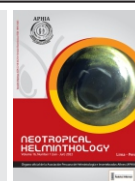




Neotropical Helminthology



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

BRAIN EXTRACTION IN THE LARVARY BIOREGULATOR *GAMBUSIA PUNCTATA* (POEY, 1854): TECHNICAL ASPECTS OF RESEARCH

EXTRACCIÓN CEREBRAL EN EL BIORREGULADOR LARVARIO *GAMBUSIA PUNCTATA* (POEY, 1854): ASPECTO TÉCNICO DE INVESTIGACIÓN

George Argota-Pérez^{1*} & José Iannacone^{2,3}

¹ Centro de Investigaciones Avanzadas y Formación Superior en Educación, Salud y Medio Ambiente "AMTAWI". Puno, Perú. george.argota@gmail.com

² Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG). Grupo de Investigación en Sostenibilidad Ambiental (GISA). Grupo de Investigación "One Health". Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). Lima, Perú.

³ Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela de Posgrado (EPG). Universidad Ricardo Palma (URP). Lima, Perú. jose.iannacone@urp.edu.pe

*Corresponding author: george.argota@gmail.com

George Argota-Pérez: <https://orcid.org/0000-0003-2560-6749>

José Iannacone: <https://orcid.org/0000-0003-3699-4732>

ABSTRACT

The aim of the study was to describe brain extraction in the larval bioregulator *Gambusia punctata* (Poey, 1854) as a technical aspect of research. The study was carried out in March 2021 where an area near the mouth of the Almendares River, Havana, Cuba was selected through random probabilistic sampling. The brain extraction in the species *G. punctata*, was by means of an instrument with two tweezers: holding and dissecting, which allowed manipulation and greater control over the biological sample. The technical aspect of research for the extraction of the brain is as follows: 1st) the individual (male or female) is placed in a ventral position and by means of a smooth stainless steel dissection forceps the containment of the biological sample is carried out, 2nd) with a curved and toothed iris thinker for delicate tissues, the cephalic region is desquamated, and 3rd) visualization and extraction of the brain with a smooth holding forceps until conization is shown in the anatomical region of the brain. In this study, a simple description for brain extraction was shown, which constituted a technical aspect of research that allowed the analysis of enzymatic biomarkers, genetic transcription, histological analysis, DNA molecule, neuropeptides, as well as the bioaccumulation of metals. It is concluded that the technical description of the extraction was simple with which the physiological, morphological and molecular analyses are allowed to verify the survival and, in this case, of the species before their interactions with the environment

Keywords: brain – extraction – *Gambusia punctata* – technique

Este artículo es publicado por la revista *Neotropical Helminthology* de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú auspiciado por la Asociación Peruana de Helminología e Invertebrados Afines (APHIA). Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

doi:10.24039/rmh20221611350

RESUMEN

El objetivo del estudio fue describir la extracción cerebral en el biorregulador larvario *Gambusia punctata* (Poey, 1854) como un aspecto técnico de investigación. El estudio se realizó en marzo de 2021 donde se seleccionó mediante un muestreo probabilístico aleatorio, una zona próxima a la desembocadura del río Almendares, La Habana, Cuba. La extracción cerebral en la especie *G. punctata*, fue mediante un instrumental de dos pinzas: de sujeción y disección, las cuales permitieron la manipulación y un mayor control sobre de la muestra biológica. El aspecto técnico de investigación para la extracción del cerebro es el siguiente: 1^{ro}) se coloca el individuo (macho o hembra) en posición ventral y mediante una pinza de disección lisa de acero inoxidable se realiza la contención de la muestra biológica, 2^{do}) con una piensa de iris para tejidos delicados curva y dentada se descama la región cefálica, y 3^{ro}) visualización y extracción del cerebro con una pinza de sujeción lisa hasta mostrarse la conización en la región anatómica cerebral. En este estudio, se mostró una descripción sencilla para la extracción cerebral lo cual, constituye un aspecto técnico de investigación que permite el análisis de biomarcadores enzimáticos, transcripción genética, análisis histológicos, molécula del ADN, neuropéptidos, así como la bioacumulación de metales. Se concluye, que la descripción técnica sobre la extracción del cerebro en la *G. punctata* fue sencilla con lo cual, se permite desde este órgano metabólico activo, el análisis fisiológico, morfológico y molecular para verificar la supervivencia y en este caso de la especie ante sus interacciones con el ambiente.

Palabras clave: cerebro – extracción – *Gambusia punctata* – técnica

INTRODUCCIÓN

El cerebro es un órgano rico en minerales y vitaminas (Sujatha *et al.*, 2020), tiene conectividad neuronal compleja (Bastos & Schoffelen, 2016; González & Bandettini, 2018), puede afectarse ante cualquier interacción externa (Moniruzzaman *et al.*, 2020), y la neuroimagen que se crea quizás resultar ajena a la realidad (Sugata *et al.*, 2020).

A nivel de ecosistemas acuáticos, los peces se ubican en taxones superiores y pueden facilitar el análisis cuando existen desequilibrios en la cadena trófica (Elleuch *et al.*, 2018; López *et al.*, 2020). En este caso, es muy probable que el cerebro registre alguna bioseñal inmediata de memoria o aprendizaje (Kajiura *et al.*, 2021). La especie *Gambusia punctata* (Poey, 1854), es un pez de importancia higiénico-sanitaria por su regulación larvaria de mosquitos (Iannacone & Alvarino, 1997; Vargas & Vargas 2003; Fimia *et al.*, 2016; Kebede *et al.*, 2017; Kapesa *et al.*, 2018; Dambach, 2020), pero al mismo tiempo muestra una ventaja como biomonitor ambiental (Ramesh *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Argota *et al.*, 2021).

Asimismo, el cerebro es un órgano diana para la predicción del riesgo ambiental (Argota *et al.*, 2018; Espinosa *et al.*, 2019; Argota *et al.*, 2020), y considerándose que la práctica es un criterio para la comprensión y construcción de modelos en la ciencia (Brown, 2017; Couper, 2020), entonces pudiera ocurrir en diversos casos algún error en la interpretación de los datos y la toma de decisiones desde una muestra incorrecta.

El objetivo del estudio fue describir la extracción cerebral en el biorregulador larvario *G. punctata* como un aspecto técnico de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en marzo de 2021 donde se seleccionó mediante un muestreo probabilístico aleatorio, una zona próxima a la desembocadura del río Almendares, La Habana, Cuba (Figura 1). Mediante un jamo profesional rectangular de 60 x 50 x 45cm y luz de malla de 0,5cm se capturaron los individuos y se conservaron para su traslado en formol al 10%.

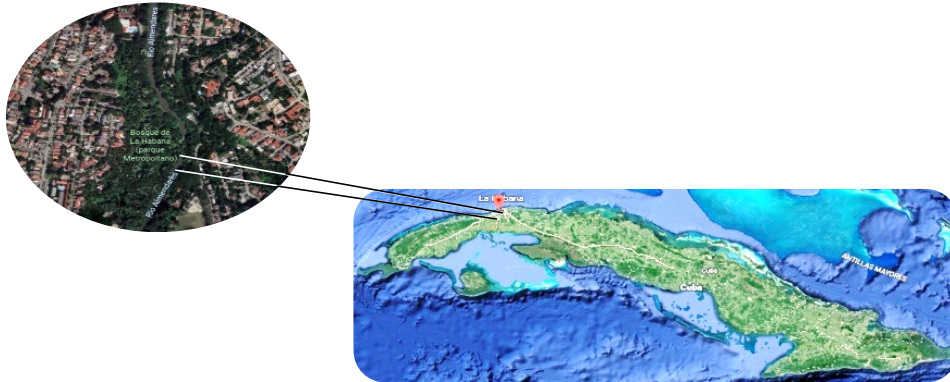


Figura 1. Zona de muestreo / río Almendares, La Habana-Cuba.

La extracción cerebral en la especie *G. punctata*, fue mediante un instrumental de dos pinzas: de sujeción y disección, las cuales permitieron la manipulación y un mayor control de la muestra biológica.

Aspectos éticos: El aspecto bioético del estudio consideró, la eutanasia de los peces en bolsas con hielo procurando que durante la inmersión de los ejemplares fueran tranquilizados para su disección (Argota *et al.*, 2018).

RESULTADOS

El aspecto técnico de investigación para la extracción del cerebro es el siguiente:

- 1^{ro}) se coloca el individuo (macho o hembra) en posición ventral y mediante una pinza de disección lisa de acero inoxidable se realiza la contención de la muestra biológica (Figura 2).
- 2^{do}) con una pinza de iris para tejidos delicados curva y dentada se descama la región cefálica (Figura 3).
- 3^{ro}) visualización y extracción del cerebro con una pinza de sujeción lisa hasta mostrarse la conización en la región anatómica cerebral (Figura 4).



Figura 2. Sujeción de *Gambusia punctata* con una pinza de disección con dientes.



Figura 3. Descamación de la región cefálica en *Gambusia punctata*.

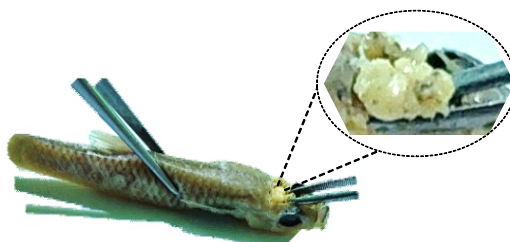


Figura 4. Extracción del cerebro en *Gambusia punctata*.

DISCUSSION

El cerebro es un órgano que muestra una conexión tridimensional (Wang *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2020), y en el caso de *G. punctata* al ser muy pequeño, su extracción es compleja. En este estudio, se mostró una descripción sencilla para la extracción cerebral lo cual, constituye un aspecto técnico de investigación que permite el análisis de biomarcadores enzimáticos (Stefan *et al.*, 2006; Argota *et al.*, 2018; Argota & Iannacone, 2019; Sana *et al.*, 2021; Aguilar *et al.*, 2022), transcripción genética, análisis histológicos (Kah *et al.*, 1979; Houjuan *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2021), molécula del ADN y neuropéptidos (Mohamed *et al.*, 2020; Kah, 2020), así como la bioacumulación de metales (Argota & Iannacone, 2017; Pereira *et al.*, 2018; Shafiuddin *et al.*, 2019).

La principal limitación se indica ante una conservación deficiente de los ejemplares, pues se dificulta la extracción del cerebro.

Se concluye, que la descripción técnica sobre la extracción del cerebro en la *G. punctata* fue sencilla con lo cual, se permite desde este órgano metabólico activo, el análisis fisiológico, morfológico y molecular para verificar la supervivencia (Birnie *et al.*, 2017), y en este caso de la especie ante sus interacciones con el ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, L, Dzul, CR, Rendón, VJ & da Cruz, AL. 2022. *Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in Gambusia yucatanana, an endemic fish from Yucatán Peninsula, Mexico*. Polycyclic Aromatic Compounds, <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1755322>.
- Argota, AP & Iannacone, J. 2019. *Exposición ecotoxicológica al plomo en sedimentos e influencia del factor de bioconcentración ante la variación de la temperatura sobre la actividad acetilcolinesterasa cerebral en la especie Gambusia punctata*. The Biologist (Lima), vol. 17, pp. 315-325.
- Argota, AP, Pérez, AIY, Iannacone, J & Fimia, DR. 2018. *Comportamiento de refugio y actividad de la acetilcolinesterasa cerebral en Gambusia punctata (Poey, 1854) (Poeciliidae) por plomo biodisponible*. The Biologist (Lima), vol. 16, pp. 171-179.
- Argota, PG. & Iannacone, J. 2017. *Predicción cuantitativa mediante biomarcadores de uso permanente como nuevo criterio para biomonitores en ecotoxicología acuática*. The Biologist (Lima), vol. 17, pp. 141-153.
- Argota, PG, Fimia, DR, Iannacone, J & Alarcón-Elbal, PM. 2020. *Crecimiento ante la respuesta visual y regímenes prolongados de alimentación en el biorregulador larval de mosquitos Gambusia punctata Poey, 1854*. Neotropical Helminthology, vol. 14, pp. 1-6.
- Argota, PG, Iannacone, J & Fimia, DR. 2021. *¿El crecimiento cerebral será una adaptación al criterio de tolerancia ambiental en la especie controladora larvaria Gambusia punctata Poey, 1854?* Neotropical Helminthology, vol. 15, pp. 91-95.
- Bastos, AM & Schoffelen, JM. 2016. *A tutorial review of functional connectivity analysis methods and their interpretational pitfalls*. Frontiers in Systems Neuroscience, vol. 9, 175.
- Birnie, GK, Costantini, D, Cooke, SJ & Willmore, WG. 2017. *A comparative and evolutionary*

- approach to oxidative stress in fish: a review.* Fish Fisheries, vol. 18, pp. 928-942.
- Brown, P. 2017. *Narrative: An ontology, epistemology and methodology for pro-environmental psychology research.* Energy Research & Social Science, vol. 31, pp. 215-222.
- Couper, PR. 2020. *Epistemology.* International Encyclopedia of Human Geography; 2nd Ed., Vol. 14th, pp. 275-284.
- Dambach, P. 2020. *The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: Opportunities and limitations.* Biological Control, vol. 150, pp. 1-33.
- Elleuch, B, Bouhamed, F, Elloussaief, M & Jaghbir, M. 2018. *Environmental sustainability and pollution prevention.* Environmental Science and Pollution Research, vol. 25, pp. 18223-18225.
- Espinosa, RG, Costilla, SR, Pérez, VFJ, González, DJ, Flores, RR, Cuevas, DSMC, Medellín, GCE & Ilizaliturri, HA. 2019. *DNA damage in earthworms by exposure of persistent organic pollutants in low basin of coatzaacoalcos River, Mexico.* Science of the Total Environment, vol. 651, pp. 236-1242.
- Fimia, DR, Iannacone, J, Alarcón, EPM, Hernández, CN, Armiñana, GR, Cepero, RO, Cabrera, GAM & Zaita, FY 2016. *Potencialidades del control biológico de peces y copépodos sobre mosquitos (Diptera: Culicidae) de importancia higiénica-sanitaria en la provincia Villa Clara, Cuba.* The Biologist (Lima), vol. 14, pp. 371-386.
- González, CJ & Bandettini, PA. 2018. *Task-based dynamic functional connectivity: recent findings and open questions.* Neuroimage, vol. 180, pp. 526-533.
- Houjuan, X, Shu, L, Zhilei, W, Xuejiao, G, Shiwen, X & Xiaolong, W. 2012. *Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos.* Chemosphere, vol. 88, pp. 377-383.
- Iannacone, J & Alvariano, L. 1997. *Peces larvivoros con potencial para el control biológico de estados inmaduros de zancudos en el Perú.* Revista peruana de Entomología. vol. 40, pp. 9-19.
- Kah, O. 2020. *A 45-years journey within the reproductive brain of fish.* General and Comparative Endocrinology, vol. 38, pp. 253-263.
- Kah, O, Chambolle, P, Olivereau, M, Dubourg, P & Surlève, BJE. 1979. *Ultrastructure de l'hypophyse de Gambusia sp. (Poisson téléostéen) in situ et greffée à long terme: I. Paris distalis rostrale.* General and Comparative Endocrinology, vol. 38, pp. 253-263.
- Kajiura, M, Jeong, H, Kawata, NYS, Shaoyun, Y, Kinoshita, Y, Kawashima, R & Sugiura, M. 2021. *Brain activity predicts future learning success in intensive second language listening training.* Brain and Language, vol. 212, pp. 1-12.
- Kapesa, A, Kweka, EJ, Atieli, H, Afrane, YA, Kamugisha, E, Lee, MC. & Yan, G. 2018. *The current malaria morbidity and mortality in different transmission settings in Western Kenya.* PLoS One, vol. 13, pp. 1-19.
- Kebede, DL, Hibstu, DT, Birhanu, BE. & Bekele, FB. 2017. *Knowledge, attitude and practice towards malaria and associated factors in Areka Town, Southern Ethiopia: community-based cross sectional study.* Journal of Tropical Diseases, vol. 5, pp. 1-10.
- López, PM, Varela, Z, Franco, D, Fernández, JA. & Aboal, JR. 2020. *Can proteomics contribute to biomonitoring of aquatic pollution? A critical review.* Environmental Pollution, vol. 267, pp. 1-12.
- Mohamed, AAR, Rahman, ANA, Mohammed, HH, Ebraheim, LLM., Abo, E, Azza MA, Ali, SA. & Elhady, WM. 2020. *Neurobehavioral, apoptotic, and DNA damaging effects of sub-chronic profenofos exposure on the brain tissue of Cyprinus carpio L.: Antagonistic role of Geranium essential oil.* Aquatic Toxicology, vol. 224, 105493.
- Moniruzzaman, M, Mukherjee, M, Das, D. & Chakraborty, SB. 2020. *Effectiveness of melatonin to restore fish brain activity in face of permethrin induced toxicity.* Environmental Pollution, vol. 266, 115230.
- Pereira, R, Leite, E, Raimundo, J, Guilherme, S, Puga, S, Santos, MA., Canário, J, Almeida, A, Pacheco, M. & Pereira, P. 2018. *Metals(loids) targeting fish eyes and brain in a contaminated estuary - Uncovering*

- neurosensory (un)susceptibility through bioaccumulation, antioxidant and morphometric profiles. *Marine Environmental Research*, vol. 140, pp. 403-411.
- Poey, F. 1854. *Los guajacones, pececillos de agua dulce*. Memorias de la historia natural de la Isla de Cuba, vol. 1, pp. 374-390.
- Qian, X, Harris, KD, Hauling, T, Nicoloutsopoulos, D, Muñoz, MAB, Skene, N, Hjerling, LJ. & Nilsson, M. 2020. Probabilistic cell typing enables fine mapping of closely related cell types *in situ*. *Nature Methods*, vol. 17, pp. 101-106.
- Ramesh, M, Thilagavathi, T, Rathika, R. & Poopal, RK. 2018. Antioxidant status, biochemical and hematological responses in a cultivable fish *Cirrhinus mrigala* exposed to an aquaculture antibiotic Sulfamethazine. *Aquaculture*, vol. 491, pp. 10-19.
- Rodrigues, S, Antunes, SC, Correia, AT, Golovko, O, Žlábek, V. & Nunes, B. 2018. Assessment of toxic effects of the antibiotic erythromycin on the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere*, vol. 216, pp. 234-247.
- Sana, U, Zhongqiu, L, Said, H, Shahid, A, Xinle, G, Kunyuan, W & Ghulam, N. 2021. Heavy metals bioaccumulation and subsequent multiple biomarkers based appraisal of toxicity in the critically endangered *Tor putitora*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 228, 113032.
- Shafiuddin, AAS, Moshir, R, Sultana, S, Babu, Faruque, SOSM. & Islam, SS. 2019. Bioaccumulation and heavy metal concentration in tissues of some commercial fishes from the Meghna River Estuary in Bangladesh and human health implications. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 145, pp. 436-447.
- Song, X, Wang, X, Li, X, Yan, X, Liang, Y, Huang, Y, Huang, L. & Zeng, H. 2021. Histopathology and transcriptome reveals the tissue-specific hepatotoxicity and gills injury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) induced by sublethal concentration of triclosan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 220, 112325.
- Stefan, LE, Hallgren, ML. & Håkan, OK. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male *Endler guppy* (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology*, vol. 147, pp. 323-328.
- Sugata, H, Yagi, K, Yazawa, S, Nagase, Y, Tsuruta, K, Ikeda, T, Nojima, I, Hara, M, Matsushita, K, Kawakami, K. & Kawakami, K. 2020. Role of beta-band resting-state functional connectivity as a predictor of motor learning ability. *Neuroimage*, vol. 210, pp. 1-9.
- Sujatha, K, Nallusamy, S, Senthilkumar, P, Francis, PA. & Silambarasan, K. 2021. Study of mineral content available in the brain of ten fishes from two fish landing centres in Tamilnadu and Andhra Pradesh. *Materialstoday: Proceedings*, vol. 37, pp. 810-816.
- Vargas, VM. & Vargas, C. 2003. Male and mosquito larvae survey at the Arenal Tempisque irrigation project, Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, vol. 51, pp. 759-762.
- Wang, X, Allen, WE, Wright, MA, Sylwestrak, EL, Samusik, N, Vesuna, S, Evans, K, Liu, C, Ramakrishnan, C, Liu, J, Nolan, GP, Bava, FA. & Deisseroth, K. 2018. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*, vol. 361, eaat5691.

Received March 6, 2022.

Accepted April 13, 2022.