

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL ENCÉFALO DEL PEZ *GAMBUSIA AFFINIS* (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE)

Fernández, Rocío

Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Humanidades y Ciencias.
Universidad Nacional del Litoral.
Directora: lungman, Josefina
Co-directora: Romero, Natalí

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Histología, Neurobiología, Teleósteos

INTRODUCCIÓN

Gambusia affinis (Baird y Girard, 1853, Cyprinodontiformes: Poeciliidae) es una especie invasora establecida a nivel global. Fue introducida en ecosistemas de agua dulce a lo largo del siglo XX, fuera de su rango de distribución natural, para el control biológico de larvas de mosquitos. En los últimos años, se ha incrementado el interés en esta especie como modelo biológico para diferentes tipos de investigaciones debido a que son pequeños, sencillos de manipular en grandes cantidades y se reproducen fácilmente en cautiverio. Su tolerancia fisiológica, rápido crecimiento poblacional, variabilidad genética y buena adaptabilidad a diferentes entornos, hacen de *G. affinis* un organismo ideal para estudios de toxicología y ecotoxicología (Touaylia y Labiadh, 2019). Sin embargo, su uso en estudios de neurotoxicidad ha sido limitado por la falta de una caracterización detallada de la morfología de su encéfalo. Dado que las estructuras encefálicas con un alto grado de organización laminar, como el tectum óptico (TO) y el cuerpo cerebelar (CC), juegan un papel crucial en la integración de información sensorial, control motor y funciones cognitivas (Hernández Moreno, 2014; Wullimann y col., 2012; Kappers y col., 1936), es fundamental contar con una línea de base precisa sobre su morfología. Este conocimiento permitirá un mejor entendimiento de su neurobiología y proporcionará un marco de referencia para futuros estudios de monitoreo biológico y ensayos de neurotoxicidad. En el presente trabajo se exponen resultados preliminares sobre la histología de dos importantes estructuras laminares: el TO y el CC.

OBJETIVOS

- Describir la histología del tectum óptico y el cuerpo cerebelar del encéfalo de *Gambusia affinis*, estructuras clave para la integración sensorial y control motor, como base para futuros estudios de neurotoxicidad.

Título del proyecto: Nanoecotoxicología: efectos de nanopartículas de plata (NPsAg) sobre organismos acuáticos.

Instrumento: CAI+D

Año de convocatoria: 2020

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Dra. Luciana Regaldo



METODOLOGÍA

Se utilizaron 5 individuos adultos machos de *G. affinis* de longitud total promedio de $24,2 \pm 1,7$ mm, longitud dorsal craneal $4,9 \pm 0,5$ mm, ancho craneal $2,8 \pm 0,5$ mm y peso promedio de 168 ± 30 mg. Fueron recolectados en la laguna del Parque General Belgrano de la ciudad de Santa Fe ($31^{\circ}39'46.0''S$ $60^{\circ}42'37.6''O$) y mantenidos en peceras de 30 L en agua de cloro durante 24 horas previas a su sacrificio. La eutanasia fue realizada mediante la técnica de enfriamiento rápido-inmersión en agua helada ($0^{\circ}C$) hasta el cese de los movimientos operculares (Leris y col., 2019; Wilson y col., 2009). Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (amortiguado, pH $7,2 \pm 0,2$) y se mantuvieron en esta solución por 24 horas a $4^{\circ}C$.

Se empleó un método de descalcificación adaptado a ejemplares de pequeño tamaño para seccionar los encéfalos conservando su posición dentro del cráneo (Tucker y Shapiro, 1971). En primer lugar, se diseccionó la porción anterior de los peces y las cabezas de los ejemplares previamente fijados fueron introducidas en el agente descalcificador (solución de ácido nítrico al 5%) durante 2 horas. Posteriormente, se sumergieron en sulfato de sodio al 5% por 24 horas y, luego, se lavaron en agua corriente por el mismo período de tiempo. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados en etanol, clarificados en xileno y embebidos en parafina. La obtención de cortes sagitales seriales en parafina a $5 \mu m$ se llevó a cabo con un micrótopo, los cuales fueron montados y teñidos con hematoxilina y eosina utilizando un protocolo estándar (Luna, 1968). La posterior observación y captura de imágenes de las diferentes partes del encéfalo que resultaron de interés se hizo con un microscopio óptico (Optika, modelo B-293PLi) con cámara digital adjunta. Se describen el TO y el CC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta una dirección rostro-caudal (Figura 1), a nivel de mesencéfalo o cerebro medio, dorso-lateralmente se destaca una estructura pareada que posee forma circular, el TO. Caudalmente, a nivel del rombencéfalo o cerebro posterior, de manera dorsal se observa el cerebelo que presenta una forma ovalada en sentido latero-lateral y está formado por dos lóbulos ovoides.

Mesencéfalo: tectum óptico

El TO es una estructura bilobulada que forma la parte dorsal del mesencéfalo, en el borde superior del ventrículo tectal (Wullimann y col., 2012; Kappers y col., 1936). En teleosteos, dicha estructura consta de cuatro zonas (zona gris y blanca superficial, zona central, zona blanca profunda y zona gris periventricular), las cuales se pueden subdividir en capas y cuyo número puede variar debido a la gran diversidad morfológica interespecífica que presenta el encéfalo en este grupo (Abdelnaeim Hussein y Cao, 2018; D'angelo, 2013; Wullimann y col., 2012; Ito y col., 2007; von Bartheld y Meyer, 1987). En el caso de *G. affinis*, se observan 6 capas (Figura 2) que se distinguen por la concentración de diferentes tipos de neuronas, similar a lo registrado para otras especies (von Bartheld y Meyer,

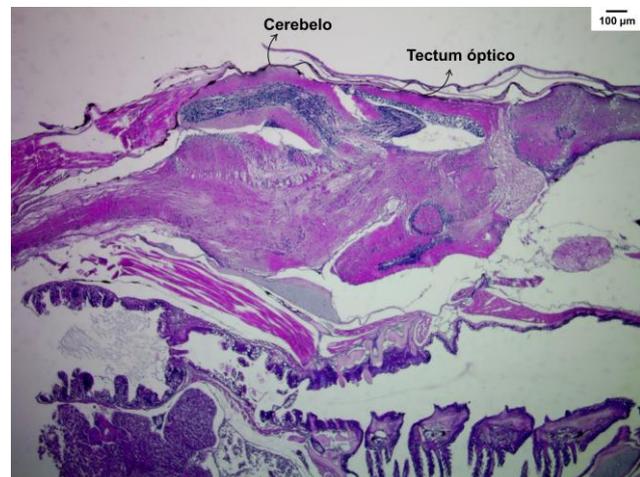


Figura 1. Microfotografía (4X) de corte sagital de la región craneal de *G. affinis*. Dorsalmente y en dirección rostro-caudal se ubica el tectum óptico seguido del cerebelo.

1987; Vanegas y col., 1974). Teniendo en cuenta la terminología en latín utilizada por Vanegas y col. (1974), desde la capa más externa a la más interna se considera la presencia de los siguientes estratos: *Stratum fibrosum marginale* (SM), *Stratum opticum* (SO), *Stratum fibrosum et griseum superficiale* (SFGS), *Stratum griseum centrale* (SGC), *Stratum álbum centrale* (SAC), *Stratum periventriculare* (SPV).

En la superficie se encuentra el SM, de apariencia vítrea, compuesta por escasos somas neuronales y una gran cantidad de neuropilo (una red pericelular o superficial de prolongaciones dendríticas). Por debajo, se delinea una fina capa de aspecto estriado, carente de somas neuronales, que podría corresponderse con las fibras nerviosas ópticas del SO descrito en Kappers y col. (1936), las cuales se empaquetan de manera ordenada y en paralelo (en la misma dirección) otorgándole dicha configuración.

A continuación, se dispone el SFGS el cual es una capa de mayor grosor que las descritas anteriormente, poblada de más somas con núcleos redondeados de diferentes tamaños. Luego, se presenta el SGC que constituye una capa similar a la anterior, pero con gran afinidad a la eosina. De acuerdo con Bernstein (1970), de esta capa se originan las principales vías eferentes del TO, las cuales ingresan a la siguiente capa denominada SAC, otorgándole una apariencia estriada. Asimismo, este estrato adquiere una apariencia muy similar al SO, pero en la cual se observan escasos y pequeños núcleos. Por último, se encuentra el SPV que corresponde a la capa más profunda y amplia (de aproximadamente 15 células de espesor), la cual aparece poblada densamente por núcleos más pequeños y densos que el resto de las capas, que generan una intensa basofilia. A su vez, este estrato se tiñe intensamente revelando que los somas neuronales se encuentran muy cercanos entre sí y poseen núcleos de gran tamaño, con escaso citoplasma rodeándolos, generando un aspecto granular.

Rombencéfalo: cuerpo cerebelar

Como en todos los teleosteos, anatómicamente el cerebelo de *G. affinis* se divide en 3 partes: el lóbulo vestibulo lateral, el cuerpo cerebelar y la válvula cerebelar. A su vez, dichas estructuras se organizan en capas de sustancia gris, cada una con las características distintivas típicas de vertebrados. El CC consta de tres capas (Figura 3). La capa más externa se corresponde con la capa molecular (CM) que se tiñe poco, donde se ven escasos somas, muy separados entre sí, con una cantidad

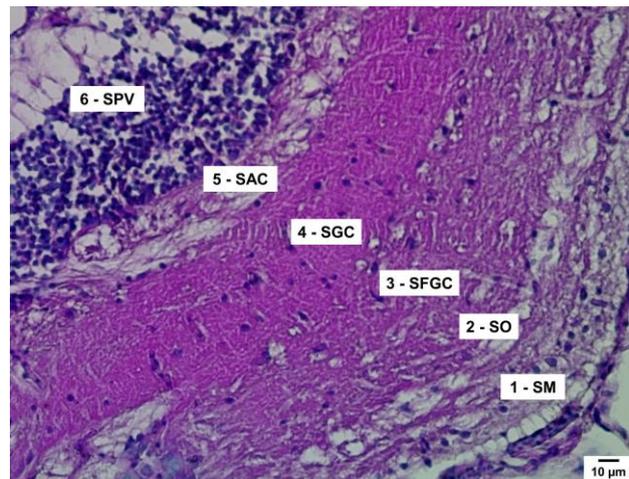


Figura 2. Microfotografía (40X) del tectum óptico de *G. affinis* donde se evidencia la organización laminar: 1-SM (*Stratum fibrosum marginale*), 2-SO (*Stratum opticum*), 3-SFGC (*Stratum fibrosum et griseum superficiale*), 4-SGC (*Stratum griseum centrale*), 5-SAC (*Stratum album centrale*), 6-SPV (*Stratum periventriculare*).

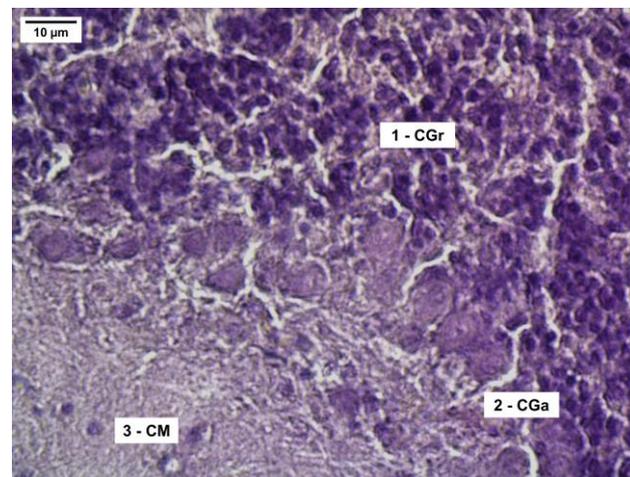


Figura 3. Microfotografía (100X) de las 3 capas que constituyen al cuerpo cerebelar de *G. affinis*: 1- CGr (capa granular), 2- CGa (capa ganglionar), 3- CM (capa molecular).

reducida de citoplasma rodeando el núcleo y donde predomina la presencia de neuropilo. La siguiente capa es la capa ganglionar (CGa) y está compuesta por células de Purkinje, neuronas características del cerebelo, que se disponen en una hilera desordenada y cuyos somas son notablemente grandes y con forma de matraz, contando con un único axón que representa el comienzo de las eferencias cerebelosas y numerosas dendritas que arborizan en la capa molecular. La capa más profunda es la capa granular (CGr) que, a diferencia de la capa molecular, se tiñe fuertemente obteniendo un aspecto moteado en consecuencia de la presencia de los abundantes núcleos de las células granulosas que se encuentran muy cercanas entre sí, con somas con escaso citoplasma. Al mismo tiempo, en esta misma capa, se pueden encontrar glomérulos que forman abundantes zonas pálidas de aspecto anastomosado, las que se observan intercaladas con los cúmulos de células granulares.

CONCLUSIÓN

El patrón general de organización anatómica observado en las estructuras descritas es típico de teleósteos. En cuanto a la histología, el cuerpo cerebelar dispone de una organización característica de vertebrados, mientras que, el tectum óptico presenta variaciones en relación a lo registrado para otras especies de peces, lo cual concuerda con la gran diversidad interespecífica citada para teleósteos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Abdelnaeim Hussein, M. N., Cao, X.** 2018. Brain anatomy and histology in teleosts. *Benha Vet. Med. J.*, 35(2), 446-463.
- Bernstein, J. J.**, 1970. 1 Anatomy and physiology of the central nervous system. *Fish physiology*, 4, 1-90. Academic Press.
- D'angelo, L.**, 2013. Brain atlas of an emerging teleostean model: *Nothobranchius furzeri*. *Anat. Rec.*, 296(4), 681-691.
- Hernández Moreno, C.** 2014. Respuesta hemato-neurológica en adultos y larvas de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a la acrilamida. Tesis doctoral.
- Ito, H., Ishikawa, Y., y col.** 2007. Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain Behav. Evol.*, 69(2), 76-86.
- Kappers, C. A., Huber, G. C. y col.** 1936. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates including man. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 84(6), 709-711.
- Leris, I., Kalogianni, E. y col.** 2019. Acute and sub-chronic toxicity bioassays of olive mill wastewater on the Eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 175, 48-57.
- Luna, L. G.**, 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3era Edición, 32-47. Blakiston Division, McGraw-Hill, New York.
- Touaylia, S., Labiadh, H.**, 2019. Effect of the exposure to Mn-doped ZnS nanoparticles on biomarkers in the freshwater western mosquitofish *Gambusia affinis*. *Int. J. Environ. Health Res.*, 29(1), 60-70.
- Tucker AM, Shapiro S.**, 1971. Procedure for sectioning the brains of small animals *in situ*. *Psychol Rep.* 29(2):563-8.
- Vanegas, H., Laufer, M., y col.** 1974. The optic tectum of a perciform teleost I. General configuration and cytoarchitecture. *J. Comp. Neurol.*, 154(1), 43-60.
- von Bartheld, C. S., Meyer, D. L.**, 1987. Comparative neurology of the optic tectum in ray-finned fishes: patterns of lamination formed by retinotectal projections. *Brain Res.*, 420(2), 277-288.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M. y col.** 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *American Association for Laboratory Animal Science* 48:785-789.
- Wulliman, M. F., Rupp, B. y col.** 2012. Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. pp. 12,13. Birkhäuser Verlag; Basel, Boston, Berlin.