en distintas direcciones el plano de segmento.

Las características y distribución de las células marcadas en esta especie se han visto conservadas entre los segmentos, a excepción de ciertos grupos celulares localizadas en la región intermediolateral. Respecto a morfología y dimensión de las células marcadas se describe en ratas una gran diversidad, abarcando grupos monopolares, así como multipolares, de somas variados, asociadas a distintas regiones de la médula espinal. A diferencia de esto, en el modelo utilizado para este estudio se corresponden en su mayoría con células bipolares, unipolares y pseudounipolares de somas redondeados o alargados (Figura 14,15,16) (Valtschanoff, Weinberg, & Rustioni, 1992; Valtschanoff, Weinberg, Rustioni, et al., 1992).

De forma particular, se reportan en niveles cervicales y lumbares ciertas neuronas bipolares, orientadas en paralelo al borde del asta dorsal, cuyas prolongaciones proyectan extensamente en el eje dorsoventral, al igual que las caracterizadas en la descripción de la región dorsal en este trabajo (Figura 14) (Valtschanoff, Weinberg, & Rustioni, 1992; Valtschanoff, Weinberg, Rustioni, et al., 1992).

Asociación funcional

Dentro de la gran diversidad funcional con las que el óxido nítrico se ha visto asociado se encuentra la regulación de los procesos de inflamación y de la respuesta del sistema inmune (Snyder & Bredt, 1992). Es además un importante regulador de la homeostasis vascular y participa como neuromodulador del sistema nervioso debido a su rol como neurotransmisor (Bredt & Snyder, 1992). Particularmente en la médula espinal se ha visto implicado en la mediación de los circuitos nociceptivos, la sensibilización central y la hiperalgesia (Meller et al., 1992; Meller & Gebhart, 1993; Radmilovich et al., 1997).

Entre las primeras propiedades asociadas a este factor altamente difusible se encuentra la modulación del tono vascular (Tuteja et al., 2004), función por lo que fue inicialmente descrito como factor de relajación derivado del endotelio. Es en relación con esta evidencia que se justifica la marca persistente de células positivas encontrada en estrecha relación con los vasos sanguíneos, posiblemente modulando la dinámica vascular según las necesidades funcionales del tejido.

Las células positivas de la región dorsal encontradas en *A. charrua*, psuedounipolares y bipolares han sido además descritas en otras especies. Experimentos de electrofisiología in vivo realizados en tortugas (Russo & Hounsgaard, 1996, 1999) han dado pistas sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas del asta dorsal (Russo & Hounsgaard, 1996) y sus patrones de conectividad. Estos antecedentes revelan que en esta región las células poseen la maquinaria enzimática, así como de las conexiones neurales necesarias para intervención en los procesos de hiperalgesia y la sensibilización. En base a la comparación entre especies y considerando la localización de estas células en la médula espinal y sus características morfológicas, es posible asociar funcionalmente a las células NADPHd+ del asta dorsal con circuitos sensoriales del procesamiento de la información del dolor encontradas en el modelo de estudio.

En cuanto a las posibles funciones de las células NADPHd+ observadas en posición ventro-lateral, la bibliografía es escasa. En este trabajo se describe una población celular marcada positivamente (Figura 21) presente en los segmentos más caudales (SIV y SV) en *A. Charrua* con características similares a las encontradas en *Carassius auratus* por Fetcho y Faber (1988). Estas células han sido descritas como interneuronas excitatorias y se han visto involucradas en la producción del patrón de escape en forma de C iniciado por los axones de las células de Mauthner (Diamond, 1971). Dichas interneuronas poseen un soma ovalado o redondeado, dimensiones de medias a grandes (15 μm) y finas ramificaciones ipsilaterales. En cuanto a su localización, en *C. auratus* se han observado en al menos dos segmentos de la médula espinal interaccionando con las motoneuronas primarias y secundarias en la coordinación del reflejo (Fetcho & Faber, 1988).

A diferencia de lo reportado en *A. charrua*, esta población no expresa actividad NADPHd+ en la médula espinal de *Carassius auratus*, según lo descrito en Brüning et al., (1995). A partir de estos antecedentes se podría discutir acerca de su funcionalidad, aunque para

poder confirmarlo sería necesario plantear como perspectiva ensayos de electrofisiología.

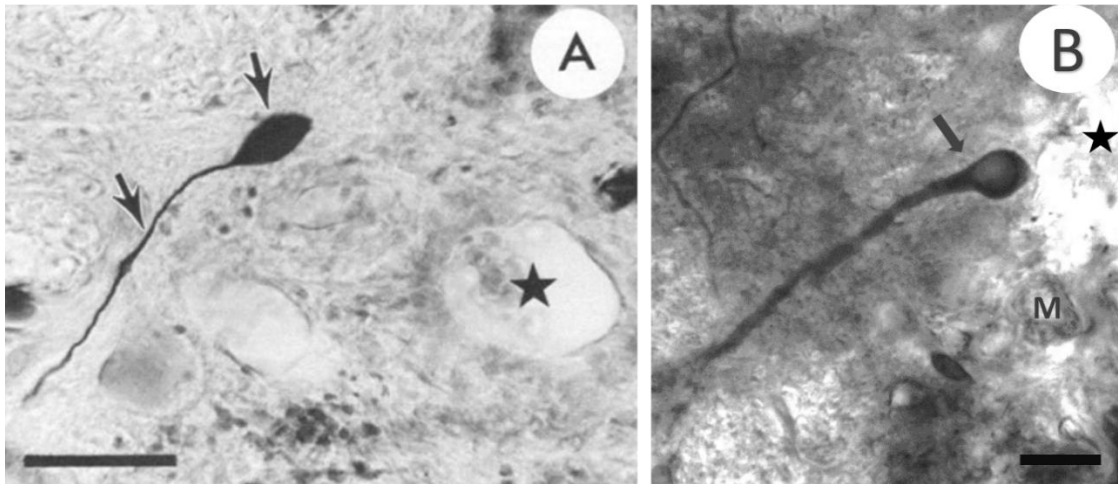


Figura 21. (a) Imagen tomada de Fetcho & Faber, 1988 donde se muestra la morfología de las interneuronas próximas a los axones de las células de Mauthner en *Carassius auratus* teñidas con HRP (ver en Fetcho & Faber, 1988), (b) Imagen de microscopía fotónica de la sección transversal del segmento SIV ♂ aumentada. Se indica con flecha una célula NADPHd+ con las características previamente descritas. Barra de calibración (a): 50 μm (b): 20 μm

Además, otras células de menores dimensiones fueron observadas en posición ventral al canal endimario (Figura 17), sobre las cuales se discutió su variación entre sexos anteriormente. Dichas células son característicamente identificables por poseer largas y delgadas prolongaciones que contactan el epéndimo. Tanto la localización como las características morfológicas de este subtipo celular podrían sugerir un papel relevante sobre la recepción, interpretación y respuesta de los circuitos medulares frente a señales no sinápticas mediadas por el líquido cefalorraquídeo (Vigh & Vigh-Teichmann, 1998).

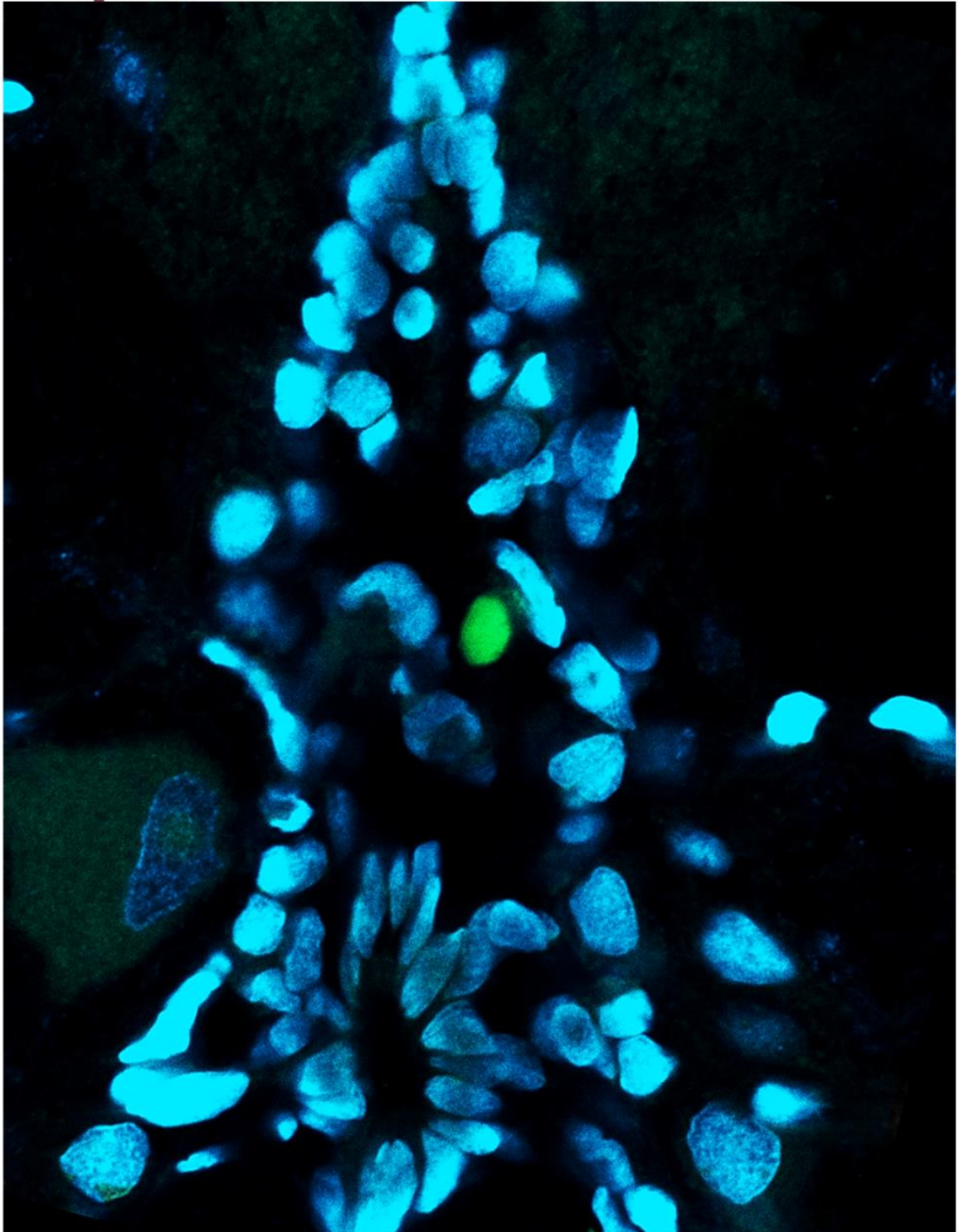
CONCLUSIONES

Como conclusión general asociada a esta comparación es posible especular que el alto grado de conservación de la distribución de las células NADPHd+, sobre todo en la región dorsal estaría sugiriendo un rol esencial del sistema nitrinérgico a lo largo de la evolución, en las funciones más básicas vinculadas relacionadas con el procesamiento de la información sensorial.

Se ha observado además que existen diferencias en cuanto a la distribución y características de las células NADPHd+ entre machos y hembras a lo largo de los distintos niveles.

Análisis de la proliferación celular

CAPÍTULO III



RESULTADOS

Con el fin de describir las características proliferativas de la médula espinal en condiciones fisiológicas se emplearon dos técnicas inmunohistoquímicas para detectar la presencia del marcador de proliferación celular (BrdU), combinadas en ciertos casos con marcadores de estirpe neuronal (HuC) y glial (S-100).

4.1 Localización de los núcleos BrdU+

La observación de las secciones transversales utilizando ambas técnicas reveló una sostenida proliferación en todos los segmentos analizados, notándose entre ellos algunas diferencias referidas a la morfología nuclear, la intensidad de marcación y la localización dentro del segmento.

Todos los segmentos presentaron células marcadas tanto en la sustancia gris como en la blanca, observándose en la segunda una menor representación.

De forma general se hallaron conservados en todos los segmentos núcleos BrdU positivos (BrdU+) asociados al canal central, así como en estrecha relación con los vasos sanguíneos, sobre todo a partir del segmento SII. Otras células marcadas dispuestas en el perímetro medular fueron también observadas repetidas veces compartiendo características morfológicas en los distintos niveles. Además de estas, se han observado células BrdU+ asociadas a procesos laterales que nacen en la sustancia gris e invaden la blanca tanto en la región dorsal como en la ventral.

El segmento SI mostró un gran despliegue de células proliferantes de diversas morfologías. En especial se pudieron identificar células marcadas asociadas al canal central, contiguas a los axones de las células de Mauthner y dispuestas en la periferia medular invadiendo la sustancia blanca. Particularmente este segmento expresa una mayor representación en regiones ventrales, y ventro-laterales en comparación a otros. Se pudo observar que las células que ocupan dichas posiciones se encuentran sobre todo aisladas y dispersas. En este nivel se encuentran comúnmente células BrdU+ en la zona medial del asta dorsal, región que estaría correspondiendo al núcleo Comisural de Cajal.

A diferencia de lo observado en el segmento anterior, la proporción de núcleos BrdU+ observada en el segmento SII fue visiblemente menor. Estas células se encontraron en su mayoría ocupando una posición medial dentro del asta dorso-lateral y en reiteradas oportunidades se encontraron dispuestas en grupos. La proporción de células positivas encontradas en este segmento fue menor, en comparación a la del segmento SI.

La distribución en el segmento SIII comparte características con el segmento SI en cuanto a la disposición ventral. Además, se observa señal positiva en regiones dorsales, acompañando la línea media, en general de forma individual. Por otra parte, en este

segmento se reconocen grandes vasos que muchas veces se encuentran asociados a células positivas en su pared.

El segmento SIV mostró un perfil similar al segmento SII, detectándose células BrdU+ en la zona medial del asta dorsal, así como adyacentes al canal endimario. Se observa una disminución de señal en comparación con el segmento anterior, sobre todo en la región ventral.

En cuanto al segmento SV, se registra una sostenida aparición de células marcadas. Presenta un perfil similar al segmento SIII, su distribución se asocia sobre todo a zonas dorso-laterales. Se han visto núcleos positivos en la periferia, asociados a vasos sanguíneos, al epéndimo, además de en regiones distales del asta ventral, solas o en grupos.

Cualitativamente se ha visto una mayor proliferación en los segmentos SI, SIII y SV con respecto al resto, sobre todo en el segmento **SIII**. La distribución de los núcleos BrdU positivos revelados mediante HRP descrita anteriormente se encuentran representada en forma esquemática en la Figura 22.

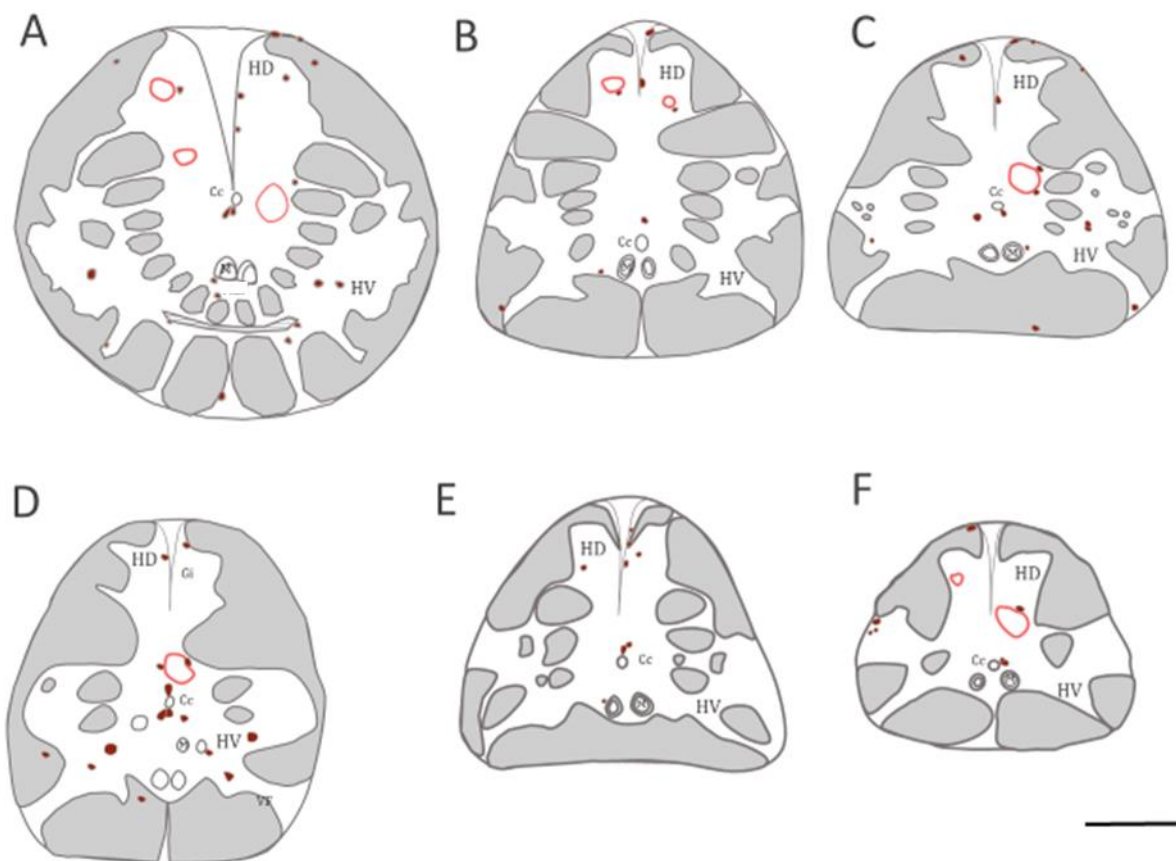


Figura 22. Representación esquemática de los resultados de la distribución de los núcleos BrdU+ (marrón) correspondiente a los segmentos I (a), II (b), III (c), IV (d) y V (e) de hembra y III de macho (f). Se indica en gris la distribución de la sustancia blanca, en blanco la sustancia gris. Se

esquematizan en rojo los vasos sanguíneos. HD- asta dorsal, HV- asta ventral, Cc- Canal central, M- axones de las células de Mauthner.

4.2 Descripción morfológica de las células BrdU+

En cuanto a la morfología propia de las células proliferantes se pudieron asociar ciertos perfiles de somas a posiciones concretas en la médula espinal. En su mayoría los núcleos que contactan con el epéndimo son fusiformes y en general presentan una marca más tenue, mientras que los que se encuentran cercanos al mismo, pero sin contacto tienden a ser redondeados y poseer una marca más intensa (Figura 23 a y b). Estas últimas presentan somas de entre 7 y 10 μm aproximadamente, y las que las que contactan con el epéndimo alrededor de 11 μm .

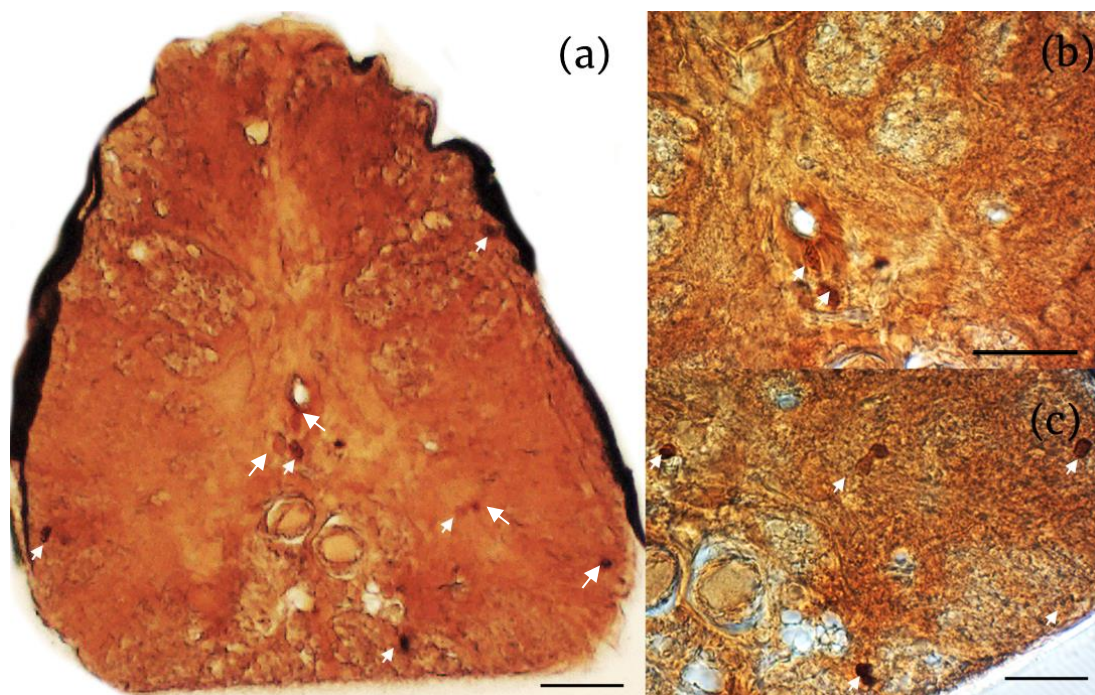


Figura 23. Sección transversal de médula espinal con BrdU en marrón revelado con HRP (flechas blancas) (a) visión panorámica del segmento SIII♀, destacando los núcleos BrdU+ dispersos en el canal central y próximos a él, en la periferia y en la región ventral. (b) Visión aumentada de la sección (a) donde se permite apreciar mejor la morfología y asociación de los núcleos. Barra de calibración: (a): 30 μm , (b): 20 μm .

En el caso de las células BrdU+ observadas sobre la línea media podemos distinguir dos morfologías diferentes, redondeadas o alargadas, ambas marcadas con igual intensidad (Figura 24). Las primeras miden entre 6 y 8 μm , mientras que las segundas tienden a ser levemente mayores (9 a 12 μm).

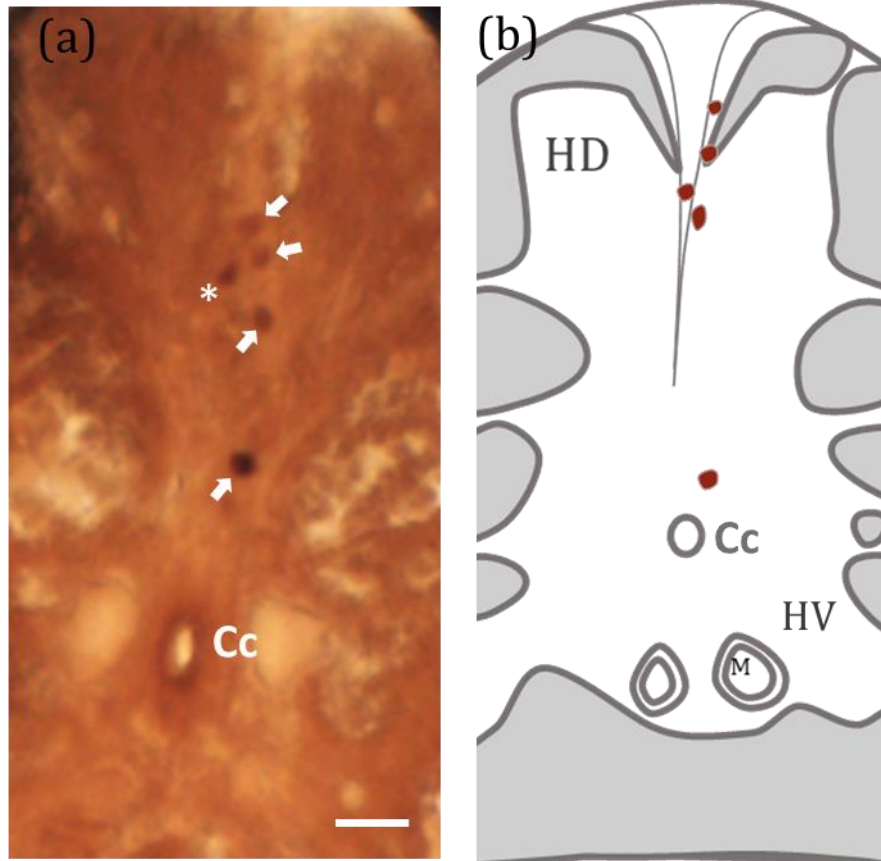


Figura 24. Sección transversal de médula espinal con BrdU en marrón revelado con HRP (flechas blancas) (a) visión aumentada del segmento (IV♀) destacando los núcleos BrdU+ en la zona medial del asta dorsal. (b) Esquema representativo de la distribución de núcleos BrdU+ observados en (a). Barra de calibración: 20 μ m.

Los núcleos positivos asociados a las proyecciones laterales mostraron características similares, siendo estos redondeados de entre 8 y 10 μ m (Figura 25). Los asociados a los vasos sanguíneos presentan una morfología similar pero tienden a ser apenas más grandes (Figura 26)

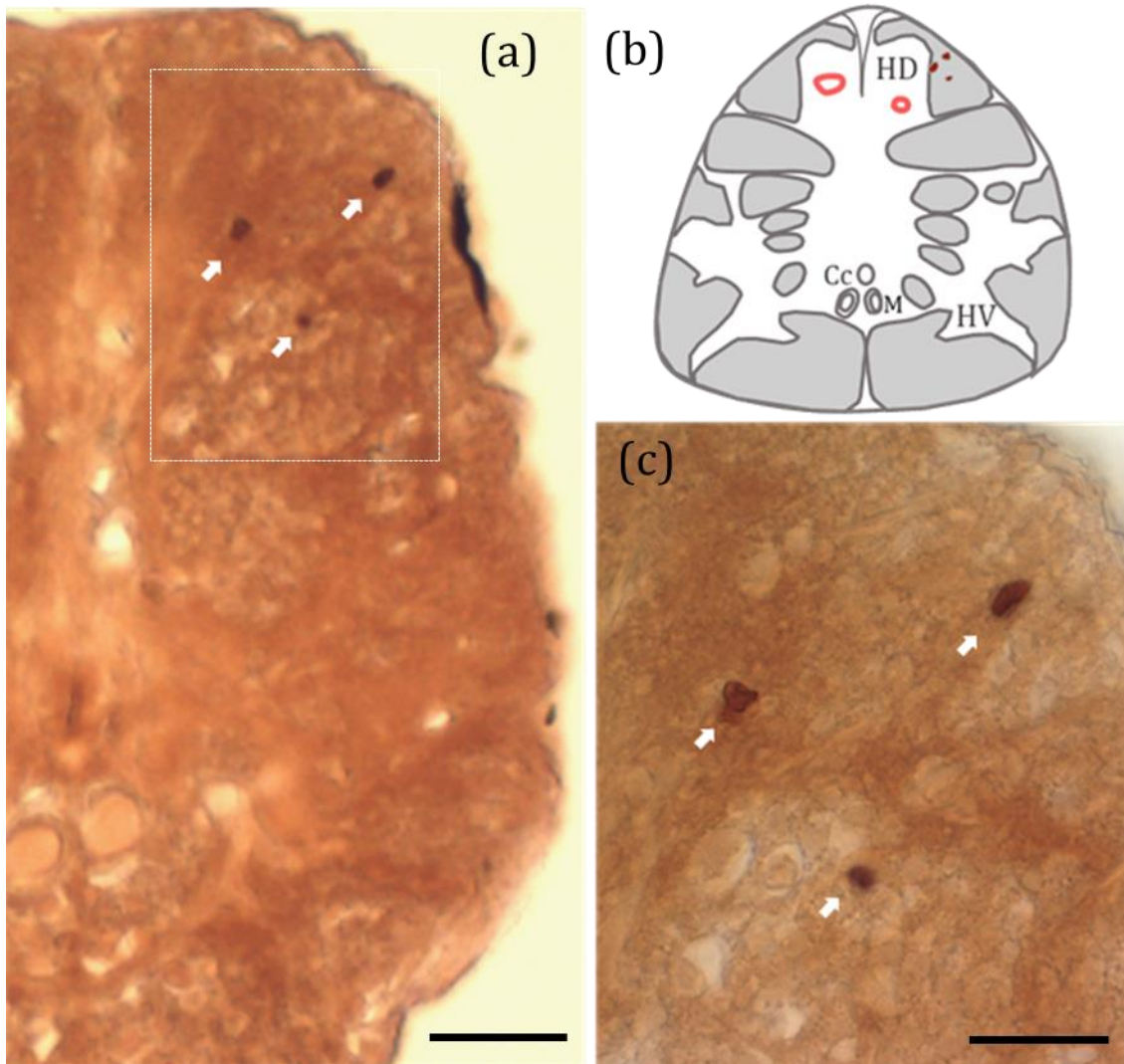


Figura 25. Sección transversal de médula espinal con BrdU en marrón revelado con HRP (flechas blancas). (a) Visión panorámica del segmento SII♀ destacando los núcleos BrdU+ asociados a las proyecciones laterales que invaden la sustancia blanca. (b) Esquema representativo de la distribución de núcleos BrdU+ observados en la sección aumentada delimitada con línea punteada en (a). (c) visión aumentada de la sección aumentada delimitada con línea punteada del corte observado en (a). Barra de calibración (a): 60 μm , (c): 30 μm . Cc- Canal central, M- axones de las células de Mauthner, HD- asta dorsal, HV- asta ventral. ♀

Por otra parte, las células marcadas en la periferia medular poseen somas aplanados y más pequeños (7 μm). En cuanto a las células que se localizan en las astas ventrales se observa variación en cuanto a tamaño, forma e intensidad de marca. Se han observado tanto en forma individual como en agrupaciones de 2 o 3 células (Figura 23).

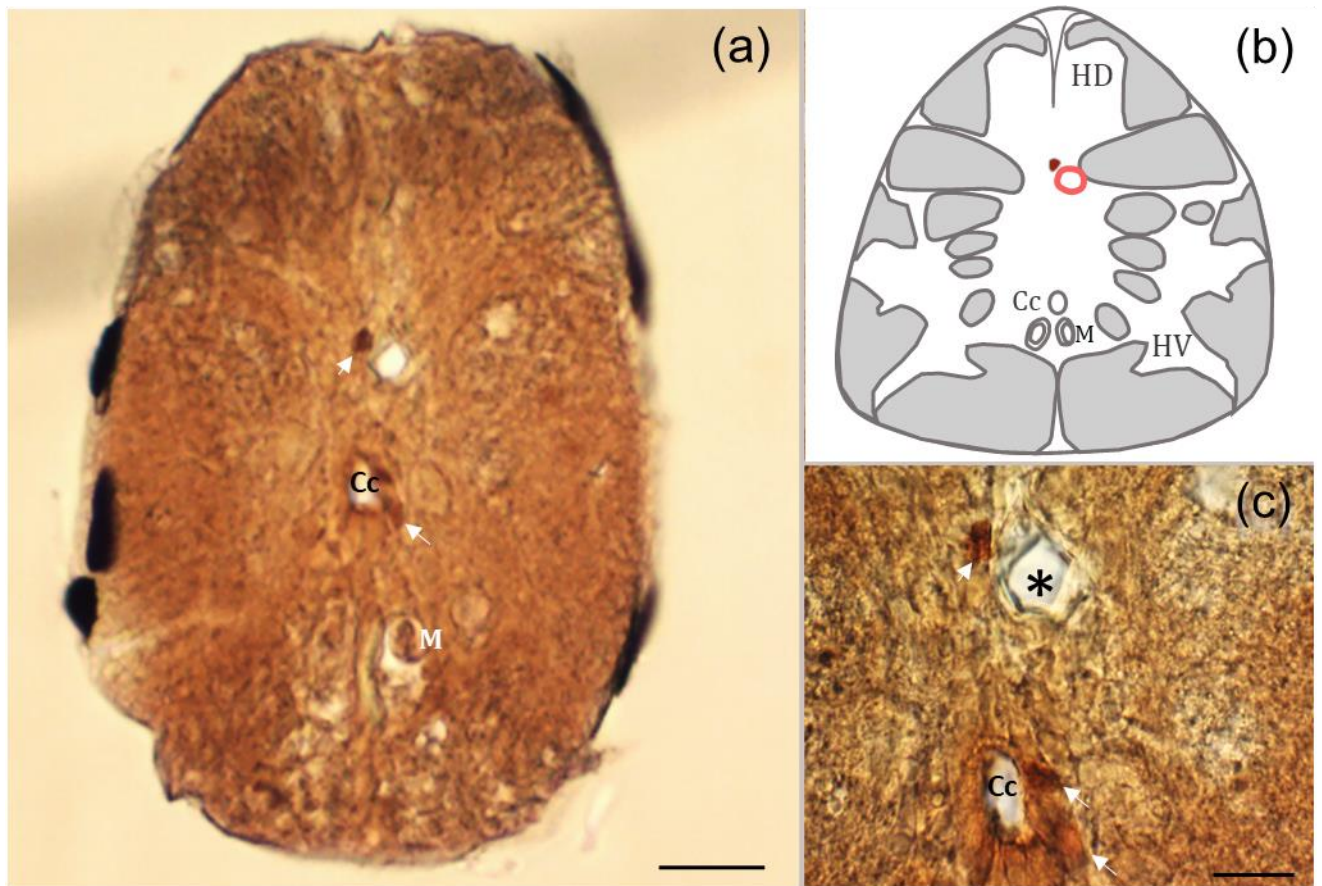


Figura 26. Sección transversal de médula espinal con BrdU en marrón revelado con HRP (flechas blancas). (a) visión panorámica del segmento (SII♀) destacando los núcleos BrdU+ asociados a un vaso sanguíneo (*). (b) Esquema representativo de la distribución de núcleos BrdU+ observados en (a). (c) visión aumentada del corte observado en (a). Barra de calibración (a): 30 μ m, (c): 20 μ m. Cc- Canal central, HD- Asta dorsal, HV- Asta ventral, M- axones de las células de Mauthner.

4.3 Identificación de la identidad de las células BrdU+ utilizando marcadores de estirpe celular

La combinación del revelado por inmunofluorescencia indirecta del marcador de proliferación (BrdU) con marcadores de proliferación celular permitió detectar la presencia de neurogénesis y gliogénesis en la médula espinal de *A. charrua* (Figura 27). La colocación de BrdU con el HuC indica que algunas de las células positivas ubicadas dorsalmente sobre la línea media son neuronas (Figura 27). Así mismo se ha observado colocación en células cercanas al canal central y en menor proporción en otras de la región ventral (Figura 28). Se encontraron células endimarias BrdU+ co-localizando con HuC en algunos casos (Figura 27), en otros solo se registró marca verde.

Por otra parte, en conjunción con el marcado por S-100 se puede observar varias células gliales dispersas en la médula espinal. Particularmente se observan rodeadas de marca

S-100 ciertas células endimarias (Figura 27b), algunas de las asociadas con los vasos sanguíneos (Figura 27b), y las células aplanadas de la periferia. También se han visto células BrdU+ con ausencia de marca HuC dispuestas en las proyecciones que invaden la sustancia blanca.

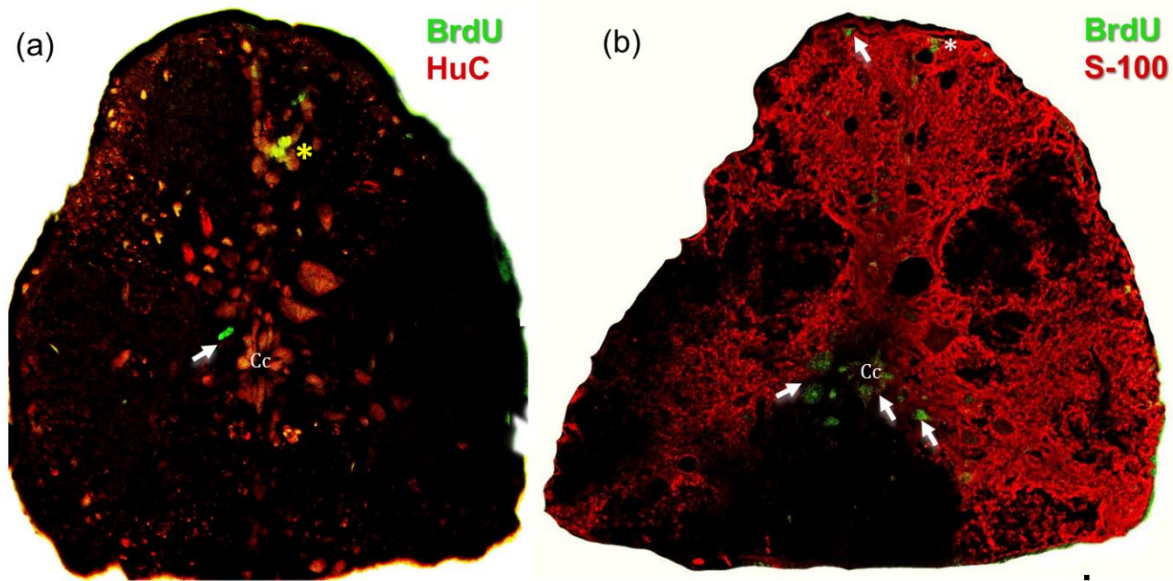


Figura 27. Sección transversal de médula espinal de *A. charrua* en vista panorámica (a) segmento (SV ♂) con BrdU en verde, HuC en rojo y la colocalización de ambas señales en amarillo (* asterisco amarillo). Se señala con flecha blanca un núcleo positivo para BrdU y negativo para HuC. (b) Segmento (SIII ♀) con BrdU en verde combinado con S-100 en rojo. Se observan los núcleos BrdU+ con flechas blancas en el canal central y próximo al mismo, en la periferia del hasta dorsal y asociado a un vaso (señalado con asterisco blanco). Cc - canal central. Barra de calibración: 60 μ m.

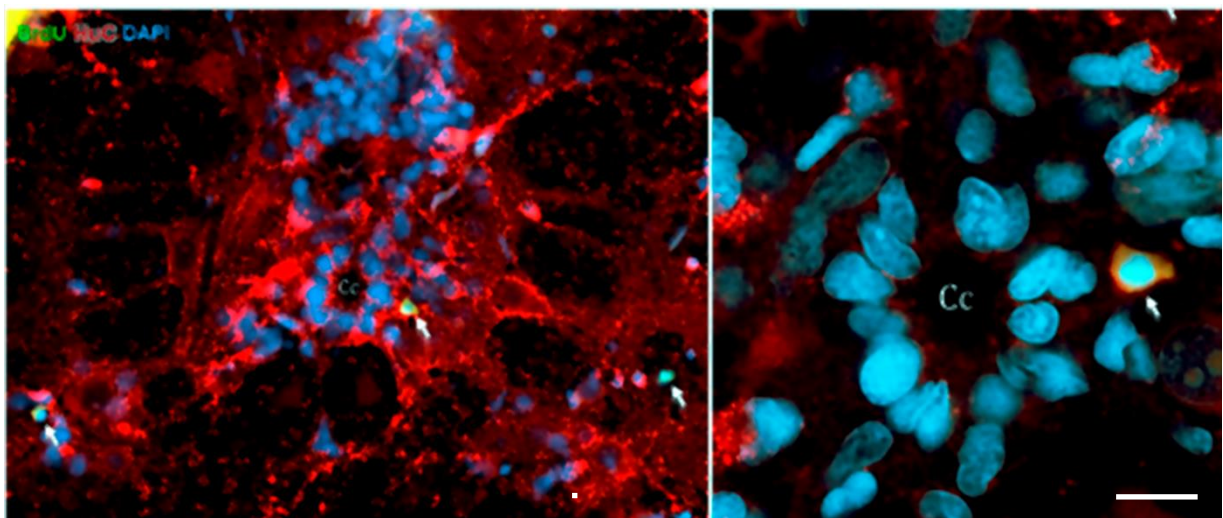


Figura 28. Imagen confocal de la sección transversal de médula espinal de *A. charrua* correspondiente al (a) segmento (SI ♀) con las células BrdU+ en verde, HuC+ en rojo y la colocalización de ambas señales en amarillo (flecha blanca), (b) visión aumentada de (a). Cc - canal central. Barra de calibración: (a): 50 μ m, (b): 10 μ m.

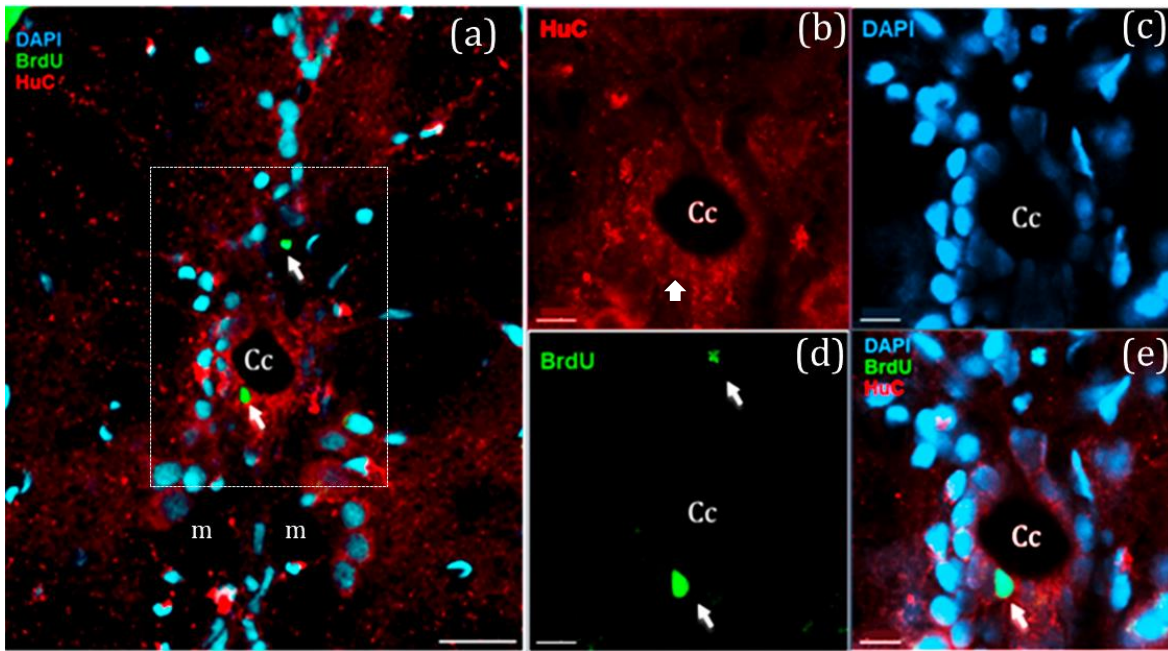


Figura 29. Imagen confocal de la sección transversal del segmento **SIV♂** de médula espinal. Doble marcado de **HuC- BrdU** en el cc: (a) vista panorámica del canal central con las células **BrdU+** en verde, **HuC+** en rojo y los núcleos teñidos con **DAPI** en azul. Visión aumentada de la sección delimitada en línea punteada de (a) marcando en (b) las neuronas con HuC, en (c) los núcleos con DAPI, en (d) las células proliferativas con BrdU y (e): combinando todos los marcadores anteriormente mencionados. Se señalan con flechas blancas las células BrdU+. Cc - canal central, M: axones de las células de Mauthner. Barra de calibración: (a): 50 μm , (b,c,d,e): 10 μm .

DISCUSIÓN

Gran parte de los antecedentes reportados en la médula espinal en los cuales se analizan los procesos proliferativos se enmarcan en condiciones de lesión (Yamamoto et al., 2001). Considerando que los mecanismos celulares y pistas moleculares activos en condiciones fisiológicas no son los iguales a las que se llevan a cabo frente a una lesión, es que en este estudio se plantea analizar la actividad proliferativa intrínseca de la médula espinal en *A. charrua*.

En este capítulo se pone en manifiesto la presencia de proliferación celular y neurogénesis en toda la médula espinal de *A. charrua* mediante el empleo del marcador de proliferación BrdU. Se destaca que ambos métodos de revelado utilizados mostraron resultados muy similares en todos los niveles analizados.

Entre las generalidades observadas en todos los segmentos se encuentra la presencia de células BrdU positivamente marcadas en el canal central y abarcando la región correspondiente a la gelatinosa central (Stilling & Wallach, 1842), asociadas a vasos sanguíneos y a proyecciones laterales de la sustancia gris que invaden la sustancia blanca. En línea con estos resultados, otros autores han detectado también la presencia de células BrdU+ en el canal central o próximo al mismo en trabajos previos realizados en otros modelos de vertebrados, entre ellos *Danio rerio* (Coira, 2015; Grandel et al., 2006) y *Trachemys d'orbigny* (A. Fernández et al., 2002; Russo et al., 2008).

Las células que rodean al canal central representan un remanente del del tubo neural y mantienen ciertas propiedades moleculares (Becker & Becker, 2015; Lacroix et al., 2014), fundamentales durante la embriogénesis del sistema nervioso, así como en los nichos neurogénicos bien caracterizados del encéfalo (Hugnot y Franzen, 2011). Además de esto, la presencia de células en división próximas a la luz del canal central recuerda a la dinámica de desarrollo en el tubo neural.

Particularmente Fernández et al., (2002) demuestran que las enormes capacidades regenerativas observadas en *Trachemys d'orbigny*, están dadas gracias a la gran capacidad proliferativa de las células que rodean el canal central, dando como resultado nuevas neuronas y glías.

Considerando estos antecedentes se podría proponer a esta región como un nicho neurogénico en la especie de interés. Sería necesario para confirmar esta hipótesis plantear como perspectiva el estudio de la dinámica proliferativa en experimentos de veinticuatro horas, con el fin de descartar la posibilidad de migración dentro del tejido.

Tomando en cuenta como uno de los factores que se postulan relacionados con el control funcional de los nichos neurogénicos ciertos componentes regulatorios de los procesos angiogénicos, no parece extraño observar la presencia de células BrdU+ asociadas a los vasos sanguíneos.

La presencia de células BrdU+ asociadas a los vasos sanguíneos se puede entender considerando que dentro de los factores que se postulan relacionados con el control funcional de los nichos neurogénicos se encuentran ciertos componentes regulatorios de los procesos angiogénicos (Palmer et al., 2000).

Trabajos previos desarrollados en el hipocampo adulto de ratas muestran una coordinación entre los eventos de proliferación de los precursores neurales y angioblastos. Se ha visto que ambos proliferan en agrupaciones similares a clusters vinculados a su vez a la microvasculatura de la región. La liberación de factores solubles como el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por parte de las células endoteliales estimulan la auto renovación de las células madre neurales y la proliferación de las células del cluster que expresan el receptor de VEGF, Flk1. Esto estaría implicando que la proliferación neural tendría una relación de codependencia o al menos compartiría señalización con los precursores endoteliales. Estas evidencias dejan entrever la relación que existe entre el estado general del organismo, así como los estímulos a los que este está sujeto con la capacidad neurogénica del sistema (Palmer et al., 2000; Taupin, 2006). En línea con lo encontrado por Grandel et al., (2006) en *D. rerio* en este trabajo se detectó la presencia de células BrdU+ en la zona medial del asta dorsal, región que estaría correspondiendo al núcleo comisural de Cajal. Combinando la señal del BrdU con marcadores de estirpe celular se pudo además identificar al menos a algunas de dichas células como neuronas. A diferencia de lo observado en *A. charrua*, en ese estudio no se reporta la presencia de células nuevas en regiones ventrales de la médula espinal de *D. rerio*. Esta diferencia podría estar asociada al diseño experimental debido a que, a diferencia de lo planteado en este trabajo (siete días de sobrevida post inyección) Grandel y su grupo propusieron experimentos más cortos con sobrevida de veinticuatro horas post inyección. Aunque se realizó un análisis cuantitativo de la proliferación celular encontrada, pudo observarse que los niveles con mayor presencia de células positivas corresponden a los segmentos **SI**, **SIII** y **SV**. Dichos segmentos están particularmente asociados a la posición de las aletas pectorales, dorsal y caudal respectivamente. Es posible que exista una necesidad diferencial en la capacidad proliferativa dada por la movilidad de las aletas. Se debe considerar que los peces utilizados en este ensayo fueron mantenidos en peceras reproductoras con individuos del sexo opuesto, expuestos por lo tanto a situación de cortejo y reproducción, además de que dichos eventos implican un gran despliegue comportamental en la especie de interés.

La respuesta neurogénica suele variar frente a distintos estímulos y condiciones ambientales (Berrosteguieta, 2020; Berrosteguieta et al., 2022; Herrera Astorga, 2022) debido a que su fino control se encuentra regulado a un nivel genético y otro epigenético. Dentro de los diversos factores epigenéticos que modulan la neurogénesis se encuentran la actividad motora (van Praag et al., 1999, 2000), entre otros (Mirescu & Gould, 2006). La estrecha interacción entre ambos permite garantizar el nacimiento e inserción funcional de las nuevas neuronas, preservando a su vez la viabilidad de los circuitos.

Son escasos los antecedentes donde se estudia la proliferación celular en la médula espinal en otras especies de vertebrados. A partir de trabajos en ratas adultas Horner et

al., (2000) observaron una distribución sobre todo periférica dentro de la sustancia blanca, y más bien escasa presencia de células proliferativas en regiones centrales o asociadas a la gelatinosa central. Comparando el diseño experimental con el de este trabajo se debe considerar que la ventana de sobrevivencia fue mayor, así como la administración de BrdU, ya que para este estudio se utilizó una única dosis. Se debe destacar también la amplia representación de la médula que fue considerada por Horner et al., (2000), al igual que en este ensayo.

El abordaje planteado para este análisis no permitió observar diferencias en la proliferación entre machos y hembras. Sin embargo, existen antecedentes que proponen a las hormonas gonadales y su fluctuación en el ciclo anual como un factor modulador de la neurogénesis que podría generar dimorfismos en este aspecto.

No obstante, sería de gran interés estudiar la neurogénesis postnatal con un abordaje dimórfico. Entre los escasos antecedentes encontrados para ese tópico se encuentran los trabajos en el sistema del bulbo olfatorio de la zona subventricular (V-SVZ-OB) de roedores donde se ha visto una fuerte modulación por la acción de las hormonas sexuales (Díaz et al., 2009; Farinetti et al., 2015). En este sistema la neurogénesis de nuevas interneuronas implica un relevo importante para los circuitos olfativos, esenciales en diversos despliegues comportamentales que están fuertemente afectados por el componente dimórfico de las hormonas sexuales. Se destacan también los trabajos realizados en aves cantoras por parte de Nottebohm et al. (1987).

Por tal motivo, partir de los antecedentes y la biología reproductiva de la especie de interés *A. charrua* se propone realizar un análisis cuantitativo más profundo a futuro con el fin de detectar posibles diferencias entre sexos, utilizando como referencia las observaciones morfológicas y anatómicas previamente descritas en esta tesis.

CONCLUSIONES

Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación demuestran la presencia de más de 20 nichos neurogénicos en el encéfalo adulto de distintas especies del género *Austrolebias* (Cypridontiformes, Rivulidae), confirmando su enorme potencial plástico. En el presente estudio se comprueba que este carácter no se limita únicamente al encéfalo, sino que se mantiene a lo largo de toda la médula espinal para ambos sexos.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Este estudio ofrece un primer acercamiento a la caracterización morfológica de la médula espinal de *A. charrua*, siendo un aporte original para futuros estudios comparativos.
2. Se desarrolló un patrón de medición para el análisis de la morfología, circularidad para comparar entre sexos en 5 niveles seleccionados de la médula espinal. Este representa una herramienta para comparar en otros modelos y situaciones experimentales.
3. La médula espinal de *A. charrua* presenta dimorfismos estructurales en cuanto a área y contorno en el segmento SIII. Debido a su posición podrían estar asociados a las características distintivas del desarrollo de las aletas y el desempeño de estas durante el cortejo. Además, se observan diferencias en cuanto al tamaño de los segmentos SII, SIV y SV, así como en la citoarquitectura de los mismos a distintos niveles.
4. La descripción de la distribución de las células NADPHd+ en la médula espinal permitió comparar con otras especies, denotando características conservadas entre distintos clados de vertebrados y sugiriendo un rol central del sistema nitrinérgico en la evolución.
5. Se observan diferencias asociadas a la distribución y morfología de las células NADPHd+ entre machos y hembras en los distintos segmentos.
6. Se observó proliferación celular y neurogénesis en todos los niveles de la médula espinal en ambos sexos. En la especie de interés este estudio representa el primer reporte sobre la presencia y distribución de neurogénesis postnatal en la médula espinal intacta de individuos adultos.
7. La complementación de los tres abordajes propuestos en esta tesis contribuye a la caracterización general de este modelo biológico, poniendo en evidencia diferencias anatómicas e histológicas entre sexos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altman, J. (1962). *Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals?* | *Science*. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.135.3509.1127>
2. Álvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain. *Neuron*, 41(5), 683-686. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00111-4)
3. Anderson, C. R. (1992). NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neuroscience Letters*, 139(2), 280-284. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90571-N](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90571-N)
4. Arévalo, R., Alonso, J. R., García-Ojeda, E., Briñón, J. G., Crespo, C., & Aijón, J. (1995). NADPH-Diaphorase in the central nervous system of the tench (tinca tinca L., 1758). *Journal of Comparative Neurology*, 352(3), 398-420. <https://doi.org/10.1002/cne.903520307>
5. Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., & Drucker-Colín, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *REV NEUROL*.
6. Becker, C. G., & Becker, T. (2015). Neuronal Regeneration from Ependymo-Radial Glial Cells: Cook, Little Pot, Cook! *Developmental Cell*, 32(4), 516-527. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.001>
7. Berois, N., García, G., & O. de Sa, R. (Eds.). (2015). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution—1st E* (1st Edition, Vol. 1). CRC Press. <https://www.routledge.com/Annual-Fishes-Life-History-Strategy-Diversity-and-Evolution/Berois-García-Sa/p/book/9780367575311>
8. Berrostequieta, I. (2020). *Estudio de la neuroplasticidad en peces del género Austrolebias frente a cambios en la luminosidad* [Tesis de maestría]. Universidad de la República.
9. Berrostequieta, 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>
10. Birse, S. C., Leonard, R. B., & Coggeshall, R. E. (1980). Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *Lebistes*. *Journal of Comparative Neurology*, 194(2), 291-301. <https://doi.org/10.1002/cne.901940202>
11. Biswas, S. P., Jadhao, A. G., Bhoyar, R. C., Palande, N. V., & Sinh, D. P. (2015). Neuroanatomical localization of nitric oxide synthase (nNOS) in the central nervous system of carp, *Labeo rohita* during post-embryonic development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 46(1), 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.06.004>
12. Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., & Temple, S. (2015). It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Developmental Cell*, 32(4), 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.010>
13. Blach, F. B., & Giri, L. (2019). It's a Male World: El sesgo sexual de los modelos animales en biología. *Arbor*, 195(791), Art. 791. <https://doi.org/10.3989/arbor.2019.791n1005>
14. Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1), 3-11. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90104-L](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90104-L)

15. Brown, A. G. (2012). *Organization in the Spinal Cord: The Anatomy and Physiology of Identified Neurons*. Springer Science & Business Media.
16. Brüning, G. (1992). Localization of NADPH diaphorase, a histochemical marker for nitric oxide synthase, in the mouse spinal cord. *Acta Histochemica*, 93(2), 397-401.
[https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80109-1](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80109-1)
17. Brüning, G., Katzbach, R., & Mayer, B. (1995). Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology*, 358(3), 353-382.
<https://doi.org/10.1002/cne.903580305>
18. Cachero, S., Ostrovsky, A. D., Yu, J. Y., Dickson, B. J., & Jefferis, G. S. X. E. (2010). Sexual Dimorphism in the Fly Brain. *Current Biology*, 20(18), 1589-1601.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.045>
19. Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C., & Strambi, A. (2002). The common properties of neurogenesis in the adult brain: From invertebrates to vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00525-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00525-5)
20. Cayre, M., Strambi, C., & Strambi, A. (1994). Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control. *Nature*, 368(6466), Art. 6466. <https://doi.org/10.1038/368057a0>
21. Chapouton, P. (2007). *Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates—Chapouton—2007—BioEssays—Wiley Online Library*.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.20615>
22. Choi, Y., Raja, S. N., Moore, L. C., & Tobin, J. R. (1996). Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *Journal of the Neurological Sciences*, 138(1), 14-20. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00325-V](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00325-V)
23. Clemente, D., Porteros, A., Weruaga, E., Alonso, J. R., Arenzana, F. J., Aijón, J., & Arévalo, R. (2004). Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, 474(1), 75-107.
<https://doi.org/10.1002/cne.20111>
24. Clorfene, J. B., & Pollack, E. D. (1994). Late-generated cells in the lateral motor columns of developing frog spinal cord. *Developmental Brain Research*, 79(1), 93-100.
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90052-3)
25. Coira, P. (2015). *Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto («Danio rerio»)*. Universidade da Coruña.
26. Dervan, A. G., & Roberts, B. L. (2003). Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. *Journal of Comparative Neurology*, 458(3), 293-306. <https://doi.org/10.1002/cne.10594>
27. Diamond, J. (1971). The Mauthner Cell. En *Fish Physiology* (Vol. 5, pp. 265-346). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60050-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60050-3)
28. Díaz, D., Valero, J., Airado, C., Baltanás, F. C., Weruaga, E., & Alonso, J. R. (2009). Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Experimental Neurology*, 216(2), 357-364.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.12.013>
29. Dulac, C., & Kimchi, T. (2007). Neural mechanisms underlying sex-specific behaviors in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(6), 675-683.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.009>

30. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1038/3305>
31. Farinetti, A., Tomasi, S., Foglio, B., Ferraris, A., Ponti, G., Gotti, S., Peretto, P., & Panzica, G. C. (2015). Testosterone and estradiol differentially affect cell proliferation in the subventricular zone of young adult gonadectomized male and female rats. *Neuroscience*, 286, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.050>
32. Fernández, A., Radmilovich, M., & Trujillo-Cenóz, O. (2002). Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 131-144. <https://doi.org/10.1002/cne.10388>
33. 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>
34. Fetcho, J. R., & Faber, D. S. (1988). Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the mauthner cell in goldfish. *Journal of Neuroscience*, 8(11), 4192-4213. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-04192.1988>
35. Forger, N. G., & Breedlove, S. M. (1986). Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: Role of early androgen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7527-7531.
36. Freire, M. (2007). *Texto y figuras preparatorios del Capítulo 20 (Tomo I) de la Histología del Sistema Nervioso de Cajal: HISTOLOGÍA COMPARADA DE LA MÉDULA ESPINAL*. <https://digital.csic.es/handle/10261/152739>
37. Frisén, J. (2016). Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 127-141. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-124953>
38. García, D. (2013). *Señales de cortejo como caracteres filogenéticos en peces anuales* [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/5133>
39. García-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the Brain: Not Just for Reproduction Anymore. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 705-712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01713.x>
40. García-Verdugo, J. M., Ferrón, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., & Font, E. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Research Bulletin*, 57(6), 765-775. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00769-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00769-9)
41. Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., & Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration, and cell fate. *Developmental Biology*, 295(1), 263-277. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040>
42. Herrera Astorga, M. L. (2022). *Adaptación a la oscuridad de la retina de peces anuales A. charrua: Cambios en la proliferación celular y en la citoarquitectura de la retina* [Tesis de maestría].
43. Horner, P. J., Power, A. E., Kempermann, G., Kuhn, H. G., Palmer, T. D., Winkler, J., Thal, L. J., & Gage, F. H. (2000). Proliferation and Differentiation of Progenitor Cells Throughout

- the Intact Adult Rat Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 20(6), 2218-2228.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02218.2000>
44. Jiang, P.-J., & Terashima, S. (1996). Distribution of NADPH-diaphorase in the central nervous system of an infrared-sensitive snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *Brain Research*, 713(1), 168-177. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01507-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01507-8)
 45. Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the Adult Rat: Electron Microscopic Analysis of Light Radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
<https://doi.org/10.1126/science.887941>
 46. Kelley, D. B. (1988). Sexually Dimorphic Behaviors. *Annual Review of Neuroscience*, 11(1), 225-251. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.11.030188.001301>
 47. Kotrschal, A., Räsänen, K., Kristjánsson, B. K., Senn, M., & Kolm, N. (2012). Extreme Sexual Brain Size Dimorphism in Sticklebacks: A Consequence of the Cognitive Challenges of Sex and Parenting? *PLOS ONE*, 7(1), e30055.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030055>
 48. Lacroix, S., Hamilton, L. K., Vaugeois, A., Beaudoin, S., Breault-Dugas, C., Pineau, I., Lévesque, S. A., Grégoire, C.-A., & Fernandes, K. J. L. (2014). Central Canal Ependymal Cells Proliferate Extensively in Response to Traumatic Spinal Cord Injury but Not Demyelinating Lesions. *PLOS ONE*, 9(1), e85916.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085916>
 49. Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology*, 80(6), 281-307.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.007>
 50. Marc Breedlove, S., & Arnold, A. P. (1981). Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: Response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. *Brain Research*, 225(2), 297-307. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90837-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90837-4)
 51. Meller, S. T., & Gebhart, G. F. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *PAIN*, 52(2), 127. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(93\)90124-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(93)90124-8)
 52. Meller, S. T., Pechman, P. S., Gebhart, G. F., & Maves, T. J. (1992). Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, 50(1), 7-10. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90377-E](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90377-E)
 53. Mirescu, C., & Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3), 233-238. <https://doi.org/10.1002/hipo.20155>
 54. Mori, E., Mazza, G., & Lovari, S. (2017). Sexual Dimorphism. En J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-7). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_433-1
 55. Muñoz, M., Muñoz, A., Marín, O., Alonso, J. r., Arévalo, R., Porteros, A., & González, A. (1996). Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezi*. *Journal of Comparative Neurology*, 367(1), 54-69.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960325\)367:1<54:AID-CNE5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960325)367:1<54:AID-CNE5>3.0.CO;2-I)
 56. Nieuwenhuys, R. (1964). Comparative Anatomy of the Spinal Cord. En J. C. Eccles & J. P. Schadé (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 11, pp. 1-57). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64043-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64043-1)
 57. Nottebohm, F., Nottebohm, M. E., Crane, L. A., & Wingfield, J. C. (1987). Seasonal changes in gonadal hormone levels of adult male canaries and their relation to song. *Behavioral and Neural Biology*, 47(2), 197-211. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(87\)90327-X](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(87)90327-X)

58. Palmer, T. D., Willhoite, A. R., & Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425(4), 479-494.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001002\)425:4<479:AID-CNE2>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001002)425:4<479:AID-CNE2>3.0.CO;2-3)
59. Papa, N., & Montagne, J. (2015). Husbandry, reproduction, and Embryo Culture of annual Fishes under Laboratory Conditions. En *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution* (99).
60. Radmilovich, M., Fernández, A., & Trujillo-Cenóz, O. (1997). Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in the spinal dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle *Chrysemys d'orbigny*. *Experimental Brain Research*, 113(3), 455-464.
<https://doi.org/10.1007/PL00005598>
61. Reimer, M. M., Kuscha, V., Wyatt, C., Sörensen, I., Frank, R. E., Knüwer, M., Becker, T., & Becker, C. G. (2009). Sonic Hedgehog Is a Polarized Signal for Motor Neuron Regeneration in Adult Zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, 29(48), 15073-15082.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4748-09.2009>
62. Reimer, M. M., Sörensen, I., Kuscha, V., Frank, R. E., Liu, C., Becker, C. G., & Becker, T. (2008). Motor Neuron Regeneration in Adult Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8510-8516. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1189-08.2008>
63. Russo, R. E., & Hounsgaard, J. (1996). Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord. *The Journal of Physiology*, 493(1), 39-54.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021363>
64. Russo, R. E., & Hounsgaard, J. (1999). Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(4), 329-365. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(99\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(99)00011-5)
65. Russo, R. E., Reali, C., Radmilovich, M., Fernández, A., & Trujillo-Cenóz, O. (2008). Connexin 43 Delimits Functional Domains of Neurogenic Precursors in the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 28(13), 3298-3309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5736-07.2008>
66. Sacher, J., Neumann, J., Okon-Singer, H., Gotowiec, S., & Villringer, A. (2013). Sexual dimorphism in the human brain: Evidence from neuroimaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 31(3), 366-375. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.06.007>
67. Sandri, C., Akert, K., Kristol, C., van Buren, J., & Bennet, M. V. (1976). AChE-positive and -negative motoneurons in the spinal cord of *Sternarchus albifrons*. *Brain Research*, 111(1), 157-162. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)91056-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)91056-8)
68. 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), Art. 7.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
69. Schmidt, H. H., Gagne, G. D., Nakane, M., Pollock, J. S., Miller, M. F., & Murad, F. (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40(10), 1439-1456. <https://doi.org/10.1177/40.10.1382087>
70. Shah, N. M., Pisapia, D. J., Maniatis, S., Mendelsohn, M. M., Nemes, A., & Axel, R. (2004). Visualizing Sexual Dimorphism in the Brain. *Neuron*, 43(3), 313-319.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.008>

71. Sillar, K. T. (2009). Mauthner cells. *Current Biology*, 19(9), R353-R355.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.025>
72. Snyder, S. H., & Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, 266(5), 68-71, 74-77. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0592-68>
73. Stilling, B., & Wallach, J. (1842). *Untersuchungen über den Bau des Nervensystems*. O. Wigand.
74. Tanaka, E. M., & Ferretti, P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(10), 713-723.
<https://doi.org/10.1038/nrn2707>
75. Taupin, P. (2006). Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. *Stem Cell Reviews*, 2(3), 213-219. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0049-0>
76. Teixeira de Mello, F. (2019). *Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay* (1ª edición, Vol. 1).
https://eva.fcien.udelar.edu.uy/pluginfile.php/75458/mod_resource/content/2/Manual%20CHEA%20web%20version%20full.pdf
77. Torres-Pérez, M., Rosillo, J. C., Berrostequieta, 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>
78. Tsuji, S. (1975). Histochemical demonstration of acetylcholinesterase-rich cells in spinal electromotor nucleus of *Electrophorus electricus*. *Brain Research*, 88(3), 499-501.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90660-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90660-5)
79. Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., & Misra, M. K. (2004). Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *BioMed Research International*, 2004, 227-237. <https://doi.org/10.1155/S1110724304402034>
80. Uehara, M., Hosaka, Y., Doi, H., & Sakai, H. (2015). The Shortened Spinal Cord in Tetraodontiform Fishes. *Journal of morphology*, 276.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20338>
81. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., & Rustioni, A. (1992). NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *Journal of Comparative Neurology*, 321(2), 209-222.
<https://doi.org/10.1002/cne.903210204>
82. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Rustioni, A., & Schmidt, H. H. H. W. (1992). Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neuroscience Letters*, 148(1), 6-10. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90791-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90791-5)
83. van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), Art. 3.
<https://doi.org/10.1038/6368>
84. van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), Art. 3.
<https://doi.org/10.1038/35044558>
85. Vigh, B., & Vigh-Teichmann, I. (1998). Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), 57-83.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<57::AID-JEMT6>3.0.CO;2-R)
86. Weinhardt, V., Shkarin, R., Wernet, T., Wittbrodt, J., Baumbach, T., & Loosli, F. (2018). Quantitative morphometric analysis of adult teleost fish by X-ray computed tomography. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34848-z>

87. Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., & Nakafuku, M. (2001). Proliferation of Parenchymal Neural Progenitors in Response to Injury in the Adult Rat Spinal Cord. *Experimental Neurology*, 172(1), 115-127. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7798>
88. Yuan, H., Goto, N., Akita, H., Goto, J., & Jin, S. R. (2000). Sexual Dimorphism of the Motoneurons in the Human Spinal Cord. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 77(5), 143-148. https://doi.org/10.2535/ofaj1936.77.5_143
89. Zupanc, G. K. H. (2001). Adult Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Central Nervous System of Teleost Fish. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(5), 250-275. <https://doi.org/10.1159/000057569>
90. Zupanc, G. K. H., & Sîrbulescu, R. F. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 917-929. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07854.x>