

Informe Final de Pasantía  
Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Caracterización histológica y  
estudio proliferativo de la retina  
de peces *Austrolebias charrua***

*Inés Berrosteguieta Rodríguez*

*Orientadora: Anabel Fernández<sup>1</sup>*

*Co-Orientador: Juan Carlos Rosillo<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Laboratorio de Neuroanatomía Comparada, Unidad Asociada a Facultad de Ciencias*

Noviembre 2016

## Agradecimientos

Allá por el año 2013, se me dio por pasar a preguntar qué hacían en el Laboratorio de Neuroanatomía Comparada. Anabel me contó, entusiasmada las líneas de investigación que se estaban llevando a cabo en ese momento, entre ellas estaban interesados en empezar a conocer un poco más de la retina de *Austrolebias charrua*, a lo que yo le pregunté ¿qué sentido tenía si ya se había investigado en otros peces? No me da la carilla para responder a esta pregunta, lo que sí quiero plasmar es que no me volví a preguntar lo mismo. Lo que Anabel me enseñó fue más que conocimiento académico, ella me transmite su entusiasmo y amor por la Ciencia día a día, que no es fácil, pero sí posible. Quiero agradecerle enormemente por estos años compartidos, a ella y a los otros integrantes del equipo. ¿Qué sería del laboratorio sin Juanca y Maxi? Les agradezco todo lo que me enseñaron, la paciencia y la linda amistad que se fue formando con el paso de los años. Así como también a María Inés, que fue otra maestra más de mi formación.

También quiero agradecer a mi familia, que me dio el apoyo para estudiar esta carrera, y me alentó, se preocupó y preocupa por que me vaya bien en lo que me gusta hacer. Me incentiva a seguirme formando, para estar más capacitada y mejor preparada.

Mis amigas, con cuales compartí Ciencias y con las que no también, siempre formando parte de mi vida y ayudándome a crecer como persona.

A todas estas personas y más, les agradezco por formar parte de esta linda etapa de la vida, en la que se aprende a querer aprender más.

# INDICE

Resumen.....	5
Palabras clave.....	6
Abreviaturas.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Introducción y antecedentes.....	8
1.2. Retina de vertebrados.....	8
1.3 Antecedentes de neurogénesis en retina de vertebrados .....	10
1.3.1 Neurogénesis en retina de peces teleósteos.....	11
1.4. Ventajas del modelo biológico.....	12
1.5. Marcadores de proliferación celular.....	12
1.6. Hipótesis.....	14
1.7. Objetivos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
A. Caracterización histológica de la retina.....	15
A.1. Obtención y condicionamiento de los peces.....	15
A.2. Técnica de Cajal de Castro.....	15
A.3. Azul de Metileno.....	15
A.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	16
A.5. Técnica de Golgi.....	16
B. Proliferación en la zona marginal ciliar.....	17
B.1. Colecta y acondicionamiento de los peces.....	17
B.2. Aplicación y revelado de los marcadores de proliferación celular.....	17
B.2.1 Diseño experimental .....	17
B.2.2. Administración de los marcadores de proliferación celular.....	17
B.2.3. Fijación de los peces.....	17
B.2.4. Técnica de disección, encastre y realización de los cortes.....	18
B.2.5. Detección inmunohistoquímica.....	18
B.2.6. Controles.....	20
B.2.7. Observación y fotografiado de los cortes.....	20
B.3. Cuantificación celular y métodos de cuantificación.....	21
B.3.1. Cuantificación celular.....	21
B.3.2. Métodos de cuantificación.....	21

3. RESULTADOS.....	22
A. Caracterización histológica de la retina.....	22
A.1. Técnica de Cajal de Castro.....	22
A.1.A. Descripción histológica.....	22
A.1.B. Análisis morfométrico comparativo en diferentes edades.....	23
A.2. Azul de Metileno y Microscopía electrónica de transmisión.....	25
A.3. Técnica de Golgi.....	28
B. Proliferación celular en la zona marginal ciliar.....	29
B.1. Identificación de las diferentes poblaciones marcadas y localización.....	29
B.2. Cuantificación celular.....	32
4. DISCUSIÓN.....	33
4.1. Caracterización histológica.....	33
4.1.1. Adaptaciones a la luz y oscuridad.....	33
4.1.2. Características histológicas citoarquitecturales.....	34
4.1.3. Análisis morfométrico comparativo en diferentes edades.....	35
4.2. Proliferación celular en la zona marginal ciliar.....	35
4.2.1. Identificación de las diferentes poblaciones marcadas y localización.....	35
4.2.2. Cuantificación celular.....	36
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	38
5.1. Caracterización histológica.....	38
5.2. Proliferación celular.....	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40

## Resumen

*Austrolebias charrua* es un pez teleósteo autóctono con ciclo de vida corto y conocido. Varios estudios se han realizado para conocer distintos aspectos de su forma de vida, desarrollo y sistema nervioso. Es sabido que los teleósteos son un buen modelo para estudiar la neurogénesis postnatal, es decir la formación de nuevas neuronas en la vida adulta. En esta tesis se realiza una caracterización histológica de la retina mediante diferentes técnicas, esto reveló su semejanza con otros teleósteos diurnos como zebrafish, así como con peces nocturnos. *A. charrua* presenta adaptaciones a la luz: como el grosor de las capas; adaptaciones a la oscuridad: como la agrupación en paquetes de las células ganglionares; y adaptaciones propias a ambientes lumínicos cambiantes: como la distribución de los melanosomas en las células del epitelio pigmentario. Se observó que el grosor de las capas cambia en función de la edad, produciéndose una disminución del grosor en la capa nuclear interna, y un aumento en el grosor de la capa plexiforme interna; interpretado como un aumento en la complejidad de las conexiones neuronales.

En la zona marginal ciliar (ZMC), nicho neurogénico presente en la retina de vertebrados, bien desarrollado en peces, el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión permitió diferenciar tres zonas: periférica, media y central, de acuerdo a las características distintivas en forma y tamaño de las poblaciones celulares que componen dichas zonas. Paralelamente se estudió la proliferación celular en la ZMC. Para esto se utilizaron ejemplares macho, los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con marcadores de proliferación celular, análogos halogenados de la timidina: iododesoxiuridina (IdU: inyectada el día 0) y clorodesoxiuridina (CldU: inyectada el día 29), para discriminar temporalmente y cuantificar las poblaciones de células proliferantes, mediante el revelado de los marcadores con técnicas inmunohistoquímicas. La inmunohistoquímica mostró la presencia de tres poblaciones celulares proliferantes: células proliferantes que migran (las más abundantes), células altamente proliferantes (abundancia intermedia) y células que reentran al ciclo celular, firmes candidatas a células madre neurales (las menos abundantes). Las tres poblaciones proliferantes reveladas por la inmunohistoquímica fueron encontradas en la ZMC. Estos resultados sugieren además la existencia de una posible ruta migratoria en la capa nuclear externa, integrada por células IdU+.

## **Palabras clave**

Retina; Citoarquitectura; Proliferación celular; Zona marginal ciliar; Iododesoxiuridina; Clorodesoxiuridina; *Austrolebias charrua*.

## Abreviaturas

ZMC: zona marginal ciliar

EP: epitelio pigmentario

SF: segmentos de los fotorreceptores

MLE: membrana limitante externa

CNE: capa nuclear externa

CPE: capa plexiforme externa

CNI: capa nuclear interna

CPI: capa plexiforme interna

CCG: capa de células ganglionares

CFNO: capa de fibras del nervio óptico

MLI: membrana limitante interna

BrdU: bromodesoxiuridina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

IdU: iododesoxiuridina

CIdU: clorodesoxiuridina

PAF: paraformaldehído

BF: buffer fosfato

BFT: buffer fosfato tritón

MET: microscopía electrónica de transmisión

NO: nervio óptico

FR: fotorreceptores

SE: segmento externo

SI: segmento interno

CR: cristalino

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Introducción y antecedentes

La neurociencia había sostenido desde Ramón y Cajal, que los individuos adultos eran incapaces de generar nuevas neuronas o de regenerarlas luego de una lesión (1). Sin embargo, a diferencia de lo establecido, en las últimas décadas se ha observado la existencia de procesos de neurogénesis en humanos adultos (2, 3), así como la persistencia en la generación de nuevas neuronas por períodos prolongados en el encéfalo, a lo largo de la escala zoológica (4, 5, 6). Este descubrimiento ha modificado nuestra comprensión en relación a cómo funciona el sistema nervioso central, y ha forjado una nueva línea de investigación que crece día a día, el estudio de la generación de neuronas en la vida adulta. La neurogénesis adulta es definida como el nacimiento y maduración de nuevas neuronas, que son agregadas o reemplazan neuronas en circuitos existentes, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas (7). Estudiar los procesos que regulan la diferenciación neuronal y los mecanismos mediante los cuales estas neuronas se integran a redes neuronales preexistentes, puede ayudar a desarrollar terapias como respuesta a enfermedades neurodegenerativas.

Las neuronas generadas por neurogénesis en individuos adultos, se localizan en sitios específicos denominados "nichos neurogénicos"; donde residen las células madre, y progenitores neurales con potencial proliferativo y neurogénico.

En la retina existe una zona considerada nicho neurogénico denominada zona marginal ciliar (ZMC). Esta zona presenta diferentes niveles de desarrollo según la escala zoológica, siendo más desarrollada en peces y anfibios.

En esta pasantía se empleó como modelo de estudio peces del género *Austrolebias* y se realizó la descripción histológica de la retina, y se demostró y mapeó la presencia de áreas proliferativas en la ZMC. La utilización de peces como modelo biológico presenta varias ventajas a la hora de estudiar la neurogénesis adulta. Específicamente el empleo de peces anuales del género *Austrolebias* facilita el manejo de variables como la edad de los peces, el ciclo de vida corto y una gran capacidad neurogénica.

### 1.2. Retina de vertebrados

La retina posee una citoarquitectura conservada entre los vertebrados (8). Sin embargo la retina de cada especie posee características propias, y su morfología no está solo determinada por su clasificación taxonómica sino por los requerimientos funcionales impuestos por condiciones ecológicas y etológicas (9). Esto promueve que dentro de los teleosteos exista una gran variabilidad en la citoarquitectura de la retina.

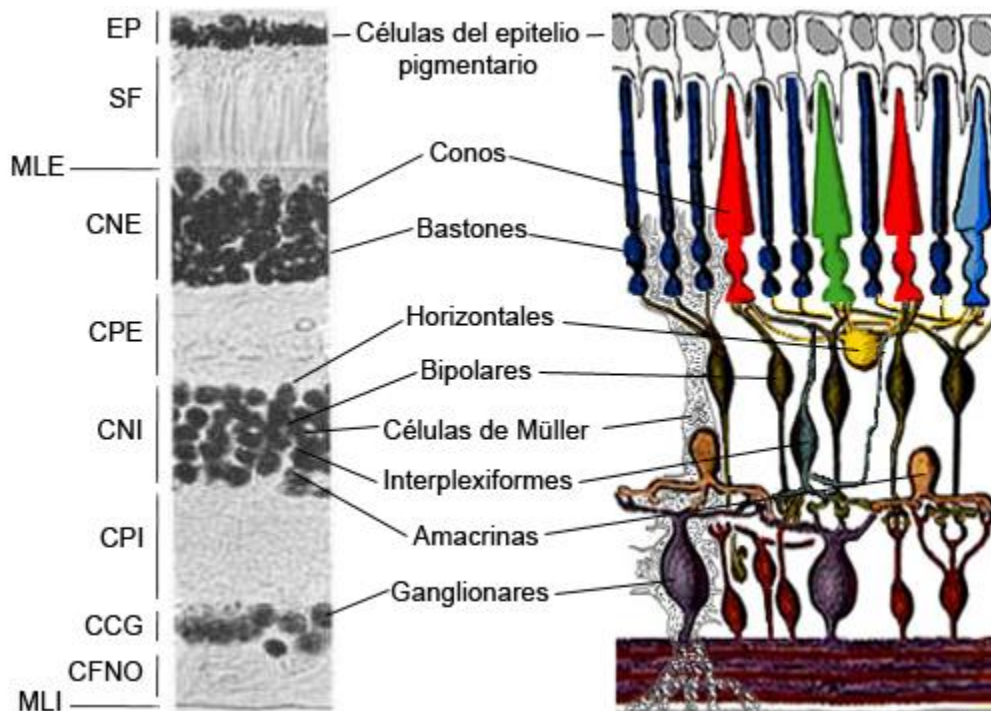
La retina es un conjunto de capas celulares ubicado en la parte más interna del ojo. Deriva del tubo neural: una evaginación par del prosencéfalo forma las vesículas ópticas, que dan lugar a las copas ópticas y estas finalmente dan lugar a la retina, la que consecuentemente forma, parte del sistema nervioso central (10). Constituye una



intrincada red sensorial conformada de neuronas y células gliales. Allí ocurren las primeras etapas de procesamiento de la señal luminosa, transformándose esta señal en impulsos nerviosos que son enviados hacia centros cerebrales de procesamiento y percepción visual, o centros de control reflejo del ingreso de la luz (11-14).

La retina está compuesta por varias capas que alternan diferentes tipos de células nerviosas y conexiones entre ellas (Fig. 1). Del exterior al interior se organiza en 8 capas y 2 membranas:

- Epitelio pigmentario (EP): compuesto por una monocapa de células epiteliales que poseen pigmentos y están unidas por complejos de unión, conformando la barrera hematorretiniana.
- Capa de los segmentos de los fotorreceptores (SF): formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores conos y bastones. Las uniones adherentes entre los fotorreceptores y las células de Müller forman la membrana limitante externa (MLE).
- Capa nuclear externa (CNE): integrada por los somas celulares de los conos y bastones.
- Capa plexiforme externa (CPE): espacio donde ocurren las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y las células horizontales, bipolares e interplexiformes.
- Capa nuclear interna (CNI): en esta capa se localizan las células horizontales, bipolares, interplexiformes, amácrinas y los somas de las células de Müller.
- Capa plexiforme interna (CPI): formada por los procesos de las células bipolares, interplexiformes, amácrinas y bipolares. En esta capa tienen lugar las conexiones sinápticas entre las células bipolares y las ganglionares.
- Capa de las células ganglionares (CCG): formada por los somas de las células ganglionares.
- Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO): formada por los axones de las células ganglionares, que al abandonar la retina, formarán el nervio óptico. En la parte más interna se encuentra la membrana limitante interna (MLI), compuesta por la membrana basal de las células de Müller.



**Figura 1.** Esquema tomado de Ogueta 2013 (8), donde se muestran las diferentes capas de la retina en teleosteos y los tipos celulares pertenecientes a cada capa. EP: epitelio pigmentario, SF: segmento s de los fotorreceptores, MLE: membrana limitante externa, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares, CFNO: capa de fibras del nervio óptico.

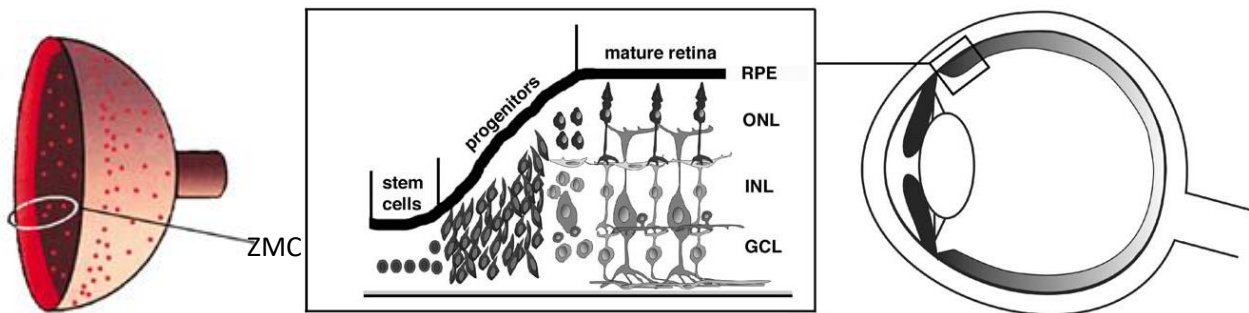
### 1.3. Antecedentes de neurogénesis en retina de vertebrados

En los peces y anfibios, el crecimiento del globo ocular y la retina continúa cuando son adultos, acompañando el aumento de tamaño del animal (15, 16, 17). En otros vertebrados esto es diferente, por ejemplo en pollos, el ojo continúa creciendo hasta el primer mes de vida. Originalmente se pensaba que este crecimiento ocurría por un estrechamiento de la retina, y que no se generaban nuevas neuronas. Posteriormente se demostró mediante el uso de 5-bromo 2'-desoxiuridina (BrdU), que nuevas células son agregadas a la retina luego de la eclosión y que las células de la ZMC persisten al menos hasta los dos meses de vida (18). Experimentos realizados en diferentes vertebrados homeotermos como ser codornices, zarigüeyas (marsupial, mamífero no placentario) y ratón, mostraron que las aves poseen una zona que se asemeja a la ZMC de peces y anfibios, siendo la mismamás reducida en codornices que en pollos. En las zarigüeyas, existen algunas células posiblemente relacionadas con la ZMC, sin embargo dichos autores no encontraron una ZMC en la retina del ratón (19). Posteriormente se evidenció que en aves, la neurogénesis persiste hasta la fase adulta, aunque el número y la multipotencialidad de los progenitores retinianos, es mucho menor en comparación con peces y anfibios (20, 21). Hoy en día se sabe que sí existe la neurogénesis en la retina de mamíferos adultos, incluso en primates se demostró la presencia de una zona comprendida entre el cuerpo ciliar y el inicio de la retina periférica. En esta zona análoga a la ZMC, que es más reducida, ocurriría la diferenciación de células madre y progenitoras en los diferentes tipos celulares de la retina (22).

### 1.3.1 Neurogénesis en retina de peces teleósteos

Si bien se ha demostrado la neurogénesis en la retina en diferentes vertebrados, es sabido que se ve muy reducida a medida que se avanza en la escala zoológica, convirtiendo a los teleósteos en modelos especialmente útiles para estudiar la retinogénesis y caracterizar la ZMC (Fig. 2).

El crecimiento retiniano en peces se realiza a través de dos mecanismos: el tejido maduro se expande acompañando el aumento de tamaño del globo ocular y, de forma simultánea, se forman nuevas células que se agregan a las células ya diferenciadas en la retina.



**Figura 2.** A Esquema de la zona marginal ciliar, tomado de Otteson y Hitchcock 2003 (16). Esquema del margen de la retina en anfibios, aves y peces, de Hitchcock et al 2004 (30).

La adición de nuevas células ocurre a partir de un anillo de tejido indiferenciado, circunferencial y cuneiforme compuesto por una población de células madre y progenitores retinianos, que recibe el nombre de zona marginal ciliar. Dicha región se ubica en el límite entre la retina neural diferenciada y el epitelio que reviste a los cuerpos ciliares (el epitelio ciliar). La ZMC fue identificada hace 50 años gracias a estudios sobre la morfología celular y la ubicación de figuras mitóticas (23, 24). Su papel en la neurogénesis de la retina se ha confirmado por múltiples métodos, que incluyen el marcado de células que se dividen incorporando análogos a la timidina tales como timidina-3H (25, 26, 27) y BrdU (25, 26, 28).

Esta zona periférica de la retina se encuentra en un proceso continuo y secuencial de proliferación y diferenciación celular, y constituye una región histológicamente distintiva, en la cual se encuentran células multipotentes que poseen la capacidad de generar todos los tipos celulares retinianos, excepto los fotorreceptores de tipo bastón (15). Las células multipotentes de la ZMC proliferan a lo largo de toda la vida postnatal del animal (29, 30) y dan origen a las células ganglionares, amácrinas, bipolares, horizontales, fotorreceptores de tipo cono y células de Müller, además de autopropagarse (16). En los peces, los fotorreceptores de tipo bastón derivan de una población neurogénica distinta de células precursoras, que se encuentra fuera de la ZMC, ubicada entre las células y capas de la retina madura (31), a nivel de la capa nuclear externa (CNE). Estas células progenitoras derivan a su vez de “células proliferativas de la capa nuclear interna”, que migran a la CNE, dando lugar a los precursores de los bastones (32, 33).

Poco se sabe acerca del ciclo de renovación de los distintos tipos celulares en la retina. En los mamíferos la renovación en adultos es casi nula, en los peces no sucede lo mismo, por lo cual conocer los mecanismos de renovación (proliferación y migración) en esta especie puede ayudarnos a comprender más acerca del sistema nervioso en general.

#### **1.4. Ventajas del modelo biológico**

El empleo de peces teleósteos presenta varias ventajas que justifican su utilización. Los peces presentan una neurogénesis persistente tanto embrionaria como postnatal. Dicha neurogénesis ocurre de forma natural y mediante inducción por daño, en donde se ha observado que la retina puede regenerar todos los tipos neuronales y restaurar su funcionamiento previo (16).

La especie *Austrolebias charrua* pertenece al género de peces anuales *Austrolebias*, dicha especie es autóctona y con un ciclo de vida corto y conocido, que permite una fácil manipulación y reproducción en cautiverio. Nada se sabe aún sobre la histoarquitectura de la retina en esta especie, así como tampoco sobre la proliferación y la neurogénesis. Todo esto lo convierte en un modelo atractivo para este tipo de estudio.

Por otro lado en el laboratorio donde se desarrolló la pasantía, se han publicado distintos estudios sobre proliferación y neurogénesis en el cerebro de distintas especies del género *Austrolebias*. En los mismos reportan la existencia de múltiples regiones cerebrales con rápida capacidad proliferativa y neurogénica (34). Así mismo se demostró la existencia de una vinculación anatómica entre la retina y el bulbo olfatorio (una rama del nervio terminal), la cual ha sido implicada en el comportamiento sexual de estos peces y seguramente esté influenciando la capacidad neurogénica de ambas estructuras (35).

En esta tesis además de realizarse una descripción de la histoarquitectura de la retina de *A. charrua*, se estudió la proliferación de la ZMC. Para esto se utilizaron diferentes marcadores de proliferación.

#### **1.5. Marcadores de proliferación celular**

Inicialmente los estudios de proliferación celular se limitaban a la observación directa de una célula madre dividiéndose en dos células hijas, es decir, la visualización de la mitosis; ni los fenómenos previos ni posteriores, eran detectables con las técnicas de microscopía convencional (36).

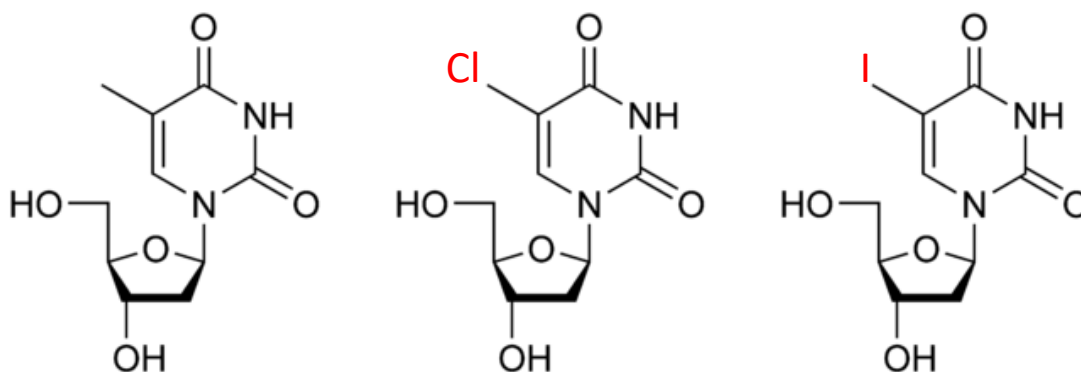
El desarrollo de técnicas autorradiográficas, en la detección de nucleótidos marcados con tritio radiactivo, permitió identificar células en la fase de síntesis (donde tiene lugar la duplicación del material genético) del ADN (ácido desoxirribonucleico) (37). La timidina es un nucleótido exclusivo del ADN (ausente en el ARN-ácido desoxirribonucleico), si este nucleótido es marcado con un radioisótopo (generalmente tritio, timidina-3H) y administrado in vivo o in vitro, las secuencias de ADN que estén siendo sintetizadas durante dicha administración, incorporarán la timidina marcada. La energía producida por dichos radioisótopos marcará su impronta en una película de emulsión fotográfica, evidenciando las células que se encuentran en fase S del ciclo

celular. Estas técnicas son laboriosas, complejas y lentas, razones por las cuales han sido sustituidas por técnicas inmunocitoquímicas.

El BrdU es un nucleósido sintético análogo a la timidina, puede ser incorporado en la fase S del ciclo celular, sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen al BrdU (38), ofrece la posibilidad de identificar células en fase S sin la necesidad de radioisótopos, obviando todos sus inconvenientes. Esta técnica además de ser simple y relativamente rápida, provee una alta fidelidad, además de que la marcación de los núcleos es clara y bien definida (36).

Además se han desarrollado diferentes compuestos halogenados análogos a la timidina, donde el grupo bromo es sustituido por yodo o cloro, formando así iododesoxiuridina (IdU) y clorodesoxiuridina (CldU) (Fig. 3), conservando todas las ventajas propias del método. Este avance proporciona además la posibilidad de marcar dos poblaciones celulares que proliferan en diferentes tiempos. Administrando pulsos de ambos marcadores en el mismo animal, se pueden identificar dos poblaciones celulares proliferantes, sin que presenten reacciones cruzadas (39). Esto proporciona una herramienta que permite entender la relación entre la historia de la proliferación celular, el establecimiento de las células recientemente generadas, y evaluar el estado proliferativo (39).

En este trabajo se utilizó la administración de CldU e IdU como herramienta para estudiar la proliferación celular en la ZMC en la retina de *A. charrua*. La técnica permite además visualizar células doble marcadas (se dividieron durante el primer pulso y reentraron en el ciclo celular durante la administración del segundo pulso), siendo estas consideradas candidatas a células madre, ya que además de incorporar ambos marcadores, no migran.



**Figura 3.** Esquema de la estructura molecular de la timidina, Clorodesoxiuridina (CldU), Iododesoxiuridina (IdU).

## 1.6. Hipótesis

-La retina de *Austrolebias charrua* comparte características histológicas con otros grupos de teleósteos.

-*A. charrua* posee una ZMC con elevada tasa de proliferación, encargada de aumentar el número celular de las diferentes capas de la retina.

## 1.7. Objetivos

### Objetivo general

El objetivo de esta pasantía, es la aplicación de diferentes técnicas y abordajes experimentales para el estudio de la caracterización histológica y proliferación celular en la retina de peces *A. charrua*.

### Objetivos específicos

-Caracterizar histológicamente la retina utilizando las siguientes técnicas: Golgi, Cajal, Azul de Metileno y Microscopía electrónica de transmisión.

-Mediante las técnicas argénticas de Golgi y Cajal de Castro, analizar las diferentes capas de la retina y tipos celulares. Con la técnica de Golgi determinar si existen variaciones entre los grosores de las capas de la retina a diferentes edades.

- Analizar las características ultraestructurales de la retina y ZMC mediante microscopía electrónica de transmisión.

- Determinar por medio de la aplicación del IdU y CldU la localización y distribución de distintas poblaciones de células proliferativas en el encéfalo de *Austrolebias charrua*.

-Cuantificar las células marcadas con CldU, IdU y células que contengan ambos marcadores en la ZMC, utilizando el programa ImageJ, con el fin de conocer la capacidad proliferativa de las diferentes poblaciones.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Caracterización histológica de la retina

#### A.1. Obtención y acondicionamiento de los peces

Para la realización de esta etapa se utilizaron ejemplares machos de *Austrolebias charrua* provenientes del acuario de Facultad de Ciencias, eclosionados de una misma turba. Las edades utilizadas fueron entre 1 a 6 meses. Los peces fueron mantenidos en el acuario del IIBCE ( Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable) durante todo el proceso de experimentación, en peceras individuales con agua de clorinada y ambientación vegetal, a temperatura de 19°C, con aireadores permanentes y alimentados una vez al día con *Tubifex tubifex* (*Tubifex rivolorum*).

El protocolo de experimentación realizado con *A. charrua* para todo el estudio, ha sido evaluado y aceptado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

#### A.2. Técnica de Cajal de Castro

Dos peces de cada edad (1, 2 y 3 meses) fueron anestesiados con Eugenol (eugenol 10% en etanol 96%) en concentración 1:1000 ml. Como plano anestésico profundo se consideró la disminución del movimiento opercular, pérdida del reflejo de escape y su flotabilidad. En este estado los peces se decapitaron cuidadosamente bajo lupa (NIKON, SMZ 800). Debido al reducido tamaño y fragilidad de los ojos, las maniobras de la técnica exigieron que la misma se realizara con la cabeza entera en vez de solo los ojos. Se realizó la técnica según Ramón y Cajal y De Castro (40) con un fijador especial (Hidrato cloral 5 g; alcohol 95-98%; agua destilada 40/50 cm<sup>3</sup>; ácido nítrico 1-2 cm<sup>3</sup>). Luego de un pasaje por alcohol (96% 50 cm<sup>3</sup>) con amoníaco (2-3 gotas), se realizó la impregnación argéntica al 1.5% (en estufa 35-38°C por cinco días). Luego de la reducción con hidroquinona (1g en 70-100cm<sup>3</sup> de agua destilada) y formol (40%, 5-10 cm<sup>3</sup>) por 24 horas, las piezas se deshidrataron (alcoholes de graduación creciente); se incluyeron en una resina epóxica de dureza media y se cortaron en micrótomos de deslizamiento horizontal a 30 µm de grosor, en un plano longitudinal (Fig. 5). Los cortes se montaron en araldita de forma seriada, utilizando portaobjetos y cubreobjetos de vidrio.

Las mediciones de la retina se realizaron a nivel del nervio óptico, midiendo el grosor de cada capa en las diferentes edades. En Microsoft Excel 2007 se realizó una tabla con las medidas de las diferentes capas (CNE, CPE, CNI, CPI y CG) y se calcularon los porcentajes de cada una en las diferentes edades.

#### A.3. Azul de Metileno

Se utilizaron 2 peces de 1 mes de edad. Los peces fueron anestesiados del mismo modo que en la técnica anterior. Una vez anestesiados se realizó la perfusión intracardíaca. Para esto, se removió la sangre del aparato circulatorio realizando un lavado con solución salina, la cual tiene un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO<sub>2</sub> al 1%) para

facilitar el paso de las soluciones y evitar el colapso de los vasos; y un anticoagulante (Citrato de sodio,  $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$  al 2%), para evitar que se generen trombos al contactar el fijador con la sangre. Una vez realizado el lavado cada pez fue perfundido con una mezcla fijadora conteniendo PAF al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer fosfato 0.1 M pH=7.2. Los ojos se disecaron cuidadosamente y permanecieron en la misma solución fijadora durante 1 hora, a 4° C. Se lavaron reiteradas veces con buffer fosfato (BF) y se postfijaron con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en BF durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y bajo campana de extracción de gases. Se lavaron varias veces con BF, se deshidrataron en alcohol de graduación creciente y fueron incluidos en resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA). Se realizaron cortes seriados semifinos de 0.5-2  $\mu\text{m}$  de grosor en ultramicrotomo (LEICA XL). Posteriormente se realizó la tinción con azul de metileno borácico al 1% y se visualizaron y fotografiaron con el microscopio óptico de luz con el fin de localizar las áreas de interés a ser analizadas por microscopía de transmisión (MET).

#### **A.4. Microscopía electrónica de transmisión**

Una vez seleccionadas las áreas de interés, con el ultramicrotomo se obtuvieron secciones de 80 nm que se colectaron con rejillas de cobre de ranura (2x1 mm), previamente recubiertas con membranas de soporte de polivinilformvar (solución de formvar al 0.3% diluido en cloroformo). Una vez adheridas a la membrana, para aumentar la densidad electrónica del tejido, las secciones se contrastaron por flotación con una solución acuosa saturada de acetato de uranilo ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) al 2% (60°C durante 1 hora y media) y luego en citrato de plomo al 3% (10 minutos en atmósfera de nitrógeno). Los análisis se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol JEM 1010 operando a 80 kV), equipado con una cámara digital (HAMAMATSU C-4742-95). Las imágenes obtenidas fueron transferidas a la computadora y luego procesadas en el programa Photoimpact de libre acceso. La realización de los cortes finos y fotografiado de imágenes fue realizada por Juan Carlos Rosillo, co-tutor.

#### **A.5. Técnica de Golgi**

4 especímenes de 6 edad fueron anestesiados y perfundidos del mismo modo que en la técnica anterior, sin la utilización del glutaraldehído. Posteriormente los peces se decapitaron cuidadosamente bajo lupa (NIKON, SMZ 800). Al igual que en la Técnica de Cajal, se trabajó con las cabezas enteras. Las cabezas fueron postfijadas en una mezcla de 5% de bicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) con PAF al 4%, o con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% durante 2 días. Pasado este tiempo se sumergieron en nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.75% 2 días. Los pasos de postfijación e impregnación se repiten 2 veces (40). Las piezas se deshidrataron en alcoholes de graduación ascendente (25, 50, 70, 96 y 100%, una hora en cada uno) e incluyeron en resina epóxica de dureza media y luego fueron cortadas en microtomo de deslizamiento horizontal (E.LEITZ WETZLAR) a 90–100  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes seriados se montaron en araldita entre 2 láminas de plástico



transparente (Mylar) para su posterior estudio al microscopio óptico (Nikon ECLIPSE E200).

## B. Proliferación en la zona marginal ciliar

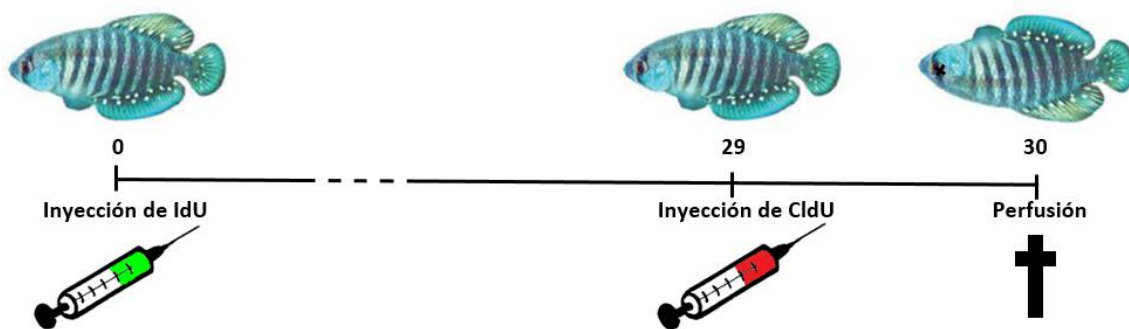
### B.1. Colecta y acondicionamiento de los peces

En este estudio se utilizaron especímenes adultos de *A. charrua* de entre 6 y 8 meses de edad. Los ejemplares se colectaron en charcos ubicados en el departamento de Treinta y Tres. Los peces se mantuvieron en el acuario del Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE), en las mismas condiciones que los peces utilizados en la sección anterior.

### B.2. Aplicación y revelado de los marcadores de proliferación celular

#### B.2.1 Diseño experimental

Para los experimentos de proliferación celular se utilizaron 5 machos de *Austrolebias charrua* y se realizaron tratamientos de marcado de treinta días. En el día cero, a los 5 peces se les administró mediante una inyección intraperitoneal, el primer marcador de proliferación (IdU). En el día 29, a los mismos especímenes se les administró el segundo marcador de proliferación (CldU). En el día 30, se realizó el sacrificio de los peces. Obteniendo así, un tiempo de sobrevivencia post inyección del IdU de 30 días y del CldU 1 día. En la figura 4 se muestra el esquema metodológico aplicado.



**Figura 4.** Esquema de la metodología aplicada a *A. charrua*, en el día 0 se inyecta intraperitonealmente la iododesoxiuridina, en el día 29 se inyecta la clorodesoxiuridina y en el día 30 se realiza el sacrificio del animal anestesiado por perfusión intracardiaca.

#### B.2.2. Administración de los marcadores de proliferación celular

Los marcadores de proliferación se administraron intraperitonealmente; esta vía de administración es elegida por la simplicidad de la maniobra y porque la cavidad peritoneal tiene una gran superficie de absorción, permitiendo que las sustancias pasen al sistema circulatorio con facilidad. Para la inyección de los marcadores se determinó el peso vivo de cada animal utilizado. El IdU se administró en una

concentración de 57,5 mg/Kg y el CldU se administró en una concentración de 42,5 mg/Kg.

### B.2.3. Fijación de los peces

La fijación se realizó de igual manera que en la sección A.3.

### B.2.4. Técnica de disección, encastre y realización de los cortes

Una vez que el animal fue fijado se realizó la disección de los ojos bajo lupa (NIKON, SMZ800) y se encastraron en una mezcla de gelatina (1,5%)-albúmina (45%) disuelta en cloruro de sodio (0.9%) con 30  $\mu$ l de glutaraldehído (25%), obteniendo un bloque cuya consistencia permitió realizar los cortes, sin dañar los ojos. El bloque se colocó, fijó y cortó en un vibrátomo (LEICA VT100S). Los cortes fueron seriados de 80  $\mu$ m de grosor en planos de corte transversales (Fig. 5). Una vez obtenidos los cortes, se realizó el tratamiento inmunohistoquímico para revelar los marcadores de proliferación por inmunofluorescencia.



**Figura 5.** Plano de corte transversal del ojo (rojo) de *A. charrua*, realizado para el estudio proliferativo. Plano longitudinal (verde), utilizando para la realización de otras técnicas.

### B.2.5. Detección inmunohistoquímica

Los anticuerpos encargados de detectar el CldU e IdU (Tabla 1) reconocen estas sustancias en el ácido ADN monocatenario, para que estos se encuentren los cortes deben ser previamente tratados. Esto se logra mediante la incubación de los cortes en HCl diluido en buffer fosfato tritón (BFT) al 0,3% (HCl 15% - BFT 85%). El BFT desorganiza la estructura lipídica y genera agujeros en las membranas biológicas, permitiendo que el HCl ingrese a las células y desnaturalice el ADN doble cadena, exponiendo los antígenos donde están unidos el IdU y CldU a los anticuerpos específicos. Una vez que los antígenos fueron expuestos, se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios,

luego con los secundarios conjugados con un fluoróforo para su detección mediante inmunofluorescencia, utilizando microscopía láser confocal. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo:

- 1- Se lavan tres veces los cortes en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 2- Se incuban los cortes en la solución de BFT-HCl, durante 40 minutos.
- 3- Se realizan tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 4- Se incuban los cortes en anticuerpos primarios toda la noche en BFT, utilizando: - Anti IdU: mouse anti-BrdU (IdU) - Anti CldU: rat anti-BrdU (CldU)
- 5- Se realizan tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 6- Previo a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados se realiza una incubación con un anticuerpo secundario biotilado: - Biotilado Donkey anti-rat
- 7- Se realizan tres lavados en BF, sobre un agitador, durante 10 minutos cada lavado.
- 8- Se incuban los cortes en anticuerpos secundarios conjugados con flourocromos, en BFT durante una hora y media en oscuridad, utilizando: - Anti-mouse Alexa-fluor 488 para el IdU y Streptavidina de unión a la biotina Cy3 para el CldU.

Una vez aplicado el protocolo, los cortes fueron montados en portaobjetos rotulados, se les colocó glicerina y se los cubrió con un cubreobjetos. Los cortes fueron mantenidos en heladera evitando procesos de crecimiento de microorganismos, y en cajas opacas para que los conjugados fluorescentes no se vean excitados por la luz y no se pierda la intensidad de la señal.

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

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
<b>Rata anti-BrdU(CldU)</b>	Accurate	1/500
<b>Ratón anti-BrdU (IdU)</b>	Becton Dickenson	1/500
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
<b>Biotilado, burro anti-rata</b>	Jackson	1/500
<b>Burro anti-ratón Alexa 488</b>	Molecular probes	1/1000
<b>Streptavidina de unión a la biotina Cy3</b>	Jackson	1/500

### **B.2.6. Controles**

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

### **B.2.7. Observación y fotografiado de los cortes**

Los preparados histológicos, fueron observados y analizados con un Microscopio Confocal Olympus FluoView™300 asistido por un software para Windows®, el FluoView™300. Para la visualización de los preparados se utilizaron dos opciones de láser respecto el tipo de fluorocromo conjugado a los anticuerpos secundarios:

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

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

Una vez especificados los parámetros de visualización de las imágenes en el FluoView™300 (línea de excitación e intensidad del láser, apertura del pinhole de detección, ganancia del fotomultiplicador, velocidad de barrido del láser, tamaño de la imagen), se seleccionó el modo de barrido XYZ, que capta una serie de imágenes ópticas confocales XY a través del espesor de la muestra. En cada corte (grosor 80  $\mu\text{m}$ ) se estableció una ventana de 30  $\mu\text{m}$  donde se encuentra la información de interés (núcleos marcados) y se obtuvieron fotos de esa ventana cada 3  $\mu\text{m}$  (en el plano Z), es decir, de cada corte se obtienen 11 planos focales. Las fotografías se realizan individualmente en cada canal, es decir que se obtienen 11 fotografías del canal 1 (488 color verde, se observan núcleos IdU positivos), 11 del canal 2 (543 color rojo, núcleos CldU positivos) y 11 de la superposición de las imágenes de ambos canales. Gracias al método de apilamiento brindado por el software del microscopio, también se pudieron apilar las 11 imágenes de cada grupo, obteniendo así una imagen de cada uno de los tres grupos, en donde las 11 imágenes individuales se encuentran superpuestas. En estas imágenes se visualiza la información de los núcleos marcados en la ventana indicada en canales por separado y unidos. Las fotografías son de la ZMC derecha e izquierda de cada corte.

### **B.3. Cuantificación celular y métodos de cuantificación**

#### **B.3.1. Cuantificación celular**

Una vez obtenidas las imágenes de las superposiciones, se cargaron estas imágenes en el programa ImageJ. Para cada trío de imágenes de cada corte, en la imagen del canal 1 se realizó la cuantificación de los núcleos IdU+, en la imagen del canal 2 se realizó la cuantificación de los núcleos CldU+ y en la imagen de ambos canales se realizó la cuantificación de doble marcados IdU+/CldU+. La cuantificación se realizó sobre las imágenes apiladas de las tres opciones (canal 1, canal 2 y ambos), recurriendo al desglose de las 11 imágenes por separado de ser necesario. Otra herramienta utilizada para confirmar la veracidad del doble marcado, fue la utilización de los planos ortogonales que proporciona el programa para analizar la imagen apilada.

#### **B.3.2. Métodos de cuantificación**

Luego de realizar la cuantificación de los núcleos marcados en la ZMC derecha e izquierda de cada corte, se dividió el número entre dos para obtener un promedio. Se realizó una tabla y un gráfico de frecuencias relativas simples para presentar las cantidades de núcleos IdU+, CldU+ y doble marcados IdU+/CldU+ en la región estudiada. También se realizó una tabla y gráfico con el promedio de cada tipo de núcleo, y se calculó su desviación estándar. Estos gráficos son realizados por el programa para Windows®, Microsoft Excel 2007.

Para determinar las tasas de proliferación de células IdU+, CldU+ y doble marcadas IdU+/CldU+ se utilizó el programa para Windows®, Microsoft Excel 2007.

### 3. RESULTADOS

#### A. Caracterización histológica de la retina

##### A.1. Técnica de Cajal de Castro

##### A.1.A. Descripción histológica

Si bien la técnica de Cajal de Castro se utiliza para la tinción de las neurofibrillas en el sistema nervioso, también da una coloración ámbar de fondo que permite distinguir con mejor claridad la citoarquitectura del tejido en comparación con otras técnicas de tinción.

La aplicación de la técnica de Cajal de Castro a peces de diferentes edades brindó un panorama general de la retina y permitió distinguir con claridad las diferentes capas; así como observar variaciones de estas capas en distintas edades de los peces. Los cortes realizados en el plano longitudinal de retina de *A. charrua* adulto, evidenciaron una organización compartida en cuanto al número de capas con el resto de los vertebrados, como muestra la figura 6. Desde el exterior al interior del ojo se observa el epitelio pigmentario, fuertemente impregnado con las sales argénticas, superpuesto con los segmentos de los fotorreceptores. La capa nuclear externa compuesta por los somas de conos y bastones, linda hacia el interior con la capa plexiforme externa. Luego se encuentra la CNI, en su porción más externa se divisan con facilidad las células horizontales, cuyos núcleos alargados en sentido horizontal, se disponen paralelamente a las capas de la retina, conformando entre una y dos capas de células (Fig. 6). Las células horizontales son menos numerosas que los demás tipos celulares que componen la capa nuclear interna. Las demás células de la CNI no son identificables con esta técnica, aunque se puede estimar el tamaño de los somas en alrededor de 8  $\mu\text{m}$ . La capa plexiforme interna, de mayor tamaño que la plexiforme externa, refleja la complejidad de las conexiones celulares que allí se desarrollan, limitando hacia el interior con la capa de células ganglionares. En la capa de las células ganglionares puede apreciarse que el tamaño de los cuerpos de dichas células, es mayor que el de las demás células de la retina, siendo aproximadamente de 12  $\mu\text{m}$ . Pudo observarse además una distribución particular de las células ganglionares, formando “paquetes” entre espacios vacíos de cuerpos celulares, estando en contacto directo la CPI con la capa de fibras del nervio óptico. Esta disposición de las células ganglionares se ve restringida a áreas centrales de la retina, alejadas de la ZMC, cercanas a niveles del nervio óptico y en cortes longitudinales. En el análisis de cortes de retina seriados de peces de 6 meses con esta técnica no se visualizó la presencia de una fovea.



**Figura 6.** Capas de la retina de cortes longitudinales de 30 µm, vistas gracias a la técnica de Cajal de Castro, pudiéndose apreciar: EP (epitelio pigmentario), SF (segmento de fotorreceptores), CNE (capa nuclear externa), CPE (capa plexiforme externa), flecha: células horizontales, CNI (capa nuclear interna), CPI (capa plexiforme interna), CCG (capa de células ganglionares). Además se visualizan las células ganglionares dispuestas en paquetes (círculo punteado), separados por espacios ausentes de somas celulares.

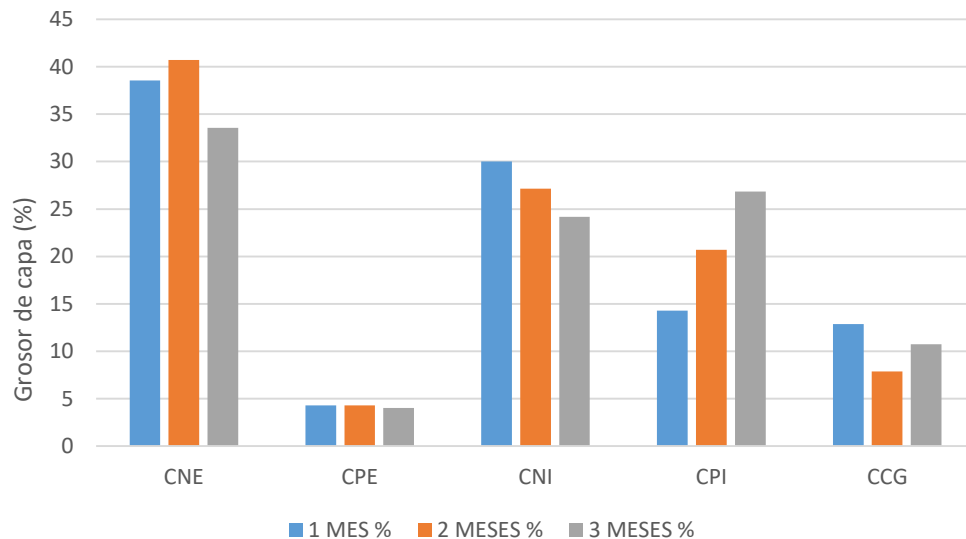
### A.1.B. Análisis morfométrico comparativo en diferentes edades

Las observaciones realizadas en cortes longitudinales (30 µm) de retina con el método de Cajal de Castro a distintas edades evidenciaron diferencias en los grosores relativos de las capas de la retina. Esto resultó en la medición comparativa de cada capa en especímenes de 1, 2 y 3 meses (dos individuos de cada edad).

Tabla 2. En la tabla se muestran los porcentajes correspondientes a cada capa en función del grosor total de la retina. Las edades corresponden a 1, 2 y 3 meses de edad. Las capas medidas son: CNE: capa nuclear externa y SF: segmento de los fotorreceptores, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna y CG: células ganglionares.

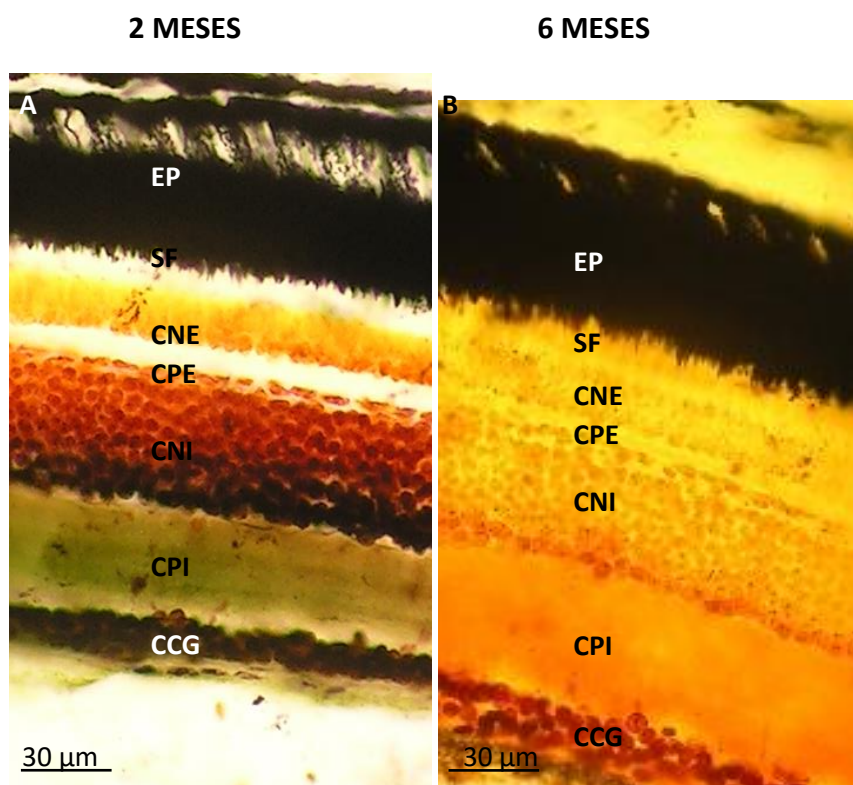
Capas	1 mes (%)	2 meses (%)	3 meses (%)
<b>CNE y SF</b>	38.57	40.71	33.56
<b>CPE</b>	4.27	4.29	4.03
<b>CNI</b>	30	27.14	24.12
<b>CPI</b>	14.29	20.71	26.85
<b>CG</b>	12.85	7.86	10.74

Las tomas morfométricas a nivel del nervio óptico de cortes longitudinales, revelan que las capas muestran una variación de tamaño, destacándose una tendencia a la disminución de la capa nuclear interna, y un aumento de la capa plexiforme interna. También se observa que la capa plexiforme externa se mantiene constante. Las capas restantes (capa nuclear externa y la capa de las células ganglionares), no evidencian una tendencia clara (Tabla 2 y Figura 7).



**Figura 7.** Representación gráfica de los porcentajes de los grosores de las capas de la retina, a diferentes edades, respecto al grosor total de la retina. Se utilizaron *A. charrua* de 1, 2 y 3 meses de edad. CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares. Datos obtenidos de cortes longitudinales de 30 micras, mediante la aplicación de la Técnica de Cajal de Castro.

En la figura 8 se observa la retina a nivel del NO (nervio óptico) de un pez de 2 meses (A) y 6 meses (B). Se aprecia una disminución de la CNI y un aumento de la CPI. Esta disminución del espesor de la CNI se ve reflejada en el número de capas celulares, siendo aproximadamente 11 en peces de 1 mes, y 8 en peces de 6 meses.



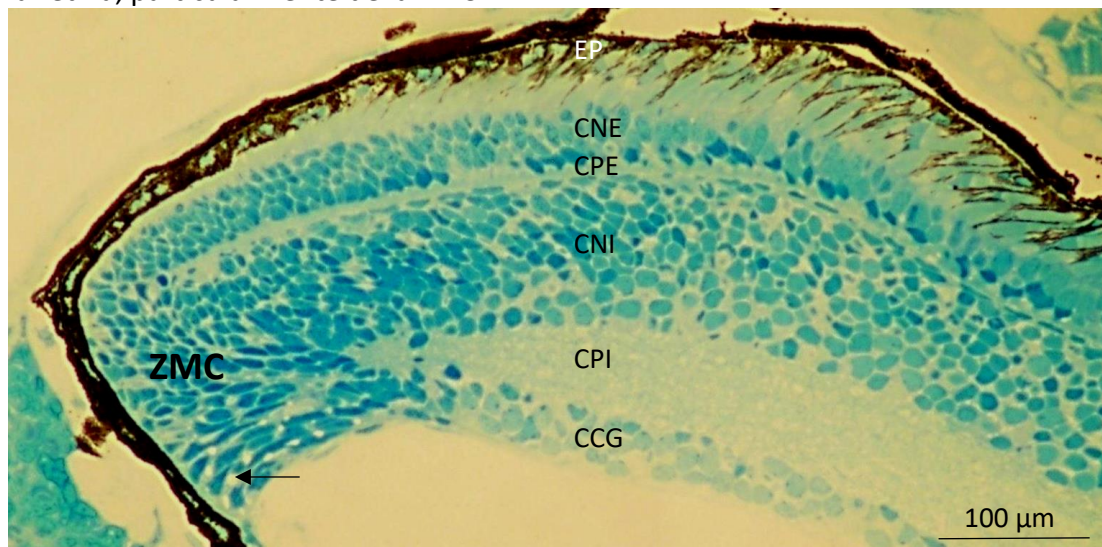
**Figura 8.** Capa de la retina de *A. charrua* con la Técnica de Cajal de Castro. A. Ejemplar de 2 meses de edad. B. Ejemplar de 6 meses de edad. EP: epitelio pigmentario, SF: segmentos de los fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares.



## A.2 Azul de Metileno y Microscopía electrónica de transmisión

La tinción con azul de metileno permitió analizar con mayor detalle la citoarquitectura de las diferentes capas retinianas e identificar la morfología de algunos componentes celulares tanto a nivel de la retina como de la zona marginal ciliar. Esta tinción brindó información adicional que denota una clara diferencia entre las células de la ZMC y el resto de la retina. Se identificaron con claridad las diferentes capas y tamaño y forma de los núcleos celulares.

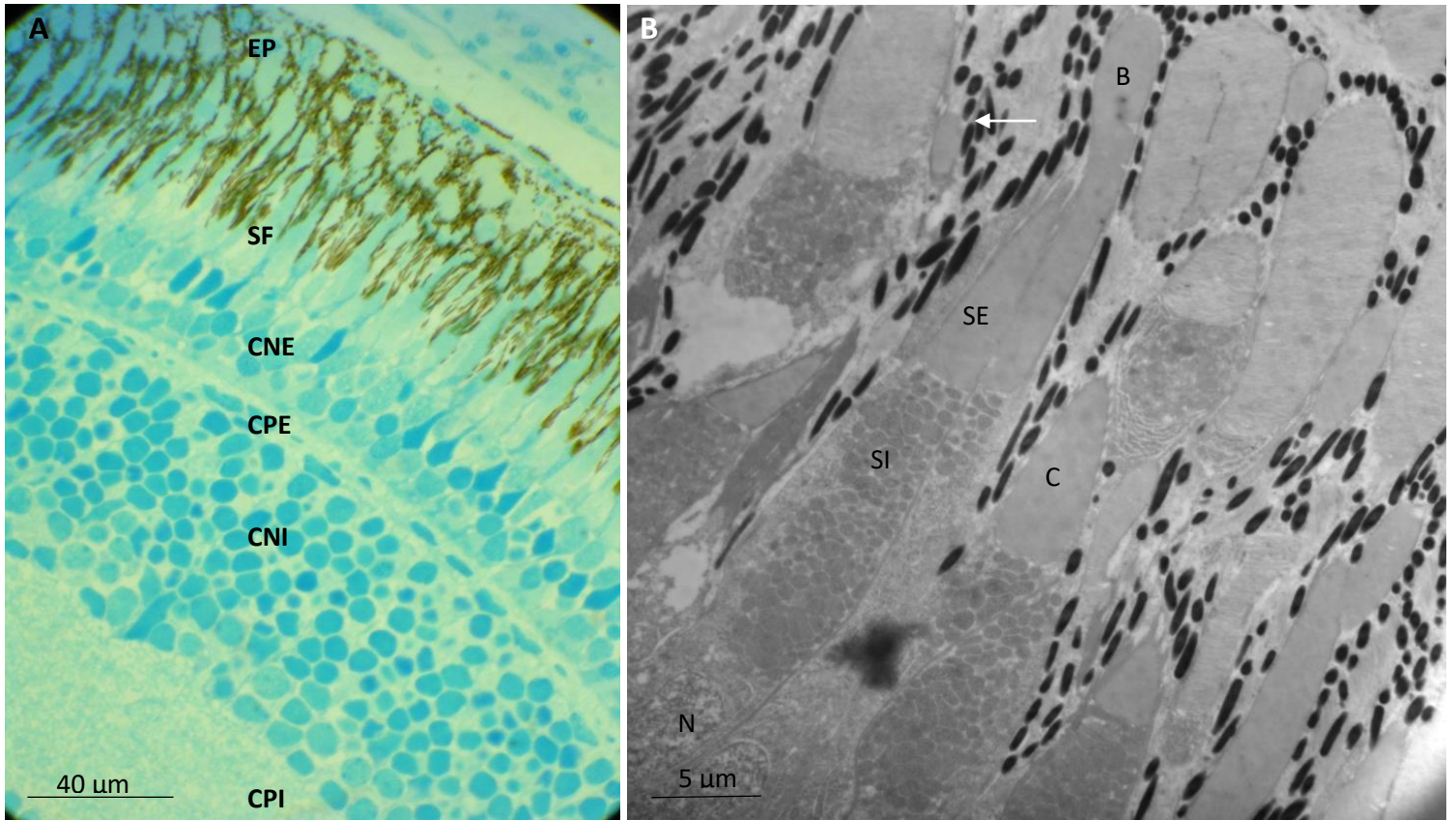
La técnica de microscopía electrónica de transmisión complementó la información aportada por la tinción de azul de metileno, permitiendo analizar la ultraestructura de la retina, particularmente de la ZMC.



**Figura 9.** Vista panorámica de un corte transversal con tinción de Azul de metileno. Se aprecia la ZMC (zona marginal ciliar) y las diferentes capas de la retina. Se observan espacios blancos (flecha). EP (epitelio pigmentario), CNE (capa nuclear externa), CPE (capa plexiforme externa), CNI (capa nuclear interna), CPI (capa plexiforme interna), CCG (capa de células ganglionares).

La observación del epitelio pigmentario con la tinción de azul de metileno, reveló la existencia de proyecciones de las células del EP entre los segmentos externos e internos de los conos y bastones. Las células del EP poseen pigmentos denominados melanosomas, éstos presentan una distribución particular en el citoplasma de las células pigmentarias. Dichos melanosomas se distribuyen homogéneamente en las proyecciones citoplasmáticas, cubriendo los segmentos externos de los fotorreceptores (FR), pero también se localizan a nivel más escleral, a la altura de los núcleos de las células del EP (Fig. 9). La CNE se visualiza ahora con mayor detalle, pudiéndose distinguir con claridad de tres a cuatro capas de fotorreceptores. Esta tinción permite distinguir conos de bastones, observándose además que no todos los FR se tiñen de igual manera, siendo unos núcleos más oscuros que otros (Fig. 9).

La MET muestra la ultraestructura de esta región, donde se observa con mayor precisión, la distribución pigmentaria e individualización de los melanosomas. Se distinguen con claridad la morfología de conos y bastones, además de poderse identificar los segmentos externos e internos. En los segmentos internos se reconoce un numeroso conjunto de mitocondrias y en los externos se encuentra el apilado de membranas característico de los FR (Fig. 10).



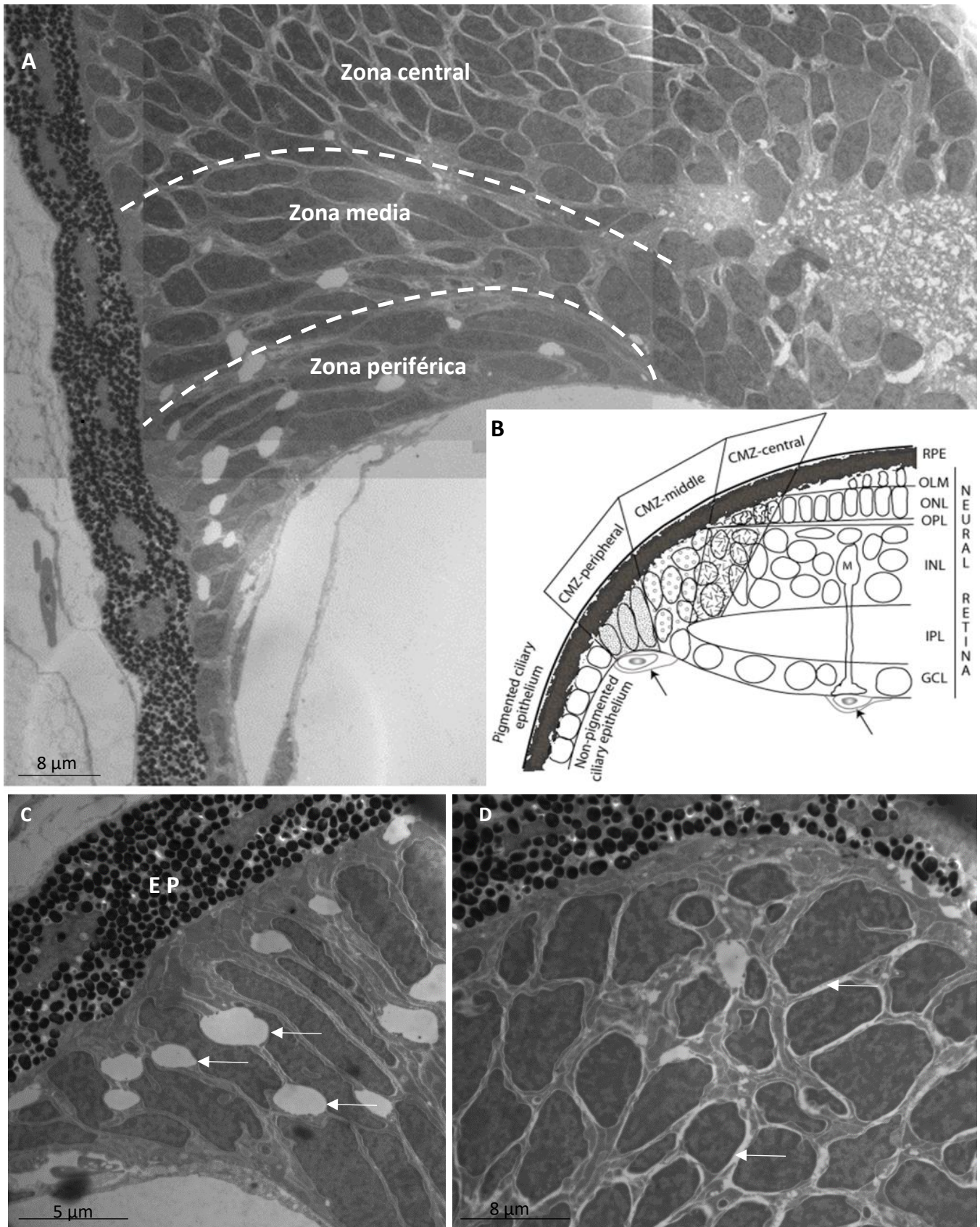
**Figura 10.** A. Capas de la retina observables gracias a la técnica de Azul de metileno EP (epitelio pigmentario), SF (segmentos de los fotorreceptores), CNE (capa nuclear externa), CPE (capa plexiforme externa), CNI (capa nuclear interna), CPI (capa plexiforme interna); en esta imagen se observan proyecciones del EP entre los SF. B. Imagen de Microscopía electrónica de transmisión, donde se reafirma la interdigitación del EP en los SF. Pueden apreciarse con detalle los melanosomas (flecha) del EP, la división del segmento externo (SE) e interno (SI) de los conos (C) y bastones (B), así como sus

A nivel de la zona marginal ciliar se identifican diferentes poblaciones celulares (Fig. 11), según la morfología de los núcleos puede dividirse en tres zonas:

- Zona periférica: se encuentra en la parte más externa de la retina. Contiene núcleos alargados y de gran tamaño (hasta 14 µm de diámetro mayor). Se visualiza un gran número de espacios circulares entre las células.
- Zona media: en esta zona los núcleos comienzan a aumentar levemente su eje menor, sin dejar de ser alargados; también aparecen núcleos más redondeados. El número de espacios disminuye notoriamente.
- Zona central: esta zona se continúa hacia el interior con la retina madura. El número de núcleos redondeados aumenta y el de alargados disminuye. Ya no se observan espacios circulares. En esta región se visualizan numerosas mitosis.

La microscopía electrónica de transmisión verificó la presencia de los espacios circulares y los diferentes tipos celulares (Fig. 11). Además permitió observar delgados espacios intercelulares y núcleos con diferentes grados de condensación de la cromatina, siendo en su mayoría electrón-densos.

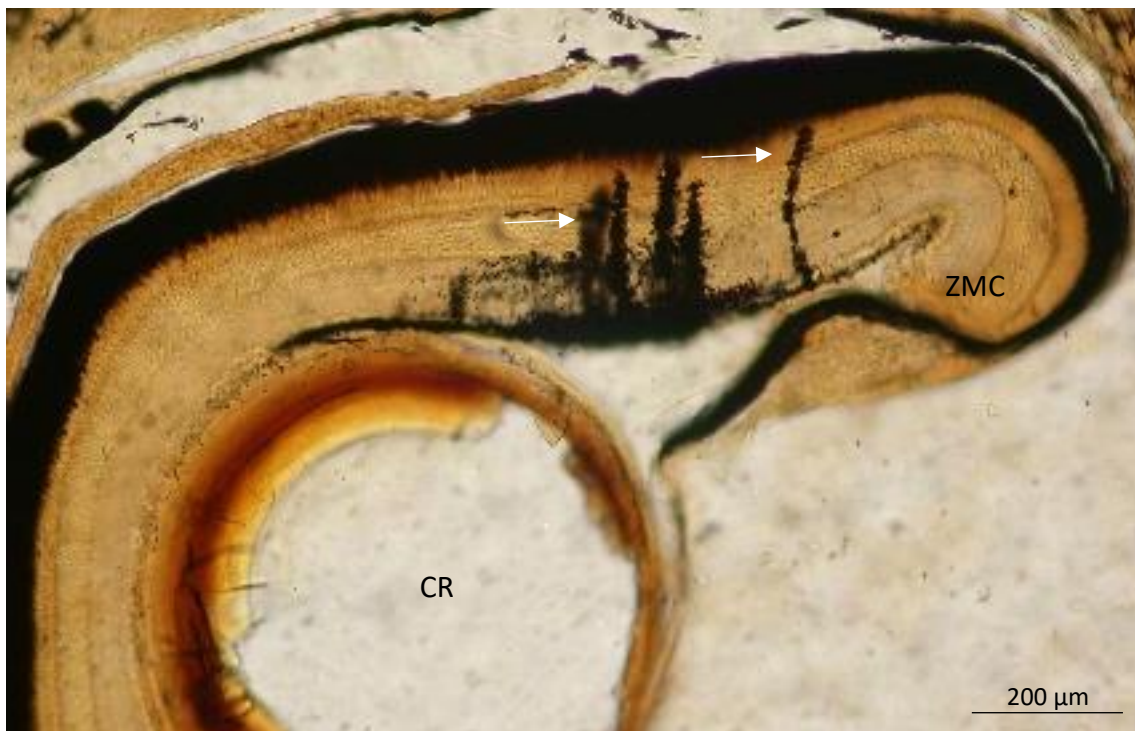
Las diferentes zonas de la ZMC son equivalentes a las descritas en pez cebra adulto (31), coincidiendo la variación en forma y tamaño de dichos núcleos de cada zona.



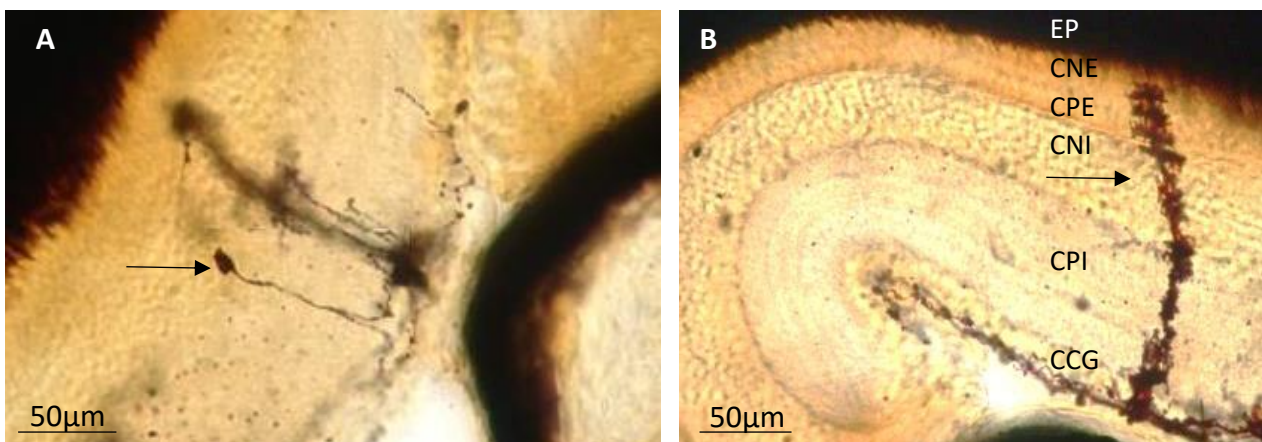
**Figura 11.** A. Micrografía electrónica de la ZMC con sus respectivas divisiones: Zona periférica, media y central. B. Imagen de la ZMC tomada de Raymond et al. 2006 (31). C. Aumento de la Zona periférica, donde se observan los espacios (flecha blanca) y el epitelio pigmentario (EP). D. Aumento de la Zona media, en donde las flechas blancas indican los espacios intercelulares.

### A.3. Técnica de Golgi

El método de Golgi es una técnica de gran utilidad para determinar la morfología y el tipo celular. Gracias a que las sales argénticas impregnan la totalidad de la célula nerviosa (ya sea neurona o glía), y un bajo porcentaje celular (40), se logró la identificación de diferentes tipos celulares (Fig. 12). En particular se reconoció una célula amácrina del tipo difusa, cuyo soma se encuentra en la CNI y su proyección dendrítica se dirige a la capa de las células ganglionares (Fig. 13 A), donde posiblemente contacte a una célula ganglionar. También se identificó glía de Müller (glía radial), extendida a lo largo de las diferentes capas de la retina (Fig. 13 B).



**Figura 12.** Vista panorámica de corte transversal de ojo de *A. charrua* con la técnica de Golgi. Se aprecian las diferentes capas de la retina, la ZMC (zona marginal ciliar) un grupo de células de Müller (flechas) y el cristalino (CR).



**Figura 13.** Técnica de Golgi, corte transversal de ojo de *A. charrua*. **A.** Se observa una célula amácrina, cuyo soma se encuentra en la CNI, y se proyecta hacia la capa de las células ganglionares. **B.** La flecha muestra una célula de Müller que se proyecta a lo largo de todas las capas de la retina (EP: epitelio pigmentario, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa plexiforme interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares).

## B. Proliferación celular en la zona marginal ciliar

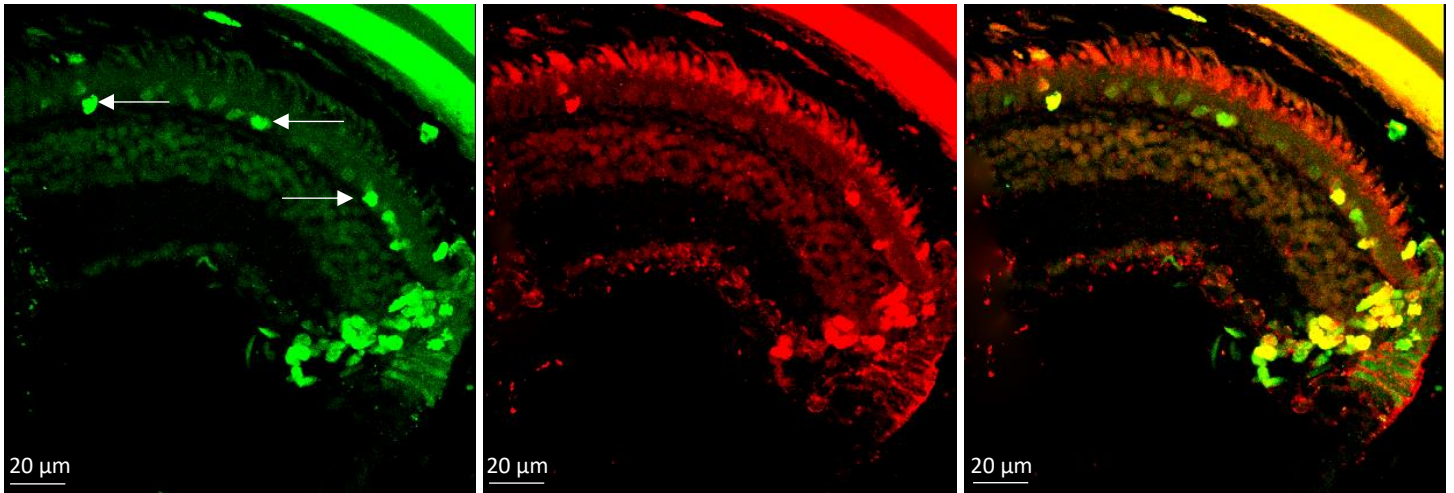
La característica fundamental de la ZMC es la capacidad proliferativa que permite la génesis de diferentes tipos celulares del ojo, durante el desarrollo y la vida. A los efectos de analizar la proliferación en la retina, se emplearon dos marcadores de proliferación.



**Figura 14.** A. Vista panorámica de un corte longitudinal de ojo de *A. charrua*, se visualiza el NO (nervio óptico), el CR (cristalino), tomada en el microscopio confocal. B. Aumento de las capas de la retina y la ZMC, tomada en microscopio óptico. C. Capas de la retina teñidas inespecíficamente, tomada en el microscopio confocal.

### B.1. Identificación de las diferentes poblaciones marcadas y localización

Mediante la utilización de inmunohistoquímica se revelaron los marcadores de proliferación celular utilizados, es decir, el IdU y CIdU. Células que captaron uno o ambos marcadores, se encontraban en fase S de síntesis de ADN en el momento de la inyección y durante la vida media de la sustancia en el organismo. Los núcleos marcados permitieron discernir la zona proliferante, la ZMC propiamente dicha. Zona con las características descritas en la sección anterior, compuesta por diferentes tipos celulares que difieren tanto en su forma como su destino. Gracias al protocolo utilizado (Fig. 4) se identificaron tres poblaciones: aquellas que incorporaron el IdU en el día 0, CIdU en el día 29 o células que incorporaron ambos marcadores en el día 0 y 29.



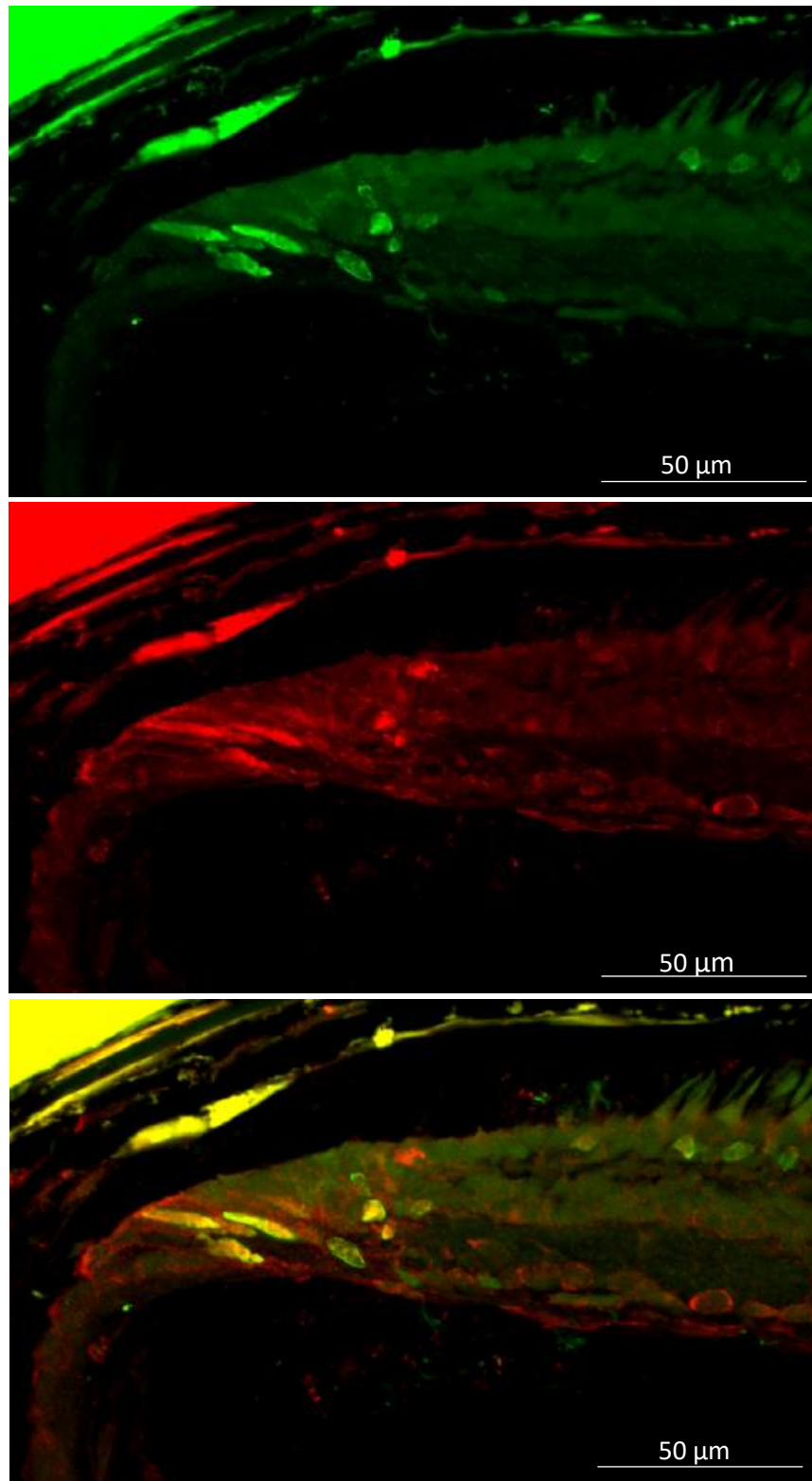
**Figura 15.** Corte transversal de retina, se observa en detalle la ZMC. En verde los núcleos IdU+ (A), rojo los CldU+ (B) y amarillo los doble marcados (C), en un apilado de 30  $\mu\text{m}$ . Se observan además núcleos marcados en la CNI (flecha).

Núcleos IdU positivos. Mediante inmunohistoquímica indirecta se revelaron los núcleos que incorporaron el IdU en el día 0 del experimento. Esta señal se observa como una marcación nuclear de color verde (Fig. 15 y 16). El tiempo de sobrevida de estas células fue de 30 días postinyección, por lo cual, esa ventana temporal le permitió a esas células cumplir con ciclos mitóticos consecutivos y realizar migraciones, por lo que se observó gran cantidad de núcleos IdU+ de variable intensidad de marcación, de diferente forma, tamaño y distribución. Su forma y distribución es heterogénea, coincidiendo con las áreas descritas en las secciones anteriores. Los núcleos IdU+ presentes en la zona medial/periférica son de gran tamaño y forma alargada (Fig. 15 y 16). Los núcleos pertenecientes a la zona central son más pequeños y de forma redondeada (Fig. 15 y 16). También se observó una posible ruta migratoria en la CNE, donde se visualizan núcleos redondeados, que disminuyen en número a medida que se alejan de la ZMC (Fig. 15 y 16). El número de células IdU positivas fue ligeramente mayor que el de células CldU positivas.

Núcleos CldU positivos. En el segundo pulso el marcador de proliferación utilizado fue el CldU, este análogo de la timidina al igual que el IdU es captado por las células que se encontraban en fase S al momento de la administración, se visualiza de color rojo. Su aplicación se realizó al día 29 del experimento, el tiempo de sobrevida de estas células fue de 24 horas postinyección, por lo cual no tuvieron tiempo de dividirse sucesivas veces como con el IdU. Las células que incorporaron este marcador se encontraron en su mayoría en la ZMC. La morfología y el tamaño, al igual que los núcleos IdU+, están determinados por la localización, siendo los núcleos presentes en las zonas periférica y medial los de mayor tamaño y forma alargada; mientras que los núcleos que se encuentran en la zona central son de menor tamaño y redondeados (Fig. 15 y 16). El número de células CldU positivas fue menor que el de IdU positivas.

Núcleos IdU/CldU positivos. En algunos casos se observaron células que fueron capaces de captar la marcación de ambas sustancias incorporadas al animal en ambos pulsos. La colocalización de los marcadores de proliferación revelados por inmunofluorescencia se

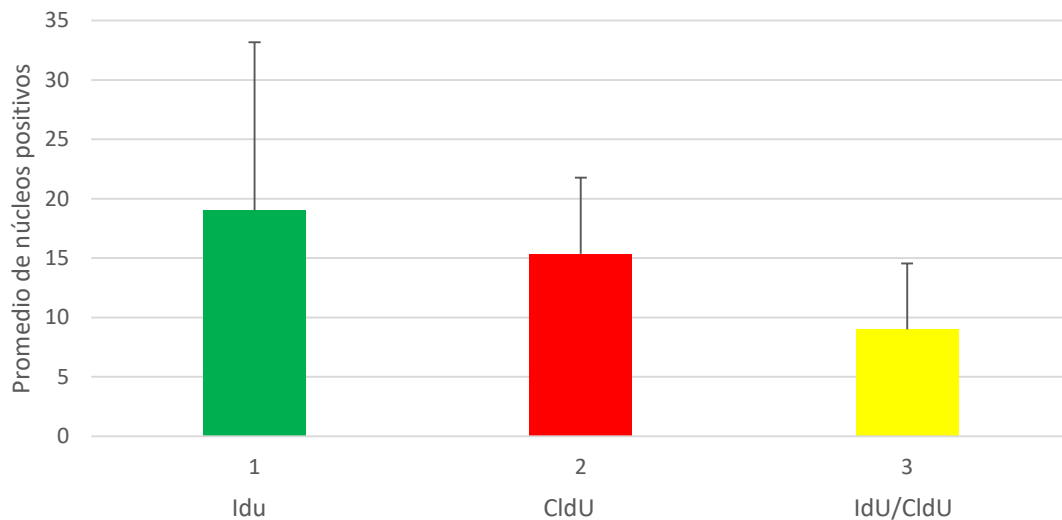
visualizó en color amarillo. Esta corresponde a núcleos que captaron ambos marcadores celulares, es decir, células que se encontraban en fase “S” de síntesis de ADN en el momento de la primera (IdU) y la segunda inyección (CldU). Dichas células se encuentran en las tres zonas de la ZMC: central, media y periférica, con la morfología y tamaño característico de cada zona (Fig. 15 y 16). Los núcleos Idu/CldU positivos poseen la característica de encontrarse en su mayoría en la ZMC.



**Figura 16.** Corte transversal de retina, se observa en detalle la ZMC. En verde los núcleos IdU+ (A), rojo los CldU+ (B) y amarillo los doble marcados (C), en un apilado de 30 µm.

## B.2. Cuantificación celular

Para la cuantificación celular se contabilizaron los núcleos positivos de 16 cortes transversales centrales (cerca del nervio óptico) de 5 peces, ubicados en la ZMC. Se calculó el promedio y la desviación estándar, de cada tipo de núcleo por corte, obteniéndose los siguientes resultados:



**Figura 17.** Resultados de la cuantificación de los núcleos Idu+ (verde), Cldu+ (rojo) y Cldu/Idu+ (amarillo) en la ZMC, con el desvío estándar.

Se observó una diferencia entre la cantidad de los diferentes tipos de núcleos, obteniéndose más núcleos IdU positivos (19.025 +/- 14.154), siguiendo en cantidad los CldU positivos (15.363 +/- 6.418) y finalmente en menor número los doble marcados IdU/CldU positivos (8.987 +/- 5.547) (Fig. 17).



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización histológica

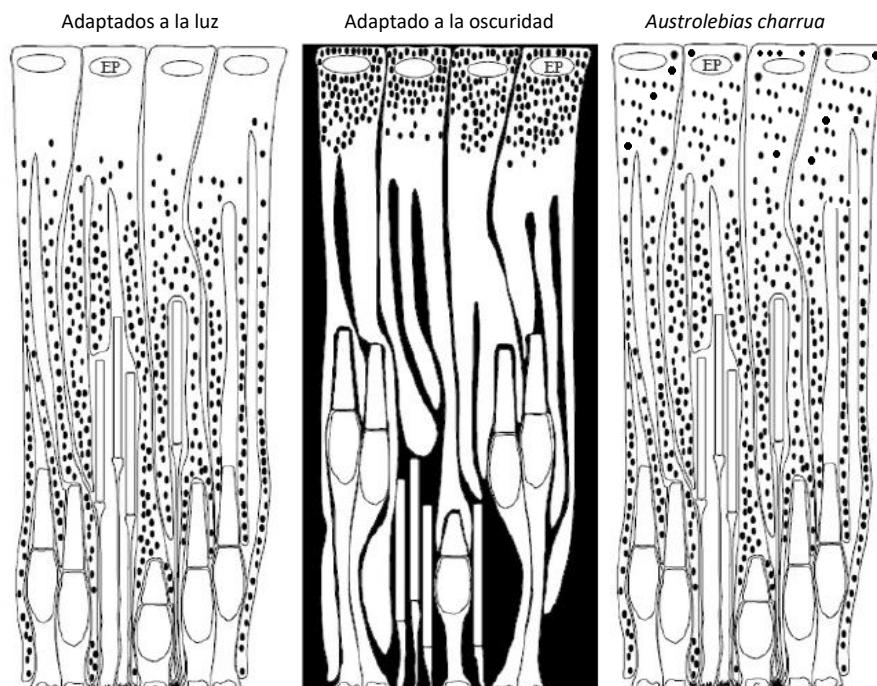
#### 4.1.1 Adaptaciones a la luz y oscuridad

La caracterización histológica de la retina de *A. charrua* permite concluir que comparte propiedades morfológicas generales con los demás peces (9). Asimismo se observan características propias de la especie que resultan novedosas. Las diferentes técnicas aplicadas aportaron información acerca de posibles adaptaciones de dichos peces al ambiente cambiante en el que viven.

Los grosores y la composición celular de las capas son propios de peces diurnos macrópticos, como zebrafish (9 y 41). Esto tiene sentido dado que son peces que presentan dimorfismo sexual y las hembras escogen a los machos en función a claves visuales como la coloración y el tamaño (42).

Sin embargo, la distribución en paquetes de las células ganglionares que se ven gracias a la aplicación de la técnica de Cajal, es considerada una característica propia de peces de hábitos nocturnos (9).

Según Marc (1998), los animales adaptados a la luz presentan una distribución de melanosomas a lo largo de los SF, mientras que los adaptados a la oscuridad poseen una distribución más restringida a la zona perinuclear de las células del EP. La MET permitió observar que la distribución de los melanosomas en *A. charrua* es tanto a lo largo de los SF como a nivel perinuclear de las células del EP (Fig. 18), esto podría indicar un estado intermedio, una adaptación de individuos que a lo largo de su vida están expuestos a condiciones de luz y oscuridad.



**Figura 18.** Imagen comparativa entre peces adaptados a la luz y adaptados a la oscuridad (EP: epitelio pigmentario; SF: segmentos de fotorreceptores) (43).

Este conjunto de características podría verse explicado por las condiciones ecológicas de esta especie. Es sabido que los hábitos alimenticios, comportamentales y el tipo de hábitats determinan la ecología visual de las especies (9). Asimismo la turbidez del agua tiene un fuerte impacto en la capacidad para localizar y cazar presas, así como para evadir predadores (44). El hecho de ser peces anuales que habitan charcos temporales (45), implica que al principio de la temporada el agua se encuentra más clara, permitiendo que los animales tengan una mayor visión del medio que los rodea, a medida que la temporada avanza la turbidez aumenta, alcanzando niveles en donde podría decirse que los peces se encuentran a condiciones de oscuridad incluso durante el día. Teniendo en cuenta que *A. charrua* es una especie carnívora con hábitos diurnos (45), que habita aguas turbias, es de esperarse que tenga un sistema visual desarrollado y con características adaptadas a la luz y oscuridad, que le beneficie durante la caza, evasión de depredadores y cortejo.

#### **4.1.2. Características histológicas citoarquitecturales**

La técnica de Cajal permitió apreciar que las células horizontales son las menos abundantes de la CNI, así como su distribución, siendo esta de una monocapa o bicapa en ocasiones; ambos datos coinciden con lo esperado para una especie como *A. charrua*, en la cual la visión es un sentido predominante y son predadores diurnos (9).

La fovea es una zona que se caracteriza por una depresión de las capas de la retina, en donde hay una concentración de FR, generalmente conos. Se han descubierto especies de teleósteos en las profundidades del mar en donde la fovea es exclusivamente compuesta por bastones (46), o incluso por conos y bastones (47). Las diferentes técnicas coincidieron en demostrar la ausencia de una fovea, cortes seriados no permitieron evidenciar una zona de la retina que presente las características de una fovea mencionadas. El hecho de que no posean una zona de agudeza visual como tal podría estar indicando que las condiciones del charco, como la turbidez, harían de esta zona de la retina una porción innecesaria.

#### **4.1.3. Ultraestructura de la retina y ZMC**

La ultraestructura de la retina y la zona marginal ciliar estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión, mostró diferentes morfologías y tamaños celulares. Además de proporcionar información acerca de la distribución de los melanosomas (Fig. 10), ya mencionada, también expuso al detalle la ZMC.

La ZMC se identificó, en conjunto con los marcadores de proliferación y la MET como la zona proliferativa, pudiendo dividirse en tres zonas en función de la forma y tamaño de los núcleos: zona central, media y periférica (Fig. 11). Esta división coincide con la descrita para zebrafish según la expresión génica diferencial de las diferentes poblaciones celulares de la ZMC (31), indicando nuevamente una semejanza con dicha especie.

Además se evidenció la presencia de espacios intercelulares (Fig. 11), la bibliografía sugiere que estos espacios son característicos de zonas en donde las células se encuentran en migración, como por ejemplo la zona subventricular germinal en cerebro de mamífero (48). Se observaron agujeros en la zona periférica, pudiendo ser estos algún tipo de capilar nutritivo con contenido filtrado.

#### **4.1.3. Análisis morfométrico comparativo en diferentes edades**

En relación a la comparación de las diferentes capas de la retina en edades crecientes, se observó una tendencia al aumento de la capa plexiforme interna, y una tendencia a la disminución de la capa nuclear interna. La bibliografía sugiere que hay una correlación positiva entre el grosor de la CPI y el grado de complejidad de las interacciones neuronales, sugiriendo que dichas interacciones aumentan con la edad del animal (9).

#### **4.2. Proliferación celular de la zona marginal ciliar**

Mediante la aplicación de los marcadores de proliferación celular en *Austrolebias charrua*, con una ventana temporal de 29 días, la inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares, las que captaron el IdU, las que captaron el CldU y las que captaron ambos marcadores. La señal de estos marcadores revelados, mostró la localización del nicho proliferante, localizado en la ZMC.

Los marcadores de proliferación utilizados (IdU, CldU), son análogos de la timidina y al BrdU y presentan una estructura química que sólo varía en el halógeno. En estudios realizados con peces se determinó que el tiempo de biodisponibilidad metabólico del BrdU es de 30 minutos a 4 horas (49; 50), por lo que podemos esperar que los tiempos de biodisponibilidad del IdU y el CldU sean similares al BrdU. De este modo, todas las células que se encontraron en algún momento de la fase "S" de síntesis de ADN, captaron los marcadores de proliferación utilizados, durante el tiempo de biodisponibilidad.

##### **4.2.1. Identificación de las diferentes poblaciones marcadas y localización**

Las células IdU+ (Alexa-fluor 488-verde) que tuvieron un tiempo de sobrevivencia postinyección de 30 días, se encontraron en dos zonas. Como era de esperar, núcleos IdU+ fueron encontrados en la ZMC, en las tres zonas descritas: periférica, media y central, coincidiendo con la forma y tamaño de cada zona. Además se observaron núcleos en la CNE correspondiente a la capa de los núcleos de los fotorreceptores, disminuyendo en número a medida que se alejaban de la ZMC, pudiendo estas últimas ser células que están migrando, sugiriendo lo que podría ser una ruta migratoria. La señal de las células IdU+ se observó en diferentes intensidades debido al largo tiempo de sobrevivencia post administración del IdU, donde consecutivas divisiones mitóticas puede generar una pérdida de la intensidad de señal con el paso del tiempo. La coloración diferencial se observa en la figura 16, en donde los núcleos alargados, los

periféricos, tienen una coloración más pálida, indicando un mayor número de divisiones mitóticas que aquellos núcleos de coloración más intensa, como son los redondeados más centrales de la misma imagen. Esta diferencia en la intensidad también es observable en la posible ruta migratoria de la CNE. Los núcleos observados en la CNE sugieren que dichas células se diferenciaron o podrían diferenciarse en conos, ya que el linaje de bastones se postula proviene de la glía de Müller que se desdiferenciaría y se transformaría en una progenitora capaz de dar todas las estirpes celulares en caso de lesión de la retina en zebrafish (32, 33).

Las células CldU+ (Alexa-fluor 543-rojas) que tuvieron un tiempo de sobrevida postinyección de 24 horas, mostraron una localización más restringida a la ZMG, es decir que su visualización en LA CNE fue más esporádica. Esto se explica porque en un período de 24 horas, la migración no sería posible. Asimismo los núcleos CldU+ presentes en la CNE podrían explicarse por divisiones mitóticas ocurridas allí mismo, por progenitores neurales aún no diferenciados que mantienen la capacidad mitótica. Los núcleos CldU+ localizados en la ZMC, se hallaron en las tres zonas descritas, al igual que los IdU+, con forma y tamaño correspondiente a la zona en la cual se encontraban. La señal de estas células siempre fue clara y de fácil reconocimiento, debido a que la sustancia captada, no se fracciona con eventuales mitosis consecutivas en el tiempo, debido al lapso de sobrevida de 24 horas.

Las células doble marcadas IdU/CldU+ (amarillas) captaron ambos marcadores de proliferación celular administrados separadamente en el tiempo, y en general permanecieron confinadas a la ZMC, lo que concuerda con la zona proliferativa de retina en vertebrados (51). Estas células doble marcadas se las interpreta como las progenitoras, por su alta capacidad mitótica y por encontrarse cerca de su sitio de origen. Dentro de estas células también se encuentran las candidatas a células madre, con una división celular asimétrica, en donde una de las hijas permanece indiferenciada con el fin de autopropetarse y mantener de forma activa la población celular proliferante, aunque para confirmar esto se tendrían que utilizar otros marcadores específicos para células madre neurales (e.g. vimentina, nestina). La colocalización de los marcadores es demostrada en el merge entre la imagen tomada en el canal 1 y el canal 2 del microscopio confocal es clara y no genera incertidumbre de su identificación como célula doble marcada.

#### **4.2.2. Cuantificación celular**

Respecto a los datos de la cuantificación celular, las células IdU+ son las más abundantes. Esto parece ser obvio, ya que el tiempo de sobrevida de los peces postinyección del IdU es de 30 días, y en este lapso, estas células han podido dividirse consecutivamente aumentando en número, comparando con la proliferación de un día como ocurre en el caso de las células CldU+. Sin embargo la diferencia numérica entre ambas poblaciones celulares no es tan marcada como en el cerebro de *A. charrua* (52), esto podría deberse a diferentes motivos. El primero sería que la marcación de las

células IdU+ fue diluida por sucesivas divisiones mitóticas, pudiendo perder de esta manera la marcación de la población de células más proliferante. Otra posible explicación sería que por el tiempo de sobrevivencia de 30 días, dichas células podrían haber migrado a su destino y encontrarse en otras zonas que no sean la ZMC. Otra causa sería que un lapso de 30 días en la vida de estos peces (ya adultos) podría significar una reducción en la proliferación causada por el envejecimiento natural, indicando que en el día 0 la proliferación es mayor que en el día 29 en la retina. La población de células doble marcadas es, como era de esperarse, menor que la de células que solo incorporan uno de los marcadores, ya para la obtención de una célula doble marcada ésta debía estar en la fase "S" durante el primer y segundo pulso. Sin embargo a diferencia de lo ocurrido en el cerebro de *A. charrua* (52), esta proporción no es tan baja, indicando que la ZMC en la retina tiene una alta actividad proliferativa. Esta mayor actividad proliferativa podría explicarse por la exigencia visual que presentan dichos peces, necesaria para funciones vitales como alimentarse, evitar depredadores y reproducirse. No existen antecedentes de estudios realizados con marcadores de proliferación y esta ventana temporal para la retina, por lo cual no es posible comparar estos resultados con lo que sucede en otras especies.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1. Caracterización histológica

1. La caracterización histológica de la retina mediante diferentes técnicas reveló su semejanza con la de otros teleósteos diurnos como zebrafish, así como con peces nocturnos
2. La retina de *A. charrua* presenta adaptaciones a condiciones de luz y oscuridad
  - Luz: grosores de las capas
  - Oscuridad: distribución en paquetes de las células ganglionares
  - Luz/oscuridad: distribución de los melanosomas de las células pigmentarias
3. La ultraestructura de la ZMC permite diferenciar tres poblaciones celulares con características distintivas como morfología y tamaño: zona periférica, media y central.
4. La variación de grosores de las capas de la retina con la edad, indica un aumento en la complejidad de las conexiones neuronales

### 5.2. Proliferación celular

1. La inmunohistoquímica reveló tres poblaciones celulares proliferantes en la retina de *Austrolebias charrua*:
  - Células IdU+: células proliferantes que migran
  - Células CldU+: células altamente proliferativas
  - Células IdU/CldU+: células que reentran en el ciclo celular, dentro de las cuales proponemos se encuentran las células madre
2. Las tres poblaciones proliferantes reveladas por la inmunohistoquímica fueron encontradas en la ZMC
3. Los núcleos IdU+ son los más abundantes, seguidos por los CldU+ y por último se encuentran los doble marcados IdU/CldU+
4. Se sugiere una ruta migratoria en la CNE, integrada por células IdU+

Este modelo de vertebrado resultó ser adecuado para estudiar el sistema nervioso. Conocer la histología y características proliferativas de los nichos neurogénicos, resulta en una herramienta poderosa a la hora de desarrollar terapias contra enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, entre otras.

Las conclusiones de este trabajo conllevan a innumerables interrogantes acerca de la proliferación y neurogénesis en retina de *A. charrua*, generando perspectivas de investigaciones a futuro, dentro de las cuales se encuentran las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es el porcentaje de células proliferantes que se diferencian en nuevas neuronas o glías? Esto se podría contestar con la aplicación de anticuerpos específicos neuronales y gliales.
2. ¿Existe una correlación entre la tasa proliferativa de la ZMC y las condiciones lumínicas? Para responder a esta pregunta se variarían las condiciones lumínicas de dos grupos de peces, manteniendo las demás condiciones.
3. ¿Las condiciones lumínicas influyen en otras modalidades sensoriales como la olfacción? Responder esto implicaría estudiar la tasa proliferativa en una zona que refleje este sentido, como el bulbo olfatorio; variando las condiciones lumínicas de dos grupos de peces, manteniendo las demás condiciones constantes.

Parte de estas preguntas son planteadas en el Proyecto de Maestría a realizarse en el 2017.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ramon y Cajal S. (1959). *Degeneration & regeneration of the nervous system* (Vol. 1). Hafner Pub. Co.
2. Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
3. Abrous, D. N., Koehl, M., & Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews*, 85(2), 523-569.
4. Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128
5. Zupanc, G. U. N. K. (2002). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), 250-275.
6. Zupanc, G. K. H. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(6), 649-670.
7. Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in neurobiology*, 80(6), 281-307.
8. Ogueta M. (2013). Tesis Doctoral: Caracterización de los progenitores neurales de retina del pez cebra adulto.
9. Wagner, H. J. (1990). Retinal structure of fishes. In *The visual system of fish* (pp. 109-157). Springer Netherlands.
10. Muñoz N. (2013). Trabajo fin de grado: Proliferación celular en la retina de teleósteos.
11. Ramón y Cajal S. (1892). La retina des vertebrés. *La Cellule*. 9:119-259
12. Kolb, H., Nelson, R., Ahnelt, P., & Cuenca, N. (2001). Cellular organization of the vertebrate retina. *Progress in brain research*, 131, 3-26.
13. Masland RH. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 4:877-886
14. Wässle H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Neurosci*. 5 (10):747-57
15. Johns PR y Fernald RD. (1981). Genesis of rods in the retina of teleost fish. *Nature*. 141-142
16. Otteson DC y Hitchcock PF. (2003). Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury induced regeneration. *Vis Res*. 43:927-36
17. Stenkamp DL. (2007) Neurogenesis in the Fish Retina. *Int Rev of Cytol*. Vol. 259
18. Andy J. Fischer and Thomas A. Reh. (2002) Identification of a Proliferating Marginal Zone of Retinal Progenitors in Postnatal Chickens. *Developmental Biology* 220, 197–210
19. R. Kubota, J.N. Hokoc, A. Moshiri, C. McGuire, T.A. Reh. (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Developmental Brain Research* 134:31–41



20. P. Hitckcock, M. Ochocinska, A. Sieh, D. Otteson. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Ret Eye Res.* 23:183-194.
21. TA. Reh, AJ. Fischer. (2006). Retinal stem cells. *Ethods Enzymol.* 419:52-73
22. Nieto J. M., Angulo A., Martínez G. C., Cuenca N. (2009). Neurogénesis en la retina de mamíferos adultos. 234; 134-139
23. Lyall, A. H. (1957). Cone arrangements in teleost retina. *Microscopical Science.* 98, 189–201
24. Müller, H. (1952). The structure and growth of the guppy retina (*Libistes reticulatus*) published in German. *Zoologische Jahrbucher- Abteilung Fur Allgemeine Zoologie Und Physiologie Der Tiere.* 63, 275–324 (Translated by Roswitha Lugauer).
25. Johns, P.R. (1977) Growth of the adult goldfish eye. III Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol.* 1977; 176:343–358
26. Meyer, R.L. (1978) Evidence from thymidine labeling for continuing growth of the retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp. Neurol.* 59:99–111
27. Scholes, J. H. (1976). Neuronal connections and cellular arrangement in the fish retina. In F. Zettler & R. Weiler (Eds.), *Neural Principles in Vision.* 63–93
28. Stenkamp, D. L., Barthel, L. K., & Raymond, P. A. (1997) Spatiotemporal coordination of rod and cone photoreceptor differentiation in the goldfish retina. *Journal of Comparative Neurol.* 382, 272–284
29. Harris WA y Perron M. (1998). Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int J Dev Biol.* 42, 299-304
30. Hitchcock PF y Kakuk-Atkins. (2004). The basis helix-loop-helix transcription factor. NeuroD is expressed in the rod lineage of the teleost retina. *J Comp Neurol.* 477(1): 108-117
31. Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL y Perkowski JJ. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol.* 6:36
32. Julian D, Ennis K y Korenbrot J. (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol.* 394, 271-282
33. Otteson DC, D'Costa AR y Hitchcock PF. (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol.* 232: 62-76
34. Fernandez 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.* 12-24.
35. Rosillo, J. C., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Garcia-Verdugo, J. M., & Fernandez, A. S. (2013). Olfacto-retinalis pathway in *Austrolebias charrua* fishes: a neuronal tracer study. *Neuroscience,* 253, 304-315.
36. Carbajo Pérez E, Carbajo Pérez S, Triviño A, Hernández LC, López A. (1994). Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica. *Univ Cor Serv Pub.* p. 135-156.

37. Steel, G.C. (1977). Experimental techniques for cell kinetic studies. En: Growth Kinetics of Tumors (Ed. by Steel, G.G.) p. 86. Clarendon Press. Oxford.
38. Gratzner, H.G. (1982). Monoclonal antibody to S-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474-475.
39. Vega, C.J., and Peterson, D.A. (2005). Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nature Methods*. 2:167-169
40. Ramón y Cajal S., y De Castro F. (1933). Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Salvat, Barcelona.
41. Menke A., Spitsenbrgen J., Wolterbeek A., Woutersen R. (2011). Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology* 39: 759-775
42. Passos C., Tassinio B., Loureiro M., Rosenthal G. (2013) Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural Processes* 96: 20–26
43. Marc, R. E. (1998). The retinal basis of vision. Capítulo: The structure of vertebrate retinas. Amsterdam: Elsevier Science BV, páginas 3-19.
44. Pekcan-Hekim, Z. (2007). Effects of turbidity on feeding and distribution of fish. Ph.D. Tesis. Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia
45. Berios N., García G., O. de Sá R. (2016). Annual Fishes. Miami: CRC Press.
46. Munk. O. (1966) Ocular anatomy of some deep-sea teleosts. *Dana Rep.*, 70, 1-62.
47. Munk, O. (1969). The eye of the 'four-eyed' fish *Dialommus Juscus* (Pisces, Blennioidei, Clinidae). *Vidensk. Meddr Dansk naturh. Foren.*, 132, 7-24.
48. Doetsch F., García-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *The Journal of Neuroscience*, 17, 5046-5061.
49. Zupanc, G. K., & Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 213-233.
50. Hinsch, K., & Zupanc, G. K. H. (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience*, 146(2), 679-696.
51. Agathocleous, M., & Harris, W. A. (2009). From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 45-69.
52. Torres M. (2014). Nuevos abordajes experimentales para el estudio de la neurogénesis en el encéfalo de *Austrolebias charrua* (*Cyprinodontiformes - rivulidae*).