

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE ADAPTACIONES DE LA RETINA DE PECES ANUALES *Austrolebias charrua*, EN RELACIÓN A CAMBIOS EN LA LUMINOSIDAD EN SU CICLO DE VIDA

I. Berrostequieta^a, J. C. Rosillo^{ab}, M. Torres-Pérez^a, A. S. Fernández^{a*}

^aUNIC-IIBCE Laboratorio de Neuroanatomía Comparada, Unidad Asociada a Facultad de Ciencias, Uruguay.

^bDepartamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay.

* Autor de correspondencia, email: afernandez@iibce.edu.uy; Tel: (598 2)4871616 int.110, Fax: 5982 5461

Recibido: Noviembre 2017. Aprobado: Mayo 2018.

Publicado: Junio 2018.

RESUMEN

Si bien la retina posee una citoarquitectura conservada en los vertebrados, es sabido que sus características dependen de la especie y de las condiciones lumínicas del entorno. *Austrolebias charrua* es un pez anual que vive en charcos donde la luminosidad varía drásticamente en su corto ciclo de vida. En este trabajo se aplicaron las técnicas de: Cajal de Castro, Inmunohistoquímica, marcado con un trazador neuronal (DiI) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) con el fin de identificar posibles características de la retina que le permitan adaptarse a un medio lumínico cambiante. La técnica Cajal de Castro y la Inmunohistoquímica, revelaron la composición celular y los grosores de las capas de la retina, característicos de peces con hábitos diurnos. Sin embargo, la capa de células ganglionares mostró una organización en grupos celulares separados por haces axonales, disposición descrita en la retina de peces nocturnos. La MET nos proporcionó detalles ultraestructurales de los fotorreceptores. En particular se evidenció la distribución de los melanosomas del epitelio pigmentario, que se encuentran distribuidos tanto a lo largo de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores como a nivel perinuclear de las células del epitelio pigmentario. Los animales adaptados a la luz presentan una distribución de melanosomas a lo largo de los segmentos de los fotorreceptores, mientras que en los adaptados a la oscuridad los pigmentos se ubican en la zona perinuclear. Este resultado nos permite proponer que *A. charrua* posee características histomorfológicas que le permiten adaptarse a un medio de luz variable.

Palabras clave: retina, peces, cambios de luminosidad, adaptaciones

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RETINA ADAPTATIONS OF ANNUAL FISHES *Austrolebias charrua*, IN RELATION TO CHANGES IN LUMINOSITY IN ITS LIFE CYCLE

ABSTRACT

Although the retina has a conserved cytoarchitecture in vertebrates, it is known that its characteristics depend on the species and the light conditions of the environment. *Austrolebias charrua* is an annual fish that lives in puddles where luminosity varies drastically in its short life cycle. In this work, the following techniques were applied: Cajal de Castro, Immunohistochemistry, a neuronal tracer (DiI) labeling and Transmission Electronic Microscopy (TEM), in order to identify characteristics of the retina that allow it to adapt to a light changing environment. The Cajal de Castro technique and Immunohistochemistry revealed the cellular composition and the thickness of the retina layers, showing characteristic of fish with diurnal habits. However, the ganglion cell layer showed an organization in cells groups separated by axonal bundles, a disposition described in the retina of nocturnal fish. The TEM gave us ultrastructural details of the photoreceptors. In particular, we evidenced the distribution of the melanosomes of the pigmentary epithelium, which are distributed both along the outer and inner segments of the photoreceptors and at the perinuclear level of the cells of the pigmentary epithelium. The animals adapted to light have a distribution of melanosomes along the photoreceptor segments, while in those adapted to darkness are located in the perinuclear zone. This result allows us to propose that *A. charrua* has histomorphological characteristics that allow it to adapt to a variable light environment.

Keywords: retina, fish, changes in luminosity, adaptation

INTRODUCCIÓN

La especie *Austrolebias charrua* pertenece al género de peces anuales *Austrolebias*, que habitan charcos temporales en Uruguay [1]. Su corto ciclo de vida comienza con la temporada de lluvias, en marzo-abril, y finaliza por el mes de noviembre cuando el charco se seca. En la siguiente temporada cuando los charcos se vuelven a formar, nacen los alevines que se encontraban en diapausa embrionaria enterrados en el sustrato del fondo del charco [2]. Las características del charco cambian, al inicio los charcos poseen abundante agua, mientras que a medida que pasan los meses se vuelven más turbios, disminuyendo gradualmente el paso de la luz a medida que comienza a secarse [2].

Asimismo la turbidez del agua tiene un fuerte impacto en la capacidad para localizar y cazar presas, así como para aparearse y evadir predadores [3]. Los animales obtienen información del ambiente que los rodea mediante una variedad de sentidos, dicha información sensorial es crítica para las actividades mencionadas anteriormente. Es sabido que las características y morfología de los órganos sensoriales como la retina en el caso de la visión, no está solo determinada por su clasificación taxonómica sino por los requerimientos funcionales impuestos por condiciones ecológicas y etológicas [4]. Teniendo en cuenta que *A. charrua* es una especie carnívora con hábitos diurnos, pero que en el transcurso de su ciclo de vida deberá adaptarse al final de la temporada a un hábitat con menor luminosidad [2], es valioso estudiar las características de su retina a los efectos de determinar si estas adaptaciones al medio repercuten en su citoarquitectura. La retina es un conjunto de capas celulares ubicado en la parte más interna del ojo, que alterna diferentes tipos de células nerviosas y conexiones entre ellas [5, 6, 7]. Histológicamente se han descrito características de la retina que optimizan el desempeño de animales diurnos, así como características propias de animales nocturnos. Entre estas características están los grosores relativos de las diferentes capas de la retina, la

organización de las células ganglionares [8] y la distribución de los pigmentos de las células del epitelio pigmentario [5]. Respecto a la distribución de los melanosomas, los animales adaptados a la luz presentan una distribución de melanosomas a lo largo de los segmentos de los fotorreceptores (SF), mientras que los adaptados a la oscuridad poseen una distribución restringida a la zona perinuclear de las células del epitelio pigmentario [5]. El objetivo de este trabajo consistió en identificar características histológicas de la retina de *A. charrua* que le permitan adaptarse a condiciones lumínicas variables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 10 machos adultos de la especie *A. charrua* provenientes de la localidad de la Coronilla en el Departamento de Rocha, República Oriental del Uruguay. Los peces fueron colectados en el mes de octubre previo al periodo de sequía que comienza en noviembre. La colecta se realizó con redes manuales. Luego de la colecta los peces fueron transportados y mantenidos en el acuario del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), durante todo el proceso de experimentación. Los peces utilizados para MET fueron fijados inmediatamente y los restantes se mantuvieron una semana en el acuario. Se colocaron en peceras individuales con agua de clorinada, con ciclo de luz oscuridad que reproduce las condiciones naturales de los charcos. Las peceras fueron ambientadas con vegetales y fibra de coco (turbas) a los efectos de reproducir el ambiente lumínico de ese momento del ciclo de vida del pez, en el charco. El acuario se mantuvo a una temperatura de 19°C, con aireadores permanentes y alimentados una vez al día con *Tubifex tubifex* (*Tubifex rivolorum*). El protocolo de experimentación realizado para todo el estudio, fue evaluado y aceptado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

Técnica Cajal de Castro

Se realizó la técnica de impregnación argéntica según Ramón y Cajal y De Castro [9]. Los peces (3) fueron anestesiados y decapitados. Las cabezas enteras de los mismos fueron sumergidas en una mezcla fijadora que consistió en: Hidrato cloral 5g; alcohol 96% 40ml; agua destilada 50ml y ácido nítrico 2ml. Se mantuvieron en esta mezcla por 5 días. Luego se realizó un pasaje de 24 h por 50 ml de alcohol al 96% con 3 gotas de amoníaco. Posteriormente se realizó la impregnación argéntica en nitrato de plata al 1.5% en agua destilada (en estufa a 37°C por 5 días). Luego de la reducción con hidroquinona (1g en 100ml de agua destilada) y formol (40%, 10ml) por 24h, las piezas se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (25%, 50 %, 75% 96% y 100%), luego se incluyeron en una resina epóxica de dureza media y se cortaron en micrótomos de deslizamiento horizontal a 30µm de grosor, en planos horizontales y transversales. Los cortes se montaron en araldita de forma seriada, utilizando portaobjetos y cubreobjetos de vidrio.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Tres peces fueron anestesiados con Eugenol (Eugenol 10% en etanol 96%) en concentración 1:1000ml. Una vez anestesiados se realizó la perfusión intracardiaca. Primero se removió la sangre del aparato circulatorio realizando un lavado con solución salina, provisto de un vasodilatador (Nitrito de sodio, NaNO_2) al 0.01% y un anticoagulante (Citrato de sodio, $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$) al 0.02%). Una vez realizado el lavado se pasó el fijador, paraformaldehído (PAF) (J.T. Barker) al 4%, con glutaraldehído al 1% diluido en buffer fosfato (BF) 0.1 M pH=7.2. Los ojos se disecaron y permanecieron en la misma solución fijadora durante 1 h a 4°C. Se lavaron 5 veces con BF y se post-fijaron con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en BF durante 1h a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente se lavaron 3 veces con BF, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y

fueron incluidos en resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA). Se realizaron cortes seriados semifinos de 0.5-2µm de grosor en ultramicrotomo (RMC-Power Tome XL). Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de metileno borácico al 1%, se visualizaron y fotografiaron con el microscopio óptico Nikon Eclipse E200 con el fin de localizar las áreas de interés a ser analizadas por MET. Una vez seleccionadas las áreas a estudiar en los cortes semifinos, se retallaron los bloques de resina para posteriormente realizar los cortes finos. Con el ultramicrotomo se obtuvieron secciones de 80nm que se colectaron con rejillas de cobre de ranura (2x1mm), previamente recubiertas con membranas de soporte de polivinilformvar (solución de formvar al 0.3% diluido en cloroformo). Luego de adheridas al film, se contrastaron por flotación en una solución saturada de acetato de uranilo acuoso al 2% (60°C durante 90 minutos) y luego en citrato de plomo al 3% (10 minutos en atmósfera de nitrógeno). Los análisis se realizaron en un MET Jeol JEM 1010 operado a 80kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95 para captura de las imágenes. Las mismas fueron procesadas empleando el programa Photoimpact.

Inmunohistoquímica y Microscopía Confocal

Otros 4 peces fueron perfundidos con PAF al 4% para la realización de diferentes técnicas histológicas. Se obtuvieron cortes a vibrátomo (LEICA VT100S) de 60µm que fueron teñidos con sustancias fluorescentes isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, por sus siglas en inglés), a los efectos de realizar una coloración de fondo para ser observada mediante la emisión de láseres (488nm y 543nm, respectivamente). Esto fue combinado con Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC). La combinación de la iluminación de láseres producida por la emisión de diferentes fluoróforos junto con la imagen proporcionada por DIC, permite un análisis con mayor detalle de las

características celulares de las capas de la retina. Se realizó inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-neuronal NeuN (Abcam ab177487) diluido 1:200 en BF con tritón al 0.3%, incubado toda la noche a 4°C. Como trazador neuronal en la retina fue utilizado el colorante lipofílico DiI (1,1',dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato), una carbocianina que fluoresce emitiendo luz en una longitud de onda de 563nm y puede ser utilizada en material fijado. Se colocan cristales en la retina y luego se deja que transporte por 15 días en estufa a 37°C. Posteriormente se corta el ojo en vibrátomo y los cortes que no necesitan revelado se contratiñen con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus FV300.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Técnica Cajal de Castro

La aplicación de la técnica de Cajal de Castro brindó un panorama general de la histoarquitectura de la retina y permitió distinguir con claridad las diferentes capas. 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 1. Desde el exterior al interior del ojo se observa la primera capa, el epitelio pigmentario (EP), fuertemente impregnado con las sales argénticas, superpuesto con los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores. La capa nuclear externa (CNE) compuesta por los somas de conos y bastones, linda hacia el interior con la capa plexiforme externa (CPE). Luego se encuentra la capa nuclear interna (CNI), en su porción más externa se divisan con facilidad las células horizontales (CH), cuyos núcleos alargados en sentido horizontal, se disponen paralelamente a las capas de la retina, conformando entre una y dos hileras de células (Fig. 1). Las CH son menos numerosas que los demás tipos celulares que componen la capa nuclear interna (CNI). Las demás células de la CNI no son identificables con esta técnica, aunque se

puede estimar el tamaño de los somas en alrededor de 8µm, formando aproximadamente 8 hileras de células. La capa plexiforme interna (CPI), de mayor tamaño que la plexiforme externa (CPE), refleja la complejidad de las conexiones celulares que allí se desarrollan, limitando hacia el interior con la capa de células ganglionares (CCG). En la CCG 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 µm. Pudo observarse además una distribución particular de las CG formando grupos de 4-8 células separadas por un espacio en el que se pueden a veces visualizar haces de fibras que conforman el nervio óptico. Esta disposición de las células ganglionares se ve restringida a áreas alejadas de la parte anterior del ojo, cercanas al nervio óptico bien visible en cortes horizontales. En el análisis de cortes de ojo seriados con esta técnica no se visualizó la presencia de una fovea en la retina. Los grosores y la composición celular de las capas son propios de peces diurnos macrópticos, parecidas al pez cebra [8]. La presencia de características compartidas con peces diurnos, es concordante con el dimorfismo sexual de la especie, siendo los machos más coloridos. Los estudios comportamentales demostraron que las hembras escogen a los machos en función a claves visuales como la coloración y el tamaño para el apareamiento [11].

Sin embargo, la distribución en “grupo” de las células ganglionares observadas por la aplicación de esta técnica, es considerada una característica propia de peces de hábitos nocturnos [7]. Esta última característica puede ser interpretada como una ventaja al momento que los charcos se vuelven más turbios.

Inmunohistoquímica, Trazadores neuronales, Microscopía Láser Confocal y Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC).

La utilización de cortes a vibrátomo contrateñidos inespecíficamente con diferentes fluoróforos, mostró mayor detalle de la citoarquitectura completa de la retina.

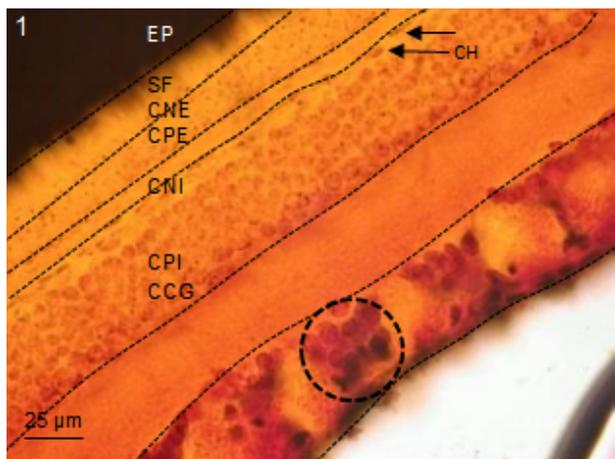


Fig.1. Capas de la retina de cortes del ojo en el plano dorso-ventral de 30 μ m, vista con la técnica de Cajal de Castro, pudiéndose apreciar: EP: epitelio pigmentario, SF: segmento de fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares. Se visualizan las células ganglionares (CG) dispuestas en paquetes (círculo punteado) separados por espacios ausentes de somas celulares.

El método de Cajal de Castro muestra muy bien las capas, pero no las características de la capa de los fotorreceptores. La aproximación de esta contratinción con fluoróforos sumado a la posibilidad de observar los cortes con DIC, combinando la iluminación monocromática del láser y la luz transmitida, ofrecen una información adicional de la alternancia de conos y bastones en la retina, así como las características morfológicas de los mismos (Fig. 2. A).

En *A. charrua* los conos y bastones alternan de un modo regular, sin observarse predominio de ninguno. Se distribuyen de 2-3 conos entre 2-3 bastones, distribución característica en peces de hábitos nocturnos [4].

Sin embargo, los conos no son tan pequeños como en los peces nocturnos sino que su desarrollo es más parecido a los peces diurnos. Los grosores de las capas de la retina son similares a los de peces diurnos. Presentan una capa

plexiforme interna (CPI) extensa y una externa (CPE) considerablemente más delgada. La capa nuclear interna (CNI) también es de mayor espesor que la externa (CNE). La inmunocitoquímica de NeuN revela que la capa nuclear interna (CNI) presenta una composición de varias filas de neuronas (Fig. 2. B), coincidente con lo observado en peces diurnos. La utilización del colorante DiI aplicado en la retina del pez fijado, mostró la conexión de una neurona de la capa nuclear interna que captó el colorante y cuyo axón atraviesa la capa plexiforme interna, observándose la llegada de botones terminales sobre las células ganglionares (Fig. 2. C).

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.

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 la del epitelio pigmentario (EP). La observación del epitelio pigmentario con la tinción de azul de metileno, reveló la existencia de proyecciones (interdigitaciones) de las células del EP entre los segmentos externos e internos de los conos y bastones (Fig. 3 A). Las células del EP poseen pigmentos denominados melanosomas, estos presentan una distribución particular en el citoplasma de las células pigmentarias. Dichos melanosomas se distribuyen homogéneamente en las proyecciones citoplasmáticas, cubriendo los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, pero también se localizan a nivel más escleral, a la altura de los núcleos de las células del EP (Fig. 3 B). La CNE se visualiza ahora con mayor detalle, pudiéndose distinguir con claridad de tres a cuatro hileras de fotorreceptores. La MET muestra la ultraestructura de esta región, donde se observa con mayor precisión, la distribución pigmentaria e individualización de los

melanosomas. Se revela la morfología de conos y bastones, además de poderse identificar sus 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 fotorreceptores (Fig. 3 B).

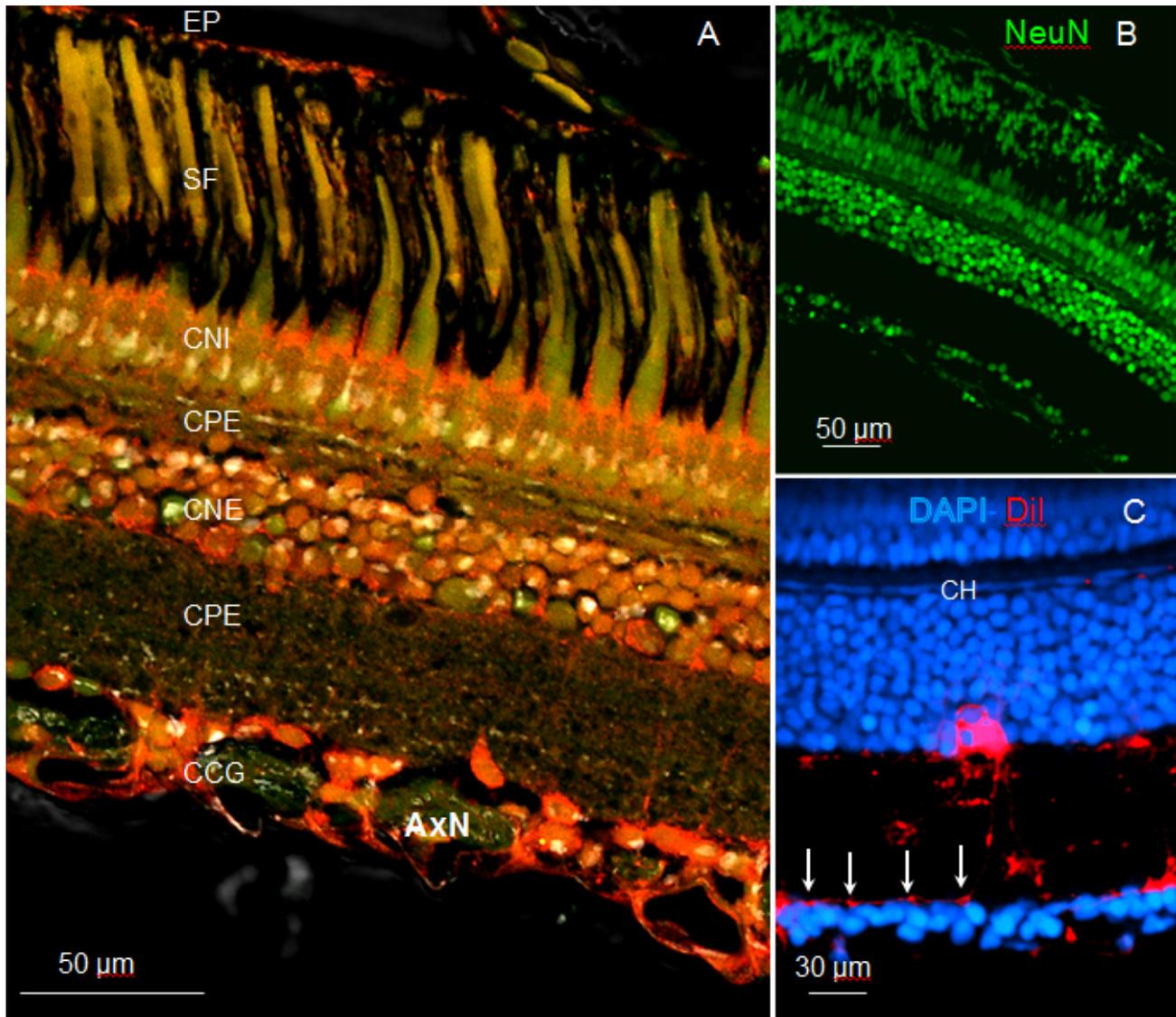


Fig. 2. A B y C. Imágenes de la retina de *A. charrua* obtenidas en un Microscopio Confocal. **a.** Apilado de imágenes obtenidas a partir de 10 planos confocales superpuestas en una sola imagen, contra- teñido con fluoroforos y tomadas con DIC. **b.** Inmunohistoquímica de Neu N (anticuerpo neuronal nuclear) donde se observa la distribución de las diferentes capas de neuronas en la retina. **c.** Contratinción con Dapi y un trazador neuronal (DiI, carbocianina en rojo) donde se observa una célula de la capa de las neuronas bipolares que envía su axón a la capa de las células ganglionares formando botones «an passant» (flechas blancas) CH cpa de las células horizontales. Ep. Epitelio pigmentario; CB capa de conos y bastones; CNE capa nuclear externa; CPE plexiforme externa; CNE nuclear externa; CPI capa plexiforme interna; CG células ganglionares; Ax NO axones que formaran el nervio óptico

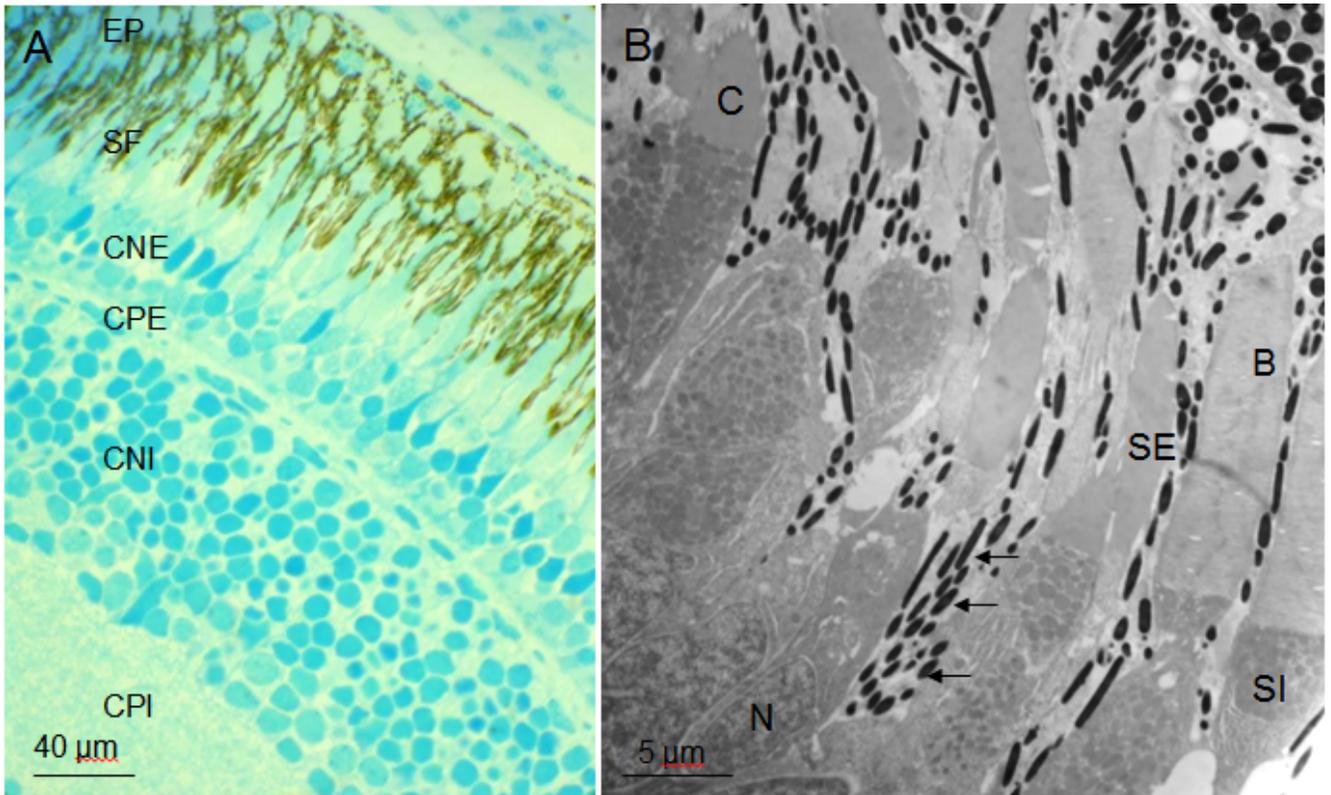


Fig. 3. A. Capas de la retina observables gracias a la técnica de Azul de metileno. EP: epitelio pigmentario, SF: segmentos de los fotorreceptores, CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna; en esta imagen se observan proyecciones 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 (flechas) del EP, la división del segmento externo (SE) e interno (SI) de los conos (C) y bastones (B), así como sus núcleos (N).

Según Marc [5], 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. 4), esto podría indicar un estado intermedio, una adaptación de la retina de peces que a lo largo de su vida están expuestos a condiciones de luz y oscuridad.

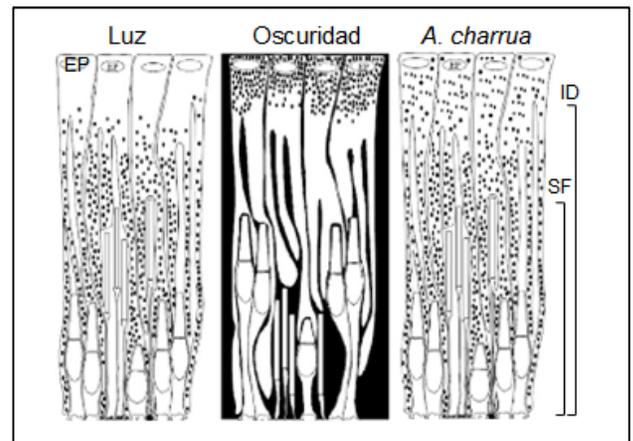


Fig. 4. Imagen comparativa de la distribución de los melanosomas de las células del epitelio pigmentario, entre peces adaptados a la luz o a la oscuridad. EP: núcleos de células del epitelio pigmentario, SF: segmentos de fotorreceptores, ID: interdigitación de las proyecciones de las células del EP entre los SF. (Imagen adaptada de [5]).

CONCLUSIONES

Estos resultados ponen de manifiesto que la citoarquitectura de la retina de *A. charrua* presenta características de peces de ámbitos tanto diurnos como nocturnos. Los aspectos relacionados con la visión diurna observados fueron: a) Las características morfológicas de los conos y bastones, los conos están alternados entre los bastones de una forma homogénea y tienen morfología característica de visión diurna, b) La capa nuclear interna presenta numerosas filas de células, c) Las capas de la retina presentan un grosor similar al observado en peces de visión diurna.

En cuanto a las características estructurales que los asemejan a peces de visión nocturna se observan: a) La ausencia de una fovea, b) Artículos externos de bastones muy desarrollados, c) La capa de las células ganglionares que se organiza en forma de “grupos” alternados por paquetes de fibras que forman el nervio óptico.

Además, la distribución de los melanomas de las células del epitelio pigmentario, presentes tanto en las interdigitaciones entre los fotorreceptores (característicos de la visión diurna) como en la zona apical perinuclear (característicos de la visión nocturna), admite postular que la organización de retina de *A. charrua* presenta una adaptación intermedia entre ambos hábitats.

Este conjunto de características podría explicarse por las condiciones ecológicas de esta especie, que habita ambientes con luminosidad cambiante. Por lo que se puede concluir que un medio de luminosidad variable, influye en las características estructurales de la retina, resultando en adaptaciones que le permiten desempeñar exitosamente la caza, evasión de depredadores y actividades reproductivas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a PEDECIBA Biología y a la ANII, por financiar parcialmente el trabajo.

REFERENCIAS

- [1] García, G., Loureiro M., Berois N., Arezo M. J., Casanova G., Clivio G. & Olivera A. (2009). “Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes; Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach”. *Biological Journal of the Linnean Society* 98:620-635.
- [2] Berois N., García G., O. de Sá R. (2015). *Annual Fishes*. Miami : CRC Press. Chapter 2 pp.33-46
- [3] Pekcan-Hekim, Z. (2007). “Effects of turbidity on feeding and distribution of fish” Ph.D. Tesis. Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia
- [4] Wagner HJ (1990). *The visual system of fish, Retinal structure of fishes* Netherlands, Springer pp. 109-157.
- [5] Marc RE (1999) “The structure of vertebrate retinas” (Toyoda et al, Eds) Elsevier, Amsterdam *The Retinal Basis of Vision* pp. 3-19.
- [6] Stenkamp D. (2011). “The rod photoreceptor lineage of teleost fish”. *Progress in Retinal and Eye Research* 30:395-404.
- [7] Yazulla S & Studholme K. (2011). “Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry”. *Journal of Neurocytology*, 30:551–592.
- [8] Menke A., Spitsenbrgen J., Wolterbeek A., Woutersen R. (2011). “Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish”. *Toxicologic Pathology* 39:759-775.
- [9] Ramón y Cajal S., y De Castro F. (1933). *Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso*. Salvat, Barcelona pp 81-129.
- [10] Passos C., Tassino 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.