



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

# Efecto de la primera alimentación en el desarrollo del tracto alimentario y la esqueletogénesis del pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*)

Trabajo de Tesis presentado para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

**Daniela María Rio**

**Directora:** Dra. Daniela I. Pérez Sirkin

**Directora Asistente:** Lic. Agustina C. Beriotto

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada - CONICET-UBA.

Buenos Aires, Marzo 2024

## AGRADECIMIENTOS

Qué difícil poner en pocas palabras lo tan agradecida que estoy, terminando un ciclo de muchos años, mucho sentimiento y mucha dedicación. Antes que nada, me gustaría agradecerles a mis directoras, Dani y Agus, que son muchísimo mejor de lo que esperaba por parte de una dirección. No sólo fueron una guía de infinita paciencia, sino compañeras, pares y ejemplos. Gracias por la ayuda, la motivación y la confianza (que me tienen, que me hicieron tenerme y que les tengo). De la mano de mis directas viene el labo 4 entero. Son un grupo de trabajo súper compañero y divertido en el que fue aumentando mi confianza y cariño. Gracias Pau por generar y mantener este ambiente de trabajo, por acompañarme como tutora y por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu labo.

Gracias a Gla y Ele por prestarme la lupa y el microscopio y por haber sido el primer labo en el que participé. Gracias al grupo de trabajo de Rosario, que criaron e hicieron los experimentos con los pejerreyes y gracias a Angela Juarez por el análisis del agua verde.

Gracias a mis amigos de la facultad, de la carrera y de la vida. Nada hubiese sido lo mismo si este grupazo de personas, que tiene a las más inteligentes, compañeras e incondicionales que conozco. Gracias a mis amigas de la facultad, por enseñarme, escucharme, acompañarme, desafiarme e impulsarme todo el tiempo. Gracias a Juan por confiar en mí más que yo misma y por mostrarme lo que soy capaz de hacer.

Y, por último, gracias a mi familia. Gracias Luli por tu **infinita** paciencia, por aguantar todo mi estrés, mis llantos, por vivir conmigo tantos años y ser la persona más buena que conozco. Gracias a Santi por crecer conmigo, los momentos que pasamos juntos son oro para mí. Y gracias a mis papás, que son sólo amor y apoyo. Les dedico todo el esfuerzo que le puse a la carrera, porque sin ellos no la hubiese vivido como lo hice. Gracias infinitas por darme la libertad, el lugar, el apoyo y la motivación para estudiar y terminar una carrera como esta.

Gracias a las personas que formaron parte de estos últimos ocho años increíbles de mi vida. Gracias FCEN por ser una segunda casa y por enseñar, trabajar y promover la ciencia argentina.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<u>El estado de la acuicultura a nivel global y en Argentina</u> .....	5
<u>El pejerrey bonaerense y la aterinicultura</u> .....	7
<u>Condiciones de cría en larvicultura</u> .....	11
<i>Temperatura</i> .....	11
<i>Nutrición</i> .....	11
<u>La importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (HUFA)</u> .....	13
<u>Sistema alimentario</u> .....	14
<u>Sistema esquelético</u> .....	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
<u>Origen de las muestras</u> .....	27
<u>Condiciones de cría</u> .....	28
<i>Agua verde</i> .....	28
<i>Tratamientos</i> .....	28
<u>Análisis histológico</u> .....	29
<i>Caracterización del tracto alimentario: animales "Car"</i> .....	30
<i>Estudio de los efectos de los tratamientos sobre el tracto alimentario: animales "Exp"</i> .....	30
<u>Coloración in toto del esqueleto</u> .....	33
<i>Caracterización de la esqueletogénesis: animales "Car"</i> .....	35
<i>Estudio de los efectos de los tratamientos sobre el esqueleto: animales "Exp"</i> .....	36
<u>Análisis estadístico</u> .....	36
<i>Para el estudio del tracto alimentario</i> .....	37
<i>Para el estudio de la incidencia de deformidades esqueléticas</i> .....	37
RESULTADOS.....	38
<u>Caracterización de la ontogenia del tracto alimentario y de las glándulas anexas</u> .....	38
<i>Momento de la eclosión</i> .....	38
<i>Cavidad bucofaríngea</i> .....	41
<i>Esófago</i> .....	42
<i>Intestino</i> .....	42

<i>Glándulas anexas</i> .....	43
<i>Vitelo</i> .....	44
<u>Caracterización de la ontogenia del sistema esquelético</u> .....	44
<i>Cráneo</i> .....	47
<i>Arcos hioideo y branquiales</i> .....	50
<i>Esqueleto apendicular y complejo caudal</i> .....	53
<i>Esqueleto axial y aletas impares</i> .....	57
<u>Efectos de la primera alimentación dentro del proyecto marco</u> .....	60
<u>Efectos de la primera alimentación sobre el desarrollo del tracto alimentario</u> .....	60
<i>i. Número de papilas gustativas</i> .....	60
<i>ii. Área de los hepatocitos</i> .....	61
<i>iii. Alto del pliegue intestinal y alto del enterocito</i> .....	62
<u>Efectos de la primera alimentación sobre la incidencia de deformidades óseas</u> .....	62
DISCUSIÓN .....	66
<u>Caracterización de la ontogenia del tracto alimentario</u> .....	66
<u>Caracterización de la ontogenia del esqueleto</u> .....	70
<u>Abordaje experimental de los efectos de las dietas iniciales sobre el pejerrey</u> .....	73
<i>Formulación de las dietas</i> .....	73
<u>Evaluación de los efectos de las dietas sobre el tracto alimentario</u> .....	74
<u>Evaluación de los efectos de las dietas sobre las deformidades esqueléticas</u> .....	77
<u>Conclusiones generales</u> .....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

## RESUMEN

El pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) es un pez teleósteo reconocido en Argentina por la calidad de su carne y su valor en la pesca deportiva. Sin embargo, su cultivo se encuentra en desarrollo, presentando una baja tasa de crecimiento y una alta mortalidad e incidencia de malformaciones óseas. El abordaje de estas problemáticas resulta aún más complicado debido al poco conocimiento acerca de la biología larval de la especie. Sabiendo que la alimentación inicial se considera un factor determinante en el desempeño y supervivencia de los animales, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: "Un esquema de primera alimentación que contemple un alimento vivo suplementado con ácidos grasos poliinsaturados, tendrá un impacto positivo en la maduración morfológica del tracto alimentario y reducirá la incidencia de deformidades esqueléticas del pejerrey bonaerense, *O. bonariensis*."

Como abordaje inicial, se caracterizó la ontogenia de los sistemas alimentario y esquelético en animales provenientes de estanques alimentados con agua verde, protocolo convencional utilizado para su cultivo. A través de cortes histológicos coloreados con Hematoxilina y Eosina se observó que el pejerrey eclosiona con un tracto alimentario, hígado y páncreas diferenciados, registrando pocos cambios durante su ontogenia. En cuanto al sistema esquelético, se caracterizó su desarrollo registrando la formación de más de 100 estructuras a partir de coloraciones *in toto* con Azul de Alcian y Rojo Alizarina. El pejerrey bonaerense eclosiona con estructuras esqueléticas únicamente en la región craneal y parte de la aleta pectoral, siendo las únicas estructuras óseas algunos elementos de los arcos branquiales. Para el día 54 post-eclosión (dpe) ya se observa un esqueleto similar al del adulto.

En cuanto a la evaluación de las diferentes dietas, desde el 0 dpe los animales fueron alimentados con nauplios: S) sin enriquecer, P) enriquecidos con aceite de pescado, o M) enriquecidos con una mezcla de aceite de pescado y vegetal. Se evaluó la incidencia de deformidades esqueléticas mediante coloraciones *in toto* a los 50 dpe y el desarrollo de su tracto alimentario a los 9 dpe en cortes histológicos analizando el número de papilas gustativas, el área de los hepatocitos y el ancho y alto de los pliegues intestinales. No se observaron diferencias entre los tratamientos para ninguna de las variables analizadas. En particular, todos los tratamientos presentaron una incidencia similar de deformaciones óseas y en cuanto al tracto alimentario, si bien no se obtuvieron diferencias en los parámetros analizados, tampoco se observaron indicadores de daño tisular.

En conclusión, los protocolos alimentarios propuestos no presentaron diferencias en los parámetros analizados, lo que sugiere que el enriquecimiento de la artemia evaluado no impactaría en la maduración morfológica del sistema alimentario ni en la incidencia de deformidades esqueléticas. Los resultados obtenidos en esta Tesis expanden el conocimiento sobre la biología larval del pejerrey bonaerense y sientan las bases para modificar futuros experimentos y mejorar su cultivo.

# The Effect of Initial Feeding on the Development of the Alimentary Tract and Skeletogenesis of pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*)

## ABSTRACT

The pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) is a teleost fish highly appreciated in Argentina for the quality of its flesh and its importance in sport fishing. However, its culture presents a low growth rate as well as a high mortality rate and incidence of skeletal malformations. The limited knowledge about the larval biology of the species increases the difficulty in addressing these issues. Knowing that the initial feeding is a critical factor in the performance and survival of animals, the following working hypothesis is proposed: "A first feeding scheme that includes live food supplemented with polyunsaturated fatty acids will have a positive effect on the morphological maturation of the alimentary tract and reduce the incidence of skeletal deformities in the Buenos Aires silverside, *O. bonariensis*."

As a first approach, the ontogeny of the alimentary and skeletal systems was characterized in animals fed with green water. Through histological sections, it was observed that the pejerrey hatch with a differentiated alimentary tract, liver and pancreas, registering few changes during its ontogeny. Regarding the skeletal system, its development was characterized by studying the formation of more than 100 structures through *in toto* staining with Alcian Blue and Alizarin Red. The pejerrey hatch with skeletal structures in the cranial region and part of the pectoral fin, being the only bony structures some elements of the branchial arches. By day 54 post-hatching (dph), a skeleton similar to that of the adult is already observed.

Regarding the evaluation of the different diets, the animals were fed from 0 dph with: S) unenriched nauplii; P) nauplii enriched with fish oil, or M) nauplii enriched with a mixture of fish and vegetable oil. The incidence of skeletal deformities was assessed by *in toto* staining at 50 dph, and the development of their alimentary tract at 9 dph was studied in histological sections by analyzing the number of taste buds, the area of hepatocytes, and the width and height of intestinal folds. All treatments showed a similar incidence of skeletal deformities, and no differences or indicators of tissue damage were observed for any of the alimentary tract variables analyzed.

In conclusion, the proposed feeding protocols showed no differences in the parameters analyzed, suggesting that the artemia enrichment evaluated would have no effect on the morphological maturation of the alimentary system or the incidence of skeletal deformities. The results obtained in this thesis expand the knowledge of the larval biology of the pejerrey bonaerense and provide the basis for future experiments and improvements in its culture.

# INTRODUCCIÓN

## El estado de la acuicultura a nivel global y en Argentina

La capacidad de producción sostenible de los sistemas alimentarios está siendo progresivamente afectada por el rápido crecimiento demográfico, el cambio climático y sus eventos extremos asociados y la urbanización, entre otras presiones. Durante el siglo XXI, la acuicultura y la pesca comenzaron a ganar relevancia debido a su contribución esencial a la seguridad alimentaria y la nutrición mundial (FAO, 2022). Sin embargo, frente a la creciente demanda global de alimentos acuáticos, es esperable que el aporte a partir de la pesca de captura no sea suficiente para satisfacer el consumo mundial. En este contexto, la acuicultura surge como una actividad capaz de hacer frente al desafío de aumentar la producción, disminuir el impacto ambiental y lograr cubrir las necesidades de alimentos acuáticos a nivel mundial (Subasinghe et al., 2009). Se define acuicultura al cultivo, en condiciones controladas, de especies que se desarrollan en medio acuático, como peces, moluscos, crustáceos y algas, entre otros, que son de utilidad para el ser humano.

Entre 1961 y 2019 el consumo aparente\* mundial de alimentos acuáticos aumentó a un ritmo medio anual del 3,0%, casi el doble del ritmo de crecimiento demográfico mundial anual (1,6%), lo cual enfatiza la importancia de la expansión y mejora de la acuicultura. En el 2020, la producción mundial de animales acuáticos se estimó en 178 millones de toneladas, el 51% de las mismas provenientes de la pesca de captura y el 49% restantes de la acuicultura (figura 1).

*\* Consumo aparente: medición indirecta del suministro de alimentos disponible en un país en el periodo de tiempo de referencia indicado. Hace referencia a la cantidad disponible para el consumo humano y no al consumo efectivo de alimentos.*

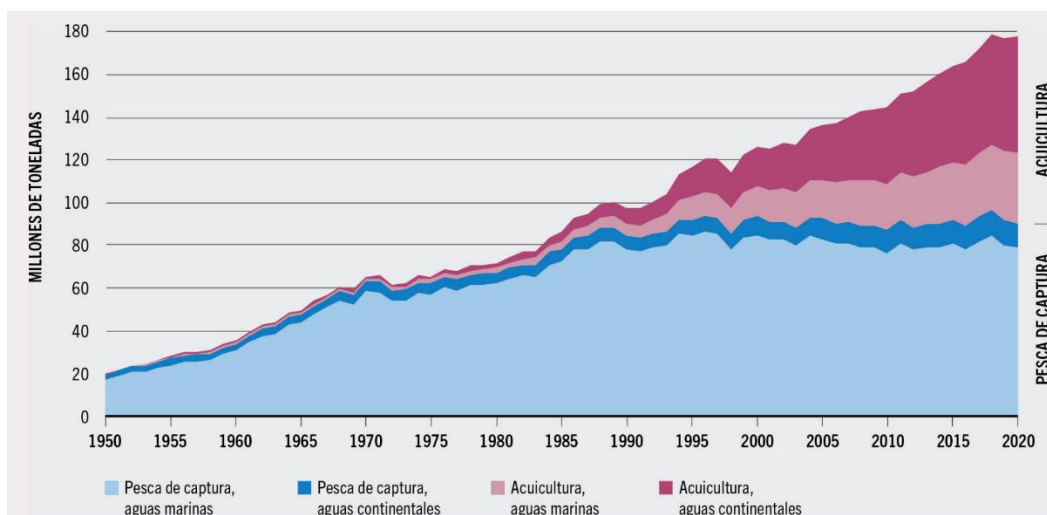


Figura 1: producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura entre 1950 y 2020 (FAO, 2022).

Argentina es considerada por la "Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación" (FAO) como uno de los cinco países de América Latina y el Caribe con mayor potencial para el desarrollo de la acuicultura (FAO, 2016). Sin embargo, el país no representa un actor relevante de la producción acuícola mundial, ni regional, con una participación del 0,004% y 0,09%, respectivamente (Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional- Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, Argentina, 2021, p.8; FAO, 2005-2024). La actividad de la acuicultura comercial semi-industrial en Argentina muestra un crecimiento lento pero sostenido desde sus comienzos en la década de los '90, con un aumento de la producción total de 1.000 toneladas en 1996 a 3.700 en 2016, registrándose un máximo de 4.027 toneladas en el 2014. Además, el total de especies producidas destinadas al consumo humano pasó de 2 a 23, incluyendo peces, moluscos bivalvos, reptiles y anfibios (FAO, 2005-2024).

La piscicultura, una de las ramas de la acuicultura, se basa únicamente en el cultivo de peces. En Argentina, el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

constituyen en conjunto cerca del 90% de la producción acuícola nacional. En 2016 representaron el 52,45% y el 38% de la producción total nacional, respectivamente (FAO, 2005-2024).

Más allá del cultivo de peces para consumo alimenticio directo, dentro del país se crían especies destinadas a la pesca deportiva y/o al repoblamiento en determinados cuerpos de agua. Un claro ejemplo de esto es el pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835). En 1904 se realizaron las primeras reproducciones artificiales de esta especie y a partir de 1940 se siembran anualmente numerosos cuerpos de agua, liberando cerca de 410 millones de larvas en lagos y lagunas del país (Colautti et al., 2010; FAO, 2005-2024).

### El pejerrey bonaerense y la aterinicultura

El pejerrey bonaerense (figura 2) es un pez teleósteo, perteneciente al orden Atheriniformes. Su clasificación taxonómica fue variando con los años, y actualmente pertenece al género *Odontesthes*, dentro de la familia Atherinopsidae –figura 3- (Betancur-R et al., 2013; Dyer, 1998; López & García M. L, 2001). Esta especie se encuentra principalmente en la región Pampeana, en lagos someros bonaerenses y en el río Paraná y fue expandiendo su distribución progresivamente hacia otras aguas continentales (Baigún & Delfino, 2003; Ringuelet, 1943). Si bien el término “pejerrey” hace referencia a más de 20 especies dentro de los Atheriniformes (Froese & Pauly, 2023), en esta Tesis se utilizará para referirse a nuestro sujeto de estudio, el pejerrey bonaerense.



Figura 2: imagen de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) en estadio larval (4 días post-eclosión) (a) y adulto (b). Imágenes tomadas en el Acuario del Río Paraná, Rosario, Argentina.

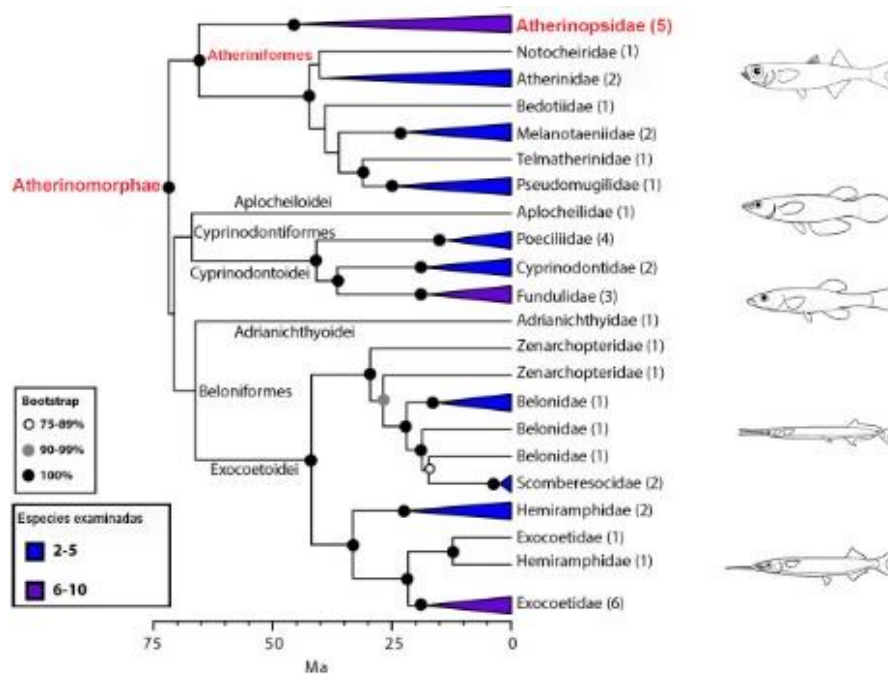


Figura 3: detalle de las relaciones filogenéticas dentro del clado Atherinomorphae. Los valores entre paréntesis indican el número de géneros examinados en cada taxón. En rojo se resalta la clasificación taxonómica de *Odontesthes bonariensis*. Adaptado de Bentacur-R et al. (2013).

El pejerrey es una especie nativa, con gran importancia en la pesca deportiva y recreativa del país. También es reconocido por la calidad de su carne que, además de valorarse por su sabor, aroma y textura, posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, componente esencial en la dieta del humano (Kopprio et al., 2015; Somoza et al., 2008). Todas estas características y su alta adaptabilidad favorecieron su expansión e introducción en diferentes cuerpos de agua, no solo dentro de Argentina, sino en diferentes países de América Latina, como Brasil, Perú, Bolivia y Uruguay, en Europa e incluso en Asia (Díaz et al., 2012; López & García M. L, 2001; Somoza et al., 2008).

A pesar de que el cultivo del pejerrey tiene una larga historia en Argentina, la mayoría de los programas se centran en la siembra de larvas en cuerpos de agua para promover el crecimiento de poblaciones naturales, en lugar del cultivo de animales para uso comercial directo (Colautti et al., 2010). Somoza *et al.* (2008) proponen que el estancamiento en el desarrollo de la aterinicultura (piscicultura del pejerrey) en el país puede explicarse por tres factores:

- Factores biológicos: la especie presenta una baja tasa de sobrevivencia y crecimiento cuando se cría en cautiverio, en comparación a las especies utilizadas en piscicultura. El pejerrey necesita en promedio 2 años para alcanzar un tamaño adecuado (200-250g) para ser comercializado.
- Brecha entre la tecnología y la ciencia: el desarrollo de formas alternativas de producción no ha sido un tema prioritario de inversión gubernamental en comparación a necesidades sociales básicas del país. Además, es una especie poco estudiada, de la cual todavía se desconocen características básicas de su biología.

- Problemas de infraestructura y socioeconómicos: el bajo consumo de alimentos acuáticos, la competencia desigual con productos provenientes de la pesca y la poca inversión y regulación del sistema productivo en el país han constituido un freno para el establecimiento de emprendimientos basados en el cultivo de pejerrey.

A pesar de esto, las técnicas en la atherinicultura han mejorado progresivamente desde sus comienzos y, en la actualidad, es posible completar el ciclo de producción enteramente en tanques (Miranda et al., 2006). La obtención eficiente de huevos fecundados a partir de reproductores criados en cautiverio permitió producir juveniles sanos en forma masiva y mantenerlos en cautiverio hasta obtener la siguiente generación de reproductores (Somoza et al., 2008).

Estos avances han sido imprescindibles para el desarrollo de la atherinicultura; no obstante, muchos otros aspectos dentro del proceso de cría del pejerrey deben ser resueltos, mejorados o simplificados para permitir la rentabilidad de los criaderos comerciales. En particular, la eficiencia en la producción de huevos, la mortalidad, especialmente de las larvas, las deformidades esqueléticas y la baja tasa de crecimiento han sido los principales focos de estudio en esta especie. En base a esto se han evaluado los efectos de factores como la temperatura del agua y el tipo de dieta sobre el crecimiento, supervivencia, y expresión génica durante etapas embrionarias, larvales o juveniles de ejemplares criados en cautiverio (Bertucci et al., 2022; Chalde et al., 2011; Gómez-Requeni et al., 2012; Strüssmann et al., 1997; Strüssmann & Takashima, 1989).

## Condiciones de cría en la larvicultura

### *Temperatura*

Es sabido que la temperatura del agua es uno de los factores que más influye en el desarrollo de los peces, habiendo numerosos registros de una relación directa entre ésta y la tasa de crecimiento de diferentes especies (Chalde et al., 2011; López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011; Martell et al., 2005; Pepin, 1991). En particular, a temperaturas menores a 15°C el pejerrey presenta una tasa de crecimiento baja y la supervivencia a temperaturas iguales o mayores a 31°C es nula (Strüssmann et al., 1997). En esta especie, la temperatura no solo afecta la tasa de crecimiento, sino que es un factor relevante en la determinación sexual. Se estimó que el período termosensible para la misma es durante las primeras 5 semanas post-eclosión (pe). El pejerrey presenta una determinación sexual por temperatura combinada con una determinación sexual genética, siendo posible obtener poblaciones monosexo manipulando únicamente la temperatura (a 17°C se obtiene un 100% de hembras y a 27°C un 100% de machos, independientemente de su genotipo). Los efectos genotípicos se observan a temperaturas intermedias (24/25°C), donde se obtiene una proporción balanceada de sexos (Bull et al., 1982; Strüssmann et al., 1997).

### *Nutrición*

Es evidente que la calidad en la producción, así como el bienestar del animal, están directamente relacionados a una nutrición adecuada y específica para cada especie (Zarantoniello et al., 2020). La alimentación inicial con rotíferos y artemia ha sido tradicionalmente utilizada en la acuicultura de forma generalizada para proveer una fuente de alimento a la mayoría de las especies

cultivadas, sin un análisis de los requerimientos nutricionales específicos. Por otro lado, los alimentos artificiales suelen tener características químicas muy diferentes a las de los organismos vivos de los que se alimentan los peces, lo cual puede dificultar el aprovechamiento de sus nutrientes, en especial en las etapas tempranas del desarrollo, en las que las capacidades de digestión pueden ser limitadas (Önal et al., 2008). Es por esto que el conocimiento de la capacidad funcional del tracto alimentario a lo largo de la ontogenia es fundamental para poder desarrollar protocolos de alimentación adecuados para cada especie.

El pejerrey comienza a alimentarse exógenamente temprano en el desarrollo, aproximadamente a los 2 días post-eclosión (dpe) (Chalde et al., 2011). Es una especie esencialmente zooplanctófaga que en ambientes naturales se alimenta principalmente de rotíferos y algas en las primeras etapas larvales y crustáceos copépodos y cladóceros en las etapas de juveniles y adultos (Colautti et al., 2010; Ringuelet et al., 1980). Además, a medida que aumenta de tamaño, incorpora progresivamente una alimentación piscívora, llegando incluso a alimentarse de otros pejerreyes de menor talla (Bucher & Etchegoin, 2006; Ringuelet, 1940). Una de las condiciones de cría utilizadas en acuicultura es la denominada "agua verde" la cual es rica en fitoplancton y zooplancton. A pesar de ser una técnica bastante difundida en el mundo de la acuicultura, la composición y producción plantónica del agua verde puede ser variable. Sin embargo, se ha evaluado la calidad del agua en cultivos mantenidos bajo esta técnica, comprobando que la misma es adecuada para la cría de peces (Alam & Al-Hafedh, 2006). Por un lado, estas características la presentan como una condición adecuada para el cultivo del pejerrey, ya que se asume que estará presente su alimento natural; pero, por el otro, es una técnica que no permite un control sobre el tipo de ingesta de los animales, dando lugar a una variabilidad en la calidad

nutricional, y aumentando el riesgo de introducción de patógenos al sistema de producción (Somoza et al., 2008).

### *La importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (HUFA)*

Los lípidos constituyen, junto con los aminoácidos, la reserva de energía más importante en los embriones de peces (Wold et al., 2009; Zambonino-Infante J L & Cahu, 2010). Particularmente, los ácidos grasos poliinsaturados (HUFA) son indispensables para el desarrollo, crecimiento y reproducción normal de peces (y otros vertebrados). Los HUFA más estudiados son el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6  $\Omega$ -3), el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5  $\Omega$ -3) y el ácido araquidónico (AA, C20:4  $\Omega$ -6). Sus funciones bioquímicas y fisiológicas se mantienen entre vertebrados y pueden estar relacionados a: (i) el mantenimiento de la integridad funcional y estructural de las membranas celulares; (ii) un rol como precursores de los eicosanoides, un grupo de moléculas biológicamente activas con diversos efectos paracrinos (Sargent, Bell, et al., 1999). Los peces de agua dulce, incluyendo el pejerrey, a diferencia de los marinos, poseen la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos para formar HUFA, con lo cual, además de incorporarlos a través de la dieta, pueden sintetizarlos (Bertucci et al., 2022; Palacios et al., 2006).

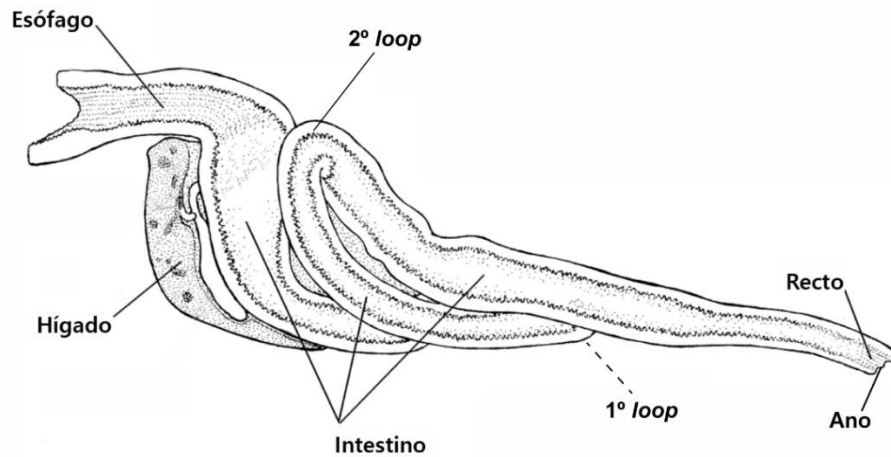
Los diversos efectos de las diferentes dietas lipídicas podrían explicarse debido a que los HUFA se unen a receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales que regulan la expresión de muchos genes involucrados en una variedad de procesos relacionados con el metabolismo lipídico, balance energético, morfogénesis y esqueletogénesis (Kliwer et al., 1997). Esto denota la importancia de una adecuada composición lipídica en las dietas iniciales. Respecto a esto, el enriquecimiento de la artemia con ácidos grasos es una práctica habitual en larvicultura,

facilitada al tratarse de organismos filtradores no selectivos (Boglino et al., 2012; Evjemo et al., 2001; Gapasin et al., 1998). Además, la artemia contiene altos niveles de proteínas, es de rápida digestibilidad, presenta una baja respuesta de escape y buena palatabilidad (Coral & Meza, 2014).

### Sistema alimentario

Los miembros de la familia Atherinopsidae se caracterizan por presentar un tracto alimentario corto y simple y carecer de un estómago funcional (Horn et al., 2006). El tracto alimentario del pejerrey comprende la boca, faringe, esófago, intestino, recto y termina en el ano (figura 4). La cavidad bucal se caracteriza por presentar dientes cónicos, tanto en los pre-maxilares, los cuales son protráctiles, como en el dentario. Los maxilares protráctiles son capaces de expandirse, formando un embudo adecuado para la captación de partículas en suspensión (Martínez-Palacios et al., 2019; Ringuelet et al., 1980). Además, posee papilas gustativas, las cuales podrían estar involucradas en la selección y captación del alimento (Devitsina & Golovkina, 2011; Elsheikh et al., 2012). La cavidad faríngea presenta cinco pares de arcos branquiales con branquiespinas que forman un "rastrillo branquial", el cual actúa como un aparato filtrador para retener las partículas de plancton incorporadas por la boca (Ringuelet et al., 1980). La región ventral y dorsal ("piso" y "techo" respectivamente) de esta cavidad presenta placas faríngeas con dientes cónicos, dirigidos hacia la línea media, que suelen estar asociados a la trituración del alimento (Martínez-Palacios et al., 2019; Ringuelet et al., 1980). La faringe también presenta numerosas papilas gustativas, que podrían estar involucradas en la decisión de ingesta o rechazo del alimento y/o en la estimulación de las secreciones necesarias para la digestión (Atema, 1971; Devitsina & Golovkina, 2011; Diaz et al., 2006; Elsheikh et al., 2012). La organización histológica del tubo digestivo

consiste en una mucosa, submucosa, túnica muscular, y adventicia/serosa (Díaz et al., 2006). A la faringe le sigue un corto esófago caracterizado por la presencia de pliegues y la ausencia de papilas gustativas. El epitelio es estratificado y posee numerosas células mucosas que podrían estar asociadas a una capacidad digestiva del órgano, así como a la lubricación de sus paredes facilitando el transporte del alimento (Díaz et al., 2012). El intestino presenta un *loop* que genera una torsión hacia la región anterior y un segundo *loop* que retorna hacia posterior (figura 4). La mucosa del intestino forma numerosos pliegues y está compuesta por la lámina propia (tejido conectivo) y un epitelio simple columnar, con microvellosidades apicales (chapa estriada) y células mucosas (Hall & Bellwood, 1995; Hamlin et al., 2000; Yamamoto, 1966). Esta mucosa participa en la digestión y absorción del alimento (Caballero et al., 2003; Ostaszewska et al., 2011) y su homeostasis depende del balance entre la apoptosis y la mitosis de los enterocitos (Hall & Bellwood, 1995; Raskovic et al., 2011). Al igual que en otras especies agástricas, como el goldfish (*Carassius auratus*), no hay glándulas multicelulares diferenciadas. Además, los enterocitos de la porción posterior del intestino presentan vacuolas supranucleares. Éstas se relacionan al proceso de pinocitosis, a través del cual las células incorporan las partículas de alimento (Yamamoto, 1966). El hígado y páncreas son glándulas anexas al tracto alimentario que colaboran en la digestión y en la reserva de los nutrientes (Chen et al., 2006; Hamlin et al., 2000; Yang et al., 2010).



*Figura 4: esquema representativo del tubo digestivo del pejerrey, adaptado de Kobelkowski & Figueroa-Lucero (2018).*

Si bien los principales cambios morfológicos y celulares que ocurren durante la ontogenia son los mismos entre los teleósteos, la cronología de los eventos es específica de cada especie y puede verse afectada por las condiciones de cría (Zambonino Infante & Cahu, 2001). El desarrollo embrionario del pejerrey es aproximadamente de 11-13 días a 18-20°C (Chalde et al., 2011; Strüssmann et al., 1997). Al eclosionar, el mismo posee un tracto alimentario funcional, con un desarrollo avanzado y sus regiones diferenciadas, rasgo característico de las especies precociales (Govoni et al., 1986; Kaji et al., 1996; Strüssmann & Takashima, 1989).

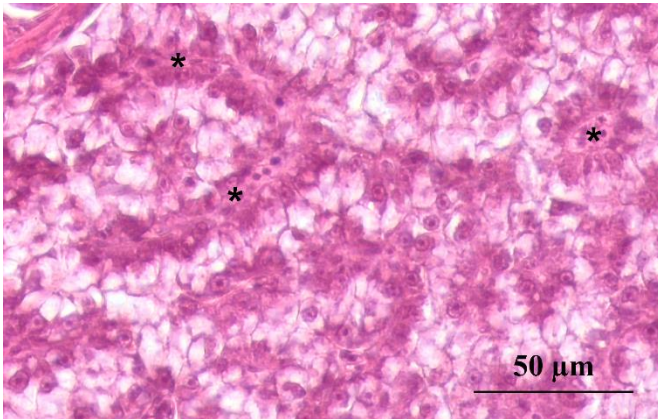
Mediante herramientas como la histomorfología es posible describir la ontogenia del sistema digestivo y elucidar relaciones funcionales entre las estructuras involucradas en el proceso digestivo, permitiendo, además, evaluar el estado nutricional de los peces y el éxito potencial de diferentes dietas a lo largo del desarrollo (Caballero et al., 2003; Green & McCormick M.I., 1999; Hall & Bellwood, 1995; Önal et al., 2008; Strüssmann & Takashima, 1989). El intestino y el hígado suelen ser los principales órganos que se analizan con este objetivo ya que participan

predominantemente en la digestión, absorción y almacenamiento de los nutrientes del alimento (Raskovic et al., 2011).

Las principales características evaluadas en el intestino son el alto de los enterocitos, la presencia y alto de los pliegues intestinales, el tamaño nuclear de los enterocitos, y la abundancia y estado de su citoplasma (Green & McCormick M.I., 1999; Hall & Bellwood, 1995; Strüssmann & Takashima, 1989). Una de las histopatologías registradas en salmónidos, asociada frecuentemente al reemplazo de proteínas de origen animal por proteínas vegetales, es la enteritis (Urán et al., 2009). Ésta se describe como un acortamiento de los pliegues intestinales, junto a un engrosamiento de la lámina propia de los mismos, la pérdida de las vacuolas supranucleares de los enterocitos y la presencia de células moduladoras de la respuesta inflamatoria (Raskovic et al., 2011).

Al eclosionar, el hígado del pejerrey no presenta reservas lipídicas ni de glucógeno, sin embargo, a partir del día 1 pe el glucógeno comienza a acumularse y este proceso se mantiene y potencia con la alimentación (Strüssmann & Takashima, 1989). El hígado de los peces carece de lóbulos hepáticos y triadas portales (unidades morfológicas básicas del hígado de mamíferos) (Raskovic et al., 2011). Los hepatocitos, en cambio, se organizan en cordones ramificados dispuestos de forma difusa o radial, y los vasos sanguíneos y conductos biliares se encuentran dispersos, sin ningún orden aparente dentro del parénquima (figura 5) (Rocha et al., 1994). El hígado tiene una importante función en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos, por lo tanto, es esperable que la actividad metabólica hepática sea mayor durante los períodos asociados a una rápida transferencia de energía y alto crecimiento (Wold et al., 2009). Son muchos los estudios en los que se evalúa los efectos de diferentes tipos de alimentación sobre el hígado en peces.

Por ejemplo, las reservas de glucógeno en los hepatocitos disminuyen significativamente y los límites celulares se vuelven difusos en larvas de pejerrey privadas de alimento. Además, frente al mantenimiento de esta condición se observan una marcada reducción en el tamaño de los núcleos de los hepatocitos y la presencia de núcleos picnóticos (Strüssmann & Takashima, 1989). Una disminución significativa en el área de los hepatocitos frente al hambre también se reportó en *Cichlasoma dimerus* (Delgadin et al., 2015; Karp, 2014). Por otro lado, Wold *et al.* (2009) registraron cambios en el tamaño de los hepatocitos y sus núcleos en el hígado del bacalao, *Gadus morhua*, frente a dietas con diferencias en el tipo (neutros o polares) y proporción lipídica. Por otro lado, frente a un exceso de lípidos en la dieta, el hígado puede sufrir esteatosis, presentando hepatocitos anormalmente grandes, cargados de lípidos (Jia et al., 2020).



*Figura 5: sección transversal (10 μm) del hígado de pejerrey (9 dpe) coloreada con Hematoxilina y Eosina. Imagen tomada en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción, FCEN, UBA durante el desarrollo de esta Tesis. \*: vasos sanguíneos.*

### Sistema esquelético

El esqueleto de los vertebrados está involucrado en múltiples procesos: la locomoción, la alimentación, la respiración, la protección de órganos sensibles, entre otros. Por esto, es indispensable que la forma y tamaño de los elementos esqueléticos no presenten alteraciones que impacten sobre su funcionalidad (Galea et al., 2021). El esqueleto de mamíferos está

compuesto por dos tipos de tejidos conectivos: el cartílago y el hueso. Sin embargo, en peces se conocen diferentes tipos de tejidos óseos, más de 15 tipos de cartílagos y diferentes tipos de tejidos intermedios entre tejido conectivo y tejido óseo, y entre tejido óseo y tejido cartilaginoso (Boglione, Gavaia, et al., 2013; Witten et al., 2010).

El cartílago es un tejido avascular, compuesto por condrocitos y una abundante matriz extracelular, que presenta cierta dureza, pero también es maleable, confiriendo flexibilidad al tejido. La matriz está compuesta por una gran proporción de glucosaminoglicanos respecto a las fibras de colágeno tipo II, lo cual permite la difusión de sustancias desde los vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante, condición crucial para la supervivencia de los condrocitos y la viabilidad del tejido (Pawlina & Ross, 2018).

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que se compone de células y una matriz extracelular mineralizada. En peces, los tipos celulares que se pueden encontrar en el tejido óseo son los osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo. Las variaciones entre los distintos tipos de huesos se basan en la presencia o ausencia de osteocitos (denominados hueso celular o acelular, respectivamente) y en la naturaleza de los osteoclastos predominantes (mononucleados o multinucleados). El principal componente orgánico de la matriz ósea suele ser el colágeno tipo I, pero en peces también puede ser abundante el colágeno tipo II (Boglione, Gavaia, et al., 2013). La matriz está mineralizada principalmente con fosfato de calcio en cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , brindando dureza a las estructuras y, consecuentemente, la capacidad de proporcionar sostén y protección (Pawlina & Ross, 2018).

Hay tres procesos descritos para la formación de los huesos en peces: la osificación endocondral, la osificación pericondral y la osificación intramembranosa (Boglione, Gavaia, et al., 2013). La distinción entre los mismos radica en si el tejido óseo se forma a partir de un molde de cartílago (endocondral y pericondral) o sin la intervención de un cartílago precursor (intramembranosa) (Galea et al., 2021). En la osificación intramembranosa las células mesenquimáticas se diferencian directamente a osteoblastos los cuales secretan la matriz ósea. La osificación pericondral, a diferencia de la endocondral, comienza desde la periferia del molde de cartílago, con la transformación del pericondrio a periostio, con células que secretan la matriz ósea. Entre las osificaciones condrales, la pericondral suele ser predominante respecto a la endocondral en peces (Boglione, Gavaia, et al., 2013).

La esquelotogénesis es el evento morfogenético en el desarrollo de los vertebrados a través del cual las estructuras esqueléticas se forman en lugares específicos, se articulan con otras estructuras y alcanzan un tamaño, forma y composición específicas (Beriotto et al., 2023; Fernández et al., 2018). En peces, está íntimamente relacionada con el crecimiento y en muchos casos el tamaño del animal correlaciona adecuadamente con el desarrollo esquelético (Bird & Mabee, 2003; Chalde et al., 2011; Parichy et al., 2009; Sæle & Pittman, 2010). En este grupo, la osificación de las estructuras esqueléticas se puede dar desde el desarrollo embrionario y estadios larvales hasta la adultez (Balon, 1999; Beriotto et al., 2023; Campinho, 2019). Ya que la esquelotogénesis se trata de un proceso altamente regulado, que necesariamente involucra la expresión de múltiples genes de forma secuencial, es esperable que sea particularmente sensible durante determinadas etapas del desarrollo (Krumlauf, 1994; Zambonino-Infante J L & Cahu, 2010). Los estadios larvales suelen considerarse críticos para el desarrollo de deformidades óseas,

las cuales frecuentemente afectan de forma negativa la condición y desempeño del animal (Beriotto et al., 2023; Boglione, Gisbert, et al., 2013).

Hasta el momento, no hay estudios sobre la esqueletogénesis general del pejerrey. Existe un trabajo en el que se estudia el efecto de la temperatura sobre el desarrollo del complejo caudal (Chalde et al., 2011), observando los primeros rayos de la aleta caudal a los 7 dpe. Además de diferencias atribuidas a las distintas temperaturas, los autores observaron variaciones en el ritmo del desarrollo de la aleta caudal entre individuos, que no podían ser explicadas por la temperatura o la edad. Por ejemplo, individuos de la misma edad, criados a la misma temperatura presentaron diferente grado de desarrollo de la aleta, y también, individuos de la misma edad, criados a diferentes temperaturas, presentaron el mismo grado de desarrollo del complejo caudal. Esto podría explicarse por la heterogeneidad en la talla de los animales, siendo los animales más grandes, los que presentaron un mayor desarrollo del complejo. Este ejemplo da una idea de la gran variabilidad que se puede encontrar al evaluar el desarrollo del esqueleto en la especie, el cual no solo se ve influenciado por las condiciones de mantenimiento, sino también por la talla de los animales.

Por otro lado, la nutrición de las larvas ha sido reconocida en varios estudios como uno de los factores clave que afectan la esqueletogénesis durante el desarrollo de los peces (Bastos Rocha et al., 2014; Boglione, Gisbert, et al., 2013; Fernández et al., 2018). Un pequeño desajuste en el suministro de algunos nutrientes como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas o minerales perjudica el desarrollo ya que los mismos, además de considerarse los precursores de la masa corporal, también actúan como moduladores de genes involucrados en la organogénesis y esqueletogénesis (Zambonino-Infante J L & Cahu, 2010).

Hay muchos trabajos en los que se evalúa el efecto de los lípidos sobre el desempeño general y sobre la esquelotogénesis en particular (Bertucci et al., 2022; Cahu et al., 2003; Gómez-Requeni et al., 2012; Wold et al., 2009; Zarantoniello et al., 2020). Los resultados sugieren que la cantidad adecuada de lípidos está dentro de un rango acotado, y que, tanto niveles lipídicos inferiores, como superiores, impactan negativamente sobre el estado del animal. Por ejemplo, Gómez-Requeni *et al.* (2012) probaron los efectos de tres dietas con diferentes concentraciones lipídicas (10%, 13% y 21%) sobre el crecimiento de juveniles de pejerrey. Encontraron que algunos de los animales alimentados con la dieta de mayor concentración lipídica presentaban deformidades esqueléticas severas, las cuales no habrían sido provocadas por un desbalance de vitaminas y/o minerales, ya que las tres dietas contenían la misma cantidad de estos micronutrientes. Hay evidencias de que no solo la cantidad de lípidos, sino también la proporción de tipos lipídicos (neutros o fosfolípidos) que contiene la dieta, determinan el efecto que la misma tendrá sobre los animales (Cahu et al., 2003; Wold et al., 2009; Zambonino-Infante J L & Cahu, 2010). Además, los fosfolípidos parecen tener un efecto preventivo en la incidencia de deformidades esqueléticas. Por ejemplo, Cahu *et al.* (2003) encontraron que un 35% de las larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con una dieta con menor proporción de fosfolípidos presentaban deformidades esqueléticas, en cambio, solo un 2% de las larvas alimentadas con la mayor proporción de fosfolípidos presentaban alguna deformidad.

Las deformidades esqueléticas pueden tener causas multifactoriales (nutricionales, ambientales y/o genéticas) (Boglione, Gisbert, et al., 2013). Dentro de las condiciones ambientales, muchos factores fueron propuestos como causantes de deformidades esqueléticas: el estado de los reproductores, la calidad del agua, la densidad de la población, el estrés por manipulación, el

pH, traumas físicos o estrés mecánico, variaciones de la temperatura, etc. (Boglione, Gisbert, et al., 2013). Por ejemplo, Strüssmann et., al (1997) al evaluar el efecto de la temperatura sobre la determinación sexual del pejerrey bonaerense y el pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*), notaron que más del 60% de los pejerreyes bonaerenses mantenidos a 29°C desde su eclosión presentaban deformidades esqueléticas en la región axial. Este porcentaje disminuía si los animales eran colocados a esa temperatura a una edad más avanzada, lo que apoya la idea de que, durante las primeras etapas de la ontogenia los animales son más sensibles, o, podría implicar que la exposición por períodos cortos causa, en promedio, menos deformidades. Para el pejerrey patagónico, también se describió un umbral térmico de inducción de deformidades esqueléticas, a menores temperaturas.

Las deformidades esqueléticas son un factor importante que afecta la productividad y rentabilidad del cultivo de peces ya que las mismas, además de disminuir la eficiencia en la incorporación de los nutrientes, el crecimiento y la tasa de supervivencia, afectan su imagen, reduciendo su valor en el mercado (Boglione, Gisbert, et al., 2013; Fernández et al., 2018; Fragkoulis et al., 2017). La detección tardía del problema, el desconocimiento del momento y causa de las deformidades y la ausencia de técnicas de detección temprana que puedan implementarse industrialmente son factores que frustran los intentos de reducción de su incidencia en el cultivo de peces (Fernández et al., 2018).

Una de las técnicas utilizadas en los trabajos científicos para detectar deformidades esqueléticas y/o caracterizar la esqueletogénesis es la doble tinción con Rojo Alizarina y Azul Alcian (RA-AA) para hueso y cartílago, respectivamente. El Azul Alcian (AA) es un colorante con carga positiva que tiñe el cartílago por su interacción electroestática con las cargas negativas de los

mucopolisacáridos presentes en el tejido (Walker & Kimmel, 2007). El Rojo Alizarina permite la observación del tejido óseo al colorear eficientemente la matriz mineralizada del hueso (Cubbage & Mabee, 1996; Puchtler et al., 1969). Este tipo de evaluación posibilita una detección de deformidades esqueléticas mucho más eficiente que mediante una evaluación visual externa, y permite realizar una descripción detallada de la esqueteogénesis, diferenciando los procesos de osificación (intramembranosa o condral).

Pese al progresivo aumento de trabajos centrados en el pejerrey bonaerense, las condiciones para su cría rara vez se basan en conocimientos sobre su biología, fisiología u ontogenia, sino que suelen ser establecidas empíricamente (Gómez-Requeni et al., 2013; Somoza et al., 2008). En base a lo presentado en esta sección es posible concluir que, para lograr un cultivo eficiente y rentable, es importante conocer los requerimientos nutricionales específicos de la especie en cada etapa de la ontogenia. Lo mismo puede abordarse a partir del estudio de la biología larval, evaluando por ejemplo el desarrollo del tracto alimentario y su capacidad digestiva, y la ontogenia del esqueleto que posibilita identificar los momentos de mayor vulnerabilidad a deformidades esqueléticas. Esto permitiría orientar los esfuerzos y reducir la incidencia de deformidades morfológicas que perjudican el desempeño del animal y disminuyen su precio en el mercado. La evaluación de diferentes dietas iniciales, junto con la caracterización de la ontogenia de sistemas claves, pueden servir como punto de partida para mejorar la eficiencia y rentabilidad del cultivo de la especie.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

La presente Tesis se enmarca dentro de un proyecto marco PICT dirigido por la Dra. Vissio titulado "Efecto de la primera alimentación en la supervivencia, el desarrollo, y el crecimiento del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)". En éste se pretende evaluar los efectos de la primera dieta sobre la supervivencia, el desarrollo y el crecimiento de larvas y juveniles de pejerrey bonaerense y analizar cómo esas condiciones nutricionales iniciales podrían repercutir en la vida adulta. Los animales estudiados en esta Tesis corresponden al primer experimento desarrollado entre los años 2022 y 2023.

En base a lo expuesto previamente se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

"Un esquema de primera alimentación que contemple un alimento vivo suplementado con ácidos grasos poliinsaturados, tendrá un impacto positivo en la maduración morfológica del tracto alimentario y reducirá la incidencia de deformidades esqueléticas del pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis*."

Para la realización de esta Tesis se proponen dos enfoques: en primer lugar, una caracterización general de los sistemas de interés que aporte al conocimiento de la biología larval de esta especie, y, en segundo lugar, una aproximación experimental que permita poner a prueba la hipótesis planteada.

El **objetivo general** de esta Tesis es caracterizar la esqueletogénesis y el desarrollo del tracto alimentario del pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis*, y evaluar la posible influencia de

una primera dieta enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo de estos sistemas.

**Objetivos específicos (OE):**

- 1) Caracterizar la ontogenia del tracto alimentario y del sistema esquelético en larvas y juveniles de pejerrey criados en acuarios con agua verde.
- 2) Evaluar los efectos del enriquecimiento de la primera alimentación sobre el desarrollo del tracto alimentario en larvas de pejerrey a través de indicadores del estado nutricional de los animales.
- 3) Evaluar los efectos del enriquecimiento de la primera alimentación sobre la incidencia de deformaciones esqueléticas en estadios larvales y juveniles de pejerrey.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de las muestras

Durante esta Tesis se trabajó con ejemplares de pejerrey desde su eclosión. Los animales fueron criados en el Laboratorio de Biotecnología Acuática (FCByF-UNR) del Centro Científico, Tecnológico y Educativo "Acuario del Río Paraná", Rosario. Desde la eclosión y durante todo el estudio los animales fueron mantenidos en tanques de 180 litros (L) en un sistema de recirculación cerrado, a  $24 \pm 0,6$  °C, bajo un fotoperiodo 12:12 h luz:oscuridad y una salinidad de 1g/L. La densidad inicial fue de 200 larvas por tanque (aproximadamente 1 individuo por litro). Para cada fecha de muestreo, todos los animales fueron anestesiados en frío, considerando la pérdida de respuesta motora como indicador efectivo del procedimiento. Luego se los pesó y fotografió en vista ventral y lateral bajo una lupa estereoscópica para su posterior medición de la talla. Para los estudios del tracto digestivo los animales se fijaron en solución de Bouin y fueron conservados en etanol 70%. Los animales destinados al estudio del esqueleto fueron fijados en formaldehído 4% en PBS (pH 7,4), deshidratados gradualmente y conservados en etanol 100%. En esas condiciones los animales fueron enviados a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, donde fueron procesados y analizados.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR (resolución N° 461/2023).

## Condiciones de cría

### *Agua verde*

Los animales estudiados para la **caracterización de la ontogenia del tracto alimentario y del esqueleto** fueron alimentados con **agua verde**. Ésta contenía principalmente diferentes géneros de clorofitas y de cianobacterias, diatomeas, amebas y algunos ciliados; y, además, fue suplementada con *Daphnia magna* a partir de los 30 dpe. El agua verde es una práctica comúnmente utilizada en acuicultura y la condición estándar de cuidado en ese laboratorio. La cría en agua verde asegura una alta disponibilidad de fitoplancton y zooplancton como alimento para las larvas. Los individuos mantenidos bajo esta condición serán identificados a lo largo de la Tesis como "Car" (caracterización). Para esta parte del trabajo se utilizaron animales provenientes de dos desoves independientes.

### *Tratamientos*

Los animales destinados al abordaje experimental de la Tesis, es decir, a la **evaluación de los posibles efectos de la dieta inicial** sobre la maduración del tracto alimentario y sobre la incidencia de deformidades esqueléticas (OE2 y OE3), serán identificados como "Exp" (experimental). Los mismos fueron criados siguiendo un esquema de alimentación más controlado. A los diferentes tanques se les asignó uno de los siguientes tratamientos que variaban en el tipo y grado de enriquecimiento de los nauplios de *Artemia salina* (Sanders):

- **Tratamiento S:** sin enriquecer
- **Tratamiento P:** enriquecidos con aceite de pescado 100%

- **Tratamiento M:** enriquecidos con una mezcla de aceites (50% de pescado, 25% de girasol y 25% de lino)

El protocolo general de alimentación consistió en la administración en exceso (*ad libitum*) de los nauplios de artemia sin enriquecer o enriquecidos según el tratamiento, cada 3 horas, desde la eclosión hasta el día 40 pe. A partir del día 30 pe, hasta el 90 pe, se incorporó alimento seco de una granulometría adecuada, preparado y utilizado habitualmente en el laboratorio. Entre los días 30 y 40 pe se llevó a cabo la adaptación al cambio de alimentación, reemplazando dos alimentaciones de artemia con alimento seco y disminuyendo el número de alimentaciones por día hasta llegar a 4. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado, contando con 9 tanques en total. El enriquecimiento de los nauplios de artemia fue evaluado mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC/MS), asegurando una proporción diferencial de ácidos grasos  $\Omega$ -3 entre los diferentes tratamientos.

### Análisis histológico

Para el estudio del tracto alimentario, tanto los animales "Car" como los "Exp" fueron procesados siguiendo la misma metodología. En el Laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción (Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires /Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada - CONICET-UBA) los animales fueron deshidratados en alcoholes de graduación ascendente e incluidos en HISTOPLAST® sintético (Biopack). Se realizaron cortes histológicos transversales y parasagittales entre 7 y 10  $\mu$ m de espesor que fueron montados en

portaobjetos cubiertos con gelatina y luego coloreados según la técnica de Hematoxilina y Eosina.

### *Caracterización del tracto alimentario: animales "Car"*

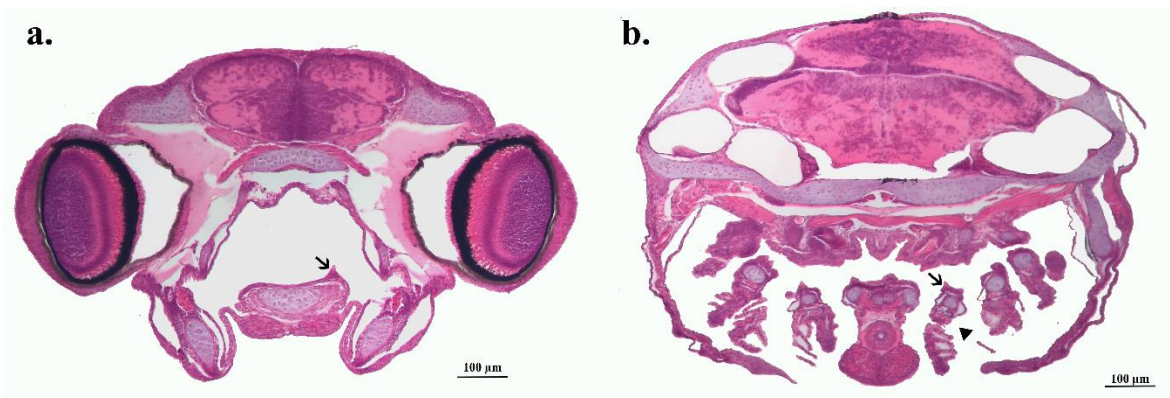
Durante el desarrollo de la Tesis se analizaron los cortes histológicos previamente coloreados en el marco del proyecto PICT. Se evaluaron las diferentes partes del mismo (cavidad bucal, faringe, esófago, intestino anterior, medio y posterior, recto, páncreas e hígado) haciendo énfasis en la presencia de estructuras o características específicas que denotan la madurez del tracto alimentario. Se analizaron entre 2 y 3 animales por cada dpe evaluado (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 18 y 21). Además, se contaban con algunos cortes coloreados con la técnica de azul de alcian (AB) y de ácido periódico de Schiff (PAS) que permitieron verificar ciertas características histológicas, en particular la identidad de células mucosas.

### *Estudio de los efectos de los tratamientos sobre el tracto alimentario: animales*

#### *"Exp"*

Para la evaluación de los efectos de los diferentes tratamientos sobre el tracto alimentario se muestrearon 3 individuos "Exp" de cada pecera al día 9 pe (27 animales en total). La evaluación de las dietas iniciales sobre el tracto alimentario se realizó mediante la comparación de distintos parámetros que suelen ser indicadores de: i) la eficiencia en la captación e ingestión del alimento, como el número de papilas bucales y faríngeas respectivamente; ii) del almacenamiento de la reserva energética, como el área de los hepatocitos; iii) la digestión y absorción del alimento, como el alto de los pliegues intestinales y de los enterocitos.

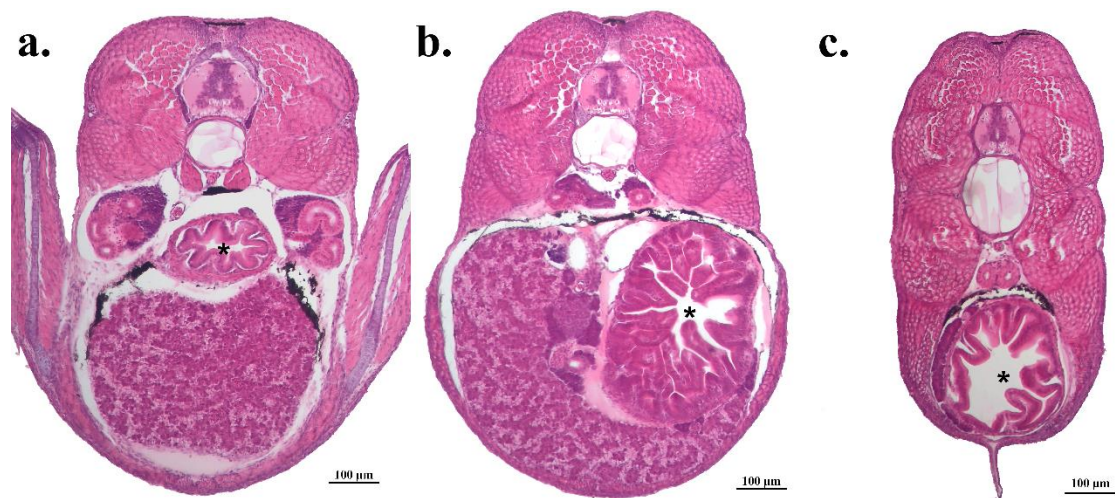
El número de papilas gustativas bucales y faríngeas se determinó por observación de los cortes seriados bajo microscopio óptico (OLYMPUS) Se cuantificaron las papilas presentes en cada individuo, distinguiendo entre las bucales y faríngeas. Para definir el límite entre la cavidad bucal y faríngea (figura 6) se consideró como el comienzo de la última el primer corte en el que se observa la presencia de arcos branquiales con epitelio respiratorio. Una de las dificultades que presenta este método de cuantificación es el hecho de que una misma papila puede aparecer en más de un corte histológico, ya que su tamaño suele ser superior a 10  $\mu\text{m}$  (Hara, 2011). Para evitar la sobrecuantificación se prestó especial atención a la posición de cada papila dentro de la cavidad bucofaríngea y a los cambios morfológicos de la misma en los sucesivos cortes.



*Figura 6: imágenes representativas de secciones transversales (10  $\mu\text{m}$ ) coloreadas con Hematoxilina y Eosina de la cavidad bucal (a) y faríngea (b) de pejerrey. Nótese la presencia de papilas gustativas (flecha) y de arcos branquiales con epitelio respiratorio (punta de flecha).*

Para la medición del área de los hepatocitos, el alto de los pliegues intestinales y el alto de los enterocitos, los cortes fueron fotografiados con un microscopio Zeiss Primo Star acoplado a una cámara digital Zeiss Axiocam 208 color. El aumento al cual se tomaron todas las fotografías fue

de 40X y el software utilizado para realizar las mediciones fue el ImageProPlus. Se seleccionaron y fotografiaron seis cortes distanciados entre sí del intestino, distinguiendo la primera porción del intestino (Ant.), la porción media-anterior (Med.), y la posterior (Post.). El intestino Ant., cercano al esófago, se caracteriza por presentar una posición central dentro de la cavidad abdominal y estar a la altura del hígado (figura 7.a). El intestino Med. también está a la altura del hígado, y ocupa un área mayor y excéntrica dentro de la cavidad (figura 7.b). El intestino Post. se definió como aquel que presenta vacuolas supranucleares y coincide con la presencia del pliegue de la aleta (figura 7.c). Se tomó la precaución de seleccionar los cortes en donde el grosor de la capa muscular del intestino fuese constante para evitar realizar mediciones en secciones oblicuas del órgano. En cada corte se midió el alto de un pliegue intestinal y el alto del enterocito, procurando medir pliegues que presentasen un claro límite entre la lámina propia y el epitelio, cuyo eje fuese lo más perpendicular posible a la pared intestinal (figura 8a).



*Figura 7: imágenes representativas de secciones transversales (10 µm) coloreadas con Hematoxilina y Eosina del intestino anterior. (a), medio (b) y posterior (c) de pejerrey. El asterisco indica la luz del intestino.*

Por otro lado, se seleccionaron, fotografiaron y se midieron el área de 15 hepatocitos en tres cortes distanciados entre sí del hígado de cada individuo, de manera de no medir dos veces el mismo hepatocito. Los hepatocitos medidos fueron aquellos con un tamaño representativo dentro la foto, con límites celulares claros y núcleo periférico (figura 8b).

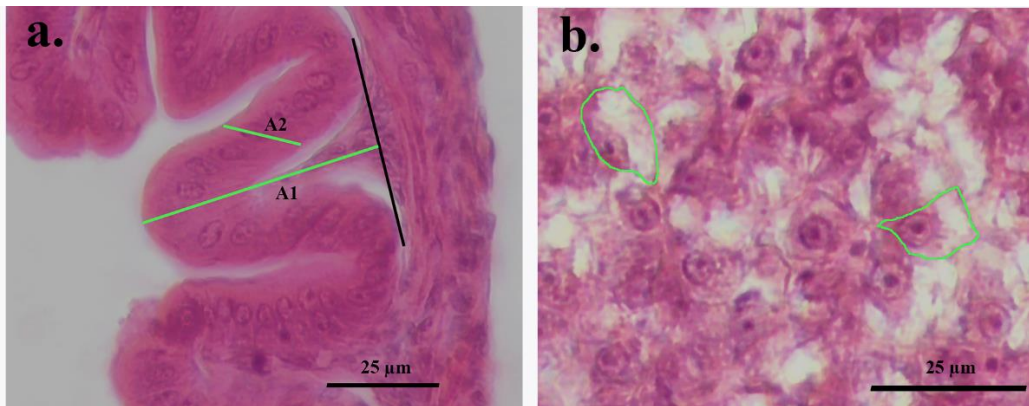


Figura 8: imágenes representativas de las mediciones realizadas de (a) el alto del pliegue intestinal (A1) y alto del enterocito (A2) y (b) el área de los hepatocitos. La línea negra marca el límite entre el epitelio y la lámina propia como guía para la medición del alto del pliegue intestinal. Nótese que se cumplen los criterios mencionados anteriormente.

### Coloración *in toto* del esqueleto

Para la caracterización de la esqueletogénesis (animales "Car") y la evaluación de la incidencia de deformidades esqueléticas (animales "Exp"), se realizaron coloraciones *in toto* de los ejemplares con Azul de Alcian (AA) en solución no ácida, con Rojo Alizarina (RA), o dobles coloraciones (AA-RA). Las condiciones ácidas que tradicionalmente se utilizan en el protocolo de tinción de cartílago con AA decalcifican la matriz ósea disolviendo los cristales de hidroxiapatita. La capacidad de tinción del Rojo Alizarina depende del grado de mineralización de la matriz

ósea, con lo cual, cuando las estructuras óseas son pequeñas o están en formación, un protocolo de doble tinción en condiciones ácidas afecta negativamente la detección del componente óseo (Walker & Kimmel, 2007). Walker & Kimmel (2007) adaptaron un protocolo de doble tinción libre de ácido, reduciendo el error en las descripciones de la esqueletogénesis. Los protocolos utilizados fueron adaptados del propuesto por Walker & Kimmel (2007) y puestos a punto previamente para esta especie en el laboratorio. Brevemente, para las coloraciones AA-RA los animales conservados en etanol 100% se lavaron con agua destilada, luego se incubaron con Azul Alcian (Mallinckrodt - 0,02g AA, 50nM  $MgI_2$  en Etanol 70%) durante toda la noche y fueron rehidratados pasando por soluciones decrecientes de etanol. Para favorecer la oxidación de la melanina y por ende el aclaramiento de la piel de los animales, los mismos se colocaron en una solución de KOH 1% y  $H_2O_2$  al 10% (9:1). A continuación, luego de una incubación en KOH 1%, lo cual favorece que el músculo se vuelva más transparente, se incubaron en Rojo Alizarina (Biopack - 0,007% en KOH 1%). Las muestras fueron luego deshidratadas en soluciones de KOH y glicerol con proporciones crecientes del último, y conservadas en glicerol 100%. Si bien se contó con un protocolo general con tiempos específicos, los mismos se adaptaron en función del tamaño de los animales ya que la coloración (RA, entre 2 y 18hrs), la oxidación de la melanina ( $H_2O_2$ , entre 30 y 90min) y el transparentado del músculo (KOH 1% entre 10 min y 5 días total) podrían requerir diferentes tiempos para alcanzar el resultado deseado. Además, para los animales más grandes se utilizó una solución de KOH 2% en lugar de 1%. Para las coloraciones con AA o RA únicamente, el protocolo consistió en una adaptación del descripto obviando el otro colorante. Las estructuras óseas y cartilaginosas se observaron y analizaron bajo una lupa

estereoscópica (Reichert) y se tomaron imágenes representativas a través de una lupa Leica EZ4D con cámara digital incorporada.

### *Caracterización de la esqueletogénesis: animales "Car"*

La caracterización del desarrollo esquelético se realizó desde el día 0 hasta el 54 pe mediante el análisis de la presencia y el grado de desarrollo de estructuras cartilaginosas y óseas en base a lo publicado por Mabee & Trendler (1996) y Beriotta., et al, (2023). Se definieron dos categorías para las estructuras cartilaginosas: presente y reabsorbiendo; y tres grados de osificación para las estructuras óseas: osificación temprana (estructura con menos del 50% de osificación), osificación avanzada (estructura con más del 50% de osificación) y osificado (estructuras con 100% de osificación). Los procesos de osificación endocondral y pericondral fueron estudiados y denominados en conjunto como osificación condral, distinguiéndola de la intramembranosa. Parte de las coloraciones y del análisis fueron realizadas previo al comienzo de esta Tesis en el marco del proyecto PICT. Durante la Tesis se completó el procesamiento y análisis de las muestras, asegurando que hubiese al menos tres registros para cada uno de los días incluidos en el estudio.

Se evaluaron en total 81 animales, de los cuales 18 fueron coloreados con RA-AA. Los días analizados para el hueso fueron: 0, 1, 2, 5, 9, 16, 17, 23, 24, 26, 32, 38 y 54 pe. Los días analizados para el cartílago fueron: 0, 2, 5, 9, 10, 16, 17, 24, 29 y 54 pe. Debido a la similitud en el desarrollo entre los días 24 y 26 los mismos se analizaron en conjunto para algunas regiones. Si bien se analizaron todas las regiones en cada individuo, algunos días no fueron incluidos en los resultados para determinadas regiones debido a problemas de coloración y reconocimiento de estructuras específicas. Para una mejor observación e identificación de las estructuras de los

arcos branquiales e hioideo, los mismos fueron retirados de algunos ejemplares y montados con glicerol entre un portaobjetos y un cubreobjetos.

### *Estudio de los efectos de los tratamientos sobre el esqueleto: animales "Exp"*

Las deformidades esqueléticas se evaluaron en individuos de 50 dpe. Previo a la coloración se realizó un análisis a simple vista de las deformidades externas, evaluando 6 individuos por cada pecera (N=54). En las coloraciones *in toto* (4 ejemplares por pecera, 36 individuos en total) se consideraron como deformidades esqueléticas: i) alteraciones de la forma de las estructuras óseas; ii) alteraciones en el número de las estructuras óseas (teniendo en cuenta la posibilidad de variaciones merísticas); iii) desviaciones del eje corporal. Estas deformidades fueron registradas especificando la región donde se observó y el tipo de deformidad. Las diferentes deformidades fueron clasificadas en base a lo descrito en Beriotto *et al.* (2023), de Azevedo *et al.* (2017) y Witten *et al.* (2009).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en la comparación de las variables respuesta (VR) evaluadas entre los tres tratamientos. Siendo la unidad experimental cada pecera, fue necesario declarar una falta de independencia entre los animales provenientes de la misma pecera a lo cual se suma la falta de independencia entre los datos provenientes de un mismo animal (anidamiento en ambos casos). En todos los análisis se utilizó un modelo mixto, debido a la falta de independencia entre las observaciones, y generalizado, ya que ninguna de las VR medidas presentó una distribución normal. Para cada análisis se verificó el cumplimiento de los respectivos supuestos. Se

consideraron diferencias significativas cuando el p-valor era menor o igual a 0,05. Las VR analizadas fueron:

*Para el estudio del tracto alimentario:*

- **Número de papilas gustativas**, variable cuantitativa discreta, distribución Binomial Negativa
- **Alto del pliegue intestinal**, variable cuantitativa continua, distribución Gamma
- **Alto del enterocito**, variable cuantitativa continua, distribución Gamma
- **Área del hepatocito**, variable cuantitativa continua, distribución Gamma

*Para el estudio de la incidencia de deformidades esqueléticas:*

- **Presencia/ausencia de alguna deformidad esquelética**
- **Presencia/ ausencia de cifosis**
- **Presencia/ ausencia de lordosis**
- **Presencia/ ausencia de deformidades en los arcos neurales o hemales**
- **Presencia/ ausencia de deformidades en los cuerpos vertebrales**
- **Presencia/ ausencia de deformidades en los rayos branquiostegales**

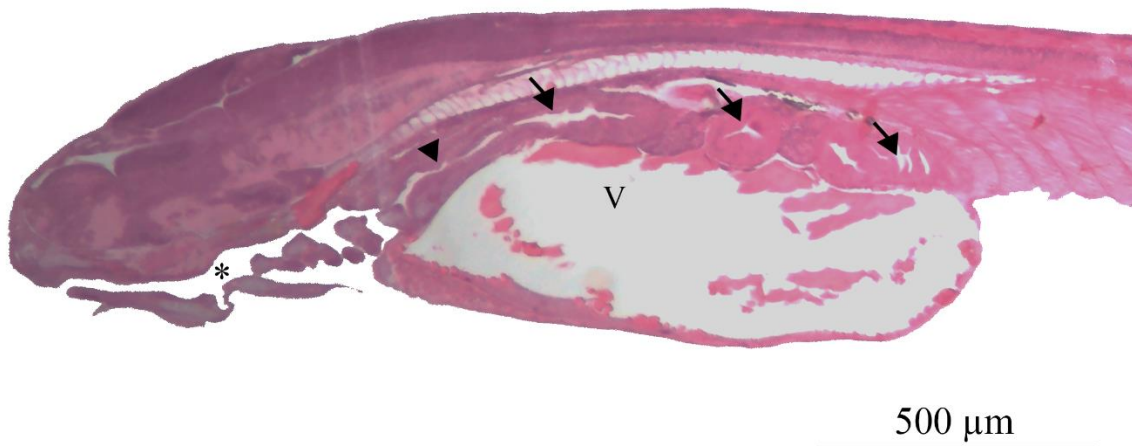
Todas variables cuantitativas discretas, con una distribución de probabilidades de Bernoulli.

## RESULTADOS

### Caracterización de la ontogenia del tracto alimentario y de las glándulas anexas

#### *Momento de la eclosión*

El pejerrey al eclosionar presenta un tracto alimentario con todas sus regiones (cavidad bucofaríngea, esófago, intestino y recto) y glándulas anexas diferenciadas. Además, la boca y el ano ya se encuentran abiertos y se observa abundante vitelo (figura 9).



*Figura 9: sección parasagital (7µm) de pejerrey (0 dpe) coloreada con Hematoxilina y Eosina. El asterisco indica la cavidad bucofaríngea; la punta de flecha señala el esófago; las flechas señalan diferentes regiones del intestino; V: vitelo.*

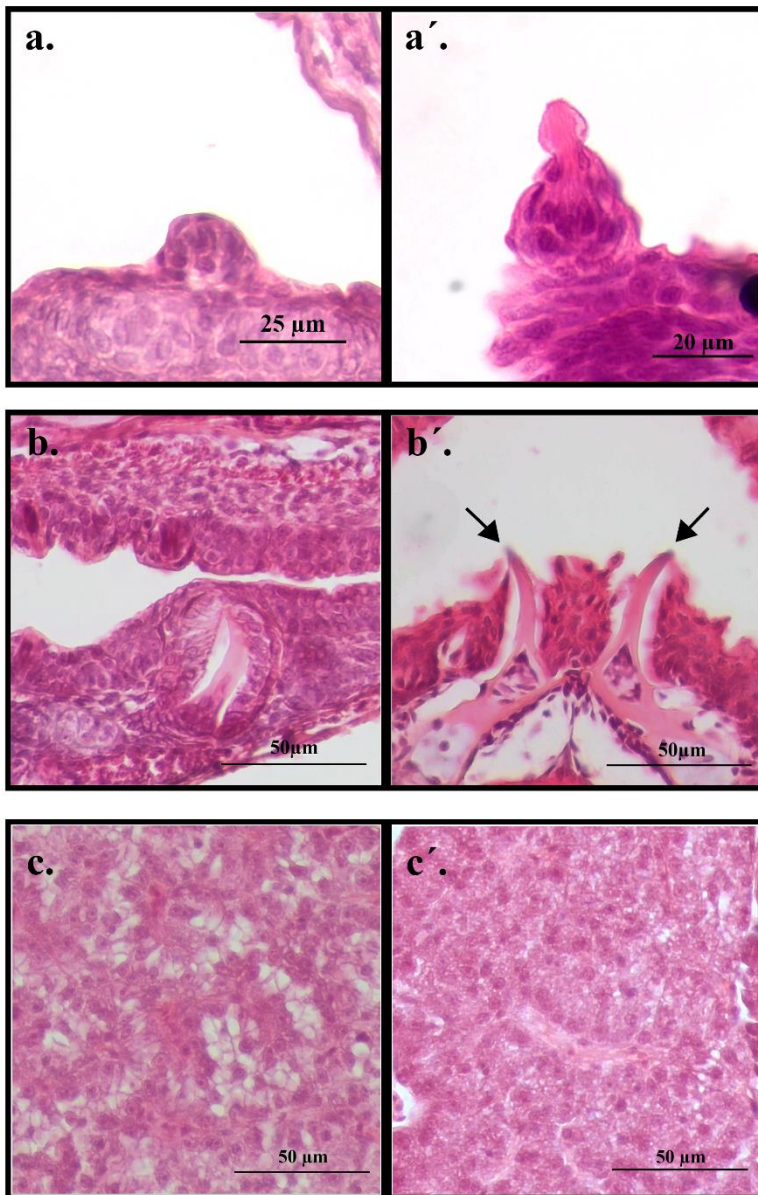
En cuanto a la cavidad bucofaríngea, la misma ya presenta papilas gustativas en la región bucal y faríngea (donde se encuentran los arcos branquiales). La región bucal presenta un menor número de papilas gustativas que la faríngea, con una estructura levemente diferente a la que presentan las papilas maduras, ya que poseen una forma más redondeada y no se observan las

características prolongaciones apicales de las células sensoriales (figura 10a). Además, es posible identificar el cartílago labial, el cual se mantiene presente hasta el final del análisis. El epitelio de la cavidad bucal es biestratificado plano, festoneado en ciertas regiones, y con escasas células mucosas de pequeño tamaño. En la cavidad faríngea el epitelio es simple plano y las papilas gustativas se encuentran en los arcos faríngeos y en el techo de la cavidad formando ocasionalmente hileras en sentido anteroposterior. Algunas de las mismas presentan las típicas prolongaciones de las células sensoriales y la morfología característica de las papilas maduras (ver referencia en figura 10a'). Se observa una lengua desarrollada, sobre la cual también se registraron papilas gustativas. Además, se observaron en promedio tres dientes embebidos en la faringe ventral (figura 10b).

La mucosa del esófago presenta un epitelio estratificado, que forma pliegues, con células mucosas intercaladas entre las células epiteliales. El intestino ya se puede diferenciar en anterior, medio y posterior, como se describió en la sección de materiales y métodos, en función de características histológicas específicas y la ubicación en la cavidad general del cuerpo. El epitelio intestinal es simple cilíndrico y presenta chapa estriada, cuyo desarrollo es mayor hacia posterior. A lo largo del intestino se observaron células en mitosis (figura 11a) y, en los enterocitos del intestino posterior, vacuolas supranucleares (ver ejemplo de vacuolas supranucleares en figura 13). La mucosa intestinal presenta pliegues, que aumentan de altura hacia posterior, salvo en el recto, el cual se caracteriza por un epitelio simple cúbico y la ausencia de vacuolas supranucleares (ver ejemplo de recto en figura 13).

En el hígado se observan algunos hepatocitos de tamaño moderado que, presentan una gran vacuola de reservas energéticas (vacuolados) (figura 10c). En algunos cortes, se observaron tanto

hepatocitos con núcleos picnóticos como en mitosis. En cuanto al páncreas, es posible distinguir un páncreas exocrino de un endocrino. El primero se diferenció por presentar células altamente basófilas en su región basal, con una porción apical con gránulos de zimógeno eosinófilos, sin presentar aún la estructura típica de acinos pancreáticos (figura 11b). El páncreas endocrino se identificó mediante la detección de acúmulos de células moderadamente basófilas (figura 11c).



*Figura 10: secciones de 7µm de espesor coloreadas con Hematoxilina y Eosina representativas de los cambios observados en la cavidad bucofaringea y el hígado de pejerrey. a. Papila gustativa inmadura (pejerrey de 0 dpe); a'. Papila gustativa madura, nótese las prolongaciones citoplasmáticas de las células sensoriales (pejerrey de 9 dpe); b. Diente embebido (pejerrey de 0 dpe); b'. Dientes eclosionados (flechas) (pejerrey de 11 dpe); c. Hígado con hepatocitos vacuolados (pejerrey de 0 dpe); c'. Hígado con hepatocitos con múltiples vacuolas pequeñas (pejerrey de 3 dpe).*



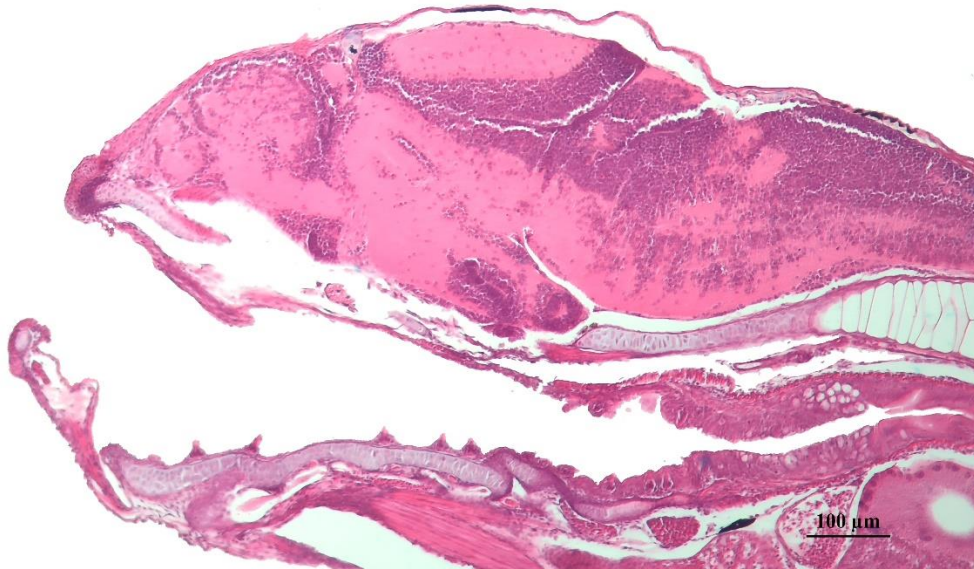
Figura 11: imagen representativa de sección parasagital (7µm) de intestino medio (a) y páncreas exocrino (b) y endocrino (c) de pejerrey (0 dpe) coloreada con Hematoxilina y Eosina. \*: páncreas endócrino; punta de flecha: células en mitosis; flecha: chapa estriada del epitelio intestinal.

A continuación, se especifican las modificaciones observadas a lo largo del desarrollo en las diferentes regiones.

### *Cavidad bucofaríngea*

A partir del día 1 pe es posible observar papilas gustativas maduras tanto en la cavidad bucal como faríngea. Además, las mismas aumentan progresivamente en número a lo largo del desarrollo, manteniendo una mayor cantidad en la región faríngea respecto a la bucal y se observa con mayor frecuencia su disposición en hileras (figura 12). A partir del 2 dpe se observan por primera vez dientes en la cavidad bucal y faríngea, y su número aumenta progresivamente en la faringe, tanto en la región dorsal como ventral. A partir del día 3 pe se observa un aumento en el número de capas del epitelio cercano al esófago, dentro del cual se encuentran numerosas papilas gustativas. A partir del día 7 pe se observa un aumento considerable en el número de papilas en los labios y se comienza a detectar dientes bucales y faríngeos eclosionados (figura

10b'). Para el día 11 pe la proporción de dientes eclosionados aumenta y se observa un incremento en la cantidad y tamaño de las células mucosas de la cavidad faríngea. Además, se detectó un mayor desarrollo del músculo estriado en la transición entre la faringe y el esófago.



*Figura 12: imagen representativa de la región anterior del pejerrey (3 dpe) en sección parasagital (7μm) coloreada con Hematoxilina y Eosina con papilas gustativas dispuestas en una hilera anteroposterior en la cavidad bucofaríngea*

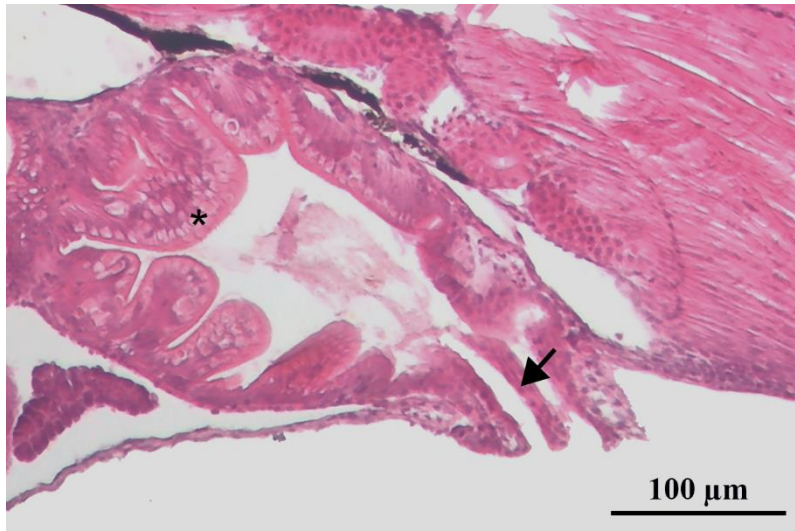
### *Esófago*

A partir del día 3 pe, se observa un aumento considerable y progresivo en la abundancia de las células mucosas, las cuales, además, aumentan de tamaño gradualmente.

### *Intestino*

A lo largo del desarrollo se observa un incremento paulatino en el alto de los pliegues intestinales y un aumento en el desarrollo de la chapa estriada de los enterocitos (con excepción del recto).

La altura relativa de los pliegues intestinales se mantiene constante, siendo mayor en intestino medio. También, la chapa estriada mantiene la relación de tamaños entre las diferentes regiones (anterior < medio < posterior). Se observa una disminución en el número de enterocitos en mitosis desde el día 2 pe. A partir del mismo día se comienzan a detectar células mucosas en el intestino anterior y posterior y a partir del 5 dpe en el intestino medio. La cantidad de células mucosas también parece aumentar con los días de desarrollo, siempre manteniéndose en una baja proporción.



*Figura 13: imagen representativa de sección parasagital (7 $\mu$ m) de intestino posterior y recto de pejerrey (11 dpe). El asterisco señala las vacuolas supranucleares características del intestino posterior; la flecha señala el recto.*

### *Glándulas anexas*

Hasta el día 2 pe se observa un aumento en el número de hepatocitos vacuolados. A partir del día 3 pe disminuye el número de hepatocitos vacuolados y se comienza a observar una mayor

proporción de hepatocitos con múltiples vacuolas pequeñas en su citoplasma (Figura 10c'). Al día 11 pe vuelve a observarse un aumento de hepatocitos vacuolados.

La estructura del páncreas presenta un estado desorganizado en la eclosión y, durante los días analizados aumenta progresivamente la presencia de acinos pancreáticos, observándose un incremento de células cuya región apical, con los gránulos de zimógeno, está orientada hacia el centro de la estructura. Además, a partir del día 7 pe se detectaron núcleos con características histológicas típicas de las células centroacinares.

### *Vitelo*

Inicialmente, el vitelo se observa en forma de placas rodeado por la capa sincicial vitelina (CSV), que se formó durante el desarrollo embrionario. Con el avance de los días, la cantidad de vitelo disminuye hasta no detectarse alrededor del día 7 pe, observándose únicamente la CSV hasta que desaparece entre los días 11 a 18 pe.

### Caracterización de la ontogenia del sistema esquelético

Al momento de la eclosión, el pejerrey presenta estructuras esqueléticas únicamente en la región craneal y parte de la aleta pectoral. En particular, se observa parte de los arcos branquiales (ceratobranquial 5 y faringobranquiales 3 y 4, ver referencia en figura 17) como las únicas estructuras óseas reconocibles. Además, la mayoría de las estructuras del cráneo y arcos branquiales e hioideo que presentan una osificación condral ya se encuentran presentes como cartílago. Respecto a la región post-craneal, únicamente se encuentran presentes el molde de cartílago a partir del cual osificarán la escapula y el coracoides, y el disco endoesquelético, a partir

del cual derivan los radiales proximales de la aleta pectoral (ver referencias en figura 19). En el análisis se observó una gran heterogeneidad en el grado de desarrollo del esqueleto en animales de la misma edad, manteniendo la secuencia de formación de las diferentes estructuras. En cuanto a la columna vertebral, las primeras vértebras se observan al día 17 pe y para el día 32 pe ( $11,84 \pm 1,27$  mm) ya se observa el total de las vértebras osificadas (entre 48 y 51 vértebras, sin considerar el urostilo). En el complejo caudal, los primeros componentes cartilagosos se observan al día 2 pe ( $7,58 \pm 0,40$  mm) y, para el día 32 pe, alcanza el máximo grado de desarrollo observado en el estudio. Finalmente, al día 54 pe ( $14,33 \pm 1,52$  mm), la mayoría de las regiones del esqueleto presentan un aspecto similar al del adulto (figura 14).

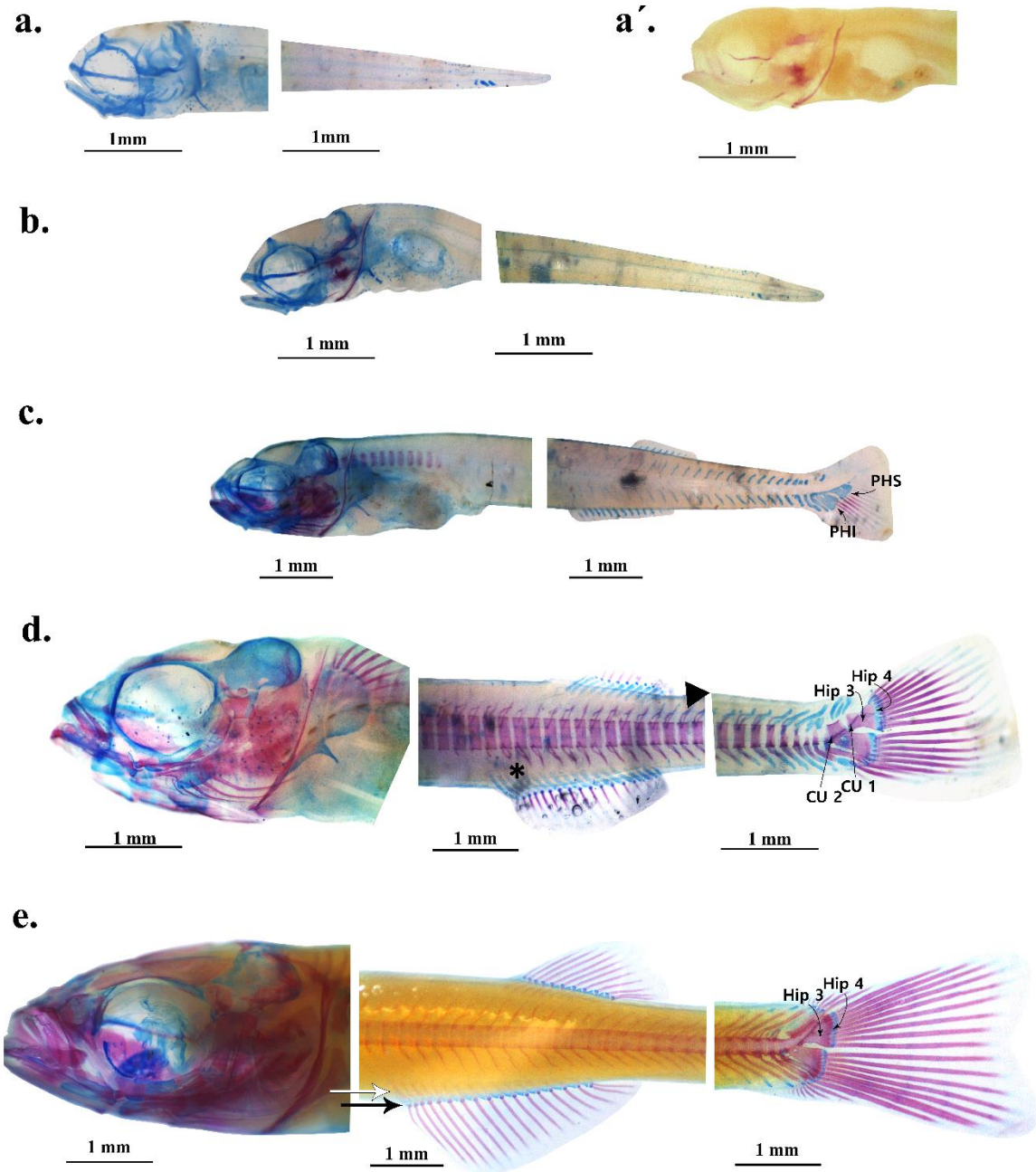


Figura 14: cambios observados en el esqueleto a lo largo del desarrollo del pejerrey. a. Pejerrey de 5 dpe coloreado con Azul Alcian. a'. Pejerrey de 5 dpe coloreado con Rojo Alizarina. b, c, d, e. Pejerrey coloreado con Azul Alcian y Rojo Alizarina de 9 dpe (b), 17 dpe (c), 24 dpe (d), 54 dpe (e). \*: indica la transición entre vértebras abdominales y caudales. Flecha blanca: radiales proximales; flecha negra: radiales distales; punta de flecha: arco y espina neural; CU: centro ural; Hip: hipural; PHI: placa hipural inferior; PHS: placa hipural superior.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada región analizada del esqueleto: cráneo, arcos hioideo y branquiales, región axial (columna vertebral y aletas impares) y aletas pares y complejo caudal. El detalle de los mismos se encuentra resumido en las respectivas tablas. Cabe aclarar que, debido a que los días analizados no son consecutivos, no es posible asegurar que los cambios observados se den en el día en que se registraron. Por esto se asume que los mismos ocurrieron en el intervalo comprendido entre el día anterior analizado y el día en que se observó el cambio.

### *Cráneo*

El pejerrey eclosiona con un gran número de estructuras cartilaginosas presentes en el cráneo: parte del arco mandibular (cartílago de Meckel y palatoc cuadrado), el hiosimpléctico y parte del neurocráneo (el plato etmoidal, la barra epifisial, las trabéculas communis y cranii, las taenias marginalis anterior y posterior, la barra epifisial, el exoccipital y la cápsula auditiva) (ver referencias en figura 15). Las estructuras del neurocráneo nombradas, salvo el exoccipital, permanecen como remanentes de cartílago hasta el final del análisis. Además, el paraesfenoides y el basioccipital, huesos del neurocráneo que osifican de manera intramembranosa, se observan por primera vez a los días 2 y 5 pe, respectivamente. También se observan un par de otolitos al momento de la eclosión y, a partir del día 1 pe ( $7,41 \pm 1,11$  mm), dos pares, los únicos que se detectaron hasta el final del análisis.

Los huesos que componen las mandíbulas son el articular, retroarticular, maxilar, dentario y pre-maxilar (ver referencias en figura 15). De éstos, el dentario, junto a sus dientes, y el maxilar se observan por primera vez al día 5 pe y el pre-maxilar, junto a sus dientes, al día 17 pe. El articular y retroarticular osifican a partir del cartílago de Meckel entre los días 17-19 pe (~9 mm) y 23-24



dpe	0	1	2	5	9	10	16	17	19	23	24 - 26	29	32	38	54
talla		7,41 ± 1,11		7,77 ± 0,41		8,15 ± 0,46							11,84 ± 1,27		14,33 ± 1,52
			7,58 ± 0,4		7,46 ± 0,79				9,2 ± 0,43			11,79 ± 0,74		12,78 ± 1,06	
n	6	6	7	9	7	-	3	3	3	3	7	-	6	2	5
n	3	-	3	4	6	2	3	3	-	2	5	3	-	-	3

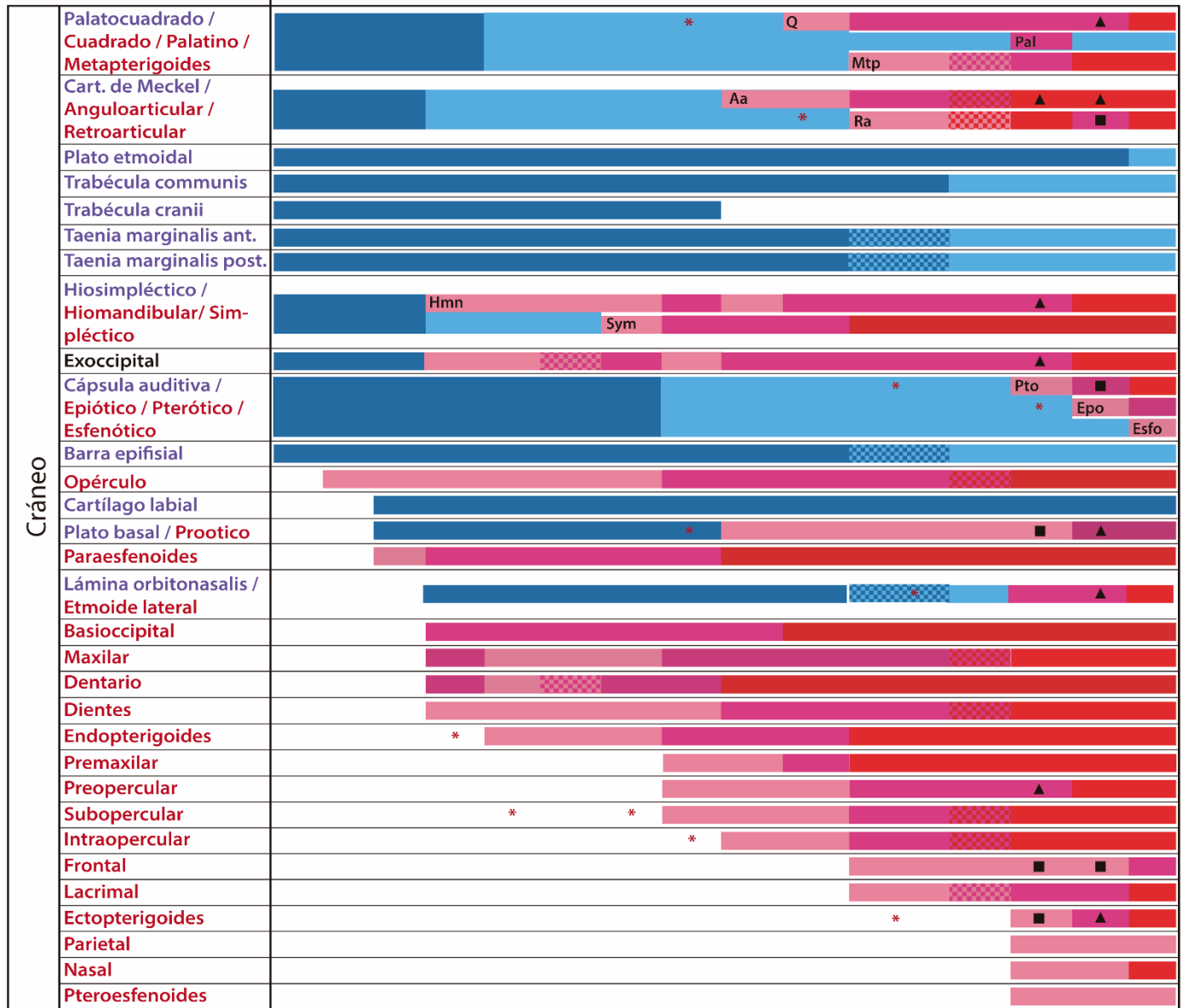


Figura 16: desarrollo de estructuras óseas y cartilaginosas del cráneo en función del día post-eclosión (dpe) y de la talla. Los colores azules hacen referencia a estructuras cartilaginosas (azul oscuro: estructura presente; azul claro: estructura reabsorbiendo). Los colores dentro de la gama del rojo hacen referencia a estructuras óseas (rosa: osificación menor al 50%; fucsia: osificación mayor al 50%, rojo oscuro:

*completamente osificado). Los datos presentados son los que representan lo observado para cada dpe en la mayoría de los individuos muestreados. Los asteriscos rojos indican que se observó la estructura ósea en la minoría de los animales analizados para ese dpe. Como los días analizados para hueso y cartílago no siempre coinciden, aquellos en los que no se cuenta con información sobre una estructura se presentan con cuadrille combinando los colores pertenecientes al día anterior y posterior, indicando que se desconoce su grado de desarrollo, pero se asume que será el correspondiente a alguno de esos colores. Además, en los casos en los que se observó una misma cantidad de individuos para dos grados de desarrollo diferente, se coloreó el casillero de uno de los dos colores, y se colocó un ■ si había una igual probabilidad de una osificación menor al 50% como de una osificación mayor al 50%; o un ▲ si había una igual probabilidad de una osificación mayor al 50% como de una osificación del 100%. Los colores de los nombres de las diferentes estructuras indican si la misma es ósea (rojo) o cartilaginosa (azul) y, en el caso de las estructuras que se forman por osificación condral cuyo nombre como cartílago y hueso es el mismo, aparecen en color negro. Se muestra en rojo el tamaño muestral (n) para el análisis de hueso y en azul el tamaño muestral (n) para el análisis del cartílago, para cada dpe. Por otro lado, en el caso de las osificaciones condrales, se priorizó informar la osificación de la estructura respecto a la reabsorción del cartílago. Aa: anguloarticular; Ant.: anterior; Epo: epiótico; Esfo: esfenótico; Hmn: hiomandibular; Mtp: metapterigoideo; Pal: palatino; Post.: posterior; Pto: pterótico; Q: cuadrado; Ra: retroarticular; Sym: simpléctico.*

### *Arcos hioideo y branquiales*

Al eclosionar el pejerrey presenta gran parte de las estructuras que componen los arcos hioideo y branquiales presentes. Las que primero comienzan el proceso de osificación son el ceratobranquial 5 y los faringobranquiales 3 y 4 (ver referencias en figura 17). Sobre estas estructuras se desarrolla una placa dental, la cual se observa a partir del día 5 pe. Las únicas estructuras de los arcos que se forman mediante una osificación intramembranosa son los rayos branquiostegales y el urohial, pertenecientes al arco hioideo.

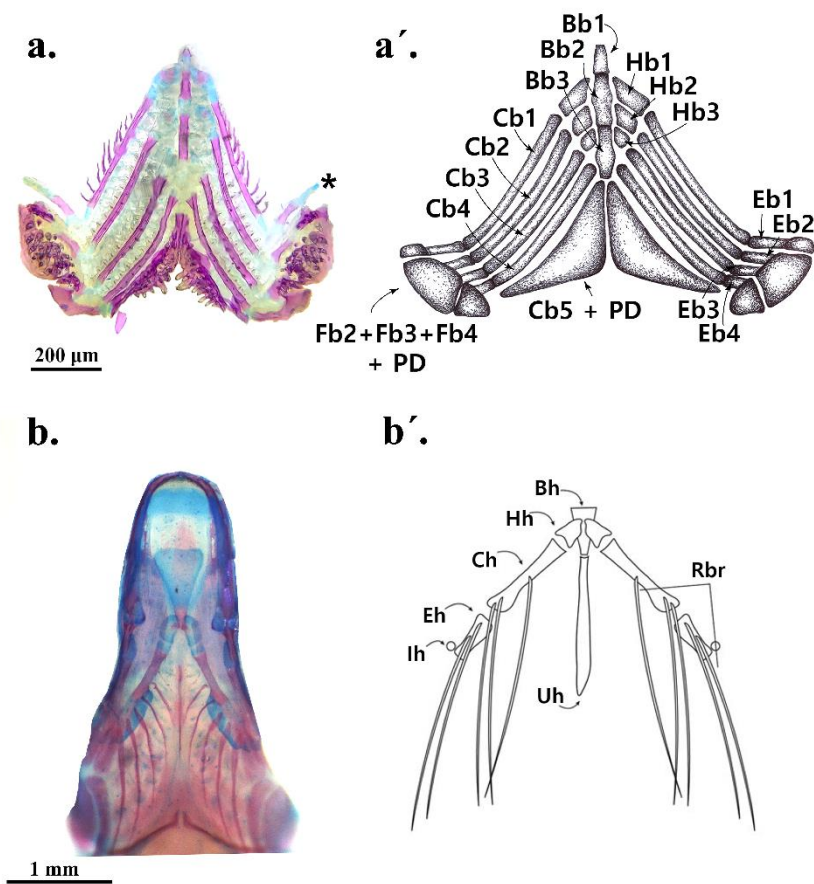


Figura 17: arcos branquiales e hioideo. a. Imagen de arcos branquiales de pejerrey de 54 dpe coloreado con Azul Alcian y Rojo Alizarina. a'. Esquema representativo de los diferentes componentes de los arcos branquiales, adaptado de Martínez-Palacios et al. (2019). b. Imagen de arco hioideo de pejerrey de 24 dpe coloreado con Azul Alcian y Rojo Alizarina. b'. Esquema representativo de los diferentes componentes del arco hioideo, adaptado de Beriotto et al. (2023). \*: probable faringobranquial 1; Bb: basibranquial; Bh: basihial; Cb: ceratobranquial; Ch: ceratohial; Eb: epibranquial; Eh: Epihial; Fb: faringobranquial; Hb: hipobranquial; Hh: hipohial; Ih: interhial; PD: placa dental; Rbr: rayos branquiostegales; Uh: urohial.

En cuanto a los arcos branquiales, se observó, a grandes rasgos, que la secuencia de osificación prosigue con los ceratobranquiales, luego los basibranquiales y finalmente los hipobranquiales y epibranquiales. En particular, los epibranquiales 1, 2 y 3 fueron observados como cartílago a partir del día 2 pe y presentan un intervalo de días en los que no se observó este molde y tampoco logró verse el comienzo de la osificación.

Respecto al arco hioideo, la secuencia de osificación comienza con el ceratohial, continúa con el urohial y finaliza con los basihial, hipohial y epihial. Al día 5 pe se observan 2 rayos branquiostegales, que aumentan progresivamente en número hasta ser 6, cantidad que se observó por primera vez en individuos de 23-24 dpe.

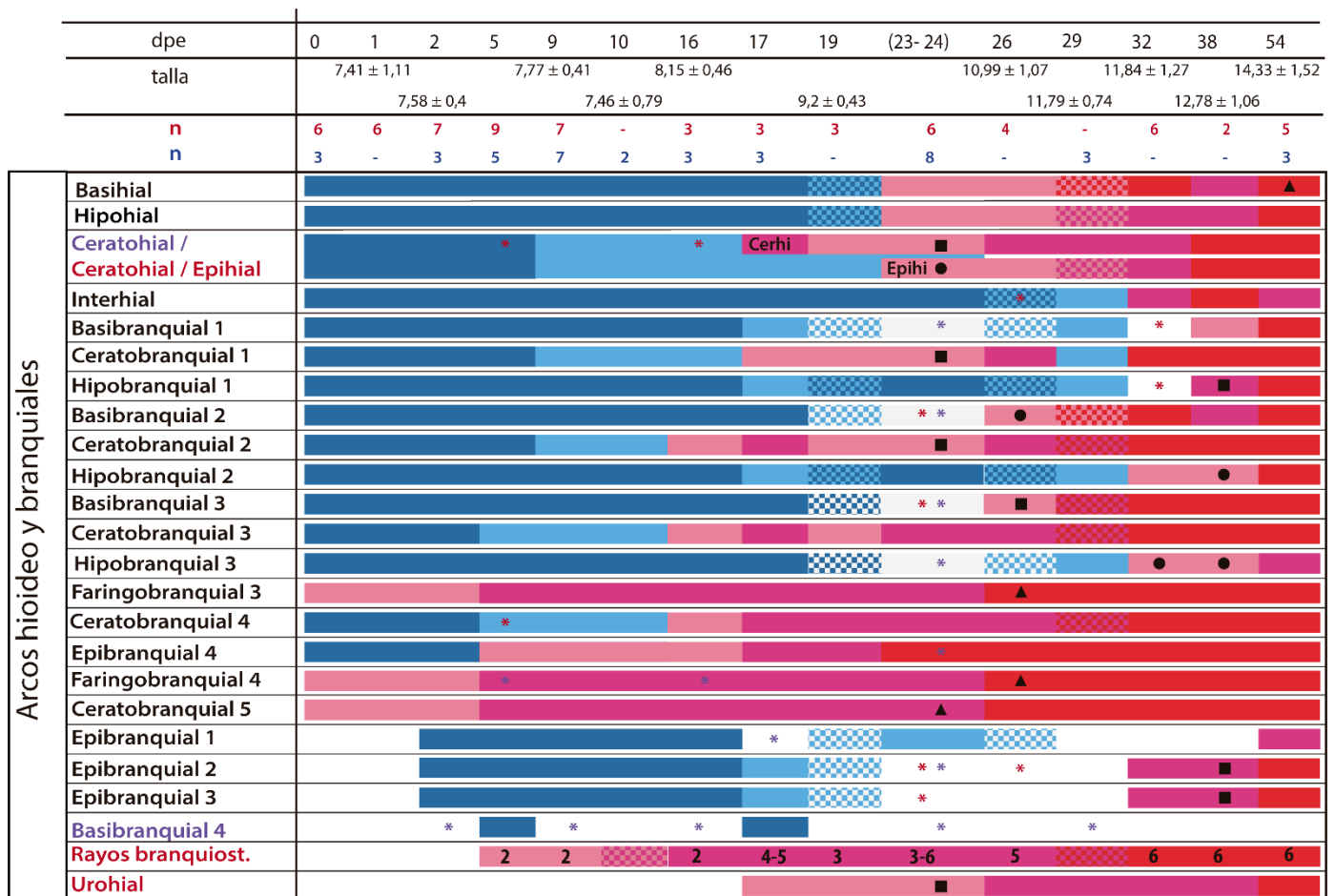


Figura 18: desarrollo de estructuras óseas y cartilaginosas de los arcos hioideo y branquiales en función del día post-eclosión (dpe) y de la talla. Los colores azules hacen referencia a estructuras cartilaginosas (azul oscuro: estructura presente; azul claro: estructura reabsorbiendo). Los colores dentro de la gama del rojo hacen referencia a estructuras óseas (rosa: osificación menor al 50%; fucsia: osificación mayor al 50%, rojo oscuro: completamente osificado). Los datos presentados son los que representan lo observado para cada dpe en la mayoría de los individuos muestreados. Los asteriscos azules o rojos indican que se observó la estructura cartilaginosa u ósea, respectivamente, en la minoría de los animales analizados para ese dpe. Como los días analizados para hueso y cartílago no siempre coinciden, aquellos en los que no se cuenta con información sobre una estructura se presentan con cuadrille combinando los colores pertenecientes al día anterior y posterior, indicando que se desconoce su grado de desarrollo, pero se asume que será el correspondiente a alguno de esos colores. Además, en los casos en los que se observó una misma cantidad de individuos para dos grados de desarrollo diferente, se coloreó el casillero de uno de los dos colores, y se colocó un ■ si había una igual probabilidad de una osificación menor al 50% como de una osificación mayor al 50%; un ▲ si había una igual probabilidad de una osificación mayor al 50% como de una

osificación del 100%; o un ● si había igual probabilidad de una ausencia de la estructura como del grado de desarrollo correspondiente al color presente. Los colores de los nombres de las diferentes estructuras indican si la misma es ósea (rojo) o cartilaginosa (azul) y, en el caso de las estructuras que se forman por osificación condral cuyo nombre como cartílago y hueso es el mismo, aparecen en color negro. Se muestra en rojo el tamaño muestral (n) para el análisis de hueso y en azul el tamaño muestral (n) para el análisis del cartílago, para cada dpe. Por otro lado, en el caso de las osificaciones condrales, se priorizó informar la osificación de la estructura respecto a la reabsorción del cartílago. Se indica el rango que incluye el número observado de las respectivas estructuras para todos los individuos analizados en cada dpe. Cerhi: ceratohial; Epihi: epihial.

### *Esqueleto apendicular y complejo caudal*

Como se mencionó previamente, al momento de la eclosión, la aleta pectoral presenta tanto el disco endoesqueletal como el molde de cartílago a partir del cual osificarán la escápula y el coracoides (ver referencias en figura 19). Estos últimos se observan por primera vez en individuos de 32 dpe, con una osificación avanzada y mantienen este grado de osificación hasta el final del análisis. Entre los días 2-5 pe comienza a segmentarse la estructura del disco endoesqueletal, proceso que continúa hasta que se observan los radiales proximales independientes al día 29 pe ( $11,72 \pm 0,74$  mm) (figura 19). Los mismos comienzan a osificarse entre los días 26-32 pe. Los radiales distales se observan por primera vez en animales de 24 dpe y permanecen como estructuras cartilaginosas hasta el final del análisis, donde se registra un número máximo de 11 radiales distales. Los rayos se observan por primera vez entre los días 23-24 pe y osifican en sentido dorsoventral, siendo 16 el número máximo de rayos observados en animales de 54 dpe. En cuanto a las estructuras de la cintura pectoral, el cleitro es el primer hueso de la región en osificarse, observándose por primera vez en individuos de 1 dpe, y completando su osificación

entre los días 26-32 pe. El resto de las estructuras de la cintura pectoral (supracleitro, postcleitro y posttemporal) se observan por primera vez en individuos de 32 dpe.

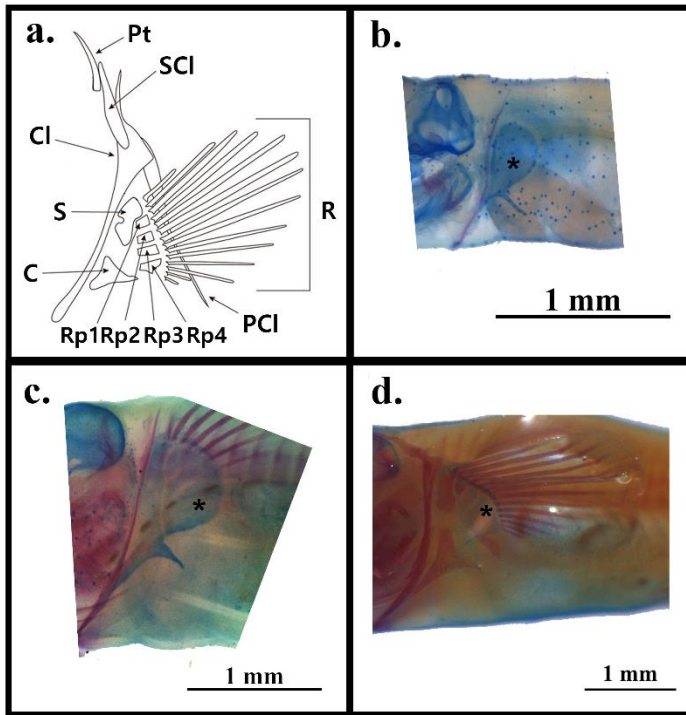


Figura 19: cintura y aleta pectoral. a. Esquema de referencia de los diferentes componentes de la cintura y aleta pectoral analizados, adaptado de Beriotto et al. (2023). b, c, d. Imágenes de cintura y aleta pectoral de pejerrey coloreado con Azul Alcian y Rojo Alizarina de 2 dpe (b), 24 dpe (c), 54 dpe (d). \* : disco endoskeletal; Flecha: radiales proximales; Punta de flecha: segmentación del disco endoskeletal; C: coracoides; Cl: cleitro; PCI: post-cleitro; Pt: Post-temporal; R: rayos; Rp: radiales proximales; S: Escápula; SCI: supra-cleitro.

La cintura y aleta pélvica (figura 20) se evidencian más avanzado el desarrollo, observándose el basipterigio como molde de cartílago por primera vez al día 24 pe y con una osificación avanzada al día 32 pe. En el adulto suelen encontrarse 1 espina y 5 rayos, los cuales se observan por primera vez el día 32 pe.

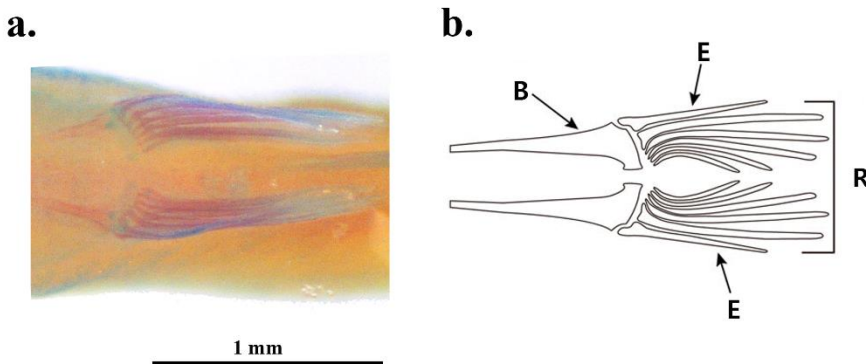


Figura 20: cintura y aleta pélvica. a. Imagen de aleta pélvica de pejerrey de 54 dpe coloreado con Azul Alcian y Rojo Alizarina. b. Esquema representativo de los componentes de la aleta pélvica, adaptado de Beriotto et al. (2023). B: basipterigio; E: espina; R: rayos.

En cuanto a la región del complejo caudal, al momento de la eclosión, el pejerrey no muestra estructuras esqueléticas. El parahipural y los hipurales 1, 2, 3 y 4 se pueden observar a partir del día 2 pe. Los hipurales 1 y 2 comienzan a fusionarse y forman la placa hipural inferior, que se observa a partir del día 17 pe (figura 14). Entre los días 19-23 pe esta placa comienza a osificarse y, para el día 32 pe, ya está totalmente osificada. Por otro lado, los hipurales 3 y 4 se fusionan formando la placa hipural superior de cartílago (ver referencias en figuras 14 y 21), la cual comienza a reabsorberse entre los días 17-23 pe, momento para el que se observa una osificación temprana. Finalizada esta osificación, los hipurales 3 y 4 pueden seguir fusionados formando la placa o estar separados (ver referencias en figuras 14 y 21). A los días 23 y 24 pe se observan por primera vez los centros urales 1 y 2 (figura 14), respectivamente, los cuales se observan fusionados a partir del día 32 pe formando el urostilo (ver referencias en figuras 14 y 21). El hipural 5 se observa por primera vez en el día 23 pe como cartílago y a partir del día 32 pe se observa completamente osificado. Los rayos comienzan a observarse en el día 17 pe y se desarrollan bidireccionalmente, desde el centro hacia dorsal y ventral. El número máximo de rayos observados fue de 40 en individuos de 54 dpe.

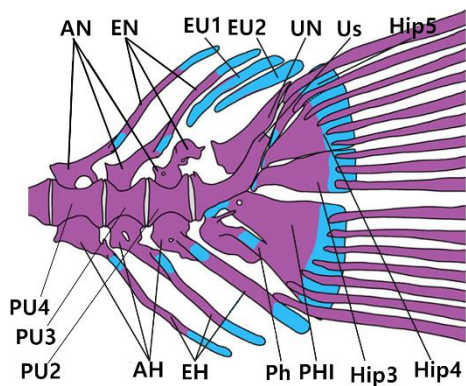


Figura 21: esquema representativo de los componentes del complejo caudal, adaptado de Thieme et al. (2021). AH: arco hemal; AN: Arco neural; EH: espina hemal; EN: espina neural; EU: epural; Hip: hipural; Ph: parahipural; PHI: placa hipural inferior; PU: preural; UN: uroneural; Us: urostilo.

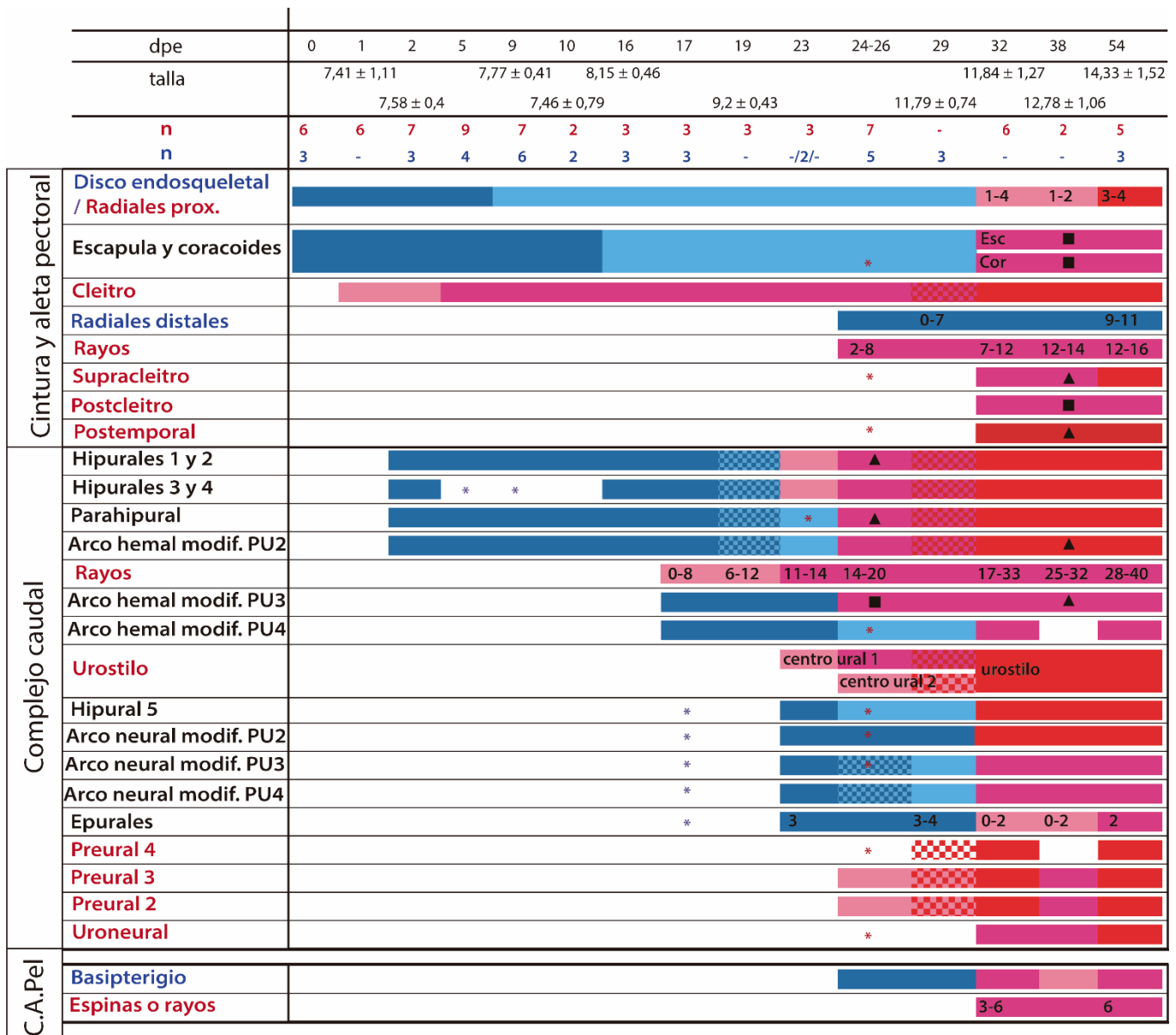


Figura 22: desarrollo de estructuras óseas y cartilaginosas de las aletas pares y el complejo caudal en función del día post-eclosión (dpe) y de la talla. Los colores azules hacen referencia a estructuras cartilaginosas (azul oscuro: estructura presente; azul claro: estructura reabsorbiendo). Los colores dentro de la gama del rojo hacen referencia a estructuras óseas (rosa: osificación menor al 50%; fucsia: osificación mayor al 50%, rojo oscuro: completamente osificado). Los datos presentados son los que representan lo observado para cada dpe en la mayoría de los individuos muestreados. Los asteriscos azules o rojos indican que se observó la estructura cartilaginosa u ósea, respectivamente, en la minoría de los animales analizados para ese dpe. Como los días analizados para hueso y cartílago no siempre coinciden, aquellos en los que no se cuenta con información sobre una estructura se presentan con cuadrille combinando los colores pertenecientes al día anterior y posterior, indicando que se desconoce su grado de desarrollo, pero se

asume que será el correspondiente a alguno de esos colores. Además, en los casos en los que se observó una misma cantidad de individuos para dos grados de desarrollo diferente, se coloreó el casillero de uno de los dos colores, y se colocó un ■ si había una igual probabilidad de una osificación menor al 50% como de una osificación mayor al 50%; o un ▲ si había una igual probabilidad de una osificación mayor al 50% como de una osificación del 100%. Los colores de los nombres de las diferentes estructuras indican si la misma es ósea (rojo) o cartilaginosa (azul) y, en el caso de las estructuras que se forman por osificación condral cuyo nombre como cartílago y hueso es el mismo, aparecen en color negro. Se muestra en rojo el tamaño muestral (n) para el análisis de hueso y en azul el tamaño muestral (n) para el análisis del cartílago, para cada dpe. Por otro lado, en el caso de las osificaciones condrales, se priorizó informar la osificación de la estructura respecto a la reabsorción del cartílago. Se indica el rango que incluye el número observado de las respectivas estructuras para todos los individuos analizados en cada dpe. C.A.Pel: cintura y aleta pélvica; Cor: coracoides; Esc: escápula; Modif.: modificado; Prox.: proximales; PU: preural.

### Esqueleto axial y aletas impares

Los cuerpos vertebrales se forman a través de un proceso de osificación intramembranosa y se clasifican en **abdominales** (carecen de arco hemal o presentan uno sin espina) y **caudales** (presentan un arco hemal cerrado con espina) (ver referencias en figuras 14 y 23). Dentro de los cuerpos abdominales, algunos pueden presentar costillas, las cuales se observaron únicamente como estructuras óseas, por primera vez al día 24-26 pe. El sentido de desarrollo del esqueleto axial es anteroposterior. Los primeros cuerpos vertebrales en observarse son los abdominales en el día 17 pe y luego los caudales, en el día 23 pe.

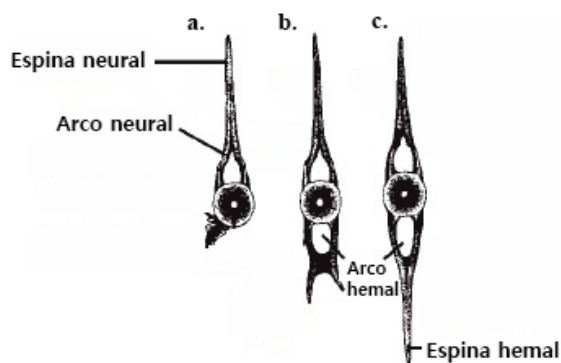


Figura 23: esquema representativo de vértebras con arco y espina neural (a), arco y espina neural y arco hemal (b) y arco y espina neural y hemal (c). Adaptado de Helfman et al. 2009.

Los arcos neurales y los hemales de la región caudal se encuentran como estructuras cartilaginosas abiertas, y, a lo largo del desarrollo, se cierran y osifican formando la estructura de arco con espina (figuras 14 y 23). Las primeras estructuras en observarse son los arcos neurales a partir del día 5 pe, que aumentan su número en sentido anteroposterior. Estos comienzan a osificarse, en el mismo sentido, entre los días 17-19 pe, completando la osificación entre los días 26-32 pe. Los arcos hemales se observan por primera vez al día 16 pe ( $8,15 \pm 0,46$  mm) y llamativamente se desarrollan en sentido posteroanterior. Su osificación ocurre en el sentido contrario, comenzando entre los días 19-23 pe, para completarse entre los días 26-32 pe.

Por otro lado, en la aleta dorsal posterior y la anal se observa un desarrollo sincrónico de sus diferentes componentes. Los radiales proximales (ver referencia en figura 14) se detectan por primera vez como cartílago en individuos de 17 dpe y comienzan su osificación entre los días 26-32 pe. Los rayos y espinas se observan por primera vez en individuos de 24-26 dpe y los radiales distales (ver referencia en figura 14) al día 23 pe, los cuales permanecen como cartílago hasta el final del análisis. La aleta dorsal anterior se desarrolla más tarde en la ontogenia, observándose por primera vez 4 de sus espinas al día 32 pe.

dpe	0	1	2	5	9	16	17	19	23	24-26	29	32	38	54
talla	7,41 ± 1,11		7,77 ± 0,41			9,2 ± 0,43			11,84 ± 1,27			14,33 ± 1,52		
	7,58 ± 0,4			8,15 ± 0,46			11,79 ± 0,74			12,78 ± 1,06				
n	6	6	7	9	6	3	3	3	3	7	-	6	2	5
n	3	-	3	4	5	3	3	-	2	5	3	-	-	3

Axial	Arcos neurales		2	1-4	6-12 A 17-20 P	0-3	1-2	2-10	9-49		46-48	47	45-47
	Arcos hemales			*	17-20	16-18		0-12	20-26		23-26	23	18-26
	CV Pre-hemales					0-11	0-9	11-28	27-29		23-28	27	25-28
	CV Hemales							0-12	17-20		19-20	20	19-21
	Costillas								0-3		0-17	13-15	13-18
A.D.P	Radiales proximales					0-8		9-10		10-11	0-10	6-9	8-11
	Espinas o rayos								6-10		9-12	12	11-12
	Radiales distales							0-6		9-11			10-11
A.A	Radiales proximales					0-13		16		16	0-17	10-17	15-18
	Espinas o rayos								0-18		16-19	17-18	17-20
	Radiales distales							0-11		10-16			17
A.D.A	Radiales proximales										*		5-7
	Espinas										4	0-4	3-5
	Radiales distales												

Figura 24: desarrollo de estructuras óseas y cartilaginosas del esqueleto axial y aletas impares en función del día post-eclosión (dpe) y de la talla. Los colores azules hacen referencia a estructuras cartilaginosas (azul oscuro: estructura presente; azul claro: estructura reabsorbiendo). Los colores dentro de la gama del rojo hacen referencia a estructuras óseas (rosa: osificación menor al 50%; fucsia: osificación mayor al 50%, rojo oscuro: completamente osificado). Los datos presentados son los que representan lo observado para cada dpe en la mayoría de los individuos muestreados. Los asteriscos azules indican que se observó la estructura cartilaginosa en la minoría de los animales analizados para ese dpe. Como los días analizados para hueso y cartílago no siempre coinciden, aquellos en los que no se cuenta con información sobre una estructura se presentan con cuadrille combinando los colores pertenecientes al día anterior y posterior, indicando que se desconoce su grado de desarrollo, pero se asume que será el correspondiente a alguno de esos colores. Los colores de los nombres de las diferentes estructuras indican si la misma es ósea (rojo) o cartilaginosa (azul) y, en el caso de las estructuras que se forman por osificación condral cuyo nombre como cartílago y hueso es el mismo, aparecen en color negro. Se muestra en rojo el tamaño muestral (n) para el análisis de hueso y en azul el tamaño muestral (n) para el análisis del cartílago, para cada dpe. Por otro lado, en el caso de las osificaciones condrales, se priorizó informar la osificación de la estructura respecto a la reabsorción del cartílago. Se indica el rango que incluye el número observado de las respectivas estructuras para todos los individuos analizados en cada dpe. A: anterior; A.A: aleta anal; A.D.A: aleta dorsal anterior; A.D.P: aleta dorsal posterior; CV: cuerpos vertebrales; P: posterior.

### Efectos de la primera alimentación dentro del proyecto marco

Como se mencionó anteriormente, esta Tesis forma parte de un proyecto marco dentro del cual se evaluó la sobrevivencia y el crecimiento de los pejerreyes de los diferentes tratamientos. No se observaron diferencias en la sobrevivencia, pero sí una tendencia a un mayor crecimiento en los animales provenientes del tratamiento M. Por otro lado, se evaluó el enriquecimiento de la artemia suministrada a través de un análisis de GC/MS, el cual mostró un aumento en la cantidad de DHA y EPA en la artemia enriquecida con aceite de pescado respecto a la no enriquecida.

### Efectos de la primera alimentación sobre el desarrollo del tracto alimentario

Para evaluar los efectos del enriquecimiento de la primera alimentación sobre el tracto alimentario se trabajó con animales de 9 dpe. Se evaluaron características que suelen ser utilizadas como indicadores de un buen estado nutricional: (i) el número de papilas gustativas, el cual puede asociarse a una buena capacidad de captación, selección e ingestión del alimento (Atema, 1971; Devitsina & Golovkina, 2011; Diaz et al., 2006; Elsheikh et al., 2012); (ii) el área de los hepatocitos, que suele ser un buen indicador de la reserva energética de los animales (Önal et al., 2008; Segner et al., 1984) y (iii) el alto del pliegue intestinal y el alto del enterocito, que se relacionan con una buena capacidad digestiva y absorbente (Caballero et al., 2003; Ostaszewska et al., 2011).

#### *i. Número de papilas gustativas*

El número total de papilas gustativas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos al día 9 pe (p-valor: 0,53). Esto se observó tanto para las papilas de la cavidad bucal (figura 25a,

p-valor: 0,96) como para las de la cavidad faríngea (figura 25b, p-valor: 0,48). Sin embargo, las últimas son significativamente más abundantes que las de la cavidad bucal (p-valor < 2e-16).

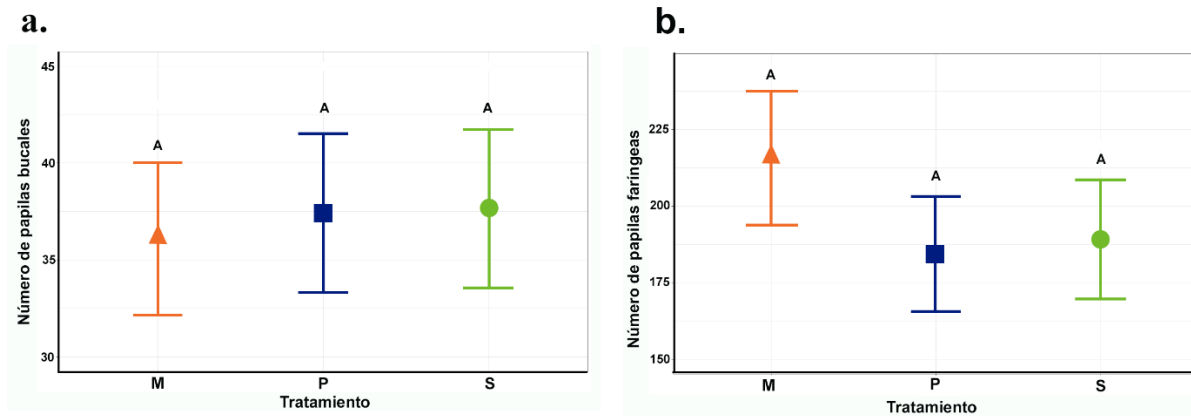


Figura 25: número de papilas gustativas en la cavidad bucal (a) y faríngea (b) para cada tratamiento al día 9 pe. Las letras M, P y S refieren a los tratamientos de alimentación con artemia enriquecida con una mezcla de aceites de pescado y vegetal (M), con aceite de pescado (P) o sin enriquecer (S). Iguales letras indican diferencias no significativas (p-valor>0,05).

### ii. Área de los hepatocitos

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para el área de los hepatocitos al día 9 pe (figura 26, p-valor: 0,13). No se observaron centros melanomacrófágicos, necrosis celular ni núcleos picnóticos en ningún individuo.

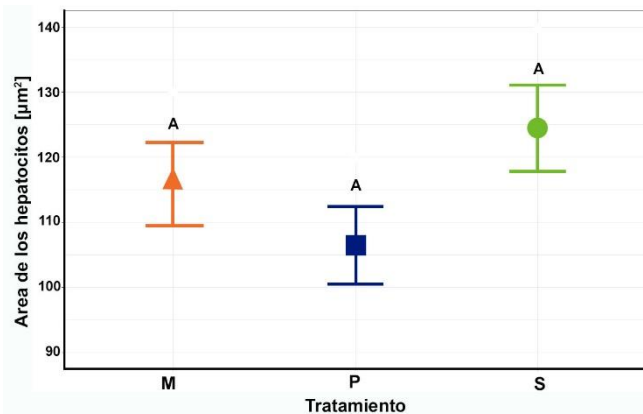


Figura 26: área de los hepatocitos para cada tratamiento al día 9 post eclosión. Las letras M, P y S refieren a los tratamientos de alimentación con artemia enriquecida con una mezcla de aceites de pescado y vegetal (M), con aceite de pescado (P) o sin enriquecer (S). Iguales letras indican diferencias no significativas (p-valor>0,05).

### *iii. Alto del pliegue intestinal y alto del enterocito*

Dentro del intestino se midió el alto del pliegue intestinal y el alto del enterocito. Una mayor altura del pliegue implica una mayor superficie de contacto con la luz intestinal, y los enterocitos más altos serían indicativos de una mayor capacidad de asimilación de los nutrientes (Green & McCormick M.I., 1999; Hall & Bellwood, 1995; Madara, 2010). No se observaron diferencias significativas tanto en el alto del pliegue como en el alto de los enterocitos entre los tratamientos al día 9 post eclosión (p-valor: 0,74, p-valor: 0,64, respectivamente). Esta ausencia de diferencias se observó en las tres regiones analizadas (Ant., Med. y Post.). Sin embargo, el alto del pliegue difiere significativamente entre las regiones (p-valor < 2e-16), siendo mayor en la zona media y menor en la zona anterior del intestino (Med. > Post. > Ant.). La altura media de los enterocitos es menor en la zona anterior respecto a las otras dos zonas (p-valor: 7,58e-10).

### Efectos de la primera alimentación sobre la incidencia de deformidades óseas

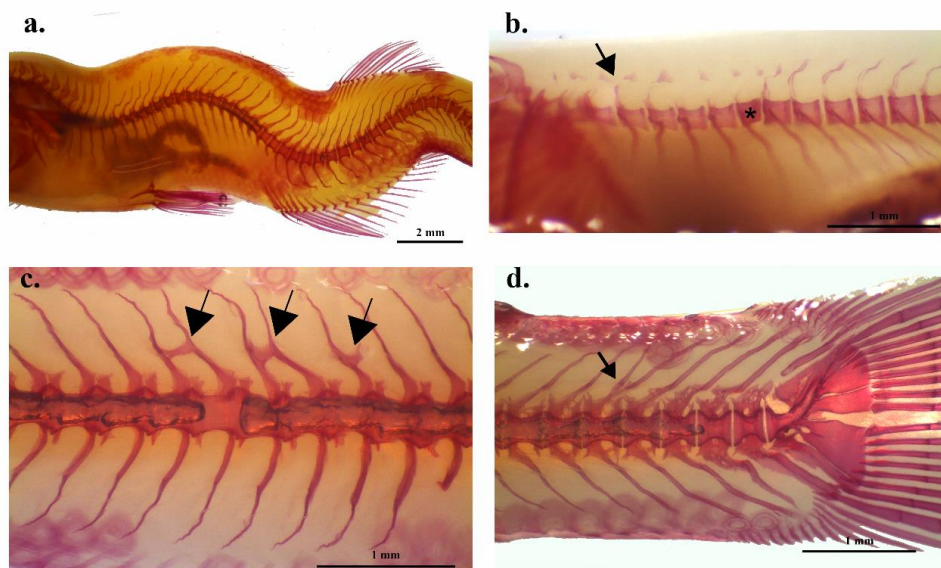
Como primer análisis, se realizó una examinación externa de los animales de los tres tratamientos al día 50 dpe (N = 54). Se observaron únicamente desviaciones del eje axial: cifosis (curvatura hacia dorsal), lordosis (curvatura hacia ventral), escoliosis (curvatura hacia los laterales). La cifosis y la lordosis suelen aparecer en tándem (lordocifosis / cifolordosis - figura 27-), y, en algunos casos, incluso acompañadas de escoliosis. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de individuos deformes entre los tratamientos (p-valor: 0,78, M: 27,8 %; P: 33,3%; S: 38,9%).



*Figura 27: fotografía representativa de pejerreyes de 50 dpe examinados externamente para la evaluación de la incidencia de deformidades esqueléticas. Notar que el individuo superior posee una doble cifolordosis mientras que en los otros dos no se detectaron deformidades.*

En los análisis *in toto*, los pejerreyes de los 3 tratamientos presentaron una gran proporción de animales con al menos una deformidad esquelética (100% en M, 66,7% en P, 91,7% en S), sin encontrar diferencias significativas entre M, P y S (p-valor: 0,37). Realizando un análisis separado del número de individuos que presentaron cifosis (p-valor: 0,42), lordosis (p-valor: 0,87), deformidades en los arcos neurales o hemales (p-valor: 0,63), deformidades en los cuerpos vertebrales (p-valor: 0,13) y deformidades en los rayos branquiostegales (p-valor: 0,13) tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. La mayoría de las deformidades se encontraron en la región axial. En cuanto a la región craneal, se observaron únicamente deformidades en los rayos branquiostegales, presentando curvaturas y superposiciones proximales o distales, y/o patrones desorganizados.

En particular, en la región axial, se observaron principalmente desviaciones de la columna vertebral, compresiones de los cuerpos vertebrales y deformidades variables tanto en los arcos neurales como hemales (Figura 28). En la mayoría de los individuos analizados se observó una curvatura en la porción distal de las costillas. Sin embargo, debido a la alta frecuencia de las mismas esto podría considerarse normal o un artefacto de técnica. Por otro lado, un 41,7% de los animales de los tratamientos M y P, y un 33,3% de los animales del tratamiento S, presentaron desviaciones del eje axial (principalmente cifosis y lordosis). En la figura 29 se representa la frecuencia de cifosis y lordosis a lo largo del eje axial. En esta se puede ver que la frecuencia de cifosis en las primeras vertebrales de la columna es la más alta y que no se encontró ningún animal que presentara cifosis entre las vértebras 27 y 36. Además, los gráficos de cifosis y lordosis parecen complementarios.



*Figura 28: deformidades observadas en el eje axial de pejerreyes de 50 dpe, coloreados con Rojo Alizarina. a. Desviaciones de la columna vertebral: cifosis y lordosis múltiples. b. Compresión del cuerpo vertebral (\*). b. c. d. Deformidades en los arcos neurales: ausencia de arcos (flecha en b), fusión de arcos sucesivos (flecha en c), doble espina neural en un único cuerpo vertebral (flecha en d).*

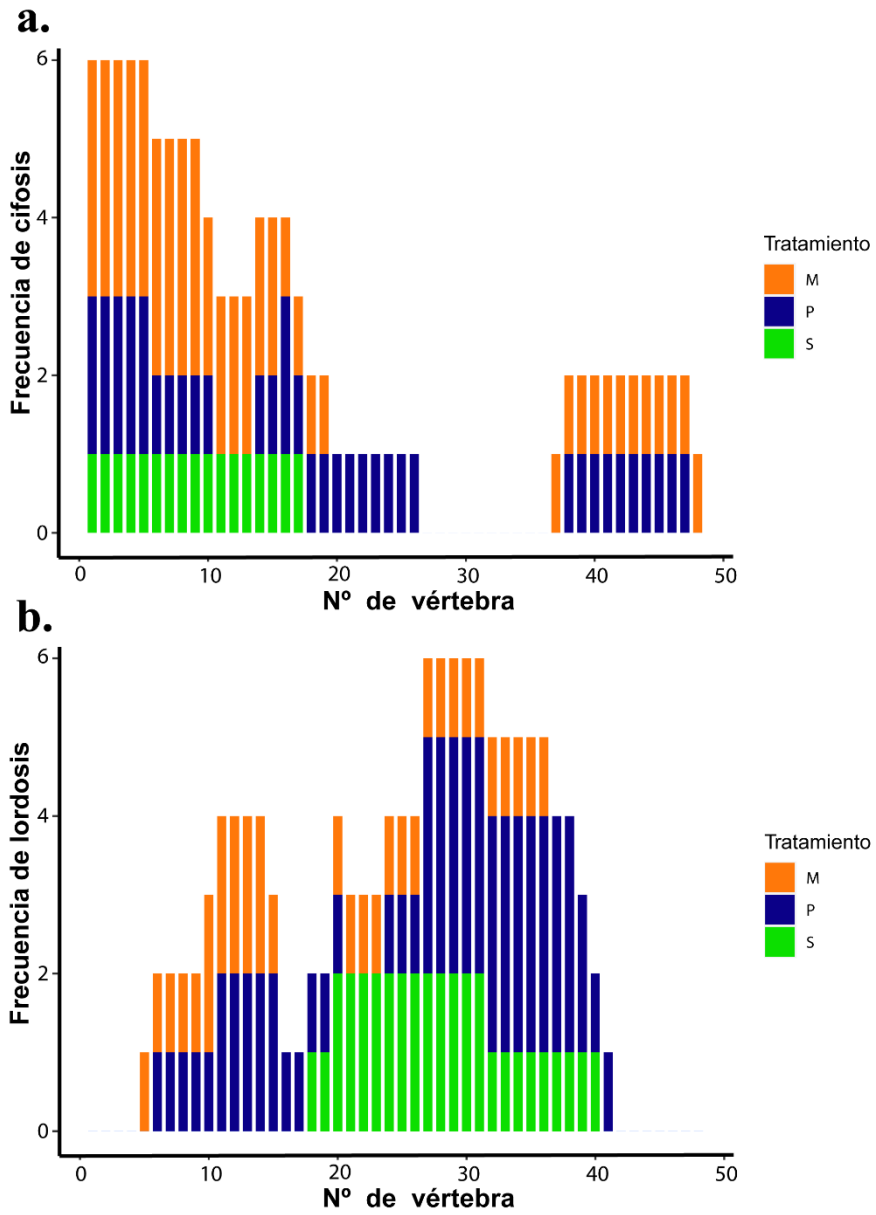


Figura 29: frecuencia de cifosis (a) y lordosis (b) observada en pejerreyes de 50 dpe coloreados con Rojo Alizarina para cada tratamiento (M, P y S) a lo largo del eje axial.

## DISCUSIÓN

En la presente Tesis se estudió el sistema alimentario y el esquelético como parte de los análisis planteados en el proyecto marco cuyo objetivo es realizar una evaluación global de los posibles efectos de tres dietas iniciales en el pejerrey. Debido a que el sistema alimentario se relaciona con la capacidad de incorporar los nutrientes, los cuales son indispensables durante las primeras etapas del desarrollo y que, dentro del cultivo del pejerrey, se detecta una alta incidencia de deformidades esqueléticas, resulta de gran interés el abordaje de estos sistemas. En la presente Tesis se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: *Un esquema de primera alimentación que contemple un alimento vivo suplementado con ácidos grasos poliinsaturados, tendrá un impacto positivo en la maduración morfológica del tracto alimentario y reducirá la incidencia de deformidades esqueléticas del pejerrey bonaerense, Odontesthes bonariensis*. Dada la falta de estudios sobre ciertos aspectos de la biología larval del pejerrey, se propuso como parte del objetivo general caracterizar la ontogenia de los dos sistemas de interés: alimentario y esquelético. Estas descripciones brindan un marco dentro del cual evaluar los efectos de las diferentes dietas iniciales sobre ambos sistemas.

### Caracterización de la ontogenia del tracto alimentario

Uno de los factores relevantes para mejorar el cultivo larval de una especie es conocer sus necesidades nutricionales y capacidades digestivas, las cuales varían durante la ontogenia. En estudios previos, se evaluó la funcionabilidad del sistema digestivo del pejerrey durante el desarrollo larval y juvenil en base a los cambios en la actividad de las enzimas digestivas (Pérez-

Sirkin et al., 2020; Toledo-Cuevas et al., 2011). Además, algunas características del hígado y del intestino al momento de la eclosión ya fueron reportadas en un trabajo de Strüssman & Takashima, (1989) en el que evaluaron los efectos de la inanición en larvas de pejerrey. Como estudio complementario a ambos trabajos, se decidió estudiar el desarrollo del tracto alimentario desde una perspectiva histológica, haciendo énfasis en distintas características específicas de cada región analizada.

Teniendo en cuenta que el pejerrey es una especie precocial, con un desarrollo embrionario de aproximadamente 13 días (Strüssmann & Takashima, 1989), no es inesperado que al momento de la eclosión, el tracto alimentario ya presente sus regiones diferenciadas. Si bien la bibliografía sugiere que la alimentación exógena comienza aproximadamente a los 2 dpe (Chalde et al., 2011), en esta Tesis se observó que al momento de la eclosión, la boca y el ano ya se encuentran abiertos y se observan vacuolas supranucleares en el intestino posterior, lo cual sería indicio de una ingestión de alimento (Hamlin et al., 2000; Yamamoto, 1966). Además, al día 0 pe se observó la presencia de chapa estriada a lo largo del epitelio intestinal, siendo mayor su desarrollo hacia posterior. En base a esto, sería esperable que los enterocitos tengan capacidad absorptiva funcional, ya que la presencia de estas microvellosidades suele asociarse a epitelios donde ocurre un transporte activo (Hamlin et al., 2000). Las observaciones mencionadas, sumado a que el pejerrey presenta nado libre y la vejiga natatoria inflada desde el momento de la eclosión, podrían ser indicios de una capacidad de alimentación exógena previo a los 2 dpe, con lo cual, sería recomendable que los pejerreyes en cultivo tengan acceso a alimento desde el momento de la eclosión.

La cantidad de papilas gustativas suele aumentar con el desarrollo, observándose una mayor abundancia y densidad en peces de mayor tamaño (Finger et al., 1991; Twongo & MacCrimmon, 1977). Sin embargo, se ha descrito una disminución en la abundancia de papilas gustativas en las larvas de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) con el aumento de la talla de los individuos (Northcott & Beveridge, 1988). En el pejerrey se observó un progresivo aumento de la cantidad de papilas gustativas tanto en la cavidad bucal como faríngea. Esto podría implicar un aumento paulatino en la capacidad de selección y captación del alimento (relacionado a las papilas de la cavidad bucal), y en la capacidad de discernir la calidad del alimento y, en consecuencia, promover, o no, la ingestión y/o secreción de enzimas digestivas (asociado a las papilas de la región faríngea) (Atema, 1971; Devitsina & Golovkina, 2011; Diaz et al., 2006; Elsheikh et al., 2012). Por otra parte, la presencia de papilas con una morfología similar a la de las papilas maduras en la región faríngea al momento de la eclosión podría ser otro indicio de una posible capacidad de alimentación exógena previa a los 2 dpe.

El epitelio intestinal presenta una continua renovación y el equilibrio entre los procesos de mitosis y apoptosis es una condición indispensable para mantener la salud e integridad del mismo (Hall & Bellwood, 1995; Raskovic et al., 2011). Durante los primeros 3 dpe, se detectaron más células en mitosis a lo largo del intestino respecto a los días siguientes, lo cual podría relacionarse a una alta tasa de crecimiento del órgano durante ese período.

En cuanto a las glándulas anexas, se observó un cambio progresivo en la organización del páncreas exocrino. Al momento de la eclosión, no es evidente la formación acinos y las células presentan escaso citoplasma basófilo. Con el desarrollo, las células adquieren la típica disposición en acinos pancreáticos, con un citoplasma basófilo más desarrollado y abundantes gránulos de

zimógeno en la región apical. Esta observación histológica se condice con el registro de actividad de las enzimas pancreáticas desde la primera semana de vida del pejerrey (Pérez-Sirkin et al., 2020). Además, fue posible observar gránulos de zimógeno desde el día 0 pe, lo cual parece estar en concordancia con estudios realizados en el lenguado senegales (*Solea senegalensis*), la breca (*Pagellus erythrinus*) y pez payaso (*Amphirion percula*), que sugieren que la aparición de los gránulos de zimógeno responde a un desarrollo programado genéticamente, en lugar de un proceso inducido nutricionalmente (Micale et al. 2006; Önal et al., 2008; Riberia et al., 1999).

Respecto al hígado, en el momento de la eclosión se observó la presencia de hepatocitos con unas pocas, pero grandes vacuolas de reservas energéticas, las cuales se mantienen hasta el día 2 pe. La granulación y vacuolización del citoplasma de los hepatocitos está relacionado a la síntesis y almacenamiento de macromoléculas de reserva energética (Green & McCormick M.I., 1999; Önal et al., 2008; Segner et al., 1984). Con el desarrollo y el comienzo de una adecuada alimentación exógena, sería esperable que el tamaño de los hepatocitos y sus reservas energéticas aumentasen; sin embargo, a partir del día 3 pe los hepatocitos del pejerrey presentaron múltiples vacuolas pequeñas y un aumento en la proporción de citoplasma, características que se revertieron a partir del día 11 pe. Una posible explicación podría relacionarse a la disminución de las reservas de vitelo, sumado al comienzo de una alimentación exógena poco eficiente (ya sea porque los sistemas de detección y captación del alimento aún no son eficientes, o por la calidad del agua verde). Así, las reservas hepáticas de los primeros dos días se consumirían progresivamente. El notable aumento en el número de papilas en los labios a partir del día 7 pe podría implicar una mayor captación de alimento, generando una ingestión suficiente como para almacenar el exceso en forma de glucógeno y/o lípidos en los hepatocitos.

A diferencia de lo observado en esta Tesis, Strüssmann & Takashima, (1989) describieron que, al momento de la eclosión, los hepatocitos del pejerrey no presentan vacuolas de reservas energéticas, sino que las mismas se detectaron a partir del día 1 pe y fueron aumentando en animales alimentados con rotíferos. Las diferencias al momento de la eclosión podrían ser consecuencia de variaciones en las condiciones durante el desarrollo embrionario, como la calidad del vitelo, la temperatura, la calidad del agua, entre otras. Las diferencias observadas en los dpe siguientes podrían deberse a las distintas dietas iniciales proporcionadas en cada trabajo.

### Caracterización de la ontogenia del esqueleto

El pejerrey eclosiona con estructuras esqueléticas presentes únicamente en la región craneal y parte de la aleta pectoral, de las cuales, las únicas que presentan algún grado de osificación son ciertos elementos de los arcos branquiales. Diferentes autores proponen que la secuencia de osificación se relaciona con las necesidades funcionales, es decir, que aquellas estructuras cuya función resulta esencial antes en la ontogenia, osificarán antes en el desarrollo (Beriotto et al., 2023; Cloutier et al., 2010). En ese aspecto, los faringobranquiales y el ceratobranquial que forman parte de las placas dentales presentan una osificación temprana al momento de la eclosión. Además, entre los días 2 y 5 pe comienza la osificación de los huesos de las mandíbulas, coincidiendo temporalmente con el comienzo de la alimentación exógena propuesto en bibliografía (Chalde et al., 2011). El cleitro, parte de la cintura pectoral, que también está relacionado con una mayor expansión ventral de la cavidad bucal (Camp & Brainerd, 2014), presenta una osificación temprana al día 1 pe. Por otro lado, el opérculo comienza a osificarse al

1 dpe, aumentando la protección de los arcos branquiales y favoreciendo la ventilación. El paraesfenoides, uno de los huesos del neurocráneo relacionado con la separación de la cavidad bucal y el encéfalo, se observa por primera vez al día 2 pe; y el basioccipital, otro hueso del neurocráneo asociado a la capacidad de elevar la cabeza y al refuerzo de la unión entre esta y la notocorda, se observa por primera vez al día 5 pe (Adriaens & Verraes, 1998; Schoch, 2006; Vandewalle et al., 1995; Wagemans & Vandewalle, 2001). Esto sugiere que, también en el pejerrey, la osificación podría responder a las necesidades fisiológicas.

El estudio de la esqueletogénesis permite sentar las bases para la caracterización del desarrollo de la especie, y poder reconocer así variaciones morfológicas frente a diferentes contextos, evaluar distintas condiciones de cría e incluso aportar información para análisis filogenéticos (Beriotto et al., 2023; Thieme et al., 2021). Respecto a esto último, un carácter variable es la direccionalidad de desarrollo de la aleta dorsal posterior y la aleta anal. En el pejerrey se observó un desarrollo anteroposterior de las mismas, lo cual se conserva en los Atheriniformes (Richter & Moritz, 2017). Thieme *et al.* (2021) realizaron un análisis del desarrollo del complejo caudal de diferentes especies dentro del clado Atherinomorphae, aportando información para aclarar las relaciones filogenéticas dentro del grupo y sus cambios evolutivos. Este clado presenta una gran variabilidad dentro complejo caudal, principalmente en las fusiones entre los diferentes hipurales durante la ontogenia. Particularmente, los atheriniformes, presentan 5 hipurales que se desarrollan inicialmente como estructuras separadas y luego, los hipurales 1 y 2 forman la placa hipural inferior, mientras que los hipurales 3, 4 y 5 presentan diferentes grados de fusión entre las distintas especies. En base a lo observado durante esta Tesis, los hipurales 3 y 4 se fusionan durante el desarrollo formando la placa de cartílago superior y una vez osificados, se encuentran

como estructuras separadas, salvo en pocos casos en los que se observó que se mantienen como una placa. Además, el hipural 5 y parahipural no se fusionan a los otros hipurales durante el desarrollo. Por último, se observó la presencia de dos centros urales separados, que luego se fusionan para formar el urostilo, rasgo que Thieme *et al.* (2021) proponen como un carácter general de los atheriniformes.

Una característica del pejerrey es la gran heterogeneidad de tamaños durante el desarrollo. Esta heterogeneidad podría explicar ciertas discrepancias observadas en los grados de desarrollo esquelético para cada edad, las cuales aumentan en frecuencia a edades más avanzadas. Por ejemplo, los ceratobranquiales 2 y 3 y el ceratohial aparecen con un grado de osificación menor en animales de 19 dpe respecto a los de 17 dpe; y los preurales 2 y 3, que presentan una osificación completa en animales de 32 dpe, pero una mayor al 50% en animales de 38 dpe. Cabe aclarar que las observaciones fueron realizadas por más de una persona, con lo cual, si bien hubo consenso y discusión previa sobre los criterios a seguir, diferencias en la apreciación del grado de osificación pudieron haber repercutido en los resultados. Por otro lado, ciertas estructuras son difícilmente identificables durante su proceso de formación. Este es el caso de los hipurales y parahipural del complejo caudal, que, en los primeros días de su formación, son difíciles de distinguir entre sí ya que presentan una morfología inicial similar; además, la ausencia de la flexión de la notocorda impide tener una referencia sobre las posiciones relativas de los componentes del complejo. Otro caso de observaciones atípicas es lo que sucede con el palatino, que se observa únicamente en animales de 32 dpe, con una osificación avanzada. Esto puede deberse tanto a una variabilidad intrínseca de los animales como a un error en las observaciones, ya que es una estructura difícil de identificar. Otras estructuras, como algunos elementos dentro

de los arcos branquiales, tales como los epibranquiales y los faringobranquiales, son difíciles de observar debido a su posición dentro del cráneo. Esto se vuelve más desafiante con el avance del desarrollo ya que la presencia de estructuras más periféricas impide la visualización. Para sortear este tipo de inconvenientes, se retiraron los arcos branquiales de algunos ejemplares, obteniendo una comprensión más clara de las estructuras presentes y su grado de desarrollo. Al realizar esto, se observó en ejemplares de 54 dpe, la presencia de una estructura cartilaginosa en la posición donde se encontraría el faringobranquial 1, sin embargo, la bibliografía sostiene que el mismo no se encuentra presente en el pejerrey (Martínez-Palacios, 2019). Más estudios son necesarios para dilucidar esta discrepancia.

### Abordaje experimental de los efectos de las dietas iniciales sobre el pejerrey

De la hipótesis de trabajo de esta Tesis se desprenden tres aspectos a considerar: i. la formulación de las dietas iniciales; ii. los efectos de las mismas sobre el tracto alimentario, y iii. los efectos de las mismas sobre el sistema esquelético.

#### *Formulación de las dietas*

La cantidad de lípidos en la dieta puede generar diferentes efectos sobre los peces (Zambonino-Infante J L & Cahu, 2010; Zarantoniello et al., 2020). Por ejemplo, en pejerrey se evaluó el efecto de cuatro dietas combinando altos y bajos niveles de lípidos (HL y LL, respectivamente) con altos y bajos niveles de proteínas (HP y LP, respectivamente) desde los 30 hasta los 90 dpe. Los pejerreyes alimentados con las dietas con baja proporción de lípidos presentaron un crecimiento mayor, independientemente de la cantidad de proteínas (dietas HP-LL y LP-LL) (Bertucci et al.,

2022). En otro estudio, Gomez-Requeni *et al.* (2013) analizaron los efectos de tres dietas con diferentes porcentajes lipídicos (6% -L6-, 10% -L10- y 25% -L25-) en juveniles de pejerrey. Encontraron que el peso final y ganado fueron significativamente menores en los animales alimentados con L6 y la tasa de sobrevivencia fue significativamente mayor en los alimentados con L25 respecto a L6. Estas diferencias en los efectos de los lípidos dietarios podrían estar relacionados a requerimientos nutricionales específicos dentro de cada estadio del desarrollo del pejerrey. En base a esto, y teniendo en cuenta la importancia de DHA y EPA en el desarrollo (Sargent, Mcevoy, et al., 1999), se decidió evaluar los efectos de distintos enriquecimientos en HUFA de la artemia como dieta inicial del pejerrey.

#### Evaluación de los efectos de las dietas sobre el tracto alimentario

La hipótesis del trabajo supone un efecto positivo del alimento sobre la maduración del tracto alimentario. Particularmente, en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) se registró un efecto positivo sobre la maduración del tracto alimentario al aumentar la cantidad de lípidos de la dieta. Las dietas suministradas entre los 15 y 38 dpe con mayor proporción lipídica aumentaron la actividad de las enzimas digestivas, así como la sobrevivencia y crecimiento de los animales (Zambonino Infante & Cahu, 1999). El número de papilas gustativas es una característica poco evaluada en los estudios experimentales del tracto alimentario en peces; sin embargo, hay ejemplos en los que el número de las papilas gustativas, su momento de aparición y su morfología varían en función del alimento disponible (Døving & Kasumyan, 2008). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la ontogenia del tracto alimentario del pejerrey, es posible

considerar que un mayor número de papilas indica un mayor desarrollo del tracto alimentario. A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas en el número de papilas gustativas bucales ni faríngeas entre animales de diferentes tratamientos al día 9 pe. Teniendo en cuenta que las papilas con características histológicas típicas de las papilas maduras se observan muy temprano en el desarrollo (al día 1 pe en ambas cavidades), sería interesante realizar un estudio en el cual se evalúe el comienzo la funcionalidad de las mismas, ya que la histomorfología no siempre indica funcionalidad. No obstante, al igual que en la caracterización de la ontogenia, y confirmando cuantitativamente este resultado, sí se encontraron diferencias significativas entre el número de papilas en la cavidad faríngea y bucal, siendo las primeras más abundantes.

El hígado es uno de los órganos más utilizados como indicador del valor nutricional del alimento (Green & McCormick M.I., 1999; Segner et al., 1984). Las características que suelen ser evaluadas son la vacuolización de los hepatocitos, el tamaño de los hepatocitos y el tamaño de sus núcleos (Raskovic et al., 2011). En la presente Tesis se midió el área de los hepatocitos de animales de 9 dpe sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos. En todos los casos se observaron animales que presentaban hepatocitos con grandes vacuolas cargadas de reservas energéticas y no se observaron indicios de malnutrición como necrosis celular, centros melanomacrofágicos o núcleos picnóticos (Raskovic et al., 2011; Strüssmann & Takashima, 1989). Por otro lado, existen reportes de esteatosis en peces alimentados con dietas ricas en lípidos, probablemente asociado a un exceso de ácidos grasos saturados o monoinsaturados (Spisni et al., 1998; Zarantoniello et al., 2020), condición que no se detectó en este estudio. Si bien se observaron diferentes aspectos histológicos entre los hígados evaluados, relacionados a la

vacuolización de los hepatocitos y su cantidad de citoplasma, esta variabilidad se repartió equitativamente entre los tres tratamientos.

Por otro lado, el intestino también se considera un órgano sensible a la calidad del alimento, presentando una gran plasticidad frente a distintas dietas (Zarantoniello et al., 2020). Sin embargo, la sensibilidad del mismo varía con las especies (Raskovic et al., 2011). Estudios previos en pejerrey demuestran que, frente a una malnutrición severa, el intestino medio y posterior de las larvas presenta una reducción del alto celular y una pérdida de los pliegues intestinales. Incluso se registró una pérdida de las microvellosidades apicales frente al mantenimiento de la condición de inanición en individuos de entre 1 a 12 dpe (Strüssmann & Takashima, 1989). Los resultados obtenidos durante esta Tesis para los animales de 9 dpe no mostraron efectos significativos de los tratamientos sobre el alto del pliegue intestinal ni el alto del enterocito. Cabe aclarar que en este análisis resultó complejo encontrar pliegues con las características pre-establecidas para ser medidos, con lo que se midieron dos pliegues por zona (Ant., Med. y Post.). Teniendo en cuenta el largo del intestino del pejerrey y la cantidad de pliegues presentes, el análisis realizado pudo haber resultado en una muestra demasiado pequeña. Por otro lado, sí fue posible determinar diferencias significativas entre el largo de los pliegues intestinales de las diferentes regiones (Med. > Ant. > Post.). Estos resultados permitieron nuevamente reafirmar cuantitativamente lo observado en el análisis de la ontogenia del tracto alimentario.

Si bien no se detectaron diferencias entre los tratamientos, tampoco se registraron efectos negativos de ninguna de las dietas en los parámetros evaluados. El pejerrey eclosiona con las regiones del tracto alimentario diferenciadas y estas maduran durante los primeros días de vida; además, el epitelio intestinal es un tejido dinámico, con una constante remodelación y sensible

al estado nutricional del animal (Gas & Noaillac-Depeyre, 1976; Hall & Bellwood, 1995; Kapoor et al. 1975) y ya se han reportado efectos sobre el intestino e hígado en los primeros días de vida del pejerrey (Strüssmann & Takashima, 1989). Entonces, podría esperarse encontrar diferencias al día 9 pe. Sin embargo, teniendo en cuenta que los pejerreyes analizados recibieron esta alimentación diferencial únicamente durante una semana, es posible que la misma no llegara a generar efectos sobre el tracto alimentario y el hígado. Resultaría interesante la evaluación de animales de edad más avanzada, ya que es posible que los efectos de estas dietas sean evidentes en animales tratados durante más tiempo.

### Evaluación de los efectos de las dietas sobre las deformidades esqueléticas

Las deformidades esqueléticas son uno de los problemas más frecuentes y generales dentro de la acuicultura. Representan una pérdida económica, no solo porque generan un aumento de la mortalidad y una disminución del crecimiento, sino también porque disminuyen notablemente el precio del animal en el mercado (Boglione, Gavaia, et al., 2013; Farahani et al., 2023). Son numerosos los intentos por reducir la incidencia de las deformidades y muchos los factores que se proponen como posibles causantes de las mismas, entre ellos, el contenido lipídico de las dietas (Boglione, Gisbert, et al., 2013; Cahu et al., 2003; Gapasin & Duray, 2001; Villeneuve et al., 2005). Esto puede explicarse por los variables roles funcionales que tienen estas moléculas en los organismos, influenciando, entre otros, la expresión de genes involucrados en la esqueletogénesis (Boglino et al., 2012; Kliewer et al., 1997; Villeneuve et al., 2005).

Respecto a la evaluación de las deformidades esqueléticas, el estudio de pejerreyes al 50 dpe permitió analizar animales con un esqueleto prácticamente desarrollado, evitando errores de interpretación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es posible que animales con deformidades severas no sobrevivan hasta el día analizado, lo cual podría alterar los resultados obtenidos.

No se encontraron diferencias en la incidencia de deformidades esqueléticas entre los tratamientos, observándose una alta proporción de individuos con al menos una deformidad en los tres tratamientos. Este análisis permitió detectar que, en el pejerrey, la región más sensible al desarrollo de deformidades esqueléticas sería la columna vertebral. Esto había sido también reportado en un trabajo previo en el cual se observó que más del 60% de los pejerreyes mantenidos a 29°C presentaban deformidades esqueléticas en la región axial (Strüssman et al., 1997). Una posible explicación es que las estructuras que se desarrollan más tarde en la ontogenia, son más susceptibles a presentar deformidades por encontrarse un mayor tiempo expuestas a posibles factores causantes de las mismas (Fiaz et al., 2012). En base a esto, se observó en el análisis de la esqueletogénesis que efectivamente la columna vertebral del pejerrey comienza a desarrollarse tarde en la ontogenia, y, además, su osificación dura aproximadamente 15 días. Dentro de las deformidades del eje axial se describieron deformidades en los arcos neurales y hemales, deformidades en los cuerpos vertebrales y desviaciones del eje axial. Respecto a esto último, se realizó un análisis minucioso de la frecuencia de cifosis y lordosis a lo largo de la columna vertebral, detectando regiones de mayor susceptibilidad a la sufrir cifosis (primeras 8 vértebras) o lordosis (entre la 25 y 35). Interesantemente, se encontró que el patrón de frecuencia

de estas dos desviaciones es complementario y hay zonas, como entre las vértebras 27 y 36, en las que sólo se registra la presencia de lordosis.

Los esfuerzos del proyecto marco estuvieron orientados a formular una dieta inicial que mostrara mejoras en el desarrollo general del animal. Teniendo esto en cuenta, los alimentos suministrados no presentaban diferencias extremas en su composición ya que, dentro de la nutrición, los excesos y/o deficiencias suelen ser perjudiciales (Oliva-Teles, 2012; Watanabe & Kiron, 1994). Esta moderada diferenciación entre las dietas podría no ser suficiente para generar efectos notables sobre las características evaluadas en los pejerreyes en esta Tesis. Por otro lado, además del contenido total de HUFA de la dieta, existen características más específicas, como la forma molecular en la que se proporcionan (polar o neutro), o la relación entre DHA y EPA, que ha sido demostrado que presentan efectos sobre el desarrollo de los animales (Gapasin & Duray, 2001; Gisbert et al., 2005; Rodríguez et al., 1998; Sargent, Mcevoy, et al., 1999; Socorro et al., 2000; Villeneuve et al., 2005; Watanabe & Kiron, 1994). Por otro lado, el enriquecimiento de la artemia y la incorporación de los nutrientes por parte de los pejerreyes no presenta necesariamente una relación directa. Cabe aclarar que futuros análisis dentro del proyecto incluyen la evaluación de los niveles de lípidos en los pejerreyes dentro de cada tratamiento. Sumado a esto, durante los meses de diciembre del 2023 a febrero de 2024 el experimento fue repetido y, en esta ocasión, las tasas de crecimiento fueron significativamente mayores en los animales pertenecientes al tratamiento M. Los resultados de la presente Tesis aportaron información indispensable para llevar a cabo los muestreos y los análisis que se realizarán sobre los animales del nuevo experimento.

## Conclusiones generales

A lo largo de esta Tesis se realizó por primera vez la caracterización histológica del desarrollo del tracto alimentario desde el momento de la eclosión hasta los 21 dpe y la descripción de la esqueletogénesis desde la eclosión hasta los 54 dpe del pejerrey bonaerense. Siendo la larvicultura uno de los cuellos de botella más frecuentes dentro de la piscicultura, generar conocimiento sobre la biología larval de las diferentes especies se vuelve indispensable. En este sentido, los resultados obtenidos expanden el conocimiento sobre la biología larval del pejerrey bonaerense y sientan las bases para una mejora de su cultivo. Por otro lado, se realizó la evaluación de tres protocolos alimentarios, enriquecidos, o no, con diferentes ácidos grasos, sobre indicadores del estado nutricional y la incidencia de deformidades esqueléticas. Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias en los parámetros analizados, se rechaza la hipótesis de trabajo planteada en esta Tesis.



---

Daniela Rio



---

Daniela Pérez Sirkin



---

Agustina Beriotta

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriaens, D., & Verraes, W. (1998). Ontogeny of the osteocranium in the African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822)(Siluriformes: Clariidae): ossification sequence as a response to functional demands. *Journal of Morphology*, 235(3), 183-237. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199803\)235:3<183::AID-JMOR2>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199803)235:3<183::AID-JMOR2>3.0.CO;2-8)
- Agencia Argentina de Inversiones y Comercio Internacional- Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, Argentina. (2021). Informe Sectorial para inversores internacionales: Piscicultura. [https://www.aaici.org.ar/pdf/sectores/agro/SEC\\_INVERSI%C3%93N\\_PISCICULTURA\\_2022.pdf](https://www.aaici.org.ar/pdf/sectores/agro/SEC_INVERSI%C3%93N_PISCICULTURA_2022.pdf)
- Alam, A., & Al-Hafedh, Y. (2006). Diurnal dynamics of water quality parameters in an aquaculture system based on recirculating green water technology. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 10(2). DOI: 10.4314/jasem.v10i2.43651
- Atema, J. (1971). Structures and Functions of the Sense of Taste in the Catfish (*Ictalurus natalis*). *Brain, Behavior and Evolution*, 4(4), 273–294.
- de Azevedo, A. M., Losada, A. P., Ferreira, I., Riaza, A., Vázquez, S., & Quiroga, M. I. (2017). New insight on vertebral anomalies in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) at early stages of development. *Journal of Fish Diseases*, 40(8), 987–1000. <https://doi.org/10.1111/jfd.12575>
- Baigún, C. R. M., & Delfino, R. L. (2003). Assessment of social and economic factors for management of summer pejerrey recreational fisheries in pampean lakes (Argentina). *Lake and Reservoir Management*, 19(3), 242–250. <https://doi.org/10.1080/07438140309354089>
- Balon, E. K. (1999). Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). In *Environmental Biology of Fishes* (Vol. 56).
- Bastos Rocha, C., Kaster Portelinha, M., Morato Fernandes, J., Conceição Pfaff de Britto, A., Renato Noguez Piedras, S., & Luís Osório Fernandes Pouey, J. (2014). Dietary phosphorus requirement of pejerrey fingerlings (*Odontesthes bonariensis*). [www.sbz.org.br](http://www.sbz.org.br)
- Beriotto, A. C., Vissio, P. G., Gisbert, E., Fernández, I., Álvarez González, C. A., Di Yorio, M. P., Sallemi, J. E., & Pérez Sirkin, D. I. (2023). From zero to ossified: Larval skeletal ontogeny of the Neotropical Cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Journal of Morphology*, 284(10). <https://doi.org/10.1002/jmor.21641>
- Bertucci, J. I., Blanco, A. M., Navarro, J. C., Unniappan, S., & Canosa, L. F. (2022). Dietary protein:lipid ratio modulates somatic growth and expression of genes involved in somatic growth, lipid metabolism and food intake in Pejerrey fry (*Odontesthes bonariensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111231>
- Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., Holcroft, N. I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton, J. C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M. A., Ballesteros, J. A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W. C., Rowley, T., Reneau, P. C., ... Ortí, G. (2013). The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS Currents*, APR 2013. <https://doi.org/10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccee75bb165c8c26288>
- Bogolino, A., Darias, M. J., Estévez, A., Andree, K. B., & Gisbert, E. (2012). The effect of dietary arachidonic acid during the Artemia feeding period on larval growth and skeletogenesis in Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(3), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01977.x>
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., & Witten, P. E. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous

- skeletogenic processes. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 5, Issue SUPPL.1). <https://doi.org/10.1111/raq.12015>
- Boglionne, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P. E., Moren, M., Fontagné, S., & Koumoundouros, G. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- Bucher, E. H., & Etchegoin, M. (2006). *El pejerrey como recurso. Bañados del río Dulce y laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina)*. Acad. Nacional de Ciencias.
- Bull, J. J., Vogt, R. C., & Bulmer, M. G. (1982). Heritability of Sex Ratio in Turtles with Environmental Sex Determination. In *Source: Evolution* (Vol. 36, Issue 2).
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225(1–4), 325–340. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00299-0)
- Cahu, C. L., Infante, J. L. Z., & Barbosa, V. (2003). Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British Journal of Nutrition*, 90(1), 21–28. <https://doi.org/10.1079/bjn2003880>
- Camp, A. L., & Brainerd, E. L. (2014). Role of axial muscles in powering mouth expansion during suction feeding in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *The Journal of Experimental Biology*, 217(8), 1333–1345. <https://doi.org/10.1242/jeb.095810>
- Campinho, M. A. (2019). Teleost metamorphosis: The role of thyroid hormone. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00383>
- Chalde, T., Fernández, D. A., Cussac, V. E., & Somoza, G. M. (2011). The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis*-Morphological indicators of development. In *Neotropical Ichthyology* (Vol. 9, Issue 4).
- Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S., Hutchinson, W., & Clarke, S. (2006). Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 256(1–4), 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.041>
- Cloutier, R., Caron, A., Grünbaum, T., & Le François, N. R. (2010). Effect of water velocity on the timing of skeletogenesis in the arctic Charr, *Salvelinus alpinus* (Salmoniformes: Teleostei): An empirical case of developmental plasticity. *International Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1155/2010/470546>
- Colautti, D. C., Garcia de Souza, J. R., Balboni, L., & Baigún, C. R. M. (2010). Extensive cage culture of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in a shallow pampean lake in Argentina. *Aquaculture Research*, 41(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02458.x>
- Coral, D., & Meza, C. (2014). Efecto comparativo de Artemia salina, Artemia enriquecida con omega-3 y balanceado comercial, suministrado durante ocho y dieciséis días en la fase de alevinaje de escalares (*Pterophyllum scalare*), en condiciones de cautiverio en el centro experimental amazónico, CEA., Mocoa, Putumayo.
- Cubbage, C. C., & Mabee, P. M. (1996). Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Journal of Morphology*, 229(2), 121–160. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199608\)229:2<121::AID-JMOR1>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199608)229:2<121::AID-JMOR1>3.0.CO;2-4)
- Delgadín, T.H., Pérez Sirkin, D.I., Di Yorío, M.P. et al. GH, IGF-I and GH receptors mRNA expression in response to growth impairment following a food deprivation period in individually housed cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Fish Physiol Biochem* 41, 51–60 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10695-014-0005-x>
- Devitsina, G. V., & Golovkina, T. V. (2011). Gustatory apparatus of the oropharyngeal cavity in juvenile rainbow trout *Parassalmo mykiss*. *Journal of Ichthyology*, 51(1), 106–115. <https://doi.org/10.1134/S0032945210061013>

- Díaz, A. O., Escalante, A. H., García, A. M., & Goldemberg, A. L. (2006). Histology and histochemistry of the pharyngeal cavity and oesophagus of the silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier and Valenciennes). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 35(1), 42–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00654.x>
- Díaz, A. O., Tano de la Hoz, M. F., García, A. M., Escalante, A. H., & Goldemberg, A. L. (2012). Characterization of glycoconjugates in the pharyngeal cavity and the oesophagus of *Odontesthes bonariensis* by lectins. *Biotemas*, 25(4). <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n4p157>
- Døving, K. B., & Kasumyan, A. O. (2008). Chemoreception. In *Fish larval physiology* (pp. 331-394). CRC Press.
- Dyer, B. (1998). *Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical silverside family Atherinopsidae (Teleostei, Atheriniformes)*. <https://www.researchgate.net/publication/285703039>
- Elsheikh, E. H., Nasr, E. S., & Gamal, A. M. (2012). Ultrastructure and distribution of the taste buds in the buccal cavity in relation to the food and feeding habit of a herbivorous fish: *Oreochromis niloticus*. *Tissue and Cell*, 44(3), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.02.002>
- Evjemo, J. O., Danielsen, T. L., & Olsen, Y. (2001). Losses of lipid, protein and n y 3 fatty acids in enriched *Artemia franciscana* starved at different temperatures. In *Aquaculture* (Vol. 193). [www.elsevier.nl/locateraqua-online](http://www.elsevier.nl/locateraqua-online)
- FAO, 2016. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. 224 pp.
- FAO, 2022. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO, 2005-2024. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Argentina. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Panné Huidobro, S. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma.
- Farahani, A. M. A., Coronado, M., Bragado, S., Justo, M. J., Blanco, X., Sotelo, A., Navarrete, P., Álvarez-Blázquez, B., & Fernández, I. (2023). Larval performance, osteological development and skeletal abnormalities in wreckfish (*Polyprion americanus*) under a standard rearing protocol and different light intensities and rearing temperatures. *Aquaculture*, 577. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739935>
- Fernández, I., Granadeiro, L., Darias, M. J., Gavaia, P. J., Andree, K. B., & Gisbert, E. (2018). *Solea senegalensis* skeletal ossification and gene expression patterns during metamorphosis: New clues on the onset of skeletal deformities during larval to juvenile transition. *Aquaculture*, 496, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.022>
- Fiaz, A. W., Léon-Kloosterziel, K. M., Gort, G., Schulte-Merker, S., van Leeuwen, J. L., & Kranenbarg, S. (2012). Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *PLoS One*, 7(4), e34072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034072>
- Finger, T. E., Drake, S. K., Kotrschal, K., Womble, M., & Dockstader, K. C. (1991). Postlarval Growth of the Peripheral Gustatory System in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 55–66.
- Fragkoulis, S., Christou, M., Karo, R., Ritas, C., Tzokas, C., Batargias, C. and Koumoundouros, G. (2017), Scaling of body-shape quality in reared gilthead seabream *Sparus aurata* L. Consumer preference assessment, wild standard and variability in reared phenotype. *Aquac Res*, 48: 2402-2410. <https://doi.org/10.1111/are.13076>
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) version (10/2023).

- Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., & Francis-West, P. (2021). Making and shaping endochondral and intramembranous bones. In *Developmental Dynamics* (Vol. 250, Issue 3, pp. 414–449). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>
- Gas, N. & Noailliac-Depeyre, J. (1976). Studies on intestinal epithelium during prolonged fasting. *Journal of Ultrastructure Research* 56, 137-151. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(76\)80161-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(76)80161-X)
- Gapasin, R. S. J., & Duray, M. N. (2001). Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in ž / milkfish *Chanos chanos*. In *Aquaculture* (Vol. 193). [www.elsevier.nl/locate/aqua-online](http://www.elsevier.nl/locate/aqua-online)
- Gisbert, E., Villeneuve, J. L., Zambonino-Infante, P., Quazuguel P, & Cahu C.L. (2005). Dietary Phospholipids Are More Efficient Than Neutral Lipids for Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supply in European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* Larval Development. *Lipids*, 40(6), 609–618.
- Gómez-Requeni, P., Bedolla-Cázares, F., Montecchia, C., Zorrilla, J., Villian, M., Toledo-Cuevas, E. M., & Canosa, F. (2013). Effects of increasing the dietary lipid levels on the growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the teleost pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquaculture*, 416–417, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.027>
- Gómez-Requeni, P., Kraemer, M. N., & Canosa, L. F. (2012). Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(4), 517–530. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0640-9>
- Govoni, J. J., Boehlert, G. W., & Watanabe, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. In *Environmental Biology of Fishes* (Vol. 16, Issue 3). Dr W. Junk Publishers.
- Green, B. S., & McCormick M.I. (1999). Influence of larval feeding history on the body condition of *Amphirion melanopus*. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 55). <http://www.idealibrary.comon>
- Hall, K. C., & Bellwood, D. R. (1995). Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 47).
- Hamlin, H. J., Hunt Von Herbing, I., & Kling, L. J. (2000). Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 57(3), 716–732. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1347>
- Hara, T. J. (2011). Morphology of the Gustatory (Taste) System in Fishes. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 187-193.
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. (2009). The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology. John Wiley & Sons.
- Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., Logothetis, E. A., Cavanagh, J. W., & Boyle, K. S. (2006). Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology*, 149(5), 1237–1245. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0281-9>
- Jia R., Cao L.P., Du J.L., He Q., Gu Z.Y., Jeney G., Xu P. and Yin G.J. (2020) Effects of High-Fat Diet on Steatosis, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Liver of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Front. Mar. Sci.* 7:363. doi: 10.3389/fmars.2020.00363
- Kaji, T., Tanaka, M., Takahashi, Y., Oka, M., & Ishibashi, N. (1996). Preliminary observations on development of Pacific bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Scombridae) larvae reared in the laboratory, with special reference to the digestive system. *Marine and Freshwater Research*, 47(2), 261-269. <https://doi.org/10.1071/MF9960261>
- Kapoor, B. G., Smit, H. & Verighina, I. A. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology* 13, 109-230. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60281-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60281-3)
- Karp, P.J. (2014). Respuesta hepática frente a la restricción alimentaria del pez cíclido *Cichlasoma dimerus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Bruce, G., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., & Lehmann, J. M. (1997). *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors and (nuclear receptor)ligandtranscriptionfibrate* (Vol. 94). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Kobelkowsky, A., & Figueroa Lucero, G. (2018). Anatomy of the digestive system of Shortfin Silverside *Chirostoma humboldtianum* (Teleostei: Atherinopsidae). *Hidrobiológica*, 28(1), 37-50.
- Kopprio, G. A., Graeve, M., Kattner, G., & Lara, R. J. (2015). Fatty acid composition of wild *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835) larvae: Implications on lipid metabolism and trophic relationships. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(4), 752–755. <https://doi.org/10.1111/jai.12786>
- Krumlauf, R. (1994). Hox Genes in Vertebrate Development. In *Cell* (Vol. 78).
- López, H. L., & García M. L. (2001). *ASPECTOS HISTORICOS E IMPORTANCIA REGIONAL DEL PEJERREY BONAERENSE*.
- López-Olmeda, J. F., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). In *Journal of Thermal Biology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 91–104). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.12.005>
- Mabee, P. M., & Trendler, T. A. (1996). Development of the cranium and paired fins in *Betta splendens* (Teleostei: Percomorpha): intraspecific variation and interspecific comparisons. *Journal of Morphology*, 227(3), 249-287.
- Madara, J. L. (2010). Functional morphology of epithelium of the small intestine. *Comprehensive Physiology*, 83-120. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp060403>
- Martell, D. J., Kieffer, J. D., & Trippel, E. A. (2005). Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. *Journal of Fish Biology*, 1558–1575. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00699.x>
- Martínez-Palacios, C. A., Aguilar-Valdez, M. C., Strüssmann, C. A., Ríos-Durán, M. G., Toledo-Cuevas, E. M., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrugal, J., Martínez-Chávez, C. C., & Ross, L. G. (2019). The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits. *Zoomorphology*, 138(4), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00457-1>
- Micale V., Garaffo M., Genovese L., Spedicato M.T. & Muglia U. (2006) The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. *Aquaculture* 251,354-465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.048>
- Miranda, L. A., Berasain, G. E., Velasco, C. A. M., Shirojo, Y., & Somoza, G. M. (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell*, 30(1), 157-162.
- Northcott, M. E., & Beveridge, M. C. M. (1988). The development and structure of pharyngeal apparatus associated with filter feeding in tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Zoology*, 215(1), 133–149. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04889.x>
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. In *Journal of Fish Diseases* (Vol. 35, Issue 2, pp. 83–108). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Önal, U., Langdon, C., & Çelik, I. (2008). Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacépède 1802): A histological perspective. *Aquaculture Research*, 39(10), 1077–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01968.x>
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Kwasek, K., Verri, T., Kamaszewski, M., Sliwinski, J., & Napora-Rutkowski, L. (2011). Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the morphology of the liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Research*, 42(12), 1796–1806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02779.x>
- Palacios, C. A. M., Racotta, I. S., Ríos-Durán, M. G., Palacios, E., Toledo-Cuevas, M., & Ross, L. G. (2006). *Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (Chirostoma, Atherinopsidae)*.
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 194-253

- Pepin, P. (1991). Effect of Temperature and Size on Development, Mortality, and Survival Rates of the Pelagic Early Life History Stages of Marine Fish. In *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Downloaded from [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com) by Entomology on (Vol. 48). [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com)
- Pérez-Sirkin, D. I., Solovyev, M., Delgadin, T. H., Herdman, J. E., Miranda, L. A., Somoza, G. M., Vissio, P. G., & Gisbert, E. (2020). Digestive enzyme activities during pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) ontogeny. *Aquaculture*, 524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735151>
- Puchtler, H., Meloan, S. N., & Terry, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 17(2), 110–124. <https://doi.org/10.1177/17.2.110>
- Raskovic, B., Stankovic, M., Markovic, Z., & Poleksic, V. (2011). Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 56(1), 87–100. <https://doi.org/10.2298/jas1101087r>
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., & Dinis, M. T. (1999). Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171(3-4), 293-308. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00496-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00496-7)
- Richter, P., & Moritz, T. (2017). Lessons from the first dorsal fin in atheriniforms—A new mode of dorsal fin development and its phylogenetic implications. *Journal of Morphology*, 278(6), 848-864. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmor.20679>
- Ringuelet, R. A. (1940). Ecología alimenticia del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Revista del Museo de la Plata*, 2(17), 427-461.
- Ringuelet, R. (1943). *PISCICULTURA DEL PEJERREY O ATERINICULTURA*.
- Ringuelet, R., Iriart, R., & Escalante, A. (1980). *ALIMENTACIÓN DEL PEJERREY (BASILICHTYS BONARIENSIS BONARIENSIS, Atherinidae) EN LAGUNA CHASCOMÚS (BUENOS AIRES, ARGENTINA). RELACIONES ECOLÓGICAS DE COMPLEMENTACIÓN Y EFICIENCIA TRÓFICA DEL PLANCTON*.
- Rocha, E., Monteiro, R. A. F., & Pereira, C. A. (1994). The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. In *J. Anal* (Vol. 185).
- Rodríguez, C., Pérez, J. A., Badía, P., Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H., & Lorenzo Hernández, A. (1998). The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture*, 9–23.
- Sargent, J., Bell, G., Mcevoy, L., Tocher, D., & Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. In *Aquaculture* (Vol. 177).
- Sargent, J., Mcevoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. In *Aquaculture* (Vol. 179).
- Schoch, R. R. (2006). Skull ontogeny: developmental patterns of fishes conserved across major tetrapod clades. *Evolution & Development*, 8(6), 524-536. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.00125.x>
- Segner, H., Orejana-Acosta, B., & Juario, J. V. (1984). The effect of *Brachionus plicatilis* grown on three different species of phytoplankton on the ultrastructure of the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forskål) fry. *Aquaculture*, 42(2), 109-115.
- Socorro, J., Arantzamendi, L., & Hernández-Cruz, C. M. (2000). Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 22).
- Somoza, G. M., Miranda, L. A., Berasain, G. E., Colautti, D., Remes Lenicov, M., & Strüssmann, C. A. (2008). Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. In *Aquaculture Research* (Vol. 39, Issue 7, pp. 784–793). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01930.x>
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., & Tomasi, V. (1998). Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 21(3), 177-184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00089.x>

- Strüssmann, C. A., & Takashima, F. (1989). PNR, Histology and Morphometry of Starved Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Larvae. In *Nippon Suisan Gakkaishi* (Vol. 55, Issue 2).
- Strüssmann, C. A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H., Takashima, F., & Augusto Strüssmann, C. (1997). Thermal Thresholds and Critical Period of Thermolabile Sex Determination in Two Atherinid Fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. In *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* (Vol. 278).
- Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
- Thieme, P., Warth, P., & Moritz, T. (2021). Development of the caudal-fin skeleton reveals multiple convergent fusions within Atherinomorpha. *Frontiers in Zoology*, 18(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12983021-00408-x>
- Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Ramírez, D. T., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C., & Martínez-Palacios, C. A. (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42(6), 776-786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x>
- Twongo, T. K., & MacCrimmon, H. R. (1977). Histogenesis of the oropharyngeal and oesophageal mucosa as related to early feeding in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *CAN. J. ZOOL.*, 55, 116–128.
- Urán, P. A., Schrama, J. W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J. H. W. M., Koppe, W., & Verreth, J. A. J. (2009). Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15(5), 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00615.x>
- Vandewalle, P., Saintin, P., & Chardon, M. (1995). Structures and movements of the buccal and pharyngeal jaws in relation to feeding in *Diplodus sargus*. *Journal of fish biology*, 46(4), 623-656. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01101.x>
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, P., & Cahu, C. L. (2005). Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *British Journal of Nutrition*, 94(6), 877–884. <https://doi.org/10.1079/bjn20051560>
- Wagemans, F., & Vandewalle, P. (2001). Development of the bony skull in common sole: brief survey of morpho-functional aspects of ossification sequence. *Journal of Fish Biology*, 59(5), 1350-1369. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00197.x>
- Walker, M. B., & Kimmel, C. B. (2007). A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotechnic & Histochemistry*, 82(1), 23-28.
- Watanabe, T., & Kiron, V. (1994). Aquaculture Review Prospects in larval fish dietetics. In *Aquaculture* (Vol. 124).
- Witten, P. E., Huysseune, A., & Hall, B. K. (2010). A practical approach for the identification of the many cartilaginous tissues in teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(2), 257-262. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01416.x>
- Wold, P. A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C. L., Infante, J. Z., Rainuzzo, J., & Kjørsvik, E. (2009). Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: Effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 15(1), 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00569.x>
- Yamamoto, T. (1966). AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF THE COLUMNAR EPITHELIAL CELL IN THE INTESTINE OF FRESH WATER TELEOSTS: GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*) AND RAINBOW TROUT (*SALMOIRIDEUS*). *Zeitschrift Für Zellforschung*, 72, 66–87.
- Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C., & Fang, L. (2010). Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 302(1–2), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.020>

- Zambonino Infante, J. L., & Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* (Vol. 130).
- Zambonino-Infante J L, & Cahu, C. L. (2010). *Effect of nutrition on marine fish development and quality*. <http://archimer.ifremer.fr>
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129, 1195-1200
- Zarantoniello, M., Randazzo, B., Gioacchini, G., Truzzi, C., Giorgini, E., Riolo, P., Gioia, G., Bertolucci, C., Osimani, A., Cardinaletti, G., Lucon-Xiccato, T., Milanović, V., Annibaldi, A., Tulli, F., Notarstefano, V., Ruschioni, S., Clementi, F., & Olivotto, I. (2020). Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: a multidisciplinary approach. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67740-w>