



## **UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

### **“Desarrollo e implementación de técnicas para el enfriamiento de embriones de dos especies de peces de interés comercial y científico: el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y el pez beta (*Betta splendens*)”**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Christian Leandro Macoretta**

Director de tesis: Dr. Leandro Andrés Miranda

Consejero de Estudios: Dra. Fabiana Lo Nostro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura, Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, CONICET-UNSAM)

Buenos Aires, 2022

## Índice

A. Resumen .....	v
B. Abstract .....	vi
C. Difusión de los resultados obtenidos.....	vii
D. Agradecimientos .....	ix
1 Introducción general .....	1
1.1 Acuicultura .....	1
1.2 Tecnologías aplicadas a la conservación de gametas y de embriones de peces .....	2
1.2.1 Criopreservación .....	2
1.2.2 Crioprotectores .....	2
1.2.3 Criopreservación de gametas y embriones de peces.....	3
1.2.4 Enfriamiento de embriones.....	4
1.3 Hipótesis general.....	5
1.4 Objetivo general.....	5
2 Capítulo 1. Enfriamiento de embriones de pejerrey ( <i>Odontesthes bonariensis</i> ).....	6
2.1 Introducción .....	6
2.1.1 El pejerrey bonaerense .....	6
2.1.2 Reproducción y desarrollo embrionario .....	7
2.1.3 Situación actual del cultivo del pejerrey en Argentina .....	8
2.1.4 Antecedentes de criopreservación y enfriamiento de gametas y embriones de pejerrey	9
2.1.5 El pez medaka, una especie modelo .....	9
2.2 Hipótesis.....	10
2.3 Objetivos .....	10
2.3.1 Objetivo general.....	10
2.3.2 Objetivos específicos.....	10
2.4 Materiales y métodos .....	11
2.4.1 Obtención de embriones.....	11
2.4.1.1 Pejerrey .....	11
2.4.1.2 Medaka.....	12
2.4.2 Ensayos de incubación de embriones de pejerrey.....	14
2.4.2.1 Ensayo de incubación N°1 .....	14
2.4.2.2 Ensayo de incubación N°2 .....	15
2.4.2.3 Ensayo de incubación N°3 .....	18
2.4.2.4 Otros soportes de incubación .....	19
2.4.3 Evaluación del desarrollo, supervivencia embrionaria y eclosión .....	20

2.4.4	Evaluación de las larvas obtenidas.....	21
2.4.4.1	Punto de no retorno.....	21
2.4.4.2	Morfología.....	21
2.4.4.2.1	Clasificación de fenotipos .....	21
2.4.4.2.2	Tinción con <i>Alcian Blue</i> .....	22
2.4.4.2.3	Tinción con <i>Oil-Red-O</i> .....	23
2.4.5	Ensayos de enfriamiento.....	23
2.4.5.1	Soluciones crioprotectoras.....	23
2.4.5.1.1	Osmolaridad .....	23
2.4.5.2	Equipamiento para el descenso controlado de temperatura y almacenamiento.....	24
2.4.5.3	Elección del estadio embrionario.....	25
2.4.5.4	Enfriamiento a -14 y -20 °C .....	27
2.4.5.5	Microinyección.....	27
2.4.5.5.1	Microinyección en distintos estadios embrionarios .....	28
2.4.5.6	Enfriamiento a -20 °C con microinyección .....	29
2.4.5.6.1	Enfriamiento de embriones de 8-, 48- y 96-hpf microinyectados .....	29
2.4.5.6.2	Enfriamiento de embriones de 96-hpf.....	29
2.4.5.7	Estudio comparativo con embriones de medaka.....	30
2.4.5.8	Análisis estadístico de los datos.....	31
2.5	Resultados .....	31
2.5.1	Incubación de embriones de pejerrey .....	31
2.5.1.1	Ensayo de incubación N°1 .....	31
2.5.1.2	Ensayo de incubación N°2 .....	32
2.5.1.3	Ensayo de incubación N°3 .....	35
2.5.1.4	Resumen de las ventajas y desventajas de los métodos de incubación .....	38
2.5.2	Osmolaridad y descenso crioscópico .....	38
2.5.3	Elección del estadio embrionario.....	42
2.5.4	Enfriamiento a -14 °C .....	44
2.5.4.1	Supervivencia posenfriamiento.....	44
2.5.4.2	Eclosión .....	45
2.5.4.3	Supervivencia larval.....	45
2.5.5	Enfriamiento a -20 °C .....	45
2.5.5.1	Supervivencia posenfriamiento.....	45
2.5.5.2	Eclosión .....	45
2.5.5.3	Supervivencia larval.....	46

2.5.6	Selección del estadio embrionario y sitio de microinyección .....	46
2.5.6.1	Microinyección de embriones de 8-, 48-, y 96-hpf en el espacio perivitelino	46
2.5.6.2	Enfriamiento a -20 °C de embriones de 8-, 48-, y 96-hpf microinyectados en el espacio perivitelino .....	47
2.5.6.3	Microinyección de embriones de 8- y 96-hpf en el vitelo.....	48
2.5.6.4	Enfriamiento a -20 °C de embriones de 8- y 96-hpf microinyectados en el vitelo	49
2.5.7	Enfriamiento a -20 °C con microinyección .....	50
2.5.7.1	Supervivencia posenfriamiento.....	50
2.5.7.2	Eclosión .....	51
2.5.7.3	Supervivencia larval.....	51
2.5.8	Morfología larval .....	52
2.5.9	Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de enfriamiento .....	53
2.5.10	Estudio comparativo con embriones de medaka.....	55
2.6	Discusión .....	64
2.7	Conclusiones.....	72
3	Capítulo 2: Enfriamiento de embriones del pez beta ( <i>Betta splendens</i> ) .....	74
3.1	Introducción .....	74
3.1.1	El pez beta .....	74
3.1.2	Reproducción y desarrollo embrionario .....	75
3.1.3	Cría del pez beta en cautiverio, acuarismo y comercio internacional .....	76
3.1.4	El pez beta como especie modelo.....	76
3.2	Hipótesis.....	76
3.3	Objetivos .....	77
3.3.1	Objetivo general.....	77
3.3.2	Objetivos específicos.....	77
3.4	Materiales y métodos .....	77
3.4.1	Mantenimiento y reproducción de <i>B. splendens</i> en las instalaciones del INTECH	77
3.4.2	Incubación de los embriones sin cuidado parental.....	82
3.4.3	Ensayos de enfriamiento.....	83
3.4.3.1	Soluciones crioprotectoras.....	83
3.4.3.2	Elección del estadio embrionario.....	84
3.4.3.3	Enfriamiento a 5 °C.....	85
3.4.3.4	Enfriamiento a 14 °C.....	86
3.4.4	Obtención de gametas .....	86
3.4.5	Congelamiento de esperma .....	86

3.5	Resultados .....	87
3.5.1	Incubación de los embriones sin cuidado parental.....	87
3.5.2	Elección del estadio embrionario.....	92
3.5.3	Enfriamiento a 5 °C.....	92
3.5.4	Enfriamiento a 14 °C.....	98
3.5.5	Obtención de gametas .....	101
3.5.6	Congelamiento de esperma .....	102
3.6	Discusión .....	103
3.7	Conclusiones.....	111
4	Conclusiones generales.....	111
5	Anexo 1: Normativa vigente y vacíos legales que atañen al Capítulo 1 de esta Tesis	
Doctoral	.....	113
5.1	Prólogo .....	113
5.2	Lugar de trabajo .....	114
5.3	Normativa vigente.....	114
5.4	Vacíos legales .....	116
5.5	Alcances de la investigación.....	118
5.5.1	Acuicultura .....	118
5.5.2	Comercio de “ovas embrionadas” .....	119
5.6	Conclusiones finales.....	120
5.7	Bibliografía .....	121
5.7.1	Normativa.....	121
5.7.2	Páginas web.....	122
5.7.3	Otros documentos.....	123
6	Bibliografía .....	124

## A. Resumen

### **Desarrollo e implementación de técnicas para el enfriamiento de embriones de dos especies de peces de interés comercial y científico: el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y el pez beta (*Betta splendens*)**

La técnica de enfriamiento ha surgido como una alternativa prometedora para transportar y sincronizar el desarrollo de embriones de peces provenientes de diferentes eventos de desove. El objetivo de esta Tesis fue desarrollar protocolos de enfriamiento para embriones de dos especies de alto interés económico y científico, tanto a nivel regional como mundial: el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y el pez beta (*Betta splendens*). En ambos casos, se evaluaron diferentes estadios embrionarios, que fueron microinyectados y / o inmersos en diferentes soluciones crioprotectoras (SCs) y enfriados a bajas temperaturas (14 y 5 °C) o a temperaturas bajo cero (-14 y -20 °C), a las cuales fueron almacenados entre 1 y 24 horas. Se evaluaron diferentes parámetros embrionarios y larvarios como la supervivencia, la eclosión y la presencia de malformaciones. Las larvas se tiñeron con *Alcian Blue* u *O-Red-Oil*, y se midieron los cartílagos craneales y el área de la vejiga natatoria. Además, se realizó un estudio comparativo utilizando embriones de medaka (*Oryzias latipes*) de una línea transgénica (TG955) con GFP y mCherry en el músculo esquelético y cardíaco, respectivamente. El protocolo más adecuado para el enfriamiento de embriones de *O. bonariensis* en estadio medio (vesículas ópticas, 96-hpf, 20°C) a -14 °C durante una hora fue la disminución lenta de la temperatura en combinación con una SC compuesta por metanol 2,5 M, Me<sub>2</sub>SO 1,4 M, sacarosa 0,3 M y NaCl 0,08 M, obteniendo un 87% de eclosión, con hasta un 31% de larvas de aspecto normal. El porcentaje de eclosión disminuyó al 60% cuando el enfriamiento se realizó hasta -20 °C y solo se obtuvo un 4,5% de larvas de aspecto normal cuando a los embriones se los microinyectó con una SC en el espacio perivitelino. Para el enfriamiento de los embriones de *B. splendens*, la SC compuesta por sacarosa 0,25 M y metanol 0,75 M fue la más conveniente para su almacenamiento durante 9 horas a 5 °C, obteniendo 77% de eclosión y 52% de larvas normales. Para el almacenamiento por 24 horas a 14 °C, la SC seleccionada fue la compuesta por sacarosa 0,125 M y metanol 0,375 M, que dio lugar a un 88% de eclosión y 81% de larvas con malformaciones leves. Las anomalías larvales incluyeron malformaciones craneofaciales, curvatura de la cola, alteración de la formación de la musculatura, presencia de edema cardíaco y vejiga natatoria desinflada. Además, se reportó una recuperación parcial en algunas larvas. Estos resultados sientan las bases para futuros estudios sobre la crioconservación de embriones de *O. bonariensis* y *B. splendens*.

## B. Abstract

### **Development and implementation of techniques for the cooling of fish embryos of two fish species with commercial and scientific interest: the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) and the Siamese fighting fish (*Betta splendens*)**

The cooling technique has emerged as a promising alternative to transport and synchronize embryos from different spawning events in fishes like pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) and the Siamese fighting fish (*Betta splendens*), two species with high aquaculture and scientific interest worldwide. In this study, early- and middle-stage embryos were microinjected and/or immersed in different cryoprotectants solutions (CSs), and cooled for 1- to 24-hours at low (14 and 5 °C) or sub-zero (-14 and -20 °C) temperatures. Embryonic and larval parameters such as survival, hatching, and abnormality rates were evaluated. Larvae were stained with Alcian Blue or O-Red-Oil, and the cranial cartilages, and swim bladder area were measured. Furthermore, a comparative study using medaka (*Oryzias latipes*) embryos from a transgenic line (TG955) with GFP and mCherry on the skeletal and cardiac muscle, respectively, was performed. The most suitable protocol for cooling middle-stage *O. bonariensis* embryos (optic vesicles, 96-hpf, 20 °C) at -14 °C for one hour was the slow temperature decrease in combination with a CS composed of 2.5 M methanol, 1.4 M Me<sub>2</sub>SO, 0.3 M sucrose, and 0.08 M NaCl, obtaining 87% hatching and 30% normal-looking larvae. If cooling was performed until -20 °C, hatching decreased to 60% and only 4.5% normal-looking larvae were obtained when a CS was microinjected in the perivitelline space. For the cooling of *B. splendens* embryos, the CS composed of 0.25 M sucrose and 0.75 M methanol was the most convenient for storage for 9 hours at 5 °C, obtaining 77% hatching and 52% normal larvae. For storage for 24 hours at 14 °C, the selected CS was composed of 0.125 M sucrose and 0.375 M methanol, which gave rise to 88% hatching and 81% larvae with mild malformations. Larval malformations included craniofacial, tail and muscle-formation abnormalities, cardiac edema, and deflated swim bladder. Remarkably, a partial recovery was noticed in some larvae. These results establish the conditions for further studies on the cryopreservation of *O. bonariensis* and *B. splendens* embryos.

## C. Difusión de los resultados obtenidos

### **Publicaciones**

1. **Macoretta CL**, Miranda LA. 2021. *Cooling of Siamese fighting fish *Betta splendens* (Teleostei, Osphronemidae) embryos at low temperatures*. Cryobiology. En prensa. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.05.005>
2. **Macoretta CL**, Miranda LA. 2020. *Cooling of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) embryos at sub-zero temperatures*. Theriogenology 149, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.027>
3. **Macoretta CL**, Miranda LA. *Comparative study of developmental abnormalities in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) and medaka (*Oryzias latipes*) embryos cooled at sub-zero temperatures*. En preparación.

### **Presentación de resultados en reuniones científicas internacionales**

1. **Macoretta CL**, Miranda LA. Primeros ensayos sobre la obtención de gametas, incubación de embriones y criopreservación de espermatozoides del pez *Betta splendens* (Teleostei, Osphronemidae). VI Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA), 2021. Modalidad virtual. Presentación en formato poster.
2. **Macoretta CL**, Miranda LA. *Development of cooling protocols for fish embryos and evaluation of larval quality*. CRYO2021, Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 2021. Modalidad virtual. **Presentación oral.**
3. **Macoretta CL**, Pahi Rosero AM, Seoane Rocha C, Miranda LA. Anormalidades y supervivencia de larvas de pejerrey provenientes de embriones refrigerados a -14 y -20 °C. VI Conferencia Latinoamericana sobre el cultivo de peces nativos. Piriápolis, Uruguay, 2018. **Presentación oral.**
4. **Macoretta CL**, Miranda LA. *Freezing of pejerrey embryos at -14 and -20 °C with microinjection of a cryoprotective solution*. 11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Manaus, Brasil, 2018. Presentación en formato poster.

### **Presentación de resultados en reuniones científicas nacionales**

1. **Macoretta CL**, Miranda LA. Evaluación de la microinyección de una solución crioprotectora en embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). VII Simposio Argentino de Ictiología. Chascomús, Buenos Aires, Argentina, 2022. **Presentación oral.**
2. **Macoretta CL**, Miranda LA. Estudio comparativo de las anormalidades producidas durante el desarrollo en embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y medaka (*Oryzias latipes*) enfriados a temperatura bajo cero. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina y la Sociedad

Chilena de Reproducción y Desarrollo, 2020. Modalidad virtual. Presentación en formato poster.

3. **Macoretta CL**, Seoane Rocha C, Miranda LA. Desarrollo de protocolos de enfriamiento para embriones de pez beta (*Betta splendens*). VI Simposio Argentino de Ictiología. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue (San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina), 2019. **Presentación oral.**
4. **Macoretta CL**, Seoane Rocha C, Miranda LA. Enfriamiento a -20 °C de embriones de pejerrey: anomalías en el desarrollo y malformaciones en larvas. IV Taller de Biología Celular y del Desarrollo. Club de Regatas (Chascomús, Buenos Aires, Argentina), 2018. Presentación en formato poster.
5. **Macoretta CL**, Miranda LA. Congelamiento de embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) mediante microinyección de una solución crioprotectora. V Simposio Argentino de Ictiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Noreste (UNNE, Corrientes, Corrientes, Argentina), 2017. Presentación en formato poster.
6. **Macoretta CL**, Miranda LA. Ensayos de toxicidad con soluciones crioprotectoras en embriones de pez beta (*Betta splendens*). V Simposio Argentino de Ictiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Noreste (UNNE, Corrientes, Corrientes, Argentina), 2017. Presentación en formato poster.

#### **Becas y premios**

1. **Beca de *The Company of Biologists*** (Reino Unido) por el proyecto “*Thermotolerance and thermal imprinting on fish embryos due to heatwaves*”. Supervisor: Dr. Ignacio Fernández Monzón (Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, España), noviembre 2020.
2. **Mención especial (Área Desarrollo y Reproducción)** por el trabajo “Estudio comparativo de las anomalías producidas durante el desarrollo en embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y medaka (*Oryzias latipes*) enfriados a temperatura bajo cero. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina y la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Modalidad virtual, septiembre 2020.
3. **Beca del programa intergubernamental India-Argentina de cooperación en Ciencia y Tecnología** por el trabajo “*Cryopreservation of embryonic stem cells and primordial germ cells for transplantation and surrogate fish production*”. Supervisores: Dr. Padmanav Routray (India) y Dr. Leandro Miranda (Argentina), marzo 2018.
4. **Beca CABBIO** para asistir al curso “Actualización en aspectos biotecnológicos aplicados a la Acuicultura”, Universidad Nacional de Mar del Plata (Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina), diciembre 2017.

#### **Pertenencia a sociedades científicas**

1. Abril 2021-presente. Miembro estudiante de la *Society for Cryobiology, International Society for Low Temperature Biology and Medicine*.

## D. Agradecimientos

En primer lugar, a mis papás, por apoyarme y alentarme a realizar esta carrera. Pero por sobre todo, por haberme permitido y acompañado desde siempre en esta pasión que es mantener y criar peces. Para ustedes, Angel y Graciela, ¡las gracias son infinitas!

A Muri, mi hermana, por acompañarme (y soportarme) en este camino.

A Pura, mi abuela, con quien me encantaría compartir este momento y celebrar este logro.

A mi director de Tesis, el Dr. Leandro Miranda, por presentarme este proyecto y darme la oportunidad de trabajar en una temática completamente novedosa en el país.

A la Dra. Fabiana Lo Nostro, por su ayuda y consejos.

Al Dr. Pablo Cetica por sus recomendaciones para mejorar esta Tesis.

Al Dr. Gustavo Somoza, quien junto a Leandro, me abrieron las puertas de su laboratorio en el INTECH.

A Gustavo Berasain, Marcela Velazco y a todo el personal de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, y en especial, a Estela, por su buena predisposición y por brindarme los embriones que, sin ellos, no podría haber realizado este trabajo.

A mis compañeros y amigos del INTECH. En especial a Omar, Ana, Cami, Vicky, Sole, Marian, Diana y Luisa. A Omar por haberme enseñado a microinyectar a los embriones. A Ana por incentivarme a estudiar las malformaciones en las larvas. A Cami por su ayuda en el seguimiento del desarrollo embrionario y las risas compartidas en esas jornadas interminables en la lupa. A Sole por cuidar, junto a Vicky, Ana y Cami, a los peces de mis ensayos, ¡y de mi casa! cada vez que estuve fuera de Chascomús. A Marian por su ayuda en el aislamiento de los “bichos que caminaban” sobre mis

embriones. A Diana y a Luisa por su ayuda en el trabajo con los medakas. A todos ustedes, ¡muchas gracias!

A José, mi compañero de aventuras y de vida, por escucharme, por aguantarme y alentarme en todo momento, ¡mil gracias por estar ahí!

A mis amigos Joaquín y Celes, por escucharme y alegrarme el día a día.

A la Dra. Paula Vissio y su equipo, en especial a Juli y Andy, por enseñarme a trabajar en histología.

A Javi, el técnico del bioterio, por haberme ayudado en la instalación de los acuarios para la cría de los betas.

Al Dr. Juan Ignacio Fernandino por cederme los medakas para los ensayos.

A la Dra. Ángela Juárez y al Dr. Alejandro Perreta por su ayuda en la identificación de los ciliados.

Al equipo de trabajo de la Dra. Nora Calcaterra, en especial, a la Dra. Aldana David, por facilitarme el *plug in* para medir los cartílagos de las larvas.

A la Dras. Gladys Hermida y Ailín O'Donohoe por prestarme el reactivo para realizar la tinción de la vejiga natatoria.

A la Dra. Cristina del Valle por permitirme utilizar el osmómetro de punto de fusión.

A los Dres. Fernando Unrein y Franco Cabrerizo por facilitarme los datos de los parámetros físico-químicos del agua.

A todo el personal del INTECH, y en especial a Juana, por alegrarme las mañanas con sus chismes y ocurrencias.

A Laury Moulia por haber convertido las fotos de mis embriones y larvas en parte de su proyecto de arte audiovisual.

A CABBIO por la financiación recibida para participar del curso de Acuicultura.

Al Ministerio de Ciencia Argentino e Indio por financiar mi viaje y estadía en India (y gracias nuevamente a Leandro por permitirme participar de este intercambio).

A todo el personal del ICAR-CIFA, en especial a los Dres. Routray, Verma, y Swain y sus equipos de trabajo, por sus ideas, consejos y hospitalidad. También un agradecimiento muy especial a Radhakrishnan, Bibekananda, Chandra, Suchismita y Dipika, por su amistad y hacer de mi pasantía en India, un viaje inolvidable.

A la Dra. Estefania Paredes por haber *sponsorado* mi ingreso a la *Society for Cryobiology*.

Al Dr. Ignacio Fernández, por sus consejos y por haber confiado en mi trabajo para presentar juntos un proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos de *FeedVax*, en especial a Feli, Sol, Mile y Lis, por escucharme, aconsejarme, y alentarme a terminar de escribir esta Tesis.

Al CONICET por haberme concedido la beca para llevar a cabo este Doctorado.

Y por último, y no me menos importante, a la UBA, por la excelente educación brindada.

## **Abreviaturas**

ADN: ácido desoxirribonucleico

AI: agua de incubación

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

hpe: horas-post-enfriamiento

hpf: horas-post-fecundación

hpi: horas-post-incubación

hpm: horas-post-microinyección

INTECH: Instituto Tecnológico de Chascomús

L: luz

O: oscuridad

PNR: punto de no retorno

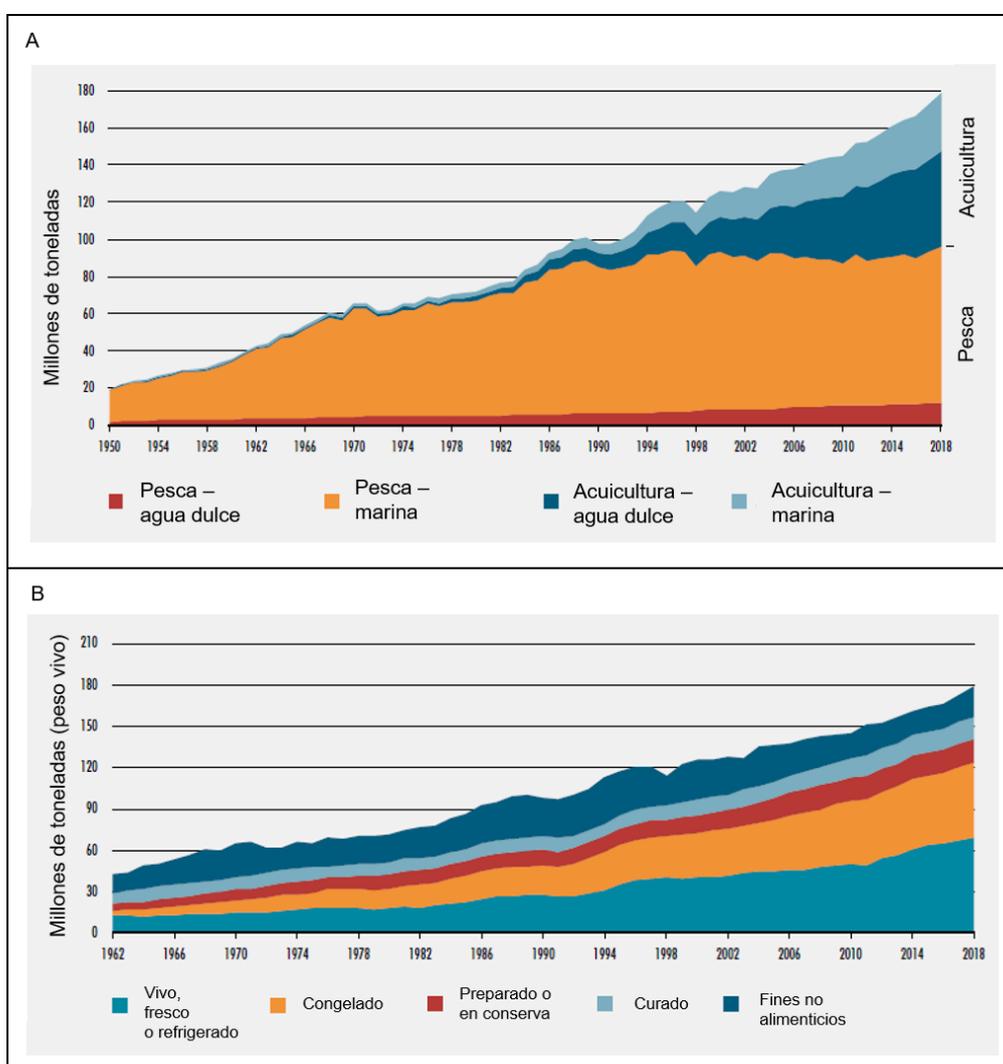
SC: solución crioprotectora

SOFIA: Informe sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura (*State of World Fisheries and Aquaculture*)

# 1 Introducción general

## 1.1 Acuicultura

La FAO define a la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas [1]. Desde los años '80, se ha registrado un incremento sostenido de la producción acuícola a nivel mundial. Actualmente, el 52% del pescado para consumo humano proviene de la acuicultura (Figura 1, A) [2]. Además, la producción acuícola no solo busca satisfacer necesidades alimenticias, sino que también tiene otros fines, como es la cría de peces ornamentales. Esta última actividad está catalogada como bien consolidada y distribuída a lo largo de todo el mundo (Figura 1, B) [2].



**Figura 1.** Producción mundial de la pesca y la acuicultura (A). Detalle del modo en que se comercializan los productos de la acuicultura (B). Gráficos tomados y modificados del informe SOFIA 2020, FAO.

## 1.2 Tecnologías aplicadas a la conservación de gametas y de embriones de peces

### 1.2.1 Criopreservación

La criopreservación es una técnica ampliamente utilizada en biotecnología reproductiva [3]. Esta técnica se aplica para la conservación de células vivas, gametas y embriones durante un tiempo de almacenamiento corto o prolongado, utilizando nitrógeno líquido. Su mecanismo está basado en lograr la deshidratación de la célula de una manera controlada, permitiendo el intercambio de líquido intra y extracelular, mitigando así la formación de cristales de hielo en el citosol durante el proceso de congelamiento [4].

### 1.2.2 Crioprotectores

La criopreservación generalmente implica el uso de uno o más compuestos que les confieran protección a las células durante el congelamiento. A estos compuestos se los denomina crioprotectores [5]. Estos crioprotectores están clasificados como externos o impermeables, e internos o permeables, dependiendo de su capacidad para atravesar las membranas biológicas [3,6]. Dentro del primer grupo se encuentran aquellos que cumplen la función de extraer el agua intracelular (glucosa, sacarosa, trehalosa) para que los crioprotectores internos (metanol, dimetil sulfóxido -DMSO-, etilenglicol, glicerol, entre otros) puedan penetrar a la célula y reemplazar al líquido extraído [3,6,7]. La correcta combinación de estos crioprotectores permite una adecuada protección de las células. No obstante, todos los crioprotectores presentan de una moderada a alta toxicidad [3,8–10] siendo, en general, los crioprotectores externos menos tóxicos que los internos [6]. Se ha demostrado que la toxicidad se incrementa de forma directamente proporcional al aumento en la concentración empleada. Puede observarse como daño a la membrana celular, proteínas y/o ADN, disminución de la actividad de las enzimas y/o mitocondrias, y en la detención del desarrollo embrionario. Asimismo, los daños antes mencionados pueden ser causados por shock osmótico, estrés oxidativo, daño por enfriamiento, entre otras causas, durante el proceso de congelamiento [11].

En la mayoría de los casos, la aplicación de los crioprotectores se realiza mediante la exposición de las células o embriones a soluciones donde estos compuestos han sido disueltos. A continuación, son enfriados a temperaturas

bajo cero hasta alcanzar la temperatura de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196 °C). Allí son almacenados durante un cierto período de tiempo. Luego, son descongelados y se les realizan lavados a fin de retirar los crioprotectores. Si bien parece ser un proceso relativamente sencillo, como ya se mencionaron previamente, hay numerosos tipos de daño que pueden ocurrir en cada uno de los pasos enumerados [5].

### 1.2.3 Criopreservación de gametas y embriones de peces

La criopreservación de embriones y gametas es un procedimiento de rutina en la práctica clínica y una herramienta de gran importancia en los tratamientos de reproducción asistida en humanos. Del mismo modo, esta técnica tiene gran importancia en el manejo reproductivo de animales domésticos, incluidos los peces. En este último grupo, solo se ha logrado con éxito la criopreservación de esperma, dado que la criopreservación de oocitos y embriones ha sido dificultosa debido a su gran tamaño, la gran cantidad de vitelo, y en el caso particular de los embriones, su estructura multicompartimental [3,6,12–14].

En Latinoamérica, se ha logrado la criopreservación de espermatozoides en peces de interés comercial como el sábalo (*Prochilodus lineatus*, [15]), el pacú (*Piaractus mesopotamicus*, [16]) y el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, [17]). A partir de esta técnica se han obtenido altas tasas de fecundación, optimizando la reproducción en cautiverio. Además, posibilita el manejo genético de los reproductores, la creación de bancos genéticos, y la transferencia de gametas entre estaciones piscícolas y/o laboratorios, disminuyendo así el riesgo del contagio de enfermedades al transportar reproductores vivos [18].

En el caso del congelamiento de embriones de peces, se han desarrollado pocos trabajos dada la dificultad que existe en conservarlos a temperaturas criogénicas. Para superar este obstáculo es necesario evaluar la toxicidad y concentración de los crioprotectores, el método de incorporación de los mismos (exposición, electroporación, tratamiento con acuaporinas, presurización, decorionado, deshidratación, sonicación, microinyección, entre

otros), la aplicación de distintos protocolos de congelamiento, y el estadio embrionario más resistente [6,9,10,19,20].

#### 1.2.4 Enfriamiento de embriones

Una alternativa al congelamiento de embriones de peces es el enfriamiento. Esta técnica consiste en exponer a los embriones a una solución crioprotectora y almacenarlos a una temperatura inferior a 0 °C durante un período corto de tiempo, dando lugar a una disminución de la actividad enzimática y celular [21,22]. Este método posibilita el transporte de los embriones entre áreas geográficamente alejadas [22], la sincronización del desarrollo de los embriones recolectados de distintos eventos de desove [6], y la optimización del uso de las instalaciones de incubación [23]. Así, se han evaluado protocolos de enfriamiento en embriones de diferentes especies de peces como *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala*, y *Cyprinus carpio* (Cypriniformes) [22,24,25], *P. mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus*, y *Brycon orbignyanus* (Characiformes) [23,26,27], y *Rhinelepis aspera* y *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) [28,29], con resultados promisorios.

En la Tabla 1 se muestra una selección de trabajos en el área de crioconservación de embriones de peces en los últimos 20 años. Cabe destacar que son muy pocos los trabajos en los que se incluyó la técnica de microinyección para incorporar los crioprotectores al embrión. Además, en la mayoría de los estudios en los que se reportó la obtención de embriones vivos, el enfriamiento se realizó hasta temperaturas cercanas a 0 °C y el almacenamiento fue sólo por algunas horas.

**Tabla 1.** Revisión de trabajos en el área de crioconservación de embriones de peces

Trabajos	Especie	Tiempo	Temperatura (°C)
Ahammad y col. 1998	<i>Labeo rohita, Catla catla, Cirrhinus mrigala</i>	8-13h	4
Liu y col. 2000	<i>Danio rerio</i>	10-60m	0 y -5
Ahammad y col. 2003	<i>Cyprinus carpio</i>	12-72h	4 y -2
Ahammad y col. 2003	<i>Labeo rohita</i>	9-15h	4 y 0
Zhang y col. 2003	<i>Danio rerio</i>	10-60m	5 y 0
Valdez y col. 2005	<i>Oryzias latipes</i>	12h-10d	5 y 0
Kopeika y col. 2006	<i>Danio rerio</i>	10m	-20
Streit y col. 2007	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	6h	-8
Fornari y col. 2010	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0h	N2 liq
da Silva Lopes y col. 2011	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	6-10h	-8
Faria Paes y col. 2014	<i>Brycon orbignyanus</i>	6-168h	8 y 0
Pessoa y col. 2014	<i>Piaractus brachypomus</i>	6-10h	-10
da Silva Lopes y col. 2015	<i>Steindachneridion parahybae</i>	6-12h	-6,5
Costa y col. 2017	<i>Prochilodus lineatus</i>	12h	5 y 0
Tian y col. 2017	<i>Epinephelus moara</i>	10-60m	4 y -26
Faria Paes y col. 2018	<i>Danio rerio</i>	6-18h	0
Keivanloo y col. 2020	<i>Cyprinus carpio</i>	1-21d	-2
<b>Microinyección</b>			
Janik y col. 2000	<i>Danio rerio</i>	Sin enfriamiento	
Beirao y col. 2006	<i>Sparus aurata</i>	30m	-10
Robles y col. 2006	<i>Scophthalmus maximus</i>	Sin enfriamiento	
Robles y col. 2007	<i>Sparus aurata</i>	15-60m	0 y -10
Alam y col. 2018	<i>Sillago japonica</i>	20m	-10

En función de estos antecedentes, y en el marco del presente trabajo de Tesis, se planteó la siguiente hipótesis general y el correspondiente objetivo general.

### 1.3 Hipótesis general

Los embriones de peces pueden ser enfriados, empleando soluciones crioprotectoras, y dar lugar a larvas viables luego de cortos periodos de almacenamiento a bajas temperaturas.

### 1.4 Objetivo general

Desarrollar e implementar protocolos de enfriamiento para embriones de dos especies de peces de interés comercial y científico: el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) y el pez beta (*Betta splendens*).

## 2 Capítulo 1. Enfriamiento de embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)

### 2.1 Introducción

#### 2.1.1 El pejerrey bonaerense

El pejerrey bonaerense *Odontesthes bonaerensis* (Figura 2), es un pez teleósteo que pertenece al orden Atheriniformes, familia Atherinopsidae. El género *Odontesthes* comprende 20 especies que se distribuyen desde Perú hasta la Patagonia argentina, habitando aguas marinas costeras, zonas de estuarios, y cuerpos de agua dulce [30,31]. En particular, *O. bonaerensis* se distribuye actualmente en distintos cuerpos de agua dulce y salobre de la Argentina, tanto en sistemas lénticos, donde se destacan principalmente las lagunas de la llanura pampeana, como lóticos, donde se lo puede encontrar en los ríos Paraná, Uruguay y de la Plata [32–34]. Al igual que otros peces del mismo orden, su cuerpo es hidrodinámico y cuenta con la característica estola plateada en los flancos. Su cabeza es cónica y alargada, con boca pequeña y protractil, con dientes maxilares también pequeños y cónicos [32].



**Figura 2.** Pejerrey bonaerense *Odontesthes bonariensis*. Fotografía tomada y cedida por la Dra. Pamela del Fresno (Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura, INTECH).

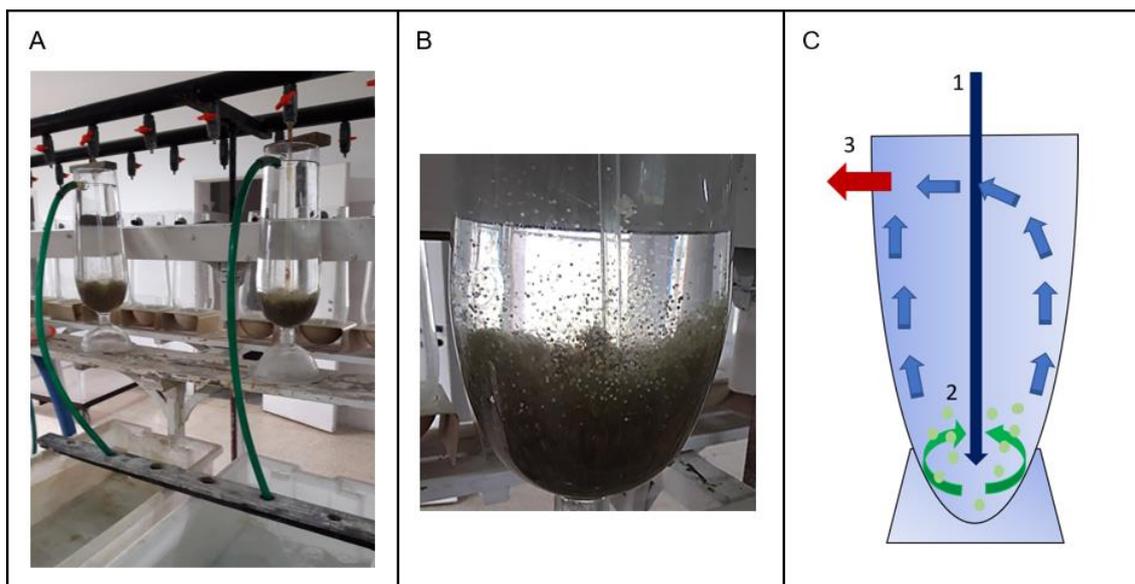
Cabe destacar que el pejerrey bonaerense es uno de los peces más promisorios en la piscicultura argentina debido al interés por su pesca deportiva y a la calidad de su carne [35]. Su acuicultura comenzó a desarrollarse a principios del siglo XX en la Estación Hidrobiológica de Chascomús, y posteriormente, hacia mediados de dicho siglo, en Brasil. Además, entre las décadas de 1940-1960, fue introducido en otros países latinoamericanos como Chile y Bolivia, y también fuera del continente como en Japón e Italia [36]. Posteriormente, y dado el interés por su acuicultura, se ha estudiado su fisiología reproductiva [37,38], el manejo de su reproducción en cautiverio [39,40] y el desarrollo de su cría intensiva [41,42].

### 2.1.2 Reproducción y desarrollo embrionario

El pejerrey es un desovador múltiple estacional, iteróparo, con hembras que maduran asincrónicamente [43,44]. La temporada de desove principal comienza hacia el final del invierno y se extiende durante toda la primavera, con un máximo en el número de puestas durante el mes de octubre. Además, dependiendo de las variables climáticas (temperatura y fotoperíodo), puede registrarse un desove menos importante en otoño [37,38,45–47].

En condiciones de cautiverio, es posible obtener puestas viables durante casi todo el año [48]. Los oocitos maduros suelen presentar una coloración amarilla verdosa [49]. Se ha registrado que los embriones tienen un diámetro de 1,6-1,7 mm a lo largo de toda la temporada reproductiva [43], donde inicialmente, la mayor parte del volumen está ocupado por el vitelo. El embrión presenta numerosas gotas lipídicas que a lo largo del desarrollo coalescen hasta formar una sola, que permanece en el saco vitelino luego de la eclosión. El embrión se encuentra rodeado por una zona radiata o corion transparente que presenta filamentos adherentes [49]. El embrión de pejerrey bonaerense, al igual que el de otros teleósteos, presenta un clivaje parcial o meroblástico (restringido al blastodisco) mientras que el vitelo permanece sin segmentarse [50]. El desarrollo embrionario se completa en 11 días a 19°C dando lugar a una larva nadadora de 6,5-7,6 mm de largo [49].

En cautiverio, la incubación de los embriones en grandes cantidades suele realizarse en incubadoras *McDonald* o jarras de eclosión. Estos recipientes son de vidrio o acrílico y se les instala un flujo continuo de agua para asegurar la correcta oxigenación. El ingreso del agua se produce por la parte superior a través de un tubo o manguera que llega hasta algunos centímetros por encima del fondo en U del recipiente, lo que genera la turbulencia y mantiene en constante movimiento a los embriones. El exceso de agua desborda por una abertura en la parte superior del envase y es por allí que se recolectan también las larvas recién eclosionadas (Figura 3).



**Figura 3.** Incubación de embriones de *O. bonariensis*. A: Fotografía de las incubadoras *McDonald* en la Estación Hidrobiológica de Chascomús. B: Detalle del fondo en U de la incubadora con los embriones suspendidos gracias al flujo de agua. C: Esquema de la circulación del agua dentro de la incubadora: 1, ingreso de agua nueva; 2, generación de turbulencias en el fondo; 3, rebalse del agua sobrante.

### 2.1.3 Situación actual del cultivo del pejerrey en Argentina

Se ha demostrado que es posible la producción masiva de larvas de pejerrey en sistemas de producción intensivos [41]. Sin embargo, dados los costos de producción y el tiempo requerido para el engorde de los animales hasta el tamaño comercial, el cultivo del pejerrey podría definirse como “semi-acuicultura”. Esta práctica hace referencia a la producción en cautiverio de larvas y juveniles (también llamados “semilla”) para su posterior siembra o liberación en ambientes naturales. Se realiza en el país desde 1904 y tiene como objetivo sostener las poblaciones de pejerrey de esos ambientes frente a las capturas con fines recreativos, deportivos y comerciales. Respecto a este último, vale la pena resaltar que en algunos ambientes está permitida su pesca artesanal y su comercialización en el mercado interno [51].

En la actualidad, hay estaciones de piscicultura en distintas provincias argentinas como Jujuy, San Juan, Córdoba y Buenos Aires, que producen larvas de pejerrey para su posterior siembra. En particular, en la provincia de Buenos Aires, se destacan las estaciones de piscicultura de Junín, que siembra en varias lagunas de ese partido, y la de Chascomús, que además de sembrar en la laguna homónima, entrega embriones, que son incubados y posteriormente sembrados por otras estaciones de piscicultura bonaerenses

como las de Necochea, Monte, Lobos, Olavarría, Guaminí y Balcarce, en sus respectivos partidos [52].

#### 2.1.4 Antecedentes de criopreservación y enfriamiento de gametas y embriones de pejerrey

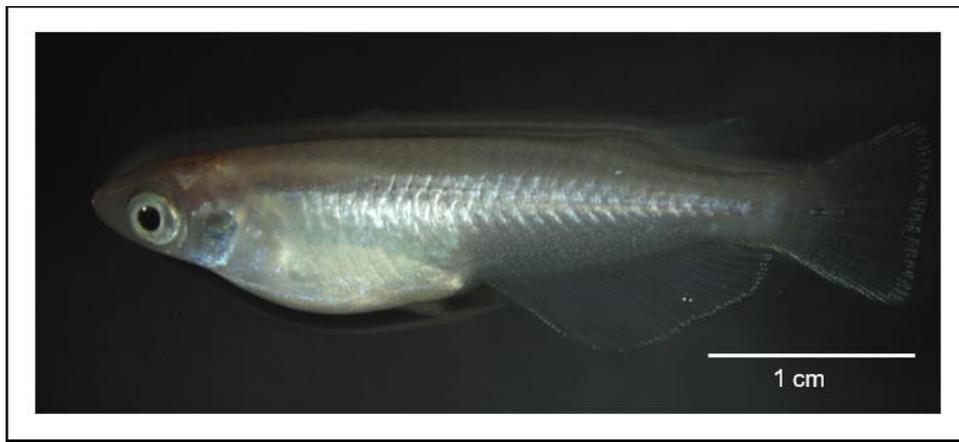
Con el objetivo de diseñar un protocolo de congelamiento de embriones, Suzuki y colaboradores (1995) publicaron los primeros ensayos de toxicidad y permeabilidad de un crioprotector (DMSO) en embriones de pejerrey [9]. Posteriormente, dada la dificultad de criopreservar embriones completos, y con el objetivo de conservar el genoma diploide, Strüssmann y colaboradores (1999) lograron congelar con éxito blastómeros aislados durante 90 minutos a -75 °C [53]. Luego, Routray y colaboradores (2002) retomaron las pruebas de toxicidad y permeabilidad del DMSO, y hallaron que su captación estaba favorecida si los embriones eran expuestos previamente a trehalosa [54].

Recientemente, en nuestro laboratorio, el Ictiofisiología y Acuicultura, como ya fue mencionado, se ha logrado la crioconservación de esperma en nitrógeno líquido [17], y se ha comenzado a desarrollar protocolos de enfriamiento de embriones a -14°C [55] y a -20°C [56] durante una hora. Teniendo en cuenta las características reproductivas del pejerrey, es conveniente implementar biotecnologías que optimicen el manejo de su reproducción en cautiverio. El enfriamiento de embriones permitiría suministrar embriones y larvas en cantidad, y de calidad, para suplir las necesidades de piscicultores y/o laboratorios durante las épocas en que no es posible reproducir la especie.

#### 2.1.5 El pez medaka, una especie modelo

El medaka, *Oryzias latipes* (Figura 4), es un pez teleósteo del orden Beloniformes perteneciente, al igual que el pejerrey, a la serie monofilética Atherinomorpha [30,57]. Es una especie de agua dulce, ovípara, de pequeño tamaño (~ 5 cm), originaria del este asiático, cuya distribución abarca Japón, Korea, Taiwán, y China [57,58]. Se lo comenzó a mantener en cautiverio y criarlo con fines ornamentales en el período Edo (Japón, siglo XVII). Sin

embargo, su impulso como especie modelo en biología llegó en 1921 con el trabajo pionero de T. Aida acerca de las bases genéticas de su coloración [57]. Desde entonces, se lo ha empleado no solo en estudios de genética sino también de embriología, fisiología, ecología, toxicología, farmacología, y criopreservación, entre otros [54,58,59]. En este sentido, desde el año 2002 se ha conformado en Japón el biobanco National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka; <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>) que provee peces de líneas estándar, líneas transgénicas, mutantes, y de las diferentes poblaciones silvestres de medaka [60].



**Figura 4.** Pez medaka, *Oryzias latipes*. Fotografía tomada y cedida por la Dra. Luisa Arias (Laboratorio de Biología del Desarrollo, INTECH).

## 2.2 Hipótesis

Los embriones de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) pueden ser enfriados, empleando soluciones crioprotectoras, y dar lugar a larvas viables luego de cortos periodos de almacenamiento a temperaturas subcero.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Desarrollar e implementar protocolos de enfriamiento para embriones de pejerrey bonaerense (*O. bonariensis*).

### 2.3.2 Objetivos específicos

Determinar:

- a) el estadio embrionario que mejor tolera el enfriamiento;
- b) la combinación de crioprotectores internos y externos más adecuada;

- c) la curva de enfriamiento más conveniente;
- d) el método de incorporación de los crioprotectores al embrión más adecuado: inmersión y/o microinyección;
- e) la viabilidad embrionaria y larval posenfriamiento.

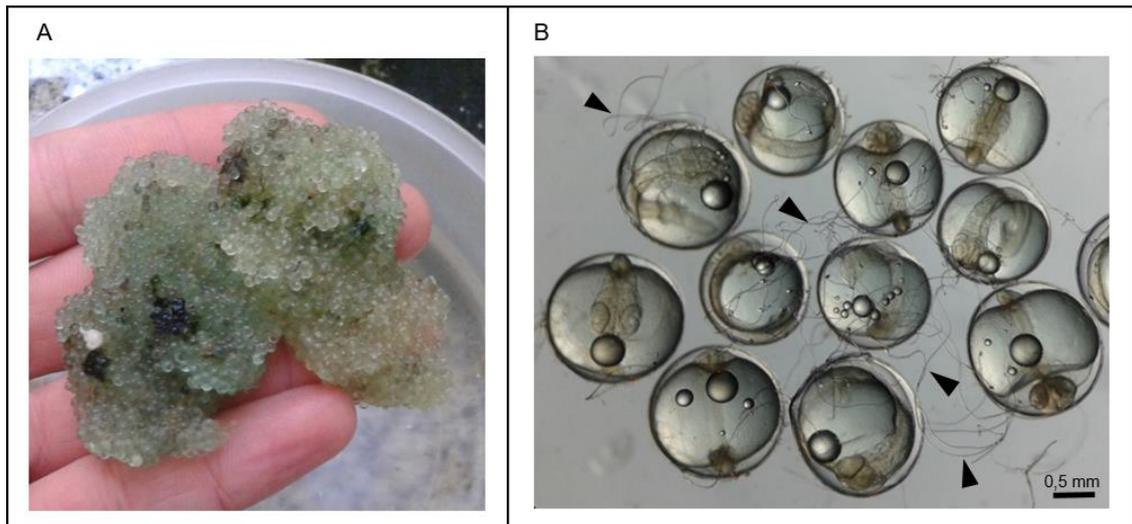
## 2.4 Materiales y métodos

### 2.4.1 Obtención de embriones

#### 2.4.1.1 *Pejerrey*

Se trabajó con embriones obtenidos de desoves naturales del plantel de reproductores de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) mantenidos en la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Chascomús, Buenos Aires, Argentina) durante el período de primavera y verano de los años 2016 al 2020. En la mencionada estación de piscicultura se mantienen individuos adultos de entre 2 y 6 años de edad, en estanques circulares de 80000 litros, con sistema abierto, aireación continua, salinidad de 15 g/l y fotoperíodo natural. A los peces se les ofrece alimento comercial extrusado en forma de pellets de 3 mm (proteínas 42,9%, lípidos 1,5%, carbohidratos 43,8%, *Shulet*, Argentina). La porción diaria de alimento ofrecida corresponde al 1% de la biomasa total del estanque, dividida en dos raciones a lo largo del día (8:00 y 16:00h).

Los grupos de embriones fueron recolectados de los rebalses y mangueras de aireación de los estanques, a los cuales permanecían adheridos a través de sus filamentos coriónicos (Figura 5, A). Los embriones fueron separados uno a uno manualmente y luego, bajo lupa estereoscópica, se les recortaron los filamentos adhesivos empleando pinzas y tijeras de microcirugía (Figura 5, B). Posteriormente, se evaluaron distintos soportes y medios para su incubación.

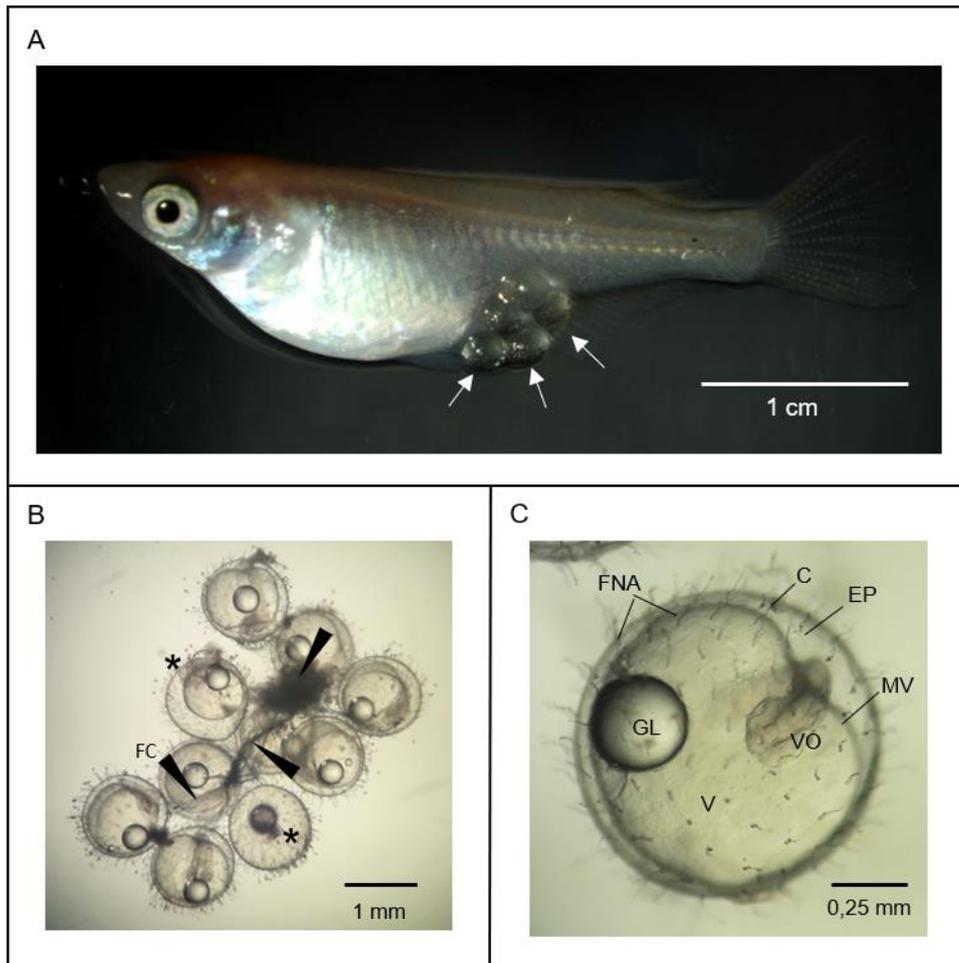


**Figura 5.** Embriones de *O. bonariensis*. (A) Grupo de embriones recién recolectados. (B) Fotomicrografía de grupo de embriones separados manualmente. Las puntas de flecha señalan los filamentos coriónicos.

#### 2.4.1.2 Medaka

Se trabajó con embriones obtenidos de desoves naturales del plantel de reproductores de medaka (*Oryzias latipes*) mantenido en el bioterio del INTECH. Para los ensayos se emplearon dos líneas diferentes: la MT835 (hi-medaka) y la TG955 (pIST6-clmc2::mCherry-myl2::GFP), cedidas por el Dr. Juan Ignacio Fernandino (Laboratorio de Biología del Desarrollo, INTECH). La primera, MT835, es una variedad cromática (anaranjada) obtenida en cautiverio, por una mutación espontánea, a partir de individuos salvajes de la población sur de Japón, en un criadero ubicado en la prefectura de Aichi del mencionado país (<https://shigen.nig.ac.jp/medaka/strainDetailAction.do?quickSearch=true&strainId=5682>). La segunda, TG955, es una línea transgénica que posee dos genes reporteros que codifican para dos proteínas fluorescentes bajo el control de dos promotores tejido-específicos. Brevemente, la expresión de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) se encuentra controlada por el promotor myl2 de músculo esquelético de medaka (*O. latipes*), mientras que la expresión de la proteína roja fluorescente (mCherry) se encuentra controlada por el promotor clmc2 de músculo cardíaco de pez cebra (*Danio rerio*). En ambos casos, los promotores myl2 y clmc2 provienen del gen de la cadena ligera de la miosina 2 [61].

Los peces adultos fueron colocados en acuarios de 2 litros conectados en un sistema de recirculación cerrado (también conocido como RAS, por sus siglas en inglés, *Recirculating Aquaculture System*). En cada acuario se dispusieron dos hembras y un macho, y se los alimentó de dos a tres veces por día con alimento comercial para peces tropicales *Tetramin* (Tetra, Alemania) y nauplios de *Artemia sp. ad libitum*. La temperatura fue de  $26 \pm 2$  °C y el fotoperíodo de 14 h L: 10 h O. Luego de un período de aclimatación de al menos 5 días bajo estas condiciones, siguiendo los lineamientos de Padilla y col. [62], a última hora de la tarde se separó al macho, dentro del mismo acuario, en un recipiente plástico transparente (para permitir el contacto visual con las hembras) y con perforaciones (para permitir el flujo de agua). A la mañana siguiente, luego del encendido de las luces, se volvió a liberar al macho y se esperó a que ocurriera el cortejo y posterior desove. A continuación, una vez finalizada la puesta, se retiró a las hembras del acuario con una red, y con la ayuda de una pipeta Pasteur y una pinza de punta fina se recolectó el grupo de huevos que permanecían unidos entre sí y a la aleta anal de la hembra (Figura 6, A) a través de sus filamentos coriónicos (Figura 6, B). Luego, bajo lupa estereoscópica, al igual que se mencionó previamente para pejerrey, se los separó empleando pinzas y tijeras de microcirugía para despojarlos de sus filamentos coriónicos adherentes (Figura 6, C). Aquellos huevos fecundados y con embriones de aspecto normal fueron incubados en placas de Petri de 70 mm con medio para embriones (NaCl 17 mM, KCl 0,4 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,27 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,66 mM; pH 7 [57]), sin agitación, a 26 °C en una incubadora programable (*Ingelab*, Almirante Brown, Buenos Aires, Argentina).



**Figura 6.** Recolección y separación de embriones de *O. latipes*. (A) Hembra con grupo de embriones\* adheridos a su aleta anal (señalados con flechas blancas). (B) Fotomicrografía de grupo de embriones retirados un día después de la puesta. Las puntas de flecha negra señalan los filamentos coriónicos (FC) adherentes que los mantienen unidos entre sí. Los asteriscos indican embriones no viables. (C) Fotomicrografía representativa de un embrión con vesículas ópticas (VO) sin pigmento, al que se le quitaron sus FC pero conserva sus filamentos no adherentes (FNA). C: corion, EP: espacio perivitelino, MV: membrana vitelina, V: vitelo, GL: gota lipídica. \*La fotografía del panel A fue tomada y cedida por la Dra. Luisa Padilla (Laboratorio de Biología del Desarrollo, INTECH).

#### 2.4.2 Ensayos de incubación de embriones de pejerrey

Posteriormente a la separación de los embriones de pejerrey se evaluaron distintos soportes y medios para su incubación.

##### 2.4.2.1 Ensayo de incubación N°1

Inicialmente, se replicó la metodología que había sido utilizada previamente en la Tesis de Grado de la Lic. Ingrid Asselborn Grinberg [56]. Para ello, se tomaron, por triplicado, grupos de 10 embriones que poseían vesículas ópticas sin pigmento y se los colocó dentro de canastillas de malla plástica de fondo rígido constituido por una placa de Petri de 55 mm de diámetro, dentro de bandejas plásticas (Figura 7), con agua destilada con el

agregado de NaCl a razón de 5 g/l (solución de incubación 1) , y dos concentraciones de solución comercial de azul de metileno (Bonacqua, CABA, Argentina) como antifúngico: 1 gota/l [56] y 5 gotas/l (recomendación del fabricante). Además, se trabajó con un tercer grupo sin agregado de azul de metileno. En los tres tratamientos, se adicionó aireación continua a las bandejas, se les realizaron cambios de agua día por medio, y se las ubicó en un cuarto aclimatado a 18-20 °C. Se evaluó la supervivencia y el desarrollo de los embriones a las 24-, 96-, y 192-horas-post-incubación (hpi), y la obtención de larvas viables (aquellas con comportamiento y apariencia normal [63]).



**Figura 7.** Método de incubación de embriones de *O. bonariensis* empleando canastillas de malla plástica y fondo rígido.

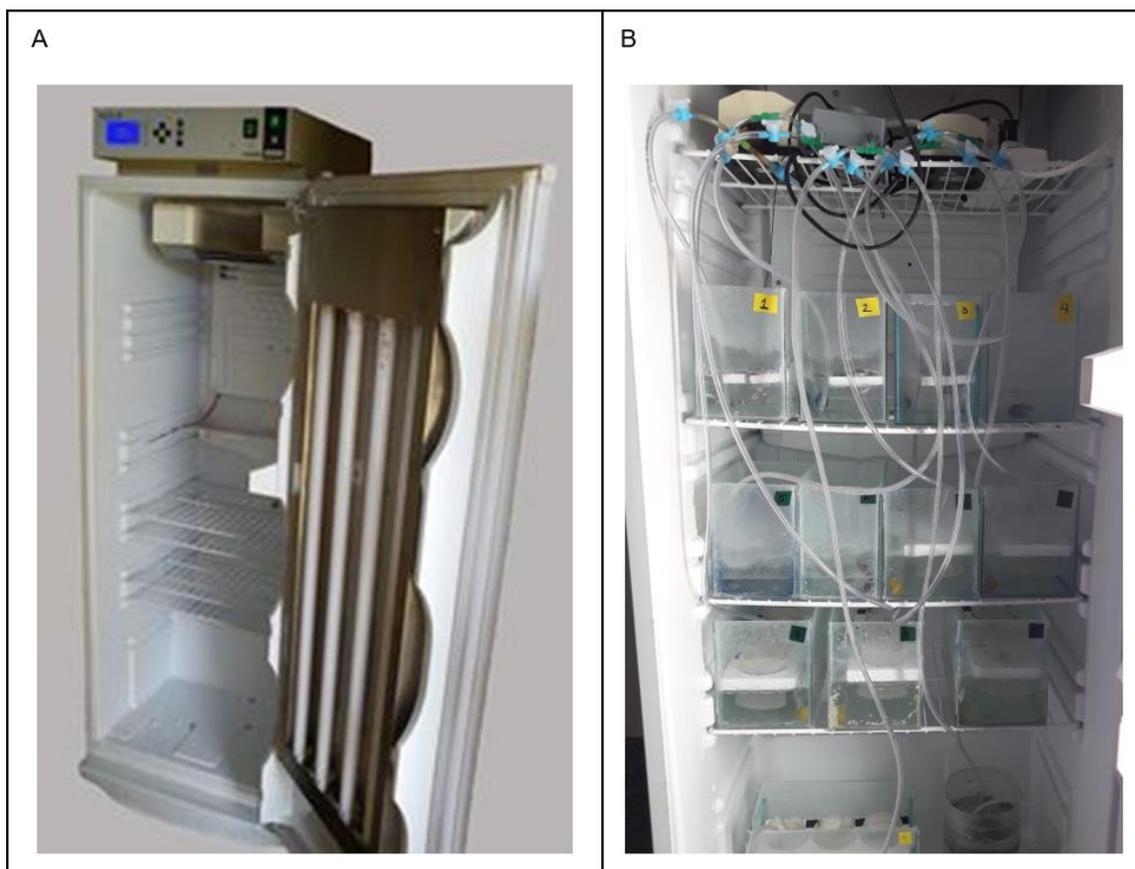
#### 2.4.2.2 Ensayo de incubación N°2

En segundo lugar, dado que el método anterior presentó desventajas como el estancamiento de los embriones en el fondo de las canastillas, se estudió la posibilidad de emplear otros soportes que aseguraran la correcta oxigenación de los mismos. Para ello se usaron canastillas de malla metálica de acero inoxidable, con fondo en U, sujetas a un flotador de telgopor que les permitiera estar suspendidas dentro de acuarios de vidrio (Figura 8, A), semejantes a aquellas que se comercializan para embriones de medaka (Figura 8, B); y pequeñas botellas plásticas invertidas (Figura 8, C) asemejando a las incubadoras recomendadas para algunos peces ornamentales (Figura 8,

D). En ambos casos, se les adicionó aireación continua empleando aireadores conectados a través de mangueras de 6 mm de diámetro externo y 4 mm de diámetro interno a piedras difusoras y se reguló el caudal de aire empleando pequeñas canillas para este fin. El agua se renovó diariamente, y los acuarios con las canastillas y las botellas plásticas fueron colocados dentro de una incubadora programable (*Ingelab*, Almirante Brown, Buenos Aires, Argentina) a temperatura de 20 °C y fotoperíodo de 12 h L: 12 h O (Figura 9).



**Figura 8.** Soportes evaluados para la incubación de embriones de *O. bonariensis*. (A) Canastillas metálicas asemejando a (B) Incubadoras comerciales para embriones de *O. latipes*. (C) Pequeñas botellas plásticas invertidas similares a las (D) incubadoras que se recomiendan para los embriones de algunas especies ornamentales. Las fotografías de B y D fueron tomadas y modificadas del sitio web de *Ebay* (<https://www.ebay.com/itm/373518450891>; <https://www.ebay.com/itm/353649501548>; <https://www.ebay.com/itm/222431732719> ).



**Figura 9.** (A) Incubadora programable *Ingelab* con (B) acuarios y sistema de aireación para embriones de *O. bonariensis*. La fotografía de A fue tomada y modificada del sitio web del fabricante (<http://www.ingelab.com.ar/>).

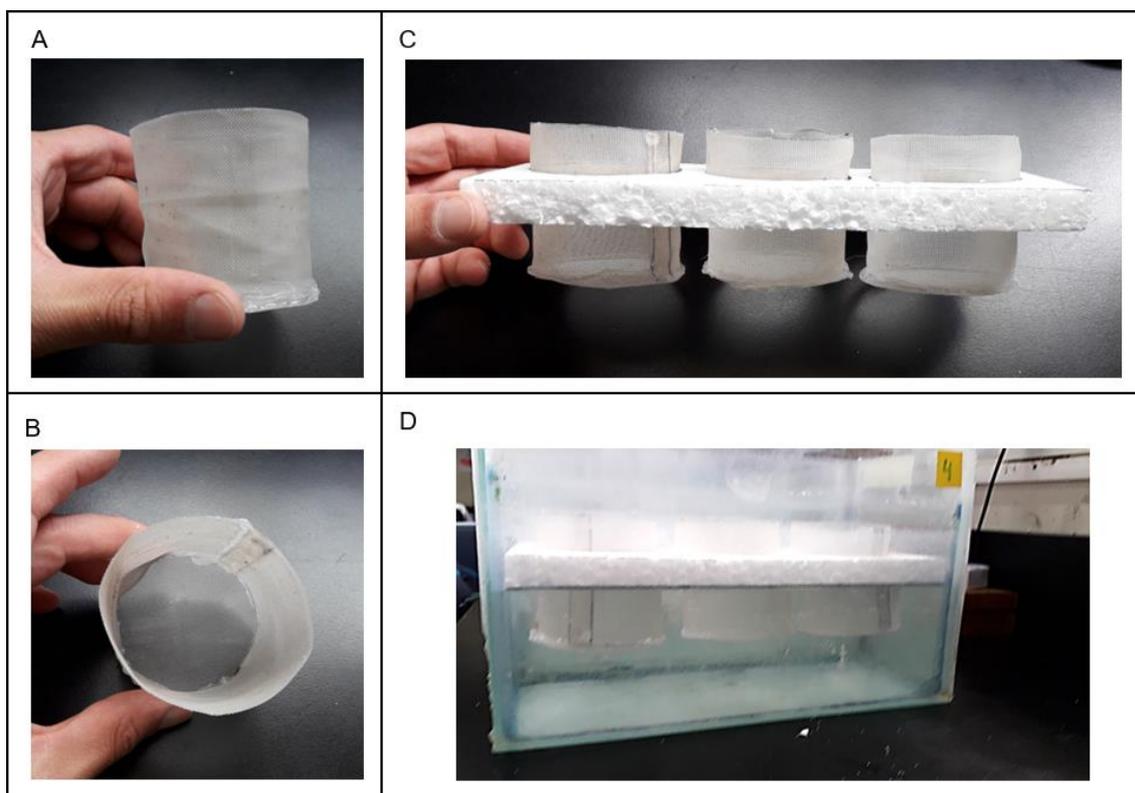
Además, con el objetivo de determinar si la detención en el desarrollo observado previamente fue consecuencia de una falta de sales esenciales en el medio de cultivo, se empleó también agua corriente dechlorada con el agregado de NaCl 5g/l (solución de incubación 2). En el agua destilada y en el agua corriente del INTECH se registraron el pH, y la concentración de los siguientes elementos: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, y Mg<sup>2+</sup>. Estos análisis fueron proporcionados por el Dr. Franco Cabrerizo (Laboratorio de Fotoquímica y Fotobiología Molecular, INTECH) y el Dr. Fernando Unrein (Laboratorio de Ecología Acuática, INTECH). Los datos obtenidos fueron contrastados con los valores teóricos para estos mismos elementos en el medio de incubación recomendado para embriones de medaka [57].

Por último, este ensayo fue realizado con grupos de 10 embriones para cada tratamiento, por duplicado, en el mismo estadio mencionado en 2.4.2.1. Se evaluó una vez más la supervivencia embrionaria a las 24-, 96-, y 168-hpi,

el desarrollo de los embriones, y su eclosión y la viabilidad de las larvas obtenidas a las 192-hpi.

#### 2.4.2.3 Ensayo de incubación N°3

Teniendo en cuenta que se ha reportado que el corion sufre alteraciones luego del proceso de enfriamiento [64], se decidió evaluar si las canastillas metálicas causaban algún efecto sobre los embriones cuando éstos eran incubados en ellas luego de haber sido enfriados. Para ello, se emplearon las mismas canastillas metálicas mencionadas en 2.4.2.2, y se confeccionaron además canastillas cilíndricas de malla plástica (Figura 10, A, B). Del mismo modo que en el ensayo anterior, se las sujetó a un flotador de telgopor (Figura 10, C) que les permitiera quedar suspendidas dentro de los acuarios de vidrio (Figura 10, D) que fueron colocados dentro de la incubadora programable antes mencionada. En todos los casos, se empleó la solución de incubación 2, se realizaron cambios de agua diariamente, y se les suministró aireación de forma continua.



**Figura 10.** Canastillas de malla plástica para la incubación de embriones de *O. bonariensis* vistas de costado (A), desde arriba (B), sujetas al flotador de telgopor (C) y colocadas dentro del acuario (D).

Se emplearon grupos de 10 embriones en el mismo estadio que en los ensayos anteriores, que fueron enfriados de forma rápida hasta -14 °C empleando la solución crioprotectora 1 (S1) como se detalla más adelante en 2.4.5. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y como control se emplearon grupos de embriones sin tratar. Se evaluó la supervivencia embrionaria, la eclosión y la morfología larval.

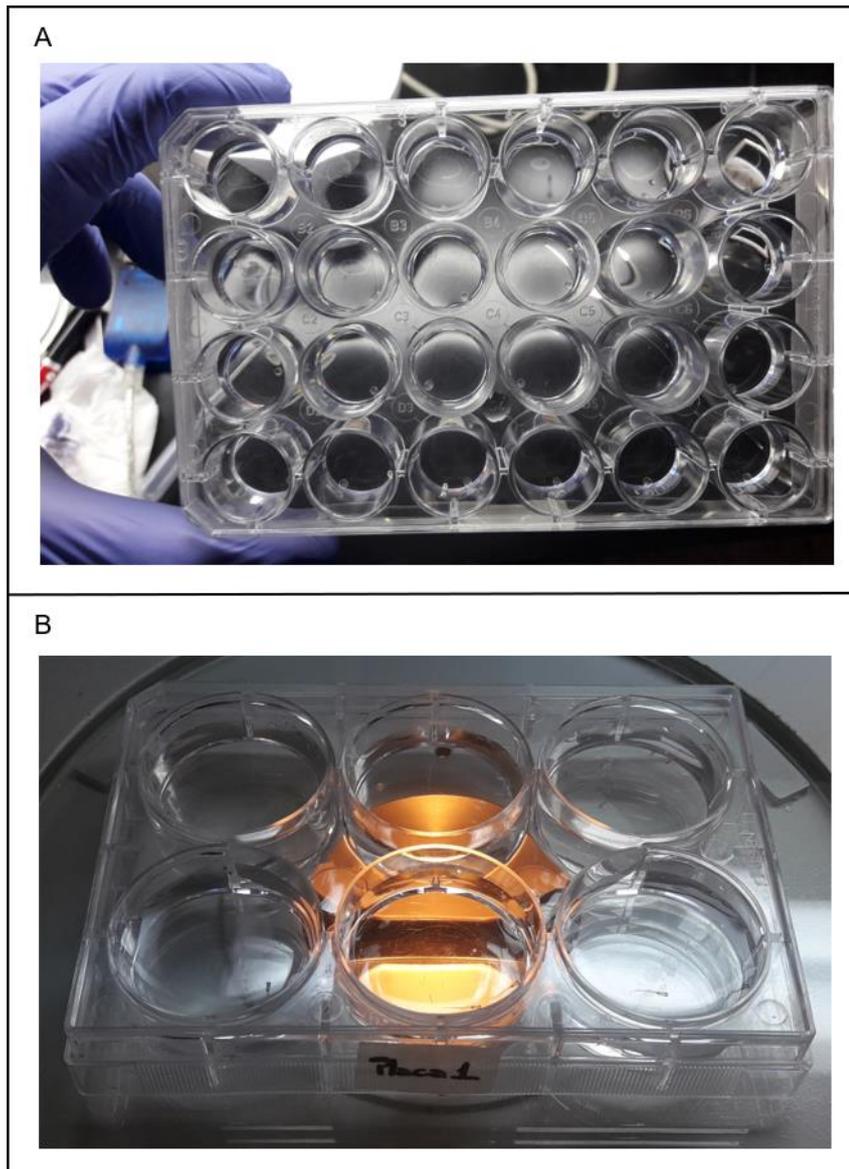
#### 2.4.2.4 Otros soportes de incubación

Considerando que se ha informado la incubación de forma individual de embriones de especies marinas en placas de 96-pocillos [65,66], con muy buenos resultados, y empleando temperaturas y tiempos de incubación semejantes a los requeridos para embriones de pejerrey (Tabla 2), se empleó esta metodología en aquellos ensayos en los que fue necesario seguir el desarrollo embrionario y larval en forma individualizada.

**Tabla 2.** Selección de trabajos donde se menciona la incubación de embriones de peces de especies marinas en placas de 96-pocillos en condiciones semejantes a las requeridas para *O. bonariensis*.

Trabajos	Especies	Temperatura de incubación	Tiempo para la eclosión	Eclosión	Duración del ensayo
Panini y col., 2001	<i>Diplodus sargus</i>	15-19 °C	48-72 h	83%	5 días
	<i>Sparus aurata</i>			99%	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>			95%	8 días
Mylonas y col., 2015	<i>Argyrosomus regius</i>	18,5-19,5 °C	44-56 h	60-100 %	5 días

Para el caso de embriones se utilizaron placas de cultivo de 24-pocillos (un embrión por pocillo, Figura 11, A), y para el caso de larvas, de 6-pocillos (grupos de cinco larvas por pocillo, Figura 11, B). En ambos casos se empleó la solución de incubación 2, que fue renovada diariamente. Las placas se mantuvieron sin agitación dentro de la incubadora programable antes mencionada.



**Figura 11.** Placas de cultivo de 24- (A) y 6-pocillos (B) empleadas para la incubación de embriones y mantenimiento de larvas de *O. bonariensis*, respectivamente.

#### 2.4.3 Evaluación del desarrollo, supervivencia embrionaria y eclosión

En ambas especies, los embriones fueron observados y fotografiados diariamente empleando una cámara *AxioCam 512 Color* y el software *Zen 2.3 BlueEdition* asociados a una lupa estereoscópica *Discovery.V20 Stereo* (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para ello, los embriones fueron posicionados en una matriz de agarosa 2% p/v con pocillos de 1 o 2 mm de diámetro y rotados empleando pinzas de punta fina. Las fotografías de los embriones tratados fueron comparadas con las del grupo control de cada ensayo, y con aquellas disponibles en la bibliografía consultada [49,59,67,68]. En cada revisión, en caso de hallarse embriones muertos, éstos fueron retirados a fin de evitar el

deterioro de la calidad de agua y la proliferación de microorganismos durante la incubación. La supervivencia embrionaria y la eclosión fueron calculadas de acuerdo a la Ecuación 1 y la Ecuación 2, respectivamente.

$$\% \text{ supervivencia embrionaria} = \frac{\text{n}^\circ \text{ embriones vivos}}{\text{n}^\circ \text{ embriones iniciales}} \cdot 100$$

**Ecuación 1.** Cálculo del porcentaje de supervivencia embrionaria a un tiempo dado.

$$\% \text{ eclosión} = \frac{\text{n}^\circ \text{ larvas obtenidas}}{\text{n}^\circ \text{ embriones iniciales}} \cdot 100$$

**Ecuación 2.** Cálculo del porcentaje de eclosión a un tiempo dado.

#### 2.4.4 Evaluación de las larvas obtenidas

##### 2.4.4.1 Punto de no retorno

A fin de evaluar, de forma indirecta, el estatus metabólico y las reservas energéticas de las larvas obtenidas, se empleó el concepto de “Punto de No Retorno” (PNR) [69]. Este se define como aquel punto umbral, durante un período de inanición, en el cual la supervivencia larval ha descendido al 50% y las larvas que aún continúan vivas son demasiado débiles para alimentarse, aún si se les ofrece alimento. Para ello, desde el momento de la eclosión, las larvas fueron colocadas individualmente en una placa *multiwell* de 24 pocillos y se registró su supervivencia cada 24 h bajo lupa estereoscópica. La supervivencia larval se calculó de acuerdo a la Ecuación 3.

$$\% \text{ supervivencia larval} = \frac{\text{n}^\circ \text{ larvas vivas}}{\text{n}^\circ \text{ larvas eclosionadas}} \cdot 100$$

**Ecuación 3.** Cálculo del porcentaje de supervivencia larval a un tiempo dado.

##### 2.4.4.2 Morfología

A fin de establecer cuál de los protocolos de enfriamiento ensayados resultó ser el más conveniente, se estudió la morfología de las larvas obtenidas. Para ello, todas las larvas fueron fotografiadas empleando el equipo mencionado en 2.4.3 y clasificadas de acuerdo a su fenotipo como se menciona a continuación en 2.4.4.2.1

##### 2.4.4.2.1 Clasificación de fenotipos

A los fines de esta Tesis, en base a los fenotipos observados, y tomando como referencia otros trabajos donde se han clasificado y descrito anomalías externas de larvas de peces [27,70–72], se establecieron 4

categorías: (1) malformación moderada (larvas con cola enrollada o curvada); (2) malformación severa (larvas con cola enrollada y malformación craneofacial y edema cardíaco); (3) fenotipo aberrante (larvas sin cola y con malformación craneofacial); y (4) fenotipo normal (larvas sin malformaciones externas aparentes).

#### 2.4.4.2.2 Tinción con *Alcian Blue*

Con el objetivo de describir las anomalías observadas en las larvas provenientes de embriones sometidos a enfriamiento, éstas fueron fijadas en paraformaldehído 4% v/v a 4 °C durante toda la noche y luego fueron despigmentadas empleando una solución de agua oxigenada e hidróxido de potasio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v, KOH 0,5% p/v) durante 45 minutos. A continuación, fueron coloreadas con *Alcian Blue*, que tiñe las estructuras cartilaginosas de color azul, siguiendo los lineamientos de Solomon y col. [73]. Por último, las larvas fueron fotografiadas empleando el equipamiento mencionado en 2.4.3 y se midió la longitud total de la notocorda y ocho parámetros craneofaciales: área del Meckel (área del triángulo definido por el cartílago de Meckel); largo de los cartílagos de Meckel, ceratohial, y palatoc cuadrado + hiosimplectico; distancias ceratohial (distancia entre la unión de los cartílagos ceratohiales y las aletas pectorales) y craneal (distancia entre la parte anterior del cartílago de Meckel y las aletas pectorales); y los ángulos de los cartílagos de Meckel y ceratohiales, según lo descrito previamente por Porcel de Peralta y col. [74]. Las mediciones fueron realizadas empleando el *software ImageJ* (*National Institutes of Health*, Maryland, USA), al que se le adicionaron los *plug-in* “*zebrafish measure*” y “*zebrafish points*”. Estas herramientas fueron desarrolladas y cedidas por el equipo de la Dra. Nora Calcaterra (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario -IBR-, Rosario, Santa Fe, Argentina). Dado que las mismas fueron concebidas originalmente para la medición de parámetros craneofaciales de larvas de pez cebra (*D. rerio*), a los fines de esta Tesis, fueron ajustadas para su uso en larvas de pejerrey *O. bonariensis*. Los parámetros evaluados fueron analizados estadísticamente a través de una prueba t de *Student* empleando el *software GraphPad Prism* ( $p < 0,05$ ).

Para el caso de las larvas de medaka, especie en la cual la osificación vertebral ocurre más temprano que en pejerrey, la tinción con *Alcian Blue* permitió identificar los discos intervertebrales. Entonces, a partir de las

fotomicrografías tomadas, se contó el número de vertebras y se comparó entre el grupo tratado y el control y la información presente en la bibliografía consultada.

#### 2.4.4.2.3 Tinción con *Oil-Red-O*

Con el objetivo de estudiar la falta de natación y el menor PNR en las larvas provenientes de embriones enfriados, éstas fueron fijadas y despigmentadas del mismo modo que se describió en 2.4.4.2.2, y posteriormente coloreadas con *Oil-Red-O* (ORO) siguiendo los lineamientos de Bhandari y col. [75]. Este colorante tiñe de color rojo los lípidos neutros como aquellos presentes en las paredes de la vejiga natatoria y en el contenido de la gota lipídica que permanece en las larvas de pejerrey luego de la eclosión. Finalmente, las larvas fueron fotografiadas con el equipo ya mencionado en 2.4.3, y se midieron las áreas delimitadas por la vejiga natatoria y por la gota lipídica empleando el *software ImageJ* (*National Institutes of Health, Maryland, USA*). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de *Student* empleando el *software GraphPad Prism* ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.5 Ensayos de enfriamiento

##### 2.4.5.1 Soluciones crioprotectoras

Las soluciones crioprotectoras (SCs) se prepararon empleando metanol, sacarosa, NaCl (*Biopack, Argentina*), y DMSO (*Sigma-Aldrich, Francia*). En base a observaciones previas realizadas en el laboratorio, se decidió inicialmente emplear dos soluciones: la solución 1 (S1) compuesta por metanol 2,5M (10% v/v), DMSO 1,4M (10% v/v), Sacarosa 0,3M (10% p/v), y NaCl 0,08M (5 g/l), y la solución 2 (S2), con la misma composición que la S1, pero sin DMSO.

##### 2.4.5.1.1 Osmolaridad

A fin de poder predecir el descenso crioscópico de las soluciones crioprotectoras recién mencionadas y evaluar cómo aportan al mismo sus distintos componentes, se midió la osmolaridad de soluciones de 5, 10, y 20% p/v de sacarosa; 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, y 20% v/v de metanol y DMSO; y de la solución salina NaCl 5 g/l, respectivamente. También se realizaron diluciones seriadas a la mitad de la S1 y la S2, desde  $2^{-1}$  hasta  $2^{-4}$ . Todas las mediciones se llevaron a cabo con el osmómetro crioscópico automático *Osmomat 030*

(Gonotec, Alemania) de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina) en colaboración con la Dra. Cristina del Valle (Departamento de Biología, UNMdP). Con estos datos se construyeron curvas de osmolaridad en función de la concentración, y se evaluó el ajuste de los puntos a una regresión lineal. A partir de las funciones obtenidas se extrapolaron el valor de osmolaridad que deberían poseer la S1 y S2. Para ello, en el caso de las curvas de los componentes por separado, se tuvo en cuenta que la osmolaridad es aditiva y que su valor teórico puede calcularse de acuerdo a la Ecuación 4, donde  $i$  corresponde al número de disociación de la sustancia en agua (por ejemplo, para NaCl,  $i = 2$ ) y  $M$ , a la molaridad de la solución en estudio (moles de soluto / litro) [76].

$$\text{Osmolaridad} = i \cdot M$$

**Ecuación 4.** Cálculo de la osmolaridad

Finalmente, se calculó el descenso crioscópico empleando la Ecuación 5 presentada en la Farmacopea Argentina [77].

$$\text{Descenso crioscópico } (^{\circ}\text{C}) = - \frac{\text{osmolaridad}}{1000 \frac{\text{mOsmol}}{\text{kg}}} \cdot 1,858 ^{\circ}\text{C}$$

**Ecuación 5.** Cálculo del descenso crioscópico de la solución crioprotectora a partir de la medición de su osmolaridad.

#### 2.4.5.2 Equipamiento para el descenso controlado de temperatura y almacenamiento

Con los objetivos de controlar el descenso de temperatura y evaluar distintas curvas de enfriamiento y temperaturas de almacenamiento, se empleó el equipo *Freeze Control* (*CryoLogic*, Melbourne, Victoria, Australia). El mismo estuvo constituido por cuatro componentes principales: el software *CryogenesisV5*, el controlador de temperatura CL-8800, una cámara criogénica *CryoChamber*, y un recipiente *CryoBath* para contener al nitrógeno líquido N<sub>2</sub> (l) (Figura 12). Desde una computadora se establecieron las condiciones a evaluar en cada ensayo de enfriamiento empleando el software recién mencionado. A la computadora, mediante un adaptador, se conectó el controlador de temperatura que a su vez estuvo conectado a la *CryoChamber*. En el interior de esta cámara, se colocaron dos *racks* de aluminio, adaptados para estos ensayos, con tres crioviales cada uno de 1,5 ml (6 tubos en total). A

su vez la *CryoChamber* fue sumergida en el *CryoBath* que contenía el  $N_2$  (l). Esta cámara posee la capacidad de calentarse o no, a fin de disminuir, incrementar o mantener la temperatura de su interior acorde a lo establecida en el programa *CryoGenesisV5*, independientemente de la temperatura del  $N_2$  (l) en la que se encuentra inmersa.

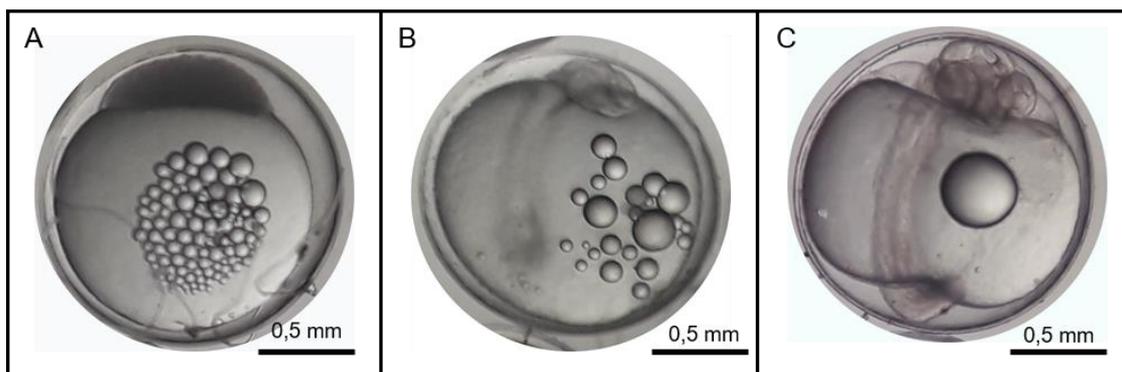


**Figura 12.** Equipo de congelamiento automático *Cryologic*. (A) *Software CryoGenesisV5*, (B) *CryoBath*, (C) *CryoChamber*, y (D) Controlador de temperatura. Imágenes tomadas y modificados de <https://www.cryologic.com/freeze.htm>.

#### 2.4.5.3 Elección del estadio embrionario

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de los diferentes estadios embrionarios de pejerrey, se recolectaron embriones recién fecundados como se mencionó en 2.4.1.1 y se los incubó en un recipiente plástico de 1 litro con fondo en U, con agua corriente dechlorada, con el agregado de NaCl 5 g/l, autoclavada, y con aireación continua dentro de la incubadora programable mencionada previamente (20 °C, 12h L: 12h O). Para llevar a cabo este

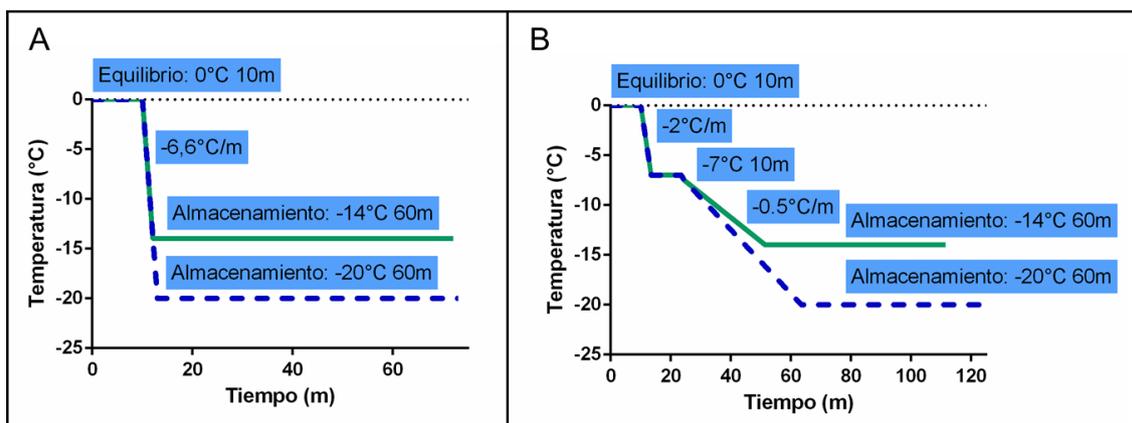
ensayo, se seleccionaron grupos de embriones que presentaran normal desarrollo, fueran traslúcidos, sin zonas opacas en el vitelo, en el corion, ni en el propio embrión. Se tomaron grupos de embriones a las 8-, 48-, y 96-hora-post-fecundación (hpf), respectivamente (Figura 13). Los embriones fueron expuestos a 1 ml de solución crioprotectora S1 (2.4.5.1) en crioviales y mantenidos a 0 °C durante 10 minutos (temperatura de equilibrio), y luego enfriados lentamente (de 0 a -7 °C a razón de -2 °C/m; plateau de 10 m a -7 °C; y de -7 a -20 °C a razón de -0,5 °C/m) empleando el equipamiento para el descenso controlado de temperatura mencionado previamente en 2.4.5.2 . A continuación, los crioviales fueron almacenados a -20 °C durante 1 hora, y luego, fueron sumergidos en un baño de agua termostatzado (Vicking, CABA, Argentina) a 37 °C durante 90 segundos. Finalmente, a los embriones se les realizaron tres lavados con 5 ml cada uno con agua de incubación y fueron incubados individualmente en una placa de cultivo de 24 pocillos. En cada pocillo se agregó 1 ml de agua de incubación y la placa fue colocada dentro de la incubadora programable con las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo ya mencionadas. Además, se emplearon dos grupos control: el primero con embriones que solo fueron expuestos a la S1 a 0 °C durante 10 minutos; y el segundo, con embriones que no recibieron ningún tratamiento. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, con 10-12 embriones por grupo. El desarrollo embrionario fue evaluado como se mencionó en 2.4.3 y, además, se registraron la tasa de supervivencia posenfriamiento y el porcentaje de eclosión. En ambos casos, los datos fueron evaluados mediante un ANOVA de una vía, y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, empleando el software *GraphPad Prism* ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Estadios embrionarios de 8- (A), 48- (B), y 96- (C) hpf, incubados a 20°C.

#### 2.4.5.4 Enfriamiento a -14 y -20 °C

En base a los resultados obtenidos en 2.4.5.3, para los ensayos de enfriamiento se emplearon embriones del estadio 96-hpf (20°C, embriones con vesículas ópticas sin pigmento). Se evaluaron dos soluciones crioprotectoras (S1 y S2), dos curvas de enfriamiento (una lenta y otra rápida), y dos temperaturas de almacenamiento (-14 y -20°C, Figura 14, Tabla 3). Para cada tratamiento, se emplearon grupos de 10-12 embriones por triplicado. En todos los casos el proceso de enfriamiento se llevó a cabo del mismo modo ya explicado en 2.4.5.3, y los embriones se incubaron en canastillas de malla plástica como se mencionó en 2.4.2.3. Se registró la supervivencia embrionaria diariamente, el porcentaje de eclosión, la morfología y la supervivencia larval.

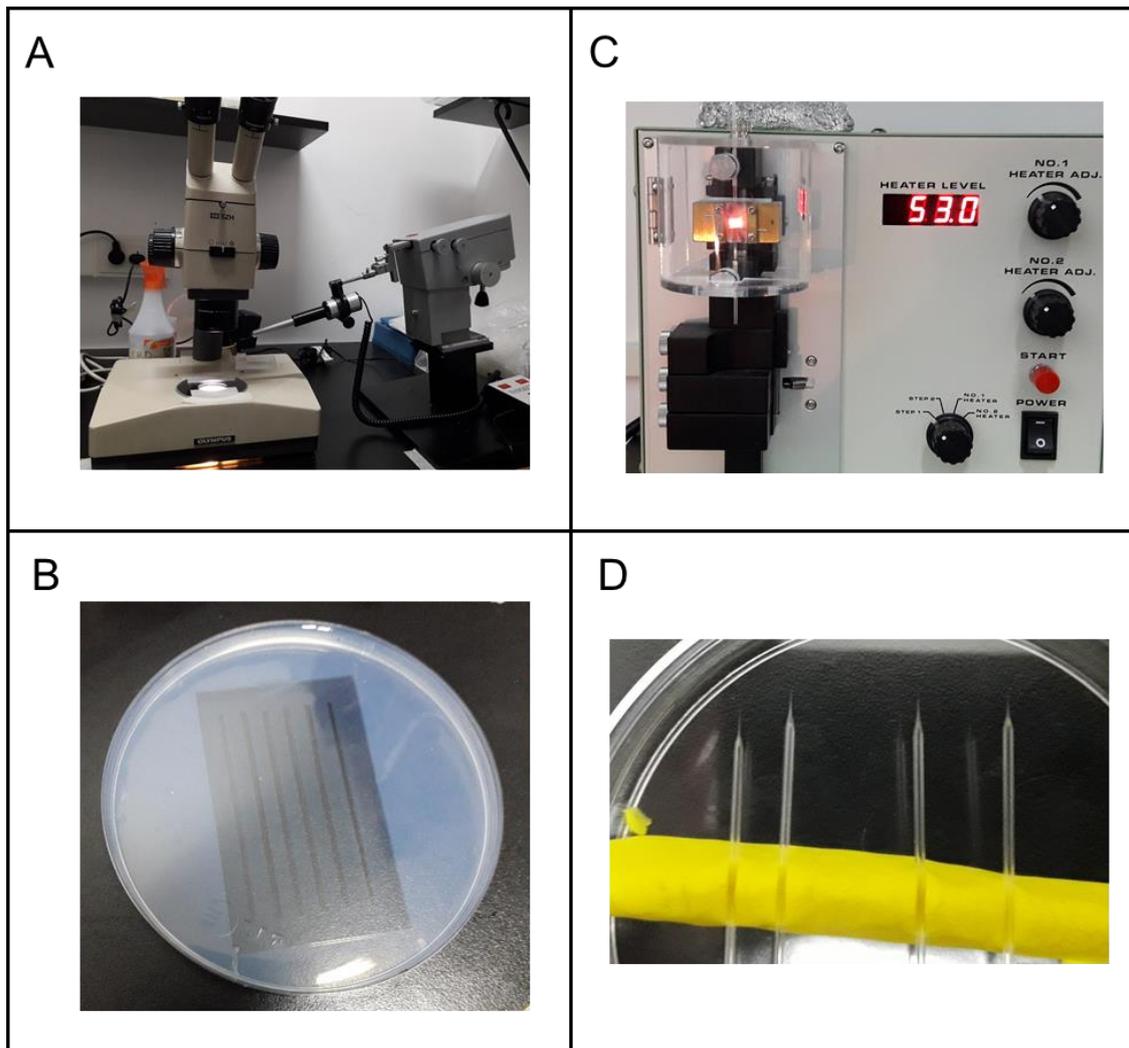


**Figura 14.** Curvas de enfriamiento (A) rápidas y (B) lentas hasta -14 y -20°C.

#### 2.4.5.5 Microinyección

Con el objetivo de garantizar el ingreso de las soluciones crioprotectoras al interior de los embriones, se empleó la técnica de microinyección. Para ello, los embriones fueron posicionados en canales de una matriz de agarosa 2%

p/v, y bajo lupa estereoscópica, se los inyectó empleando un microinyector *Nanoject II* (*Drummond*, USA). Las agujas se confeccionaron empleando capilares de vidrio de 1,1 mm de diámetro externo y 0,5 mm de diámetro interno (*Drummond*, USA). Los capilares fueron estirados en un solo paso a 53 °C con el equipo *PC-10 Puller* (*Narishige*, Japón). Los equipos y materiales antes mencionados se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Equipos y materiales empleados para realizar la microinyección. (A) Microinyector Nanoject II acomplado a lupa estereoscópica. (B) Matriz de agarosa con canales. (C) Equipo para estirar capilares PC-10 Puller. (D) Agujas para microinyección.

#### 2.4.5.5.1 Microinyección en distintos estadios embrionarios

Con el fin de evaluar si la técnica de microinyección y la toxicidad de la solución crioprotectora podrían afectar el normal desarrollo de los embriones, se realizó un ensayo piloto con distintos estadios embrionarios de pejerrey. Para ello, del mismo modo que fue mencionado en 2.4.5.3, se tomaron dos

grupos de 10-12 embriones cada uno de 8-, 48-, y 96-hpf, respectivamente. Al primer grupo de cada estadio se lo microinyectó de la forma que fue descrita en 2.4.5.5 con 32  $\mu$ l de solución crioprotectora S1 en el espacio perivitelino. Para evidenciar la microinyección, se utilizó *Phenol Red* 0,5% KCl 100 mM a razón de 1  $\mu$ l de este colorante por cada 10  $\mu$ l de solución crioprotectora. Al segundo grupo de embriones se lo empleó como control sin tratamiento. Este ensayo fue realizado por triplicado y los embriones fueron incubados como se mencionó previamente, y se registró su supervivencia a 1-, 24- y 72-horas-posmicroinyección, la eclosión, y las malformaciones larvales.

#### 2.4.5.6 *Enfriamiento a -20 °C con microinyección*

##### 2.4.5.6.1 *Enfriamiento de embriones de 8-, 48- y 96-hpf microinyectados*

En forma paralela al ensayo mencionado en 2.4.5.5.1, se evaluó si la microinyección permitía mejorar los resultados obtenidos previamente en 2.4.5.3. Para ello, se tomaron nuevos grupos de 10-12 embriones cada uno de los estadios 8-, 48-, y 96-hpf. Estos embriones fueron microinyectados con S1 en el espacio perivitelino e inmersos en esta misma solución para ser luego enfriados hasta -20 °C como se mencionó anteriormente. Además, como grupos control se incluyeron embriones de los tres estadios nombrados que fueron enfriados hasta -20 °C solo expuestos a S1 (sin haber sido microinyectados previamente). El ensayo se realizó por triplicado y se evaluaron los porcentajes de supervivencia a 1-, 24-, y 72-horas-posenfriamiento, la tasa de eclosión y la frecuencia de anomalías en larvas.

##### 2.4.5.6.2 *Enfriamiento de embriones de 96-hpf*

En segundo lugar, considerando los resultados obtenidos en 2.5.3, donde se vió que el estadio más tolerante al enfriamiento fue el de 96-hpf, se decidió evaluar cuál era el compartimento embrionario más conveniente para la microinyección de la solución crioprotectora. Para ello, de igual modo que se mencionó en 2.4.5.5.1, se tomaron grupos de 10 embriones cada uno del estadio 96-hpf. A un grupo se lo microinyectó con 32  $\mu$ l de S1 en el vitelo, y al otro grupo, en el espacio perivitelino. Ambos grupos, y un tercero sin microinyectar, fueron expuestos en crioviales a 1 ml de la S1 y enfriados de forma rápida hasta -20 °C y almacenados a esa temperatura durante 1 hora como ya se mencionó anteriormente en 2.4.5.4. Un cuarto grupo sin tratar se

empleó como control de la puesta. El ensayo se realizó por duplicado y se evaluó la supervivencia embrionaria a 1-, 24-, 48-, y 96-horas-posesfriamiento, así como el porcentaje de eclosión.

En tercer lugar, en base a los resultados obtenidos previamente, y con el objetivo de optimizar los resultados obtenidos en 2.4.5.4, se tomaron grupos de 10-12 embriones de 96-hpf que fueron microinyectados en el espacio perivitelino con 32 nl de S1 o S2. Luego de la microinyección, se procedió a realizar el enfriamiento hasta -20 °C (Tabla 3) como ya fue explicado en 2.4.5.4. Se emplearon dos grupos como control: uno de embriones microinyectados no enfriados (control de microinyección) y otro de embriones sin tratar (control de la puesta). Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron los mismos parámetros que en 2.4.5.4 (supervivencia embrionaria, eclosión, supervivencia y morfología larval).

**Tabla 3.** Resumen de los distintos protocolos de enfriamiento ensayados con embriones de 96-hpf.

Tratamiento	Solución crioprotectora	Tipo de enfriamiento	Microinyección	Temperatura final	
T1	S1	Rápido	No	-14°C	
T2	S2				
T3	S1	Lento			
T4	S2				
T5	S1	Rápido		Sí	-20°C
T6	S2				
T7	S1	Lento			
T8	S2				
T9	S1	Rápido			
T10	S2	Lento			
T11	S1				
T12	S2				

#### 2.4.5.7 Estudio comparativo con embriones de medaka

A fin de estudiar con mayor profundidad las alteraciones que ocurren en el desarrollo como consecuencia de los protocolos de enfriamiento antes presentados, se decidió realizar un estudio comparativo empleando embriones de pejerrey y de medaka. La decisión de emplear embriones de medaka (*O. latipes*) se debió a que, como se mencionó en 2.1.5, se trata de una especie modelo, en la que se puede contar con líneas transgénicas para genes reporteros, está filogenéticamente emparentada con *O. bonariensis*, y ambas presentan características embrionarias y de desarrollo semejantes.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon embriones de pejerrey de 96-hpf (20 °C) y de medaka de las líneas MT835 y TG955 del estadio 22 (Iwamatsu 2004). La obtención de embriones y su incubación se llevó a cabo como se explicó previamente en 2.4.1. Previo al momento de comenzar el ensayo de enfriamiento, un grupo de 15 embriones de cada una de las especies fue fotografiado empleando el equipamiento mencionado en 2.4.3 y se empleó el *software ImageJ* (*National Institutes of Health, Maryland, USA*) para medir el diámetro embrionario.

Para el ensayo de enfriamiento propiamente dicho se procedió de igual forma que en el T7 explicado anteriormente. Brevemente, los grupos de embriones fueron enfriados hasta -20 °C, de forma lenta, inmersos en la S1, y mantenidos a dicha temperatura por 1-hora. Luego del enfriamiento se registró la supervivencia embrionaria a la 1-, 24-, 48- y 72-hpe, y tanto los embriones como las larvas obtenidas fueron fotografiados bajo lupa estereoscópica como se mencionó previamente. Además, las larvas fueron fijadas y teñidas siguiendo los lineamientos antes descritos en 2.4.4.2.2 y 2.4.4.2.3 .

#### 2.4.5.8 *Análisis estadístico de los datos*

Los datos son expresados como media más desvío estándar. En todos los casos, los porcentajes de supervivencia posenfriamiento y de eclosión fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Tukey, empleando para ello el *software GraphPad Prism* ( $p < 0.05$ ).

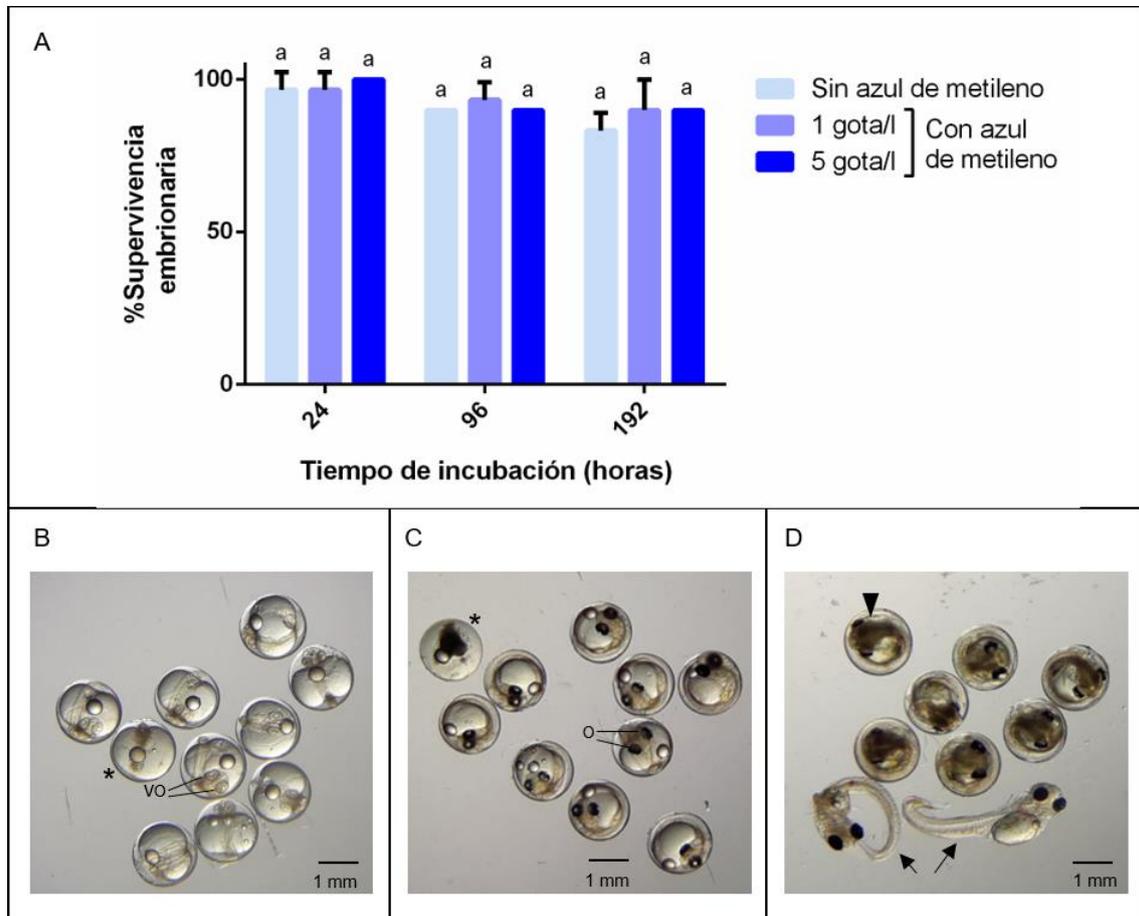
## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Incubación de embriones de pejerrey

#### 2.5.1.1 *Ensayo de incubación N°1*

La supervivencia embrionaria fue cercana al 100% a las 24-hpi, y descendió ligeramente alrededor del 90% a las 192-hpi en todos los tratamientos (Figura 16, A). Entre las 24- y 96-hpi, el desarrollo embrionario avanzó como puede observarse, por ejemplo, en la formación del ojo y su pigmentación (Figura 16, B y C). Sin embargo, habiéndose alcanzado el tiempo esperado para la eclosión (192-hpi), ésta no ocurrió. En su lugar, se observó que la región cefálica de los embriones se volvió opaca y los pocos que se

hallaron fuera del corion presentaban un desarrollo incompleto, dando lugar a larvas no viables, con colas torcidas o aún enrolladas, e inmóviles (Figura 16, D).

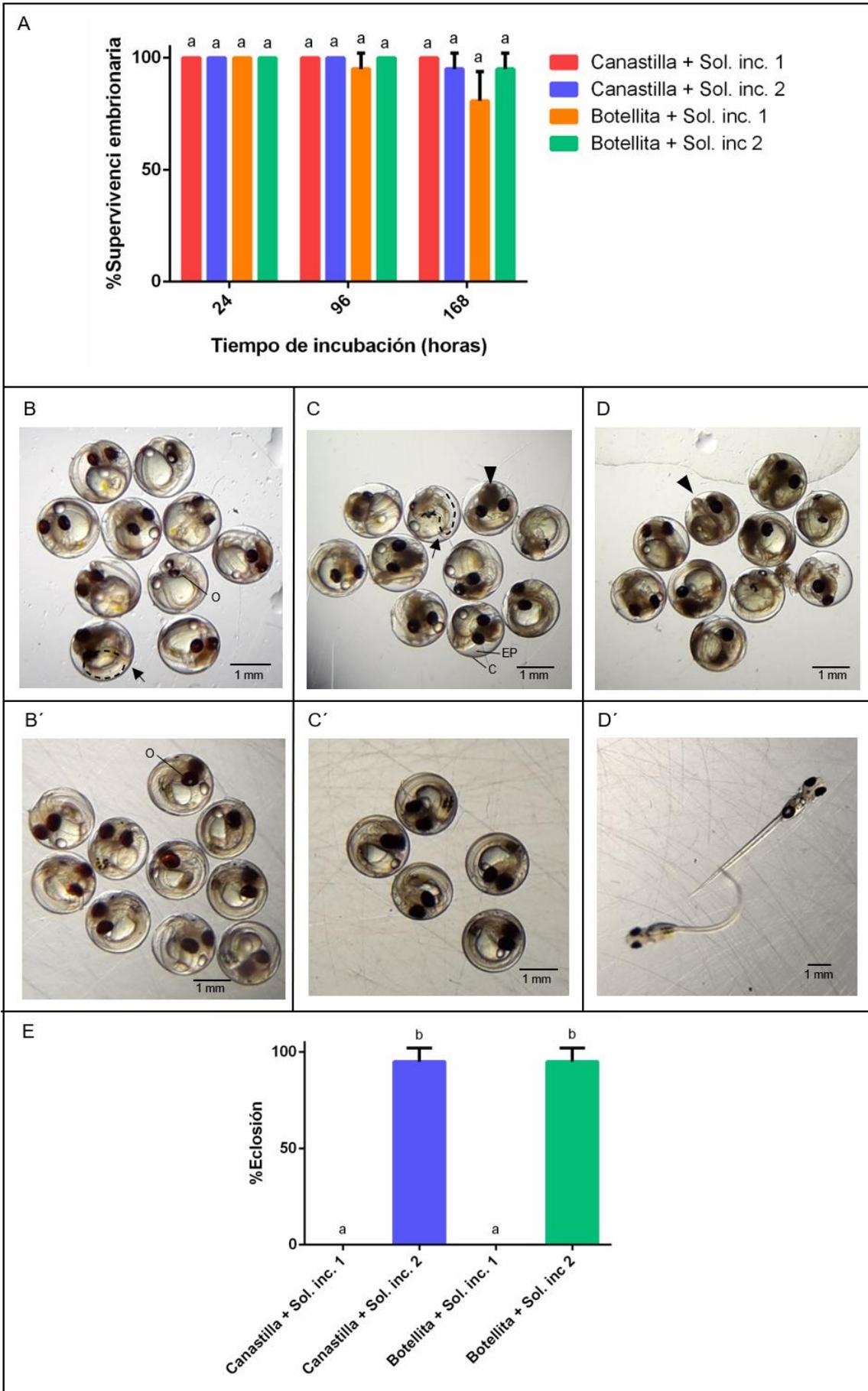


**Figura 16.** Efecto de la utilización de canastillas plásticas de fondo rígido y agua destilada con el agregado de NaCl 5g/l y distintas concentraciones de azul de metileno como medio de cultivo sobre la supervivencia (A) y el desarrollo de embriones de *O. bonariensis* a 24- (B), 96- (C), y 192-horas (D) de incubación a 20 °C, respectivamente. Las fotomicrografías pertenecen al mismo grupo de embriones y son representativas de lo observado en los tres tratamientos. El asterisco señala un embrión muerto (B, C); la punta de flecha, la región cefálica opaca del embrión (C), y las flechas, dos larvas no viables. VO: vesículas ópticas; O: ojos. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 2.5.1.2 Ensayo de incubación N°2

Una vez más, la supervivencia embrionaria fue del 100% a las 24-hpi en todos los casos y disminuyó ligeramente hacia las 168-hpi hasta 95% en ambos tratamientos donde se empleó la solución de incubación 2, y hasta el 80%, en el tratamiento que combinaba las botellitas plásticas con la solución de incubación 1. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas respecto a este parámetro en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 17, A).

Respecto al desarrollo, en ambos tratamientos donde se empleó la solución de incubación 1, a los 6-días de incubación (144-hpi), algunos embriones presentaron un retraso en la formación de los ojos y posición y curvatura atípica de la cola (Figura 17, B) respecto de los embriones que fueron mantenidos con la solución de incubación 2 (Figura 17, B'). Asimismo, en estos últimos grupos, la eclosión comenzó alrededor de las 144-hpi. Al día siguiente (168-hpi) de la mencionada revisión, en la mayoría de los embriones mantenidos en la solución de incubación 1 se volvió opaca la región cefálica y se hizo evidente que éstos eran de menor tamaño que los mantenidos en la solución de incubación 2 ya que aún podía apreciarse el espacio perivitelino (Figura 17, C). En cambio, los embriones de los otros dos grupos ocupaban la totalidad del espacio definido por el corion (Figura 17, C'). Por último, a los 8-días de incubación (192-hpi), todos los embriones mantenidos con la solución de incubación 1, si bien continuaban estando vivos (con latidos cardíacos), se habían vuelto opacos (Figura 17, D) y ninguno de ellos eclosionó (Figura 17, E). Por su parte, los embriones de ambos grupos mantenidos con la solución de incubación 2 dieron lugar a larvas viables (aspecto y natación normal, Figura 17, D') y alcanzaron una eclosión del 95% (Figura 17, E).



**Figura 17.** Efecto del soporte y solución de incubación sobre la supervivencia (A), el desarrollo (B, C, D), y la eclosión (E) de embriones de *O. bonariensis*. Fotomicrografías representativas de grupos de embriones/larvas a las 144- (B, B'), 168- (C, C'), y 192-hpi (D, D') empleando la solución de incubación 1 (B, C, D) y 2 (B', C', D'). Las líneas punteadas y las flechas indican curvaturas y posiciones atípicas de las colas. Las puntas de flecha señalan embriones con regiones opacas. O: ojo; EP: espacio perivitelino; C: corion. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Mg}^{2+}$ , y pH medidos en el agua destilada y el agua corriente del INTECH, y los valores teóricos para estos mismos parámetros en el medio indicado para embriones de medaka. Como era de esperarse, en el agua destilada, los valores de los mencionados elementos fueron nulos para el caso de Na y K, y de muy baja concentración para Ca y Mg (1 y 2 mg/l, respectivamente). Por su parte, en el agua corriente, los cuatro elementos evaluados presentaron una concentración entre un 27% y casi un 80% superior respecto del medio de cultivo tomado como referencia. Además, en base a estos resultados, teniendo en cuenta que las concentraciones para Ca y Mg fueron 51,0 y 44,7 mg/l, respectivamente, y el pH = 8, puede concluirse que el agua corriente del INTECH es dura y alcalina.

**Tabla 4.** Medición de iones y pH en el agua destilada y corriente del INTECH, y valores de referencia del medio de incubación recomendado para embriones de *O. latipes*.

Elemento	Agua destilada (mg/l)	Agua corriente (mg/l)	Medio para embriones de medaka (mg/l)
Na	-	539,00	389,00
K	-	26,70	15,20
Ca	2,00	51,00	10,82
Mg	1,00	44,70	15,95
pH	7,2	8,0	7,0

En base a estos resultados se decidió emplear a la solución de incubación 2 (agua corriente con el agregado de NaCl a razón de 5g/l) en los siguientes ensayos.

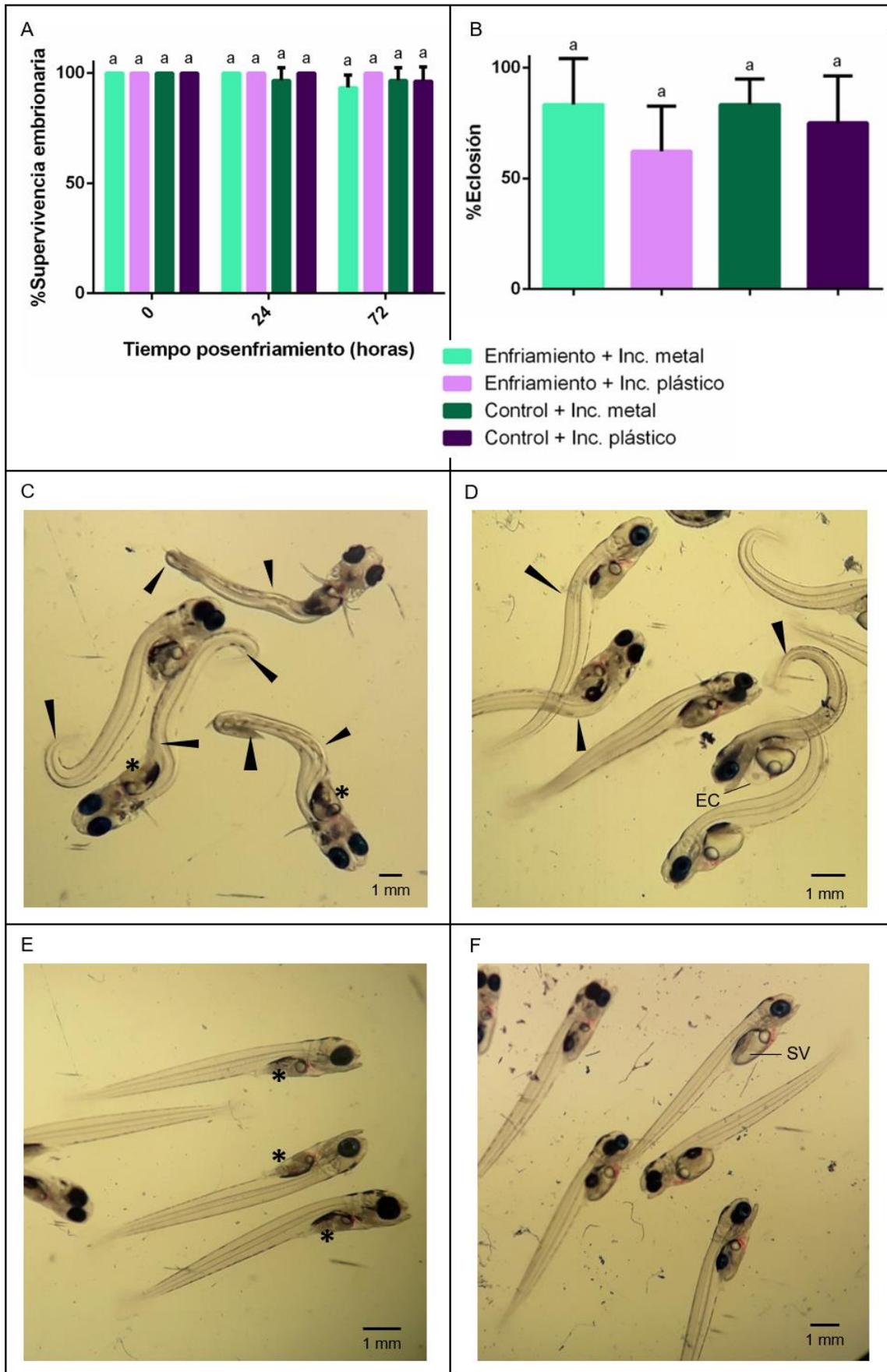
### 2.5.1.3 Ensayo de incubación N°3

Luego del enfriamiento a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1-hora, se obtuvo una supervivencia embrionaria del 100%. A lo largo de la incubación (24- y 72-hpe) no se hallaron diferencias entre los grupos enfriados y los grupos control, ni entre aquellos que fueron incubados en las canastillas de malla metálica y en las nuevas de malla plástica. La supervivencia a las 72-hpe fue de  $93,33 \pm 5,77$

% y  $100,00 \pm 0,00$  %, para los grupos de embriones enfriados e incubados en canastillas metálicas y plásticas, respectivamente. Mientras que la supervivencia de sus respectivos grupos control fue de  $96,66 \pm 5,77$  % y  $96,29 \pm 6,41$  % (Figura 18, A). En cuanto a la eclosión, tampoco se hallaron diferencias entre los distintos tratamientos. Este parámetro fue de  $83,33 \pm 20,82$  % y  $62,22 \pm 20,37$  % para los grupos enfriados e incubados en canastillas metálicas y plásticas, respectivamente. Mientras que la eclosión de sus respectivos grupos control fue de  $83,33 \pm 11,55$  % y  $75,00 \pm 21,00$  % (Figura 18, B).

En las larvas provenientes de embriones enfriados se observaron malformaciones (Figura 18, C, D) mientras que las larvas de los grupos control presentaron morfología normal (Figura 18, E, F). Entre las malformaciones se detectaron curvaturas en el eje del cuerpo, colas enrolladas (Figura 18, C, D), y edema cardíaco (Figura 18, D). Respecto de las curvaturas, éstas fueron más severas en las larvas provenientes de embriones incubados en las canastillas de metal (Figura 18, C) en comparación con aquellos incubados en las de plástico (Figura 18, D). Por otro lado, en las larvas provenientes de los embriones incubados en las canastillas de metal, tanto aquellos enfriados como control, se registró que la eclosión ocurrió antes que en los de las canastillas de plástico. Esto se vio reflejado en que a las 192-hpi, las mencionadas larvas tenían el saco vitelino vacío (Figura 18, C, E) mientras que las larvas que fueron obtenidas en las canastillas plásticas aún poseían sus sacos vitelinos llenos (Figura 18, D, F).

Por último, teniendo en cuenta lo antes mencionado, y que se encontró que las larvas por su tamaño lograban escapar por los orificios de la malla de las canastillas metálicas, y que las mismas comenzaron a presentar zonas oxidadas, se decidió emplear solo canastillas de malla plástica en los siguientes ensayos.



**Figura 18.** Efecto del soporte de incubación sobre la supervivencia embrionaria (A), la eclosión (B), y la morfología de larvas provenientes de embriones de *O. bonariensis*. Fotomicrografías

representativas de larvas obtenidas a las 192-hpi, a partir de los grupos enfriados (C, D) y control (E, F), incubados en canastillas metálicas (C, E) y plásticas (D, F), respectivamente. Las puntas de flecha señalan curvaturas del eje corporal y/o enrollamiento de la cola. Los asteriscos indican sacos vitelinos vacíos. EC: edema cardíaco, SV: saco vitelino. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 2.5.1.4 Resumen de las ventajas y desventajas de los métodos de incubación

En función a los resultados presentados previamente y considerando las ventajas y desventajas observadas, se decidió cuáles eran los soportes más convenientes para la incubación de los embriones de pejerrey. Se tuvo en cuenta la facilidad de acceso a los embriones y la necesidad o no de manipularlos en cada revisión, y la oxigenación, entre otros factores (Tabla 5). Así, en los siguientes ensayos de esta Tesis se emplearon las canastillas de malla plástica con flotador para la incubación de grupos de 10 o más embriones, y las placas multipocillo en aquellos casos en los que era necesario seguir el desarrollo de cada embrión o larva de forma individual.

**Tabla 5.** Resumen de las ventajas y desventajas de los diferentes soportes empleados para la incubación de embriones de *O. bonariensis*.

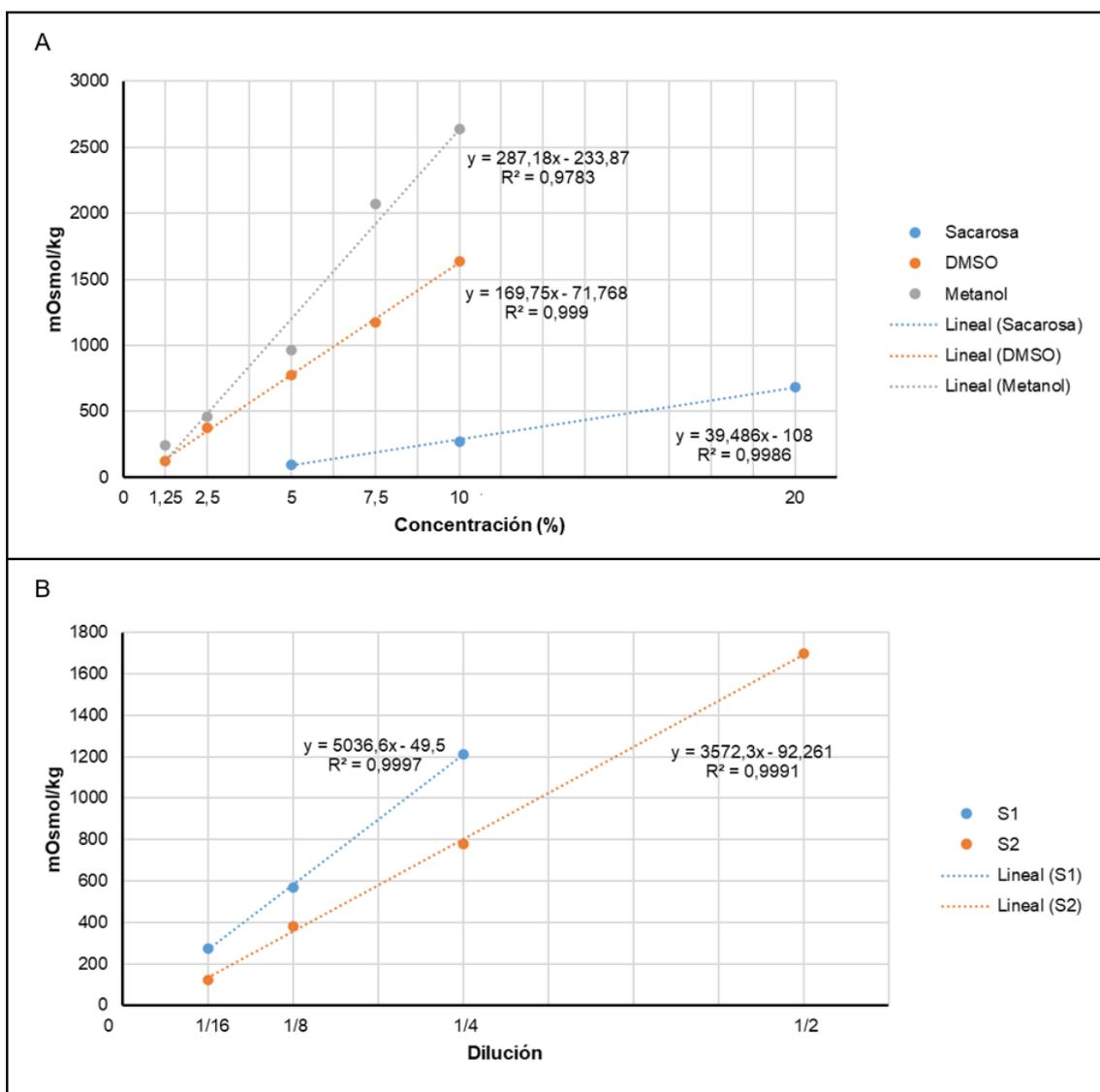
Soprote	Acceso a los embriones	Necesidad de manipular a los embriones en cada revisión	Oxigenación	Otras
Canastillas de malla plástica con fondo rígido	Fácil	Sí	Media	Los embriones quedan estáticos en el fondo
Canastilla de malla metálica con fondo en U con flotador	Fácil	Sí	Buena	Riesgo de toxicidad, aparición de marcas de óxido.
Botellitas plásticas invertidas	Difícil	Sí	Excelente	-
Canastilla de malla plástica con flotador	Fácil	Sí	Buena	-
Placas multipocillo	Fácil	No	Nula	Cambios recurrentes de medio para garantizar buena calidad de agua y oxigenación.

#### 2.5.2 Osmolaridad y descenso crioscópico

Pudo medirse la osmolaridad de la gran mayoría de las soluciones crioprotectoras preparadas. Las excepciones fueron las soluciones de metanol y DMSO de mayor concentración (15 y 20 % v/v), y las diluciones a la mitad ( $2^{-1}$ ) de la S1 y la S2, por presentar todas ellas valores de osmolaridad por fuera (muy por encima) del rango de medición del equipo empleado (Figura 19).

Tanto para las curvas de los componentes por separado (sacarosa, metanol y DMSO) como para las de las soluciones completas (S1 y S2), se obtuvo un excelente ajuste de los puntos a una regresión lineal ( $R^2=0,99$ ). En

relación a las pendientes, entre los componentes por separado, se observó que el metanol presentó el valor más alto, seguido del DMSO, y luego, la sacarosa (Figura 19, A). Esto señala cómo influyen cada uno de ellos en la osmolaridad (y correspondiente descenso del punto de fusión) en las SCs. Del mismo modo, para el caso de las curvas de las SCs completas, se observó una mayor pendiente en la S1 respecto de la S2 (Figura 19, B).



**Figura 19.** Medición de osmolaridad de los componentes por separado (A) y de las soluciones crioprotectoras (B).

En la Tabla 6 se presentan los valores de osmolaridad y descenso crioscópico calculados para la S1 y la S2. En ambos casos, la osmolaridad calculada a partir de las curvas de las SCs resultó ligeramente mayor (entre 6,6 y 13,2 %) que la calculada a partir de las mediciones de sus componentes por separado, y a su vez, esta última, mayor que la osmolaridad teórica (entre 1,6 y

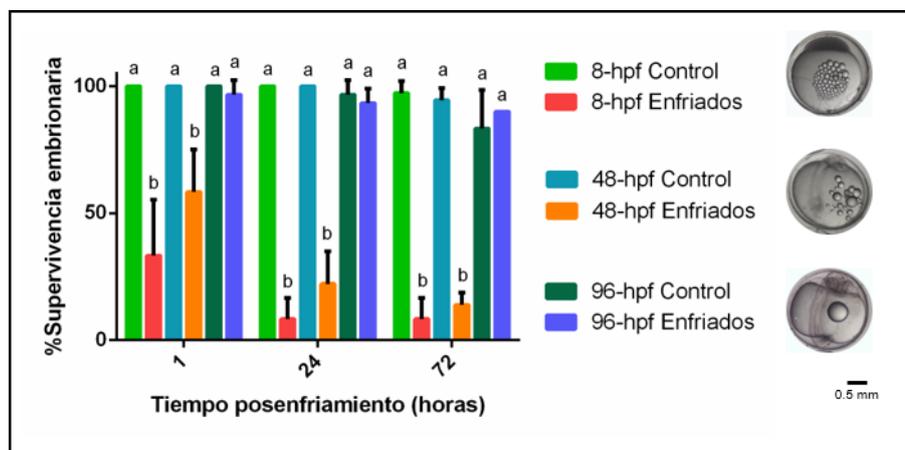
6,2 %). Así, los dos valores de osmolaridad medidos para la S1 fueron 4659,0 y 4987,1 mOsm/kg mientras que el valor teórico era 4371 mOsm/kg. El descenso crioscópico asociado a estos valores osciló entre -8,12 y -9,27 °C, respectivamente. De la misma forma, los valores de osmolaridad medidos para la S2 fueron 3020 y 3480,10 mOsm/kg, en tanto que el valor teórico de este parámetro era 2971 mOsm/kg. El descenso crioscópico en este caso tomó valores entre -5,52 y -6,47 °C, respectivamente.

**Tabla 6.** Mediciones y cálculos de osmolaridad y descenso crioscópico de las soluciones crioprotectoras S1 y S2.

	Componentes	Osmolaridad teórica (mOsm/kg)	Descenso crioscópico (°C)	Osmolaridad medida (mOsm/kg)	Descenso crioscópico (°C)	Osmolaridad solución completa (mOsm/kg)	Descenso crioscópico (°C)
S1	Metanol 2,5 M (10 % v/v)	2500	-4,65	2635	-4,90		
	DMSO 1,4 M (10 % v/v)	1400	-2,60	1639	-3,05		
	Sacarosa 0,3 M (10 % p/v)	300	-0,56	274	-0,51		
	NaCl 0,085 M (5 g/l)	171	-0,32	111	-0,21		
Total		4371	-8,12	4659	-8,66	4987,10	-9,27
S2	Metanol 2,5 M (10 % v/v)	2500	-4,65	2635	-4,90		
	Sacarosa 0,3 M (10 % p/v)	300	-0,56	274	-0,51		
	NaCl 0,085 M (5 g/l)	171	-0,32	111	-0,21		
Total		2971	-5,52	3020	-5,61	3480,04	-6,47

### 2.5.3 Elección del estadio embrionario

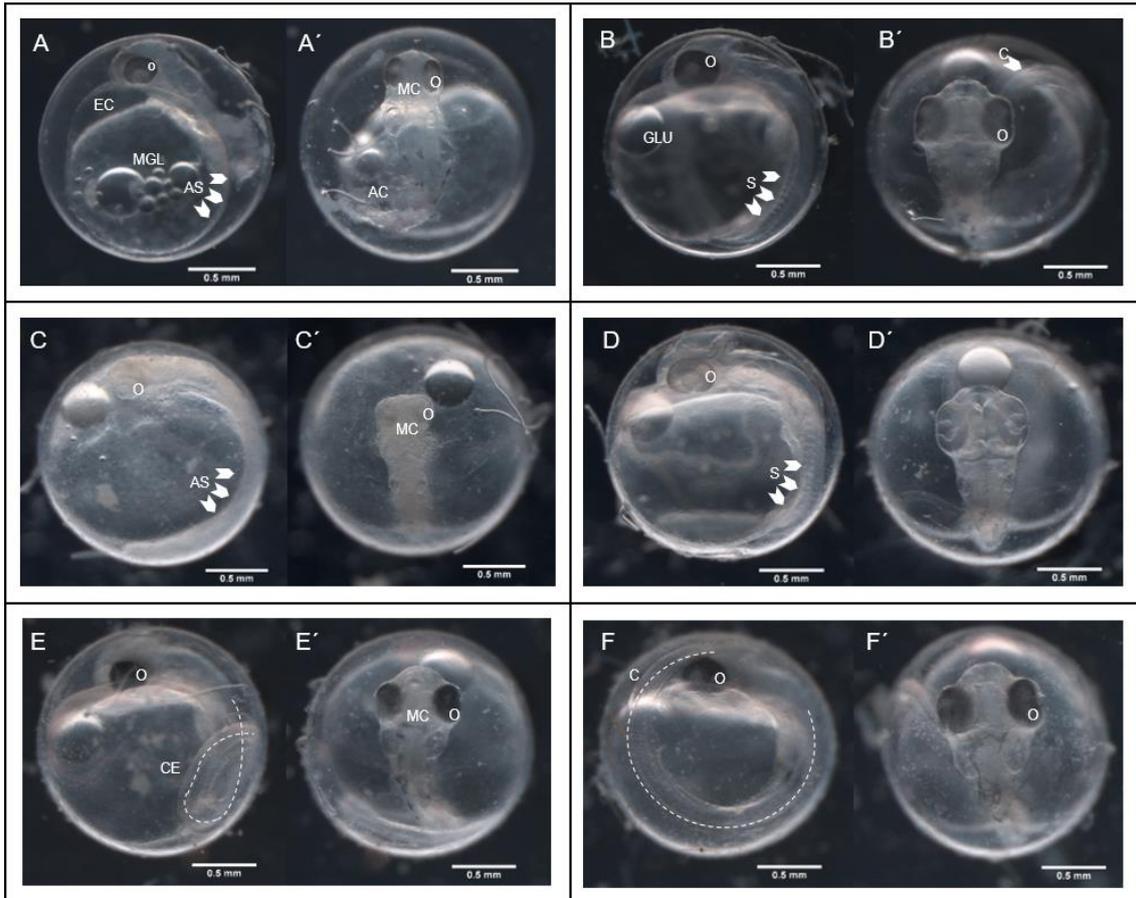
Los embriones de pejerrey sobrevivieron luego de haberles aplicado el protocolo de enfriamiento propuesto. En primer lugar, se observó que la sensibilidad al enfriamiento fue mayor en los dos estadios más tempranos (8- y 48-hpf) en comparación con el más avanzado (96-hpf). La supervivencia embrionaria, 1-hora-post-enfriamiento, fue en promedio de 33, 58, y 97% para los embriones enfriados de 8-, 48-, y 96-hpf, respectivamente (Figura 20). Además, la supervivencia de los estadios 8- y 48-hpf decayó a 8-14% a las 72-hpe, mientras que la supervivencia de los embriones de 96-hpf enfriados se mantuvo en torno al 90% y no difirió de la del grupo control ( $p < 0,05$ , Figura 20). En segundo lugar, dado los altos porcentajes de supervivencia (83-97%, Figura 20) de los grupos control de los 3 estadios embrionarios, se considera que toleraron sin problemas la manipulación. Por último, la supervivencia de ambos grupos control (embriones expuestos a la solución S1 y embriones sin tratar) fue idéntica (por ello en la Figura 20 solo se presenta un control).



**Figura 20.** Efecto del enfriamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1-hora sobre la supervivencia de embriones de *O. bonariensis* de 8-, 48-, y 96-hpf a 1-, 24-, y 72-hpe. A la derecha se presentan fotomicrografías representativas de los estadios embrionarios mencionados. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

Se hallaron anomalías en el desarrollo en los tres estadios embrionarios evaluados, siendo aquellas observadas en los embriones de 8- y 48-hpf las más severas. Los embriones de 8-hpf que reanudaron su desarrollo luego del enfriamiento presentaron grandes edemas cardíacos, múltiples gotas lipídicas (Figura 21, A), malformación craneal, y ausencia de somitos posteriores y cola (Figura 21, A') en comparación con el grupo control (Figura

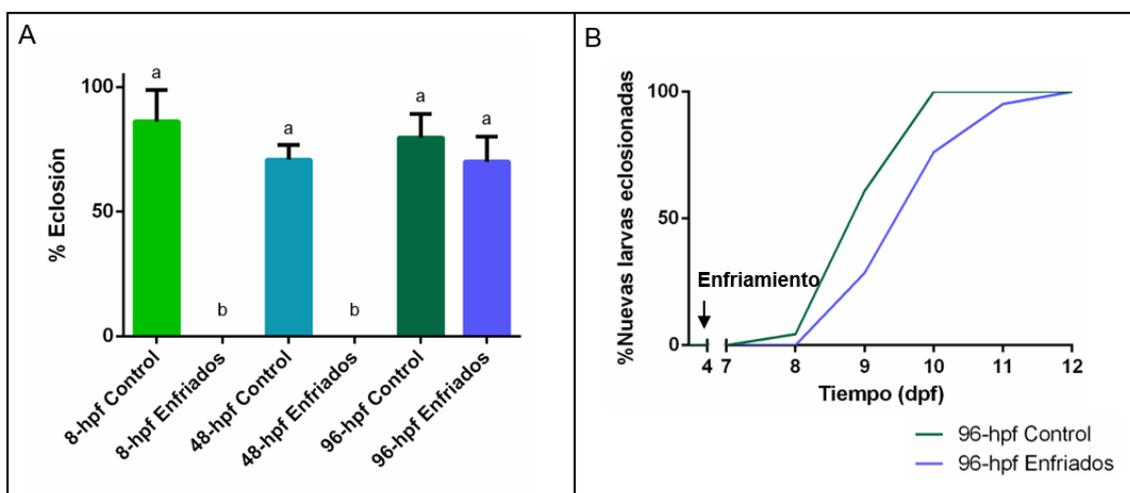
21, B, B') a las 96-hpe. En el caso de los embriones de 48-hpf enfriados, también se observó ausencia de somitos (Figura 21, C) y un pobre desarrollo de la región cefálica (Figura 21, C') en comparación con el control (Figura 21, D, D') a las 48-hpe. Por último, en los embriones de 96-hpf enfriados se hallaron las anomalías menos severas. Estos presentaron cola enrollada (Figura 21, E), y menor tamaño de cabeza (Figura 21, E') respecto al grupo control (Figura 21, F, F') a las 72-hpe.



**Figura 21.** Efecto del enfriamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sobre la morfología de embriones de *O. bonariensis*. Fotomicrografías representativas de embriones de 8 - (A: enfriado, B: control), 48- (C: enfriado, D: control), y 96-hpf (E: enfriado, F: control) evaluados a las 96-, 48-, y 72-hpe, respectivamente. Las fotomicrografías con la misma letra (X, X') corresponden a la vista lateral (X) y dorsal (X') del mismo embrión. O: ojo, MGL: múltiples gotas lipídicas, GLU: gota lipídica única, S: somitos, AS: ausencia de somitos, MC: malformación craneal, C: cola, CE: cola enrollada, AC: ausencia de cola, EC: edema cardíaco.

Los embriones enfriados de 8- y 48-hpf no lograron eclosionar, mientras que los de 96-hpf presentaron una eclosión del 70% que no difirió del porcentaje del grupo control. Asimismo, no se encontraron diferencias entre los porcentajes de eclosión de los grupos control de los 3 estadios embrionarios (8-, 48-, y 96-hpf) que oscilaron entre 71 y 86% ( $p < 0,05$ , Figura 22, A). Por otro

lado, se observó que la eclosión de las larvas provenientes de los embriones de 96-hpf enfriados fue tardía respecto al grupo control. Por ejemplo, el grupo de embriones enfriados alcanzó el 29% de eclosión al 9no día-posesfriamiento, mientras que el control ya había alcanzado el 61% en ese mismo período de incubación (Figura 22, B).



**Figura 22.** Efecto del enfriamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sobre la tasa de eclosión (A) y el tiempo de eclosión (B) de embriones de *O. bonariensis* de 8-, 48-, y 96-hpf. Las barras con distintas letras son significativamente diferentes (ANOVA/Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### 2.5.4 Enfriamiento a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$

##### 2.5.4.1 Supervivencia posesfriamiento

Se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia embrionaria después de todos los protocolos de enfriamiento evaluados y éstos se mantuvieron estables durante los días de incubación. El porcentaje de supervivencia del protocolo T1 (ver Tabla 3) fue del 100%, inmediatamente después del enfriamiento, y luego disminuyó a  $96,67 \pm 5,77\%$  (24-hpe) y, continuó en este valor durante la incubación (96-hpe). En el caso de T2, el porcentaje de supervivencia fue del 80% y fue constante durante toda la incubación. El porcentaje de supervivencia posterior al enfriamiento en T3 fue de  $96,67 \pm 5,77\%$  y luego disminuyó a  $93,33 \pm 11,54\%$  a las 24-hpe, y a  $90,00 \pm 10,00\%$  a las 96-hpe. Por otro lado, el porcentaje de supervivencia después del enfriamiento en T4 fue del 100% y disminuyó a  $93,33 \pm 11,55\%$  a las 24-hpe, y a  $90 \pm 10\%$  a las 96-hpe. El porcentaje de supervivencia en el grupo control fue del 100% a lo largo de toda la incubación. La tasa de supervivencia de T2 luego del enfriamiento (0-hpe) fue significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) respecto

de los otros tratamientos y del control. Por otro lado, a las 24-hpe, no hubo diferencias entre los grupos; y a las 96-hpe, solo la tasa de supervivencia de T2 fue menor ( $p < 0,05$ ) respecto del control (Figura 23, A).

#### 2.5.4.2 *Eclosión*

Se obtuvieron altos porcentajes de eclosión en todos los grupos: para T1, T2, T3, T4, y el control fue  $80,00 \pm 0,00$ ,  $70,00 \pm 0,00$ ,  $86,67 \pm 11,55$ ,  $86,67 \pm 15,28$  y  $93,33 \pm 5,77\%$ , respectivamente. La tasa de eclosión de T2 fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en el control (Figura 23, B).

#### 2.5.4.3 *Supervivencia larval*

No hubo diferencias entre las curvas de supervivencia de las larvas de los diferentes tratamientos y tampoco entre estas y la curva de supervivencia de las larvas del grupo control. El PNR fue en promedio ( $5,7 \pm 0,1$ ) días (Figura 23, C).

### 2.5.5 *Enfriamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$*

#### 2.5.5.1 *Supervivencia posenfriamiento*

Se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia inmediatamente después del enfriamiento (0-hpe) y durante la incubación (24-hpe y 72-hpe). Inicialmente, el porcentaje de supervivencia de T5 fue de  $86,67 \pm 5,77\%$ , luego disminuyó ligeramente a  $83,33 \pm 11,55\%$  a las 24-hpe, y finalmente, disminuyó nuevamente a  $80 \pm 10\%$  a las 72-hpe. En el caso de T6, la tasa de supervivencia después del enfriamiento fue del 100% en los tres tiempos mencionados. La tasa de supervivencia de T7 fue  $96,67 \pm 5,77\%$  después del enfriamiento y 90% a lo largo de la incubación. Para T8 fue  $93,33 \pm 11,55\%$ ,  $90 \pm 10\%$  y  $83,33 \pm 5,77\%$  a las 0-hpe, 24-hpe y 72-hpe, respectivamente. El grupo control presentó una tasa de supervivencia del  $96,67 \pm 5,77\%$  durante la toda la incubación (Figura 23,D).

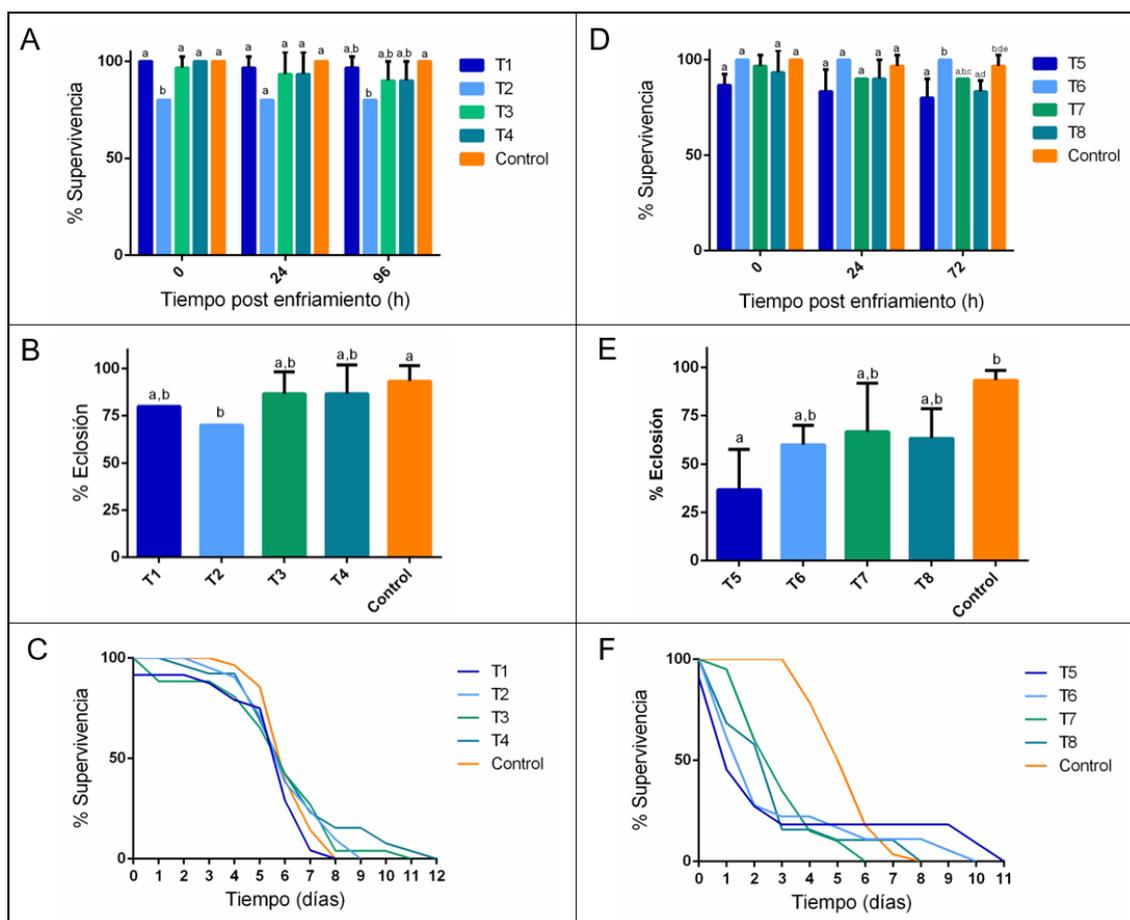
#### 2.5.5.2 *Eclosión*

Las tasas de eclosión fueron entre 37% y 67%. Particularmente, el porcentaje de eclosión de T5 fue  $36,67 \pm 2,82\%$  y fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) respecto del control ( $93,33 \pm 5,74\%$ ). En el caso de las tasas de eclosión de T6, T7 y T8 fueron  $60 \pm 10\%$ ,  $66,67 \pm 25,71\%$  y  $63,33 \pm 15,28\%$ ,

respectivamente; y estos porcentajes no presentaron diferencias con el control (Figura 23,E).

### 2.5.5.3 Supervivencia larval

Las larvas provenientes de los embriones enfriados presentaron una mortalidad temprana. El PNR para T5, T6, T7, T8 y el control fueron 0,89, 1,32, 2,16, 2,38 y 5,2 días, respectivamente (Figura 23,F).



**Figura 23.** Efecto del enfriamiento a -14 (A, B, C) y -20°C (D, E, F) sobre la supervivencia embrionaria (A, D), la eclosión (B, E) y la supervivencia larval (C, F) en *O. bonariensis*. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey, p<0,05).

### 2.5.6 Selección del estadio embrionario y sitio de microinyección

#### 2.5.6.1 Microinyección de embriones de 8-, 48-, y 96-hpf en el espacio perivitelino

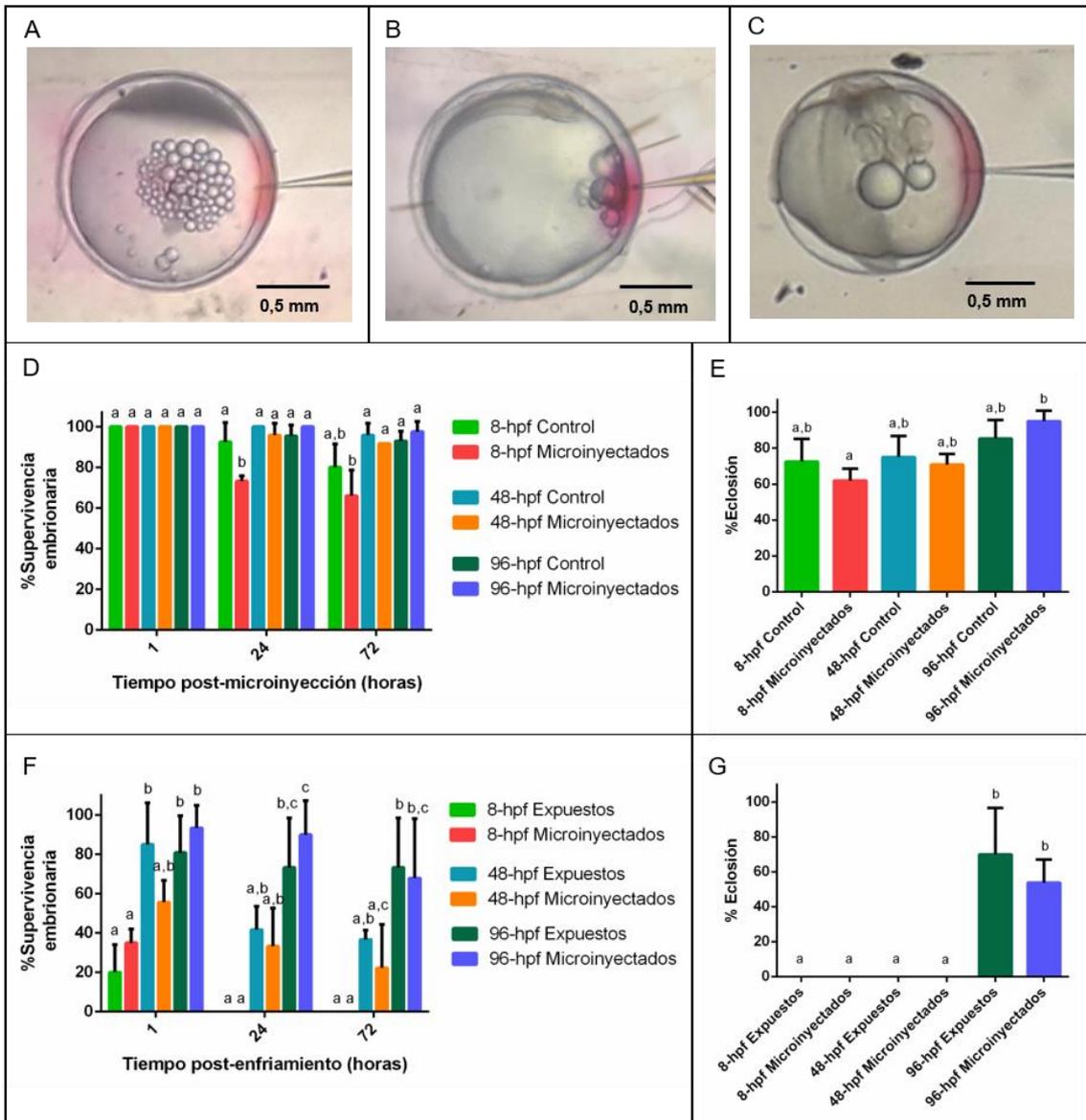
Fue posible incorporar mediante la técnica de microinyección la solución crioprotectora S1 en el espacio perivitelino de los embriones de los tres estadios embrionarios seleccionados: 8-, 48-, y 96-hpf. El sitio de la microinyección se confirmó gracias al empleo del colorante *Phenol Red*. Este es, a su vez, un indicador de pH, y al inyectarse en el espacio perivitelino su color viró del rojo al fucsia (pH alcalino, Figura 24 A, B, C).

Todos los embriones microinyectados, al igual que el grupo control, presentaron una supervivencia del 100% una hora después de haberles realizado este tratamiento (Figura 24, D). Del mismo modo, los embriones microinyectados presentaron una tasa de eclosión similar a la del grupo control que osciló entre el 75 y el 92% (Figura 24, E) y no se observaron malformaciones en las larvas obtenidas.

#### *2.5.6.2 Enfriamiento a -20 °C de embriones de 8-, 48-, y 96-hpf microinyectados en el espacio perivitelino*

Los embriones de los distintos estadios respondieron de forma diferente a la microinyección y al enfriamiento. El estadio más sensible fue el de 8-hpf, que inmediatamente luego del enfriamiento, presentó una supervivencia menor que el resto de los grupos. En particular, luego de una hora posenfriamiento, el porcentaje de supervivencia de los embriones de 8-hpf microinyectados fue del  $35 \pm 7$  % mientras que el de los que solo fueron expuestos a la S1 fue del  $20 \pm 14$  %. En ambos grupos, ningún embrión sobrevivió a las primeras 24-hpe. Para el caso de los embriones de 48-hpf, durante la primera hora posterior al enfriamiento, se registró una supervivencia del  $85 \pm 21$  % en el grupo solo expuesto, y del  $55 \pm 11$ % en el grupo que fue microinyectado previamente. Estos dos grupos no difirieron entre sí, ni tampoco respecto de los embriones de 96-hpf que presentaron porcentajes de supervivencia de  $81 \pm 19$  % y  $93 \pm 11$  % para los embriones expuestos y microinyectados, respectivamente. A las 24-hpe, la supervivencia de los grupos de embriones de 48-hpf descendió a  $41 \pm 11$  % para los expuestos, y a  $33 \pm 19$  %, para los microinyectados. Del mismo modo, la supervivencia de los embriones de 96-hpf expuestos descendió a  $73 \pm 25$  %, y la de los microinyectados, a  $90 \pm 17$  %. Luego, a las 72-hpe, la supervivencia de los embriones de 48-hpf expuestos fue de  $37 \pm 5$  %, y no difirió significativamente de las de los embriones de 96-hpf cuyo valor para dicho parámetro fue de  $73 \pm 25$  % y  $68 \pm 30$  % para el grupo expuesto y microinyectado, respectivamente (Figura 24, F).

Por último, solo se registró eclosión de larvas en los grupos de embriones enfriados en el estadio de 96-hpf, y fue de  $70 \pm 26$  % para los embriones expuestos, y de  $53 \pm 13$  % para los microinyectados, no difiriendo significativamente entre sí (Figura 24, G).



**Figura 24.** Microinyección de una solución crioprotectora en el espacio perivitelino de embriones de 8- (A), 48- (B), y 96-hpf (C) de *O. bonariensis*. Efecto sobre la supervivencia y la eclosión de embriones incubados normalmente (D, E) y de embriones enfriados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora (F, G). Letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo posmicroinyección o posenfriamiento (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

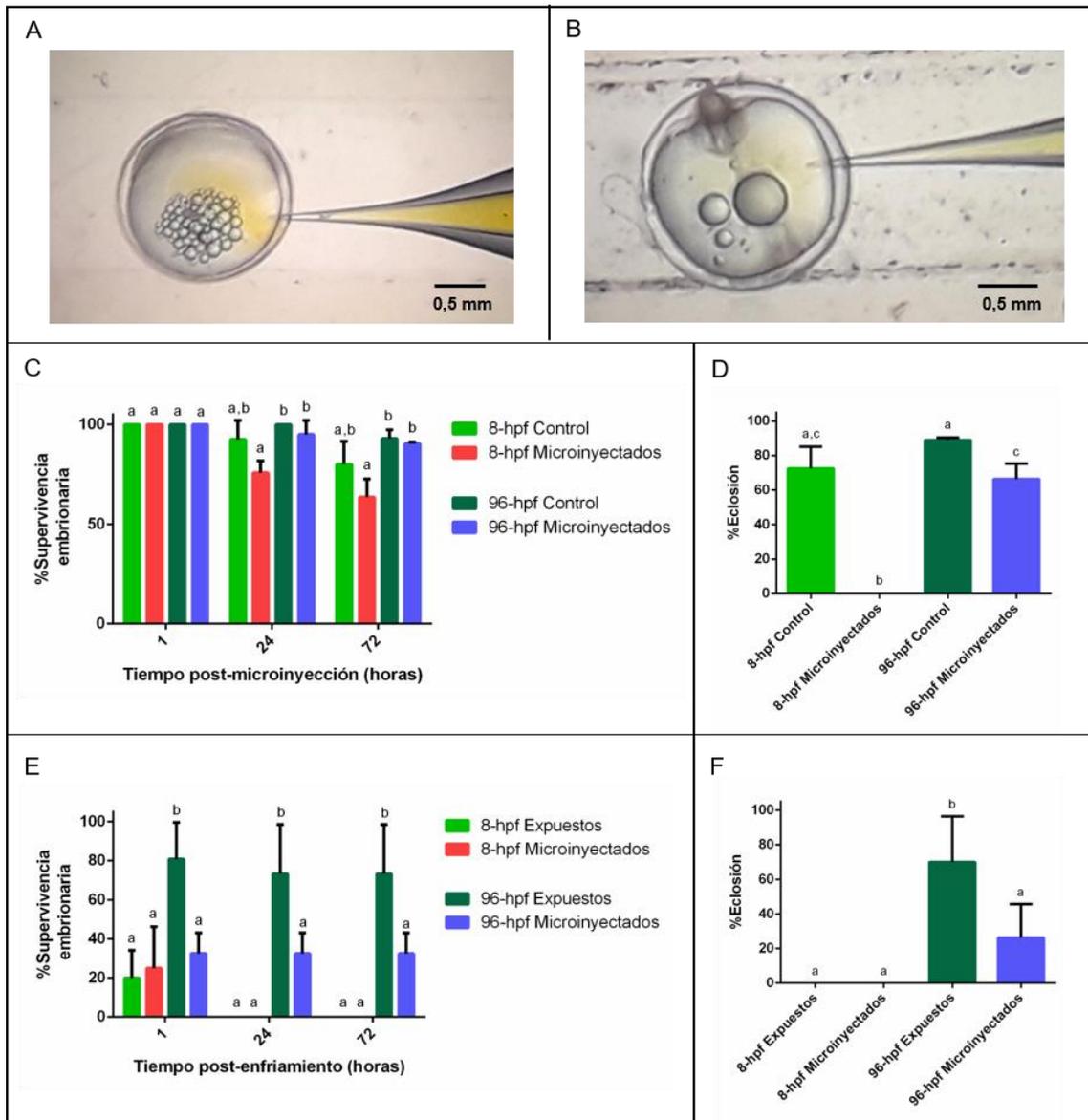
### 2.5.6.3 Microinyección de embriones de 8- y 96-hpf en el vitelo

Fue posible incorporar mediante la técnica de microinyección la solución crioprotectora S1 en el vitelo de los embriones de 8- y 96-hpf. El sitio de la microinyección se confirmó, una vez más, utilizando el colorante *Phenol Red*, el cual, al ingresar al saco vitelino, viró su color del rojo al amarillo (pH ácido, Figura 25, A, B). En todos los casos, la supervivencia en la hora posterior a la microinyección fue del 100%. A las 24-hpm, la supervivencia de los embriones de 8-hpf microinyectados fue del  $75 \pm 6\%$  y no se diferenció de su control ( $92 \pm$

9 %), pero sí de los dos grupos de embriones de 96-hpf. En estos últimos dos casos, la supervivencia de los embriones microinyectados fue del  $95 \pm 7$  % y del  $100 \pm 0$  % en los embriones control. A las 72-hpm, la supervivencia disminuyó ligeramente en todos los grupos, pero se mantuvieron las diferencias recién mencionadas. En particular, la supervivencia de los embriones de 8-hpf microinyectados fue del  $63 \pm 9$  % y la de su grupo control, del  $80 \pm 11$  %. En el caso de los embriones de 96-hpf, el valor de este parámetro fue del  $90 \pm 1$  % y del  $93 \pm 4$  % para los microinyectados y el control, respectivamente (Figura 25, C). Ninguno de los embriones de 8-hpf microinyectados logró eclosionar, mientras que en el grupo de 96-hpf microinyectado el porcentaje de eclosión fue del  $66 \pm 9$  %. El valor de este parámetro para los grupos control fue del  $72 \pm 12$  % y  $89 \pm 1$  % para los embriones de 8- y 96-hpf, respectivamente (Figura 25, D).

#### *2.5.6.4 Enfriamiento a $-20$ °C de embriones de 8- y 96-hpf microinyectados en el vitelo*

Los embriones que mejor toleraron el enfriamiento fueron los de 96-hpf no microinyectados, que presentaron una supervivencia del  $81 \pm 19$  % a la 1-hpe. Este porcentaje fue significativamente diferente de los otros tres grupos, cuya supervivencia promedio osciló entre el 20 y el 30 %. A las 24-hpe, no sobrevivió ninguno de los embriones de los grupos de 8-hpf mientras que los embriones de 96-hpf microinyectados mostraron una supervivencia del  $32 \pm 10$  %, y los que solo fueron expuestos a la S1, del  $73 \pm 25$  %. Estos últimos dos valores difirieron significativamente entre sí, y se mantuvieron constantes hasta las 72-hpe (Figura 25, E). Al momento de la eclosión, ambos porcentajes disminuyeron ligeramente y se mantuvo la diferencia antes mencionada. En particular, la eclosión fue del  $70 \pm 26$  % para los embriones expuestos a S1 y del  $26 \pm 19$  % para los embriones microinyectados (Figura 25, F).



**Figura 25.** Microinyección de una solución crioprotectora en el vitelo de embriones de 8- (A) y 96-hpf (B) de *O. bonariensis*. Efecto sobre la supervivencia y la eclosión de embriones incubados normalmente (C, D) y de embriones enfiados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora (E, F). Letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo posmicroinyección o posenfriamiento (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 2.5.7 Enfriamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con microinyección

### 2.5.7.1 Supervivencia posenfriamiento

Se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia embrionaria en T10 y T11 después del enfriamiento y estos valores no difirieron del grupo control durante el tiempo de incubación. La supervivencia en T9 y T12 fue menor que en el control ( $p < 0,05$ ). Particularmente, la supervivencia de T9 fue de  $55,81 \pm 2,19\%$  inmediatamente después del enfriamiento y disminuyó ligeramente a  $49,75 \pm 11,74$  durante la incubación (24- y 72-hpe). En el caso de T10 y T11, la supervivencia fue inicialmente de  $76,77 \pm 8,75\%$  y  $80,61 \pm 20,07$  (0- y 24-hpe)

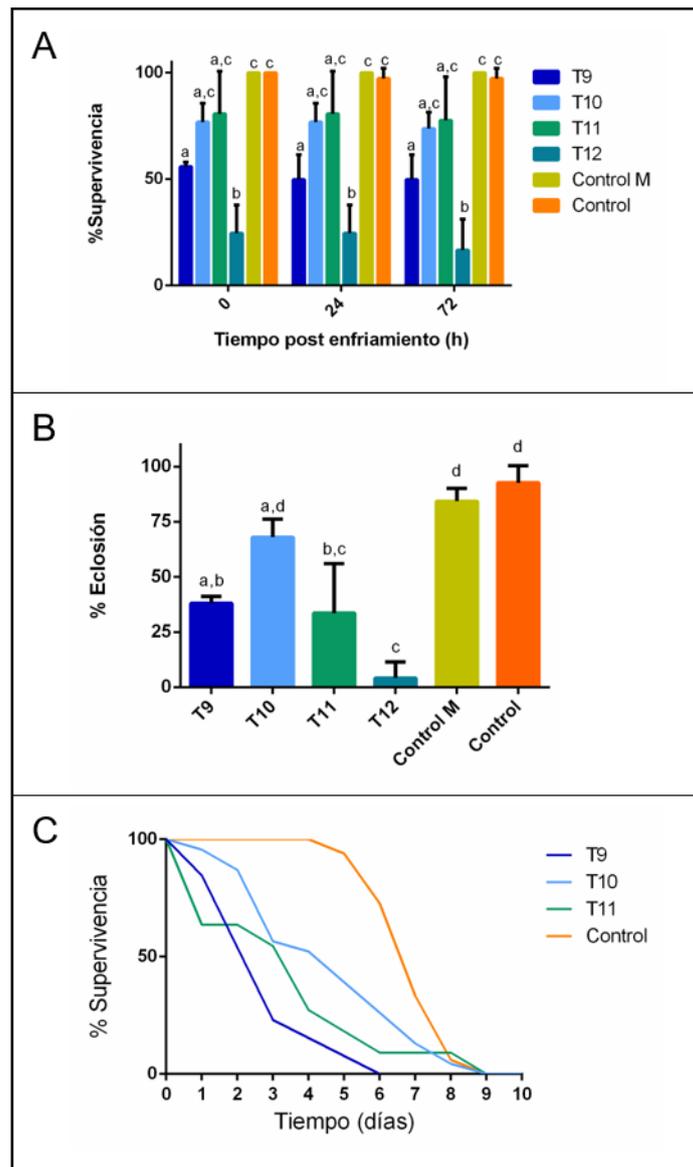
y, luego disminuyó a  $73,74 \pm 7,62\%$  y  $77,57 \pm 20,44\%$  (72-hpe), respectivamente. Con respecto a T12, inicialmente la supervivencia fue del  $24,54 \pm 13,20\%$  (0- y 24-hpe) y luego disminuyó a  $16,67 \pm 14,43\%$  (72-hpe). La supervivencia del grupo control fue del  $97,22 \pm 4,81\%$  a lo largo de la incubación (24- y 72-hpe, Figura 26, A).

#### 2.5.7.2 *Eclosión*

Solo T10 presentó una tasa de eclosión alta similar a la observada para el grupo control. Particularmente, las tasas de eclosión de T10 y del control fueron  $67,93 \pm 8,31\%$  y  $92,59 \pm 7,73\%$ , respectivamente. Los porcentajes de T9 y T11 fueron más bajos que los mencionados anteriormente ( $38,13 \pm 3,06\%$  y  $33,64 \pm 22,40\%$ , respectivamente), mientras que T12 mostró la menor tasa de eclosión de todos los tratamientos ( $4,17 \pm 7,22\%$ , Figura 26, B).

#### 2.5.7.3 *Supervivencia larval*

Se observó mortalidad temprana en las larvas obtenidas de los embriones enfriados. Particularmente, los PNR T9, T10, T11 y control fueron 2,15, 4,32, 3,11 y 6,4 días, respectivamente (Figura 26, C).

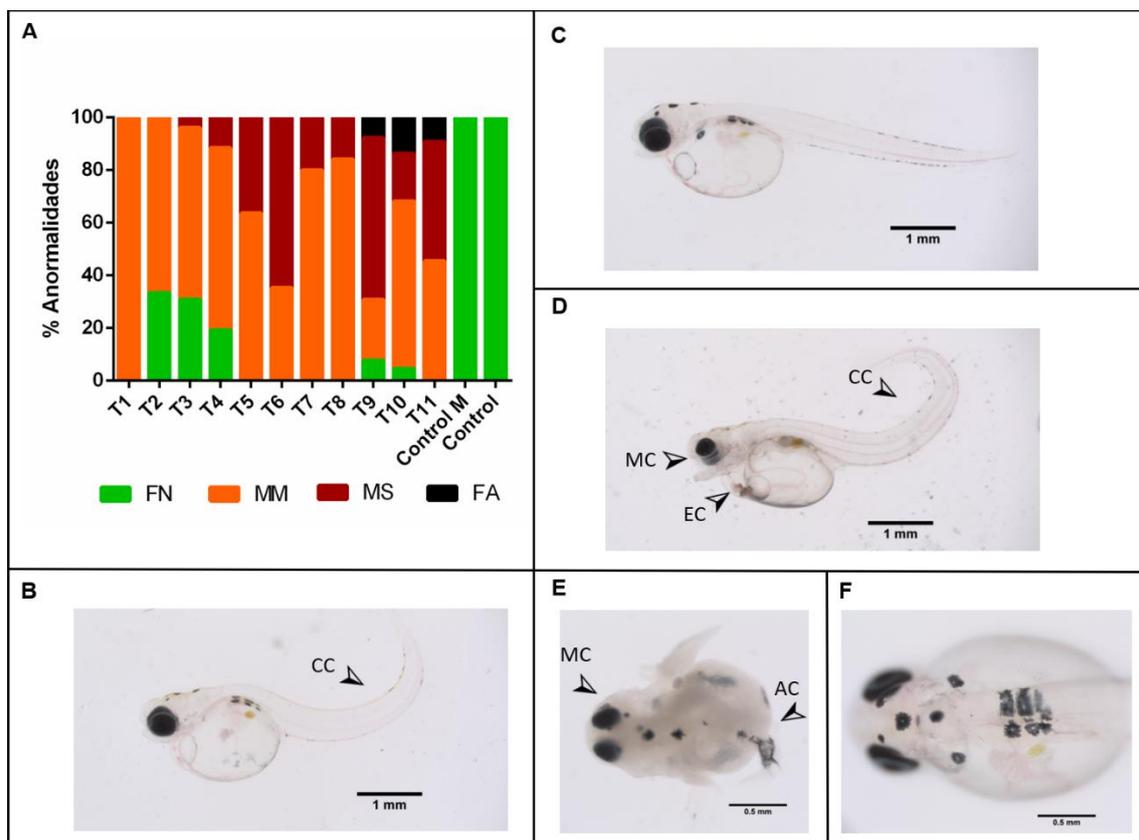


**Figura 26.** Efecto del enfriamiento  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  con microinyección sobre la supervivencia embrionaria (A), la eclosión (B) y la supervivencia larval (C) en *O. bonariensis*. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 2.5.8 Morfología larval

En algunas de las larvas provenientes de los embriones enfriados se observaron diferentes tipos de anomalías (Figura 27). En el caso de aquellas provenientes del grupo T1, todas presentaron cola enrollada (Figura 27 A, B) mientras que en los grupos T2, T3 y T4 hubo algún porcentaje de larvas de aspecto normal (33,3, 30,8, y 19,2%, respectivamente, Figura 27 A, C). Por otro lado, todas las larvas provenientes de embriones enfriados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin microinyección, presentaron malformaciones moderadas (colas enrolladas, Figura 27 A, B) y severas (colas enrolladas más edema cardíaco y anomalías craneofaciales, Figura 27 A, D). La mayor frecuencia de

malformaciones moderadas (80,0 y 84,2%) fue observada en los grupos de enfriamiento lento (T7 y T8, respectivamente, Figura 27 A). Cabe resaltar que algunas larvas provenientes de los grupos microinyectados y enfriados rápidamente (T9 y T10) presentaron fenotipo normal (7,7 y 4,5%, respectivamente, Figura 27 A, C). Sin embargo, en estos mismos grupos (T9 y T10) se hallaron larvas con fenotipo aberrante (7,7 y 13,6%, respectivamente, Figura 27 A, E). Por último, todas las larvas provenientes de ambos grupos control (Control y Control M) presentaron fenotipo normal (Figura 27 A, C, F).



**Figura 27.** Frecuencia (A) y fotomicrografías representativas (B-F) de larvas con malformaciones. B, C, D: Vista lateral de larvas con malformación moderada (MM), fenotipo normal (FN), y malformación severa (MS), respectivamente. E, F: Vista dorsal de larvas con fenotipos aberrante (FA) y normal (FN), respectivamente. Las puntas de flecha indican las anomalías observadas: cola curvada (CC), malformación craneofacial (MC), edema cardíaco (EC), y ausencia de cola (AC).

#### 2.5.9 Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de enfriamiento

En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos en esta sección de ensayos en cuanto a eclosión y PNR respecto del grupo control en los protocolos de enfriamiento a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además, se indica la proporción de larvas con aspecto normal y/o malformaciones obtenidas.

**Tabla 7.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de enfriamiento a -14 °C.

Trat.	SC	Enfriamiento	Microinyección	Temp. final	Eclosión	PNR	Larvas viables/ Malformaciones
T1	S1	Rápido	No	-14°C	=	=	100% cola enrollada/curvada
T2	S2				↓	=	33% aspecto normal
T3	S1	Lento			=	=	31% aspecto normal
T4	S2				=	=	19% aspecto normal

Así, el mejor tratamiento de los ensayados para el enfriamiento a -14 °C fue el T3 ya que no se observaron diferencias en los parámetros de eclosión ni de supervivencia larval (PNR) respecto del control y, se obtuvo hasta un 31% de larvas de aspecto normal.

En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos en esta sección de ensayos en cuanto a eclosión y PNR respecto del grupo control en los protocolos de enfriamiento a -20 °C. Además, se indica la proporción de larvas con malformaciones severas obtenidas.

**Tabla 8.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de enfriamiento a -20 °C

Trat.	SC	Enfriamiento	Microinyección	Temp. final	Eclosión	PNR	Malformaciones
T5	S1	Rápido	No	-20°C	↓↓	↓↓	36% Severas
T6	S2				=	↓↓	65% Severas
T7	S1	Lento			=	↓	20% Severas
T8	S2				=	↓	16% Severas

Así, los mejores tratamientos de los ensayados para el enfriamiento a -20°C fueron T7 y T8, ya que no mostraron un descenso en sus tasas de eclosión; sus PNRs fueron los más cercanos al del grupo control; y presentaron la menor prevalencia de malformaciones severas.

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos en esta sección de ensayos en cuanto a eclosión y PNR respecto del grupo control en los protocolos de enfriamiento a -20 °C con microinyección. Además, se indica la proporción de larvas con aspecto normal y con malformaciones severas obtenidas.

**Tabla 9.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de enfriamiento a -20 °C con microinyección.

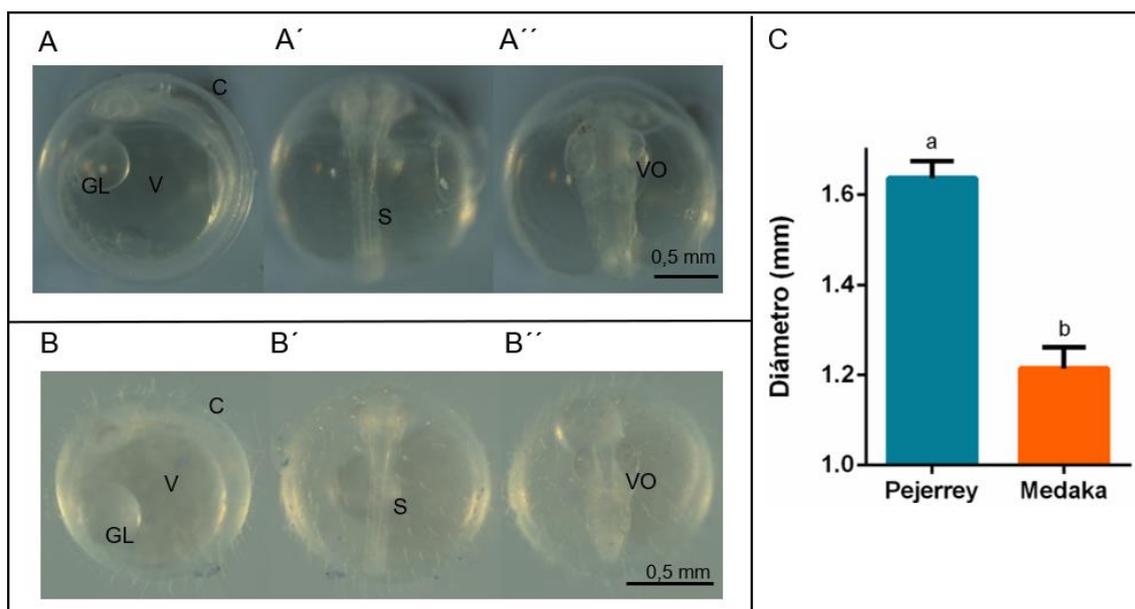
Trat.	SC	Enfriamiento	Microinyección	Temp. final	Eclosión	PNR	Larvas viables/ Malformaciones
T9	S1	Rápido	Si	-20°C	↓↓	↓↓↓	8% aspecto normal; 60% malf. severas
T10	S2				=	↓	4,5% aspecto normal; 31% malf. severas
T11	S1	Lento			↓↓	↓↓	54% malf. severas

T12	S2				↓↓↓	S/D	S/D
-----	----	--	--	--	-----	-----	-----

Así, el tratamiento que mostró el mejor resultado en el enfriamiento a -20 °C con microinyección fue el T10, ya que no se vio disminuida la tasa de eclosión y el PNR fue el más cercano al del grupo control. Además, este tratamiento presentó un porcentaje de larvas de aspecto normal, y la menor prevalencia de malformaciones severas.

#### 2.5.10 Estudio comparativo con embriones de medaka

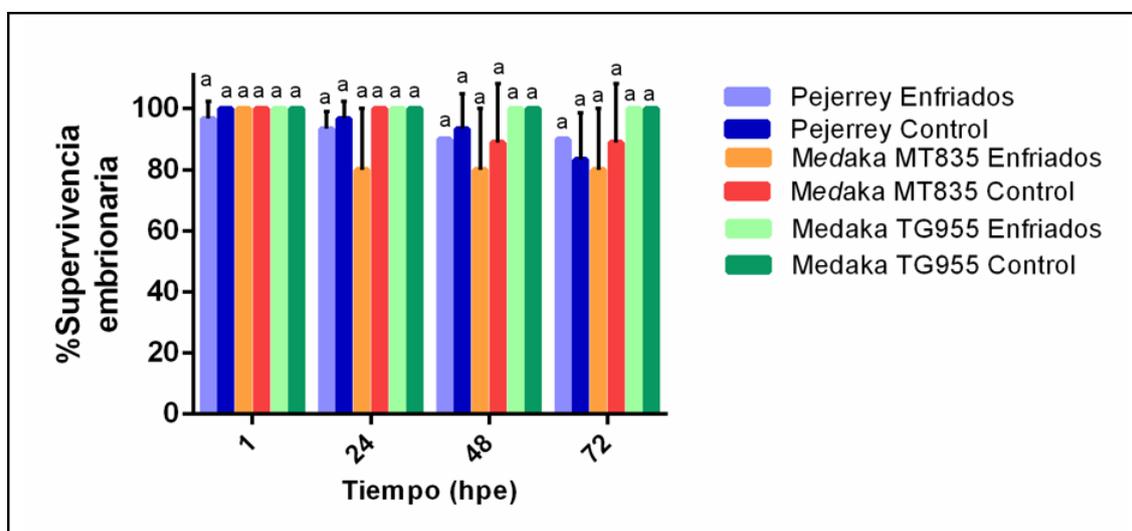
Se observó una gran similitud morfológica entre el estadio 22 de medaka (Iwamatsu, 2004) y los embriones de 96-hpf de pejerrey (Figura 28 A, B). Respecto del tamaño, se observó que los embriones de pejerrey presentaban mayor diámetro ( $1,64 \pm 0,04$  mm) que los de medaka ( $1,21 \pm 0,05$  mm, Figura 28 C).



**Figura 28.** Fotomicrografías representativas de embriones de pejerrey de 96-hpf, 20 °C (A) y medaka de estadio 22 (B) y comparación de su diámetro embrionario (C). Fotomicrografías en vista lateral (A, B), dorsal (A', B'), y detalle de la región anterior (A'', B''). C: corion; V: vitelo; GL: gota lipídica; S: somitos; VO: vesícula óptica. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

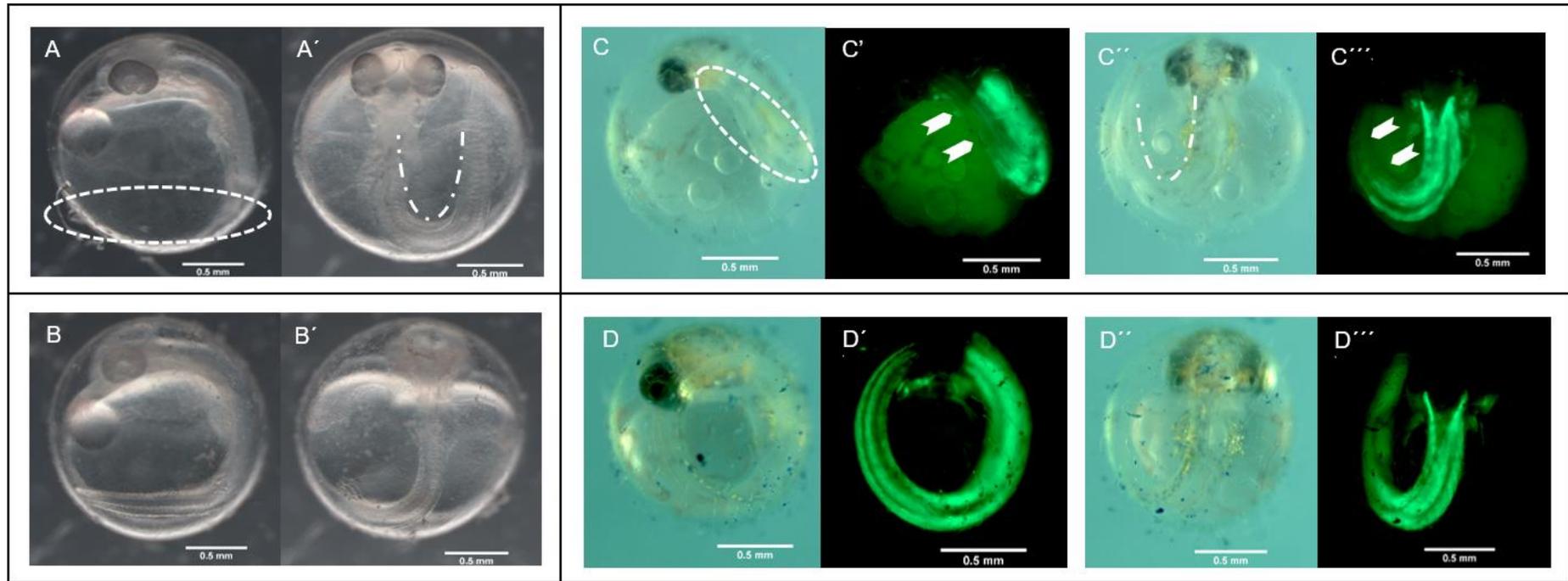
Asimismo, se observó que los embriones de medaka de ambas líneas, Himedaka y TG955, presentaron una buena tolerancia al protocolo de enfriamiento hasta -20 °C evaluado previamente en los embriones de pejerrey. Todos los grupos mostraron una supervivencia en torno al 100% a la hora posterior al enfriamiento (1-hpe). La misma descendió a 80-90% a las 72-hpe,

excepto en ambos grupos de embriones de la línea TG955 de medaka que se mantuvo en 100%. Cabe resaltar que no se hallaron diferencias entre los grupos enfriados y los grupos control, ni entre los grupos de embriones de medaka respecto de los de pejerrey ( $p < 0,05$ , Figura 29).



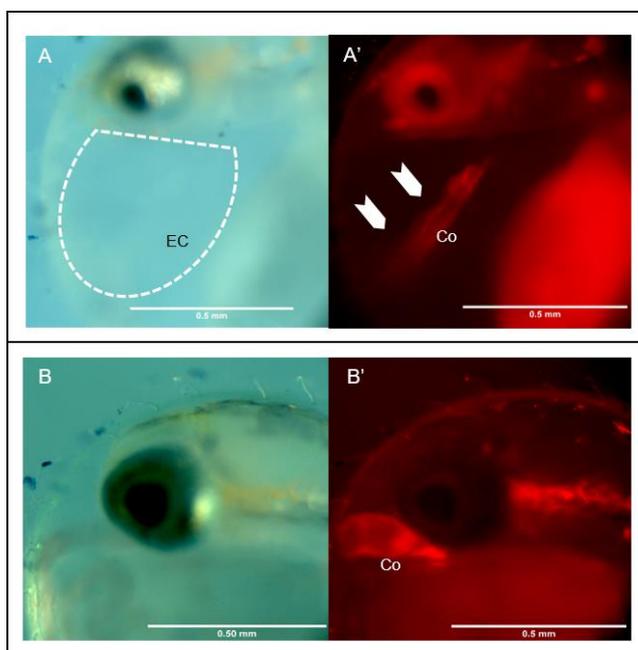
**Figura 29.** Efecto del enfriamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1-hora sobre la supervivencia de los embriones de pejerrey y medaka. Letras distintas indican diferencias significativas para un mismo tiempo (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

Los embriones enfriados de pejerrey presentaron posición y curvatura atípica de la región caudal (Figura 30, A, A') respecto del grupo control (Figura 30, B, B'). Del mismo modo, en los embriones de medaka enfriados se observaron las mismas alteraciones recién mencionadas y también el acortamiento de dicha región (Figura 30, C, C') al compararlos con los embriones no enfriados (Figura 30, D, D'). Además, en los embriones de medaka TG955 enfriados se evidenció la pérdida de fluorescencia en la región caudal (Figura 30, C', C'') respecto de los embriones control (Figura 30, D', D''). Esto último sería indicativo de musculatura defectuosa.



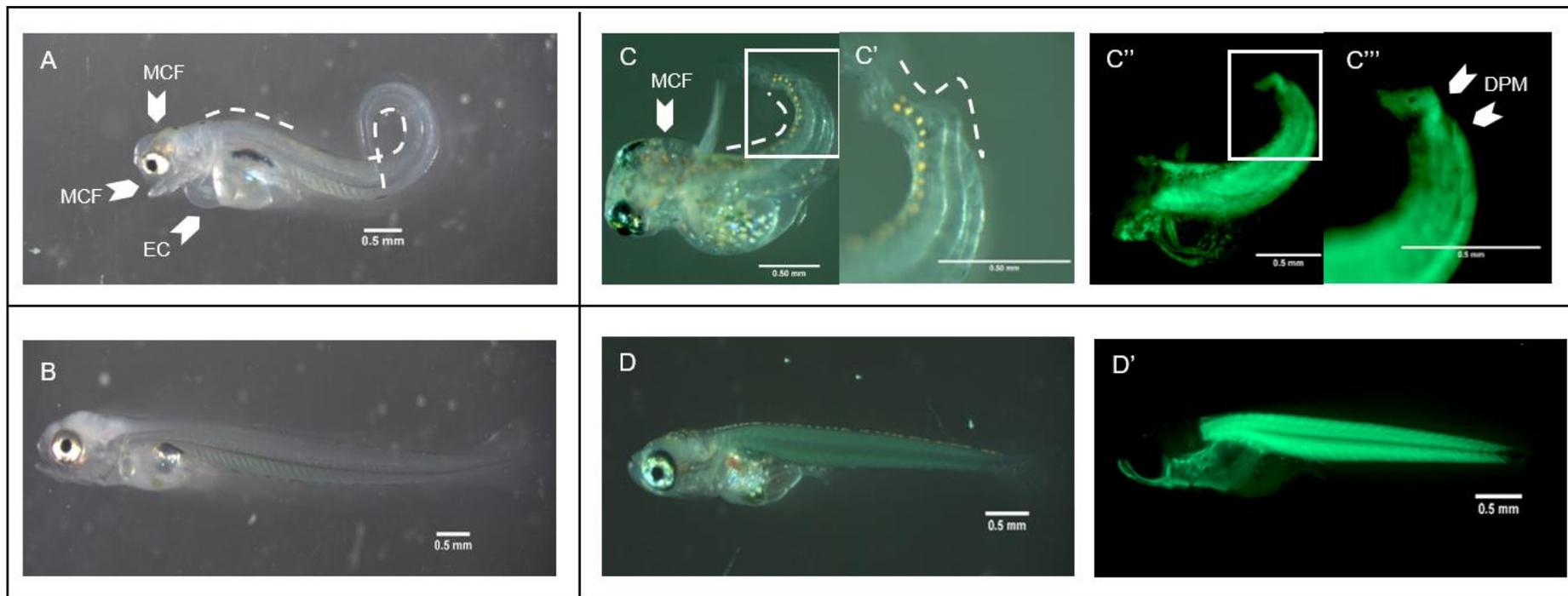
**Figura 30.** Fotomicrografías representativas de embriones de *O. bonariensis* (A, B) y *O. latipes* TG955 (C, D), enfriados (A, C) y control (B, D), a las 24-hpe, en vista lateral (A, B, C, D) y dorsal (A', B', C'', D'). Las líneas punteadas indican la posición y curvatura atípica de la región caudal respecto del control. Las fotomicrografías de los paneles C', C'', D', y D''' corresponden al mismo embrión del panel ubicado inmediatamente a su izquierda observado bajo fluorescencia. Las flechas señalan la disminución de la fluorescencia en la región caudal respecto del control.

Adicionalmente, en algunos embriones de medaka enfriados se registró la presencia de edema cardíaco (Figura 31, A) al compararlos con el grupo control (Figura 31, B). En los embriones de la línea TG955 que presentaron esta alteración pudo observarse que el corazón no se había plegado de la forma esperada (Figura 31, A', B').



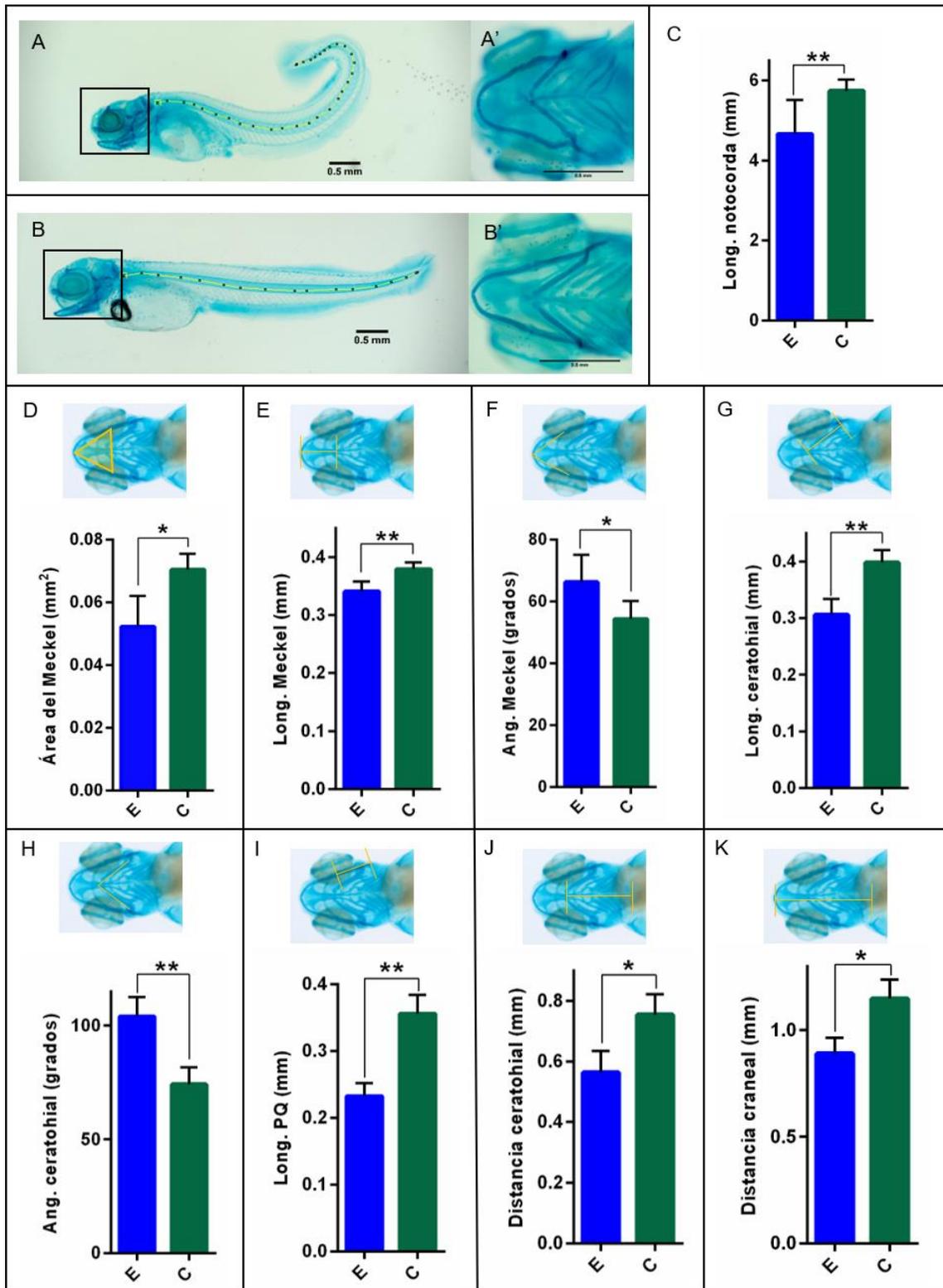
**Figura 31.** Fotomicrografías representativas de la cavidad cardíaca en embriones de *O. latipes* TG955, enfriados (A) y control (B), a las 24-hpe, en vista lateral. Los paneles A' y B' corresponden al mismo embrión observado con fluorescencia. La línea punteada indica la presencia de un edema cardíaco (EC) y las flechas, la ausencia del normal plegado del corazón (Co) respecto del control.

Como ya se había observado previamente, las larvas de pejerrey provenientes de embriones enfriados presentaron edema cardíaco, malformaciones craneofaciales, y curvatura del eje corporal y de la región caudal (Figura 32, A) en comparación con las larvas del grupo control (Figura 32, B). Del mismo modo, en las larvas de medaka provenientes de embriones enfriados se observó malformación craneofacial, curvatura y acortamiento de la región caudal (Figura 32, C, C') con respecto a las larvas de aspecto normal (Figura 32, D). En las larvas provenientes de los embriones de medaka TG955 enfriados se detectó la desorganización de los paquetes musculares de la región recién mencionada (Figura 32, C'', C''') al compararlas con las larvas provenientes de los embriones control (Figura 32, D').



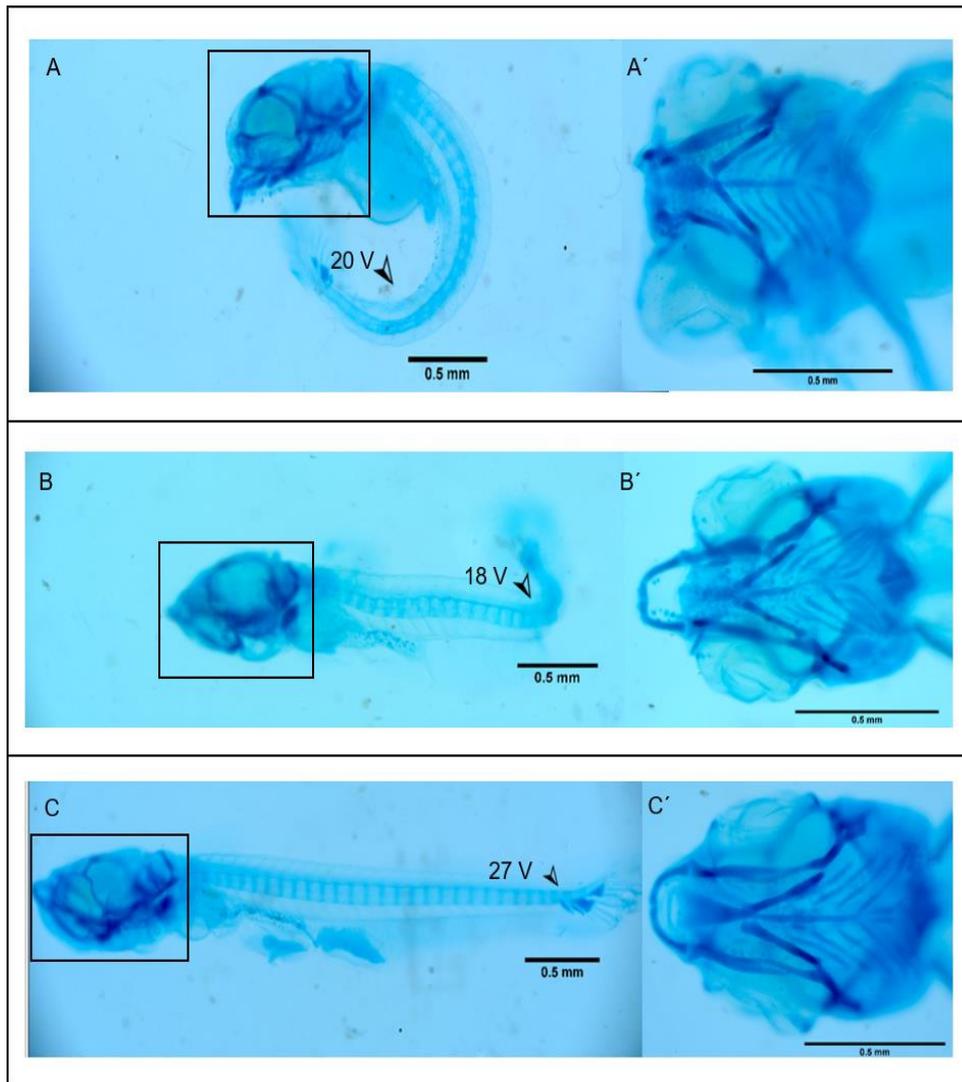
**Figura 32.** Fotomicrografías representativas de larvas de *O. bonariensis* (A, B) y de *O. latipes* TG955 (C, D) provenientes de embriones enfriados (A, C) y de embriones control (B, D) en vista lateral. Las líneas punteadas indican curvaturas en la región torácica y caudal respecto del control. Las flechas señalan la presencia de malformaciones craneofaciales (MCF), edema cardíaco (EC), y desorganización de los paquetes musculares (DPM). Las fotomicrografías de los paneles C' y C''' muestran en detalle la zona de la larva enmarcada en C y C'', respectivamente. Los paneles C'', C''', y D' corresponden a las mismas larvas de los paneles C, C', y D, fotografiadas bajo fluorescencia.

En las larvas de pejerrey provenientes de embriones enfriados se observaron, una vez más, colas curvadas (Figura 33, A) y malformaciones craneofaciales (Figura 33, A') en comparación con las larvas del grupo control (Figura 33, B, B'). La curvatura del eje corporal fue caracterizada mediante la medición de la notocorda, hallándose que en las larvas con anomalías presentaba menor longitud que en las larvas de aspecto normal (Figura 33, C). Asimismo, respecto de las malformaciones craneofaciales, se encontró que los valores correspondientes a: el área del Meckel; las longitudes de este último cartílago, del ceratohial y del palatocadrado, y las distancias ceratohial y craneal resultaron menores en las larvas provenientes de embriones enfriados respecto de aquellas que provenían de embriones no enfriados. Además, en las larvas con malformaciones se registró que los ángulos del Meckel y del ceratohial eran mayores que en las larvas del grupo control (Figura 33, D-K). Analizando estos resultados en conjunto, se puede concluir que las larvas provenientes de embriones enfriados presentaron cabezas más anchas y cortas que las larvas provenientes de embriones no tratados.



**Figura 33.** Tinción con *Alcian Blue* de larvas de *O. bonariensis* provenientes de embriones enfríos (A) y control (B). Los paneles A' y B' corresponden a un detalle, en vista ventral, de la cabeza de las larvas de los paneles A y B. (C-K) Mediciones de: longitud de la notocorda; área, longitud y ángulo del Meckel, longitud y ángulo del ceratohial; longitud del palatocadrado + hiosimpléctico (PQ); y distancias ceratohial y craneal, respectivamente. En las microfotografías está señalado con amarillo las distancias, ángulos y áreas evaluadas. Las columnas nombradas como "E" y "C" corresponden a los grupos "enfríos" y "control". Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba *t* de *Student*, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ).

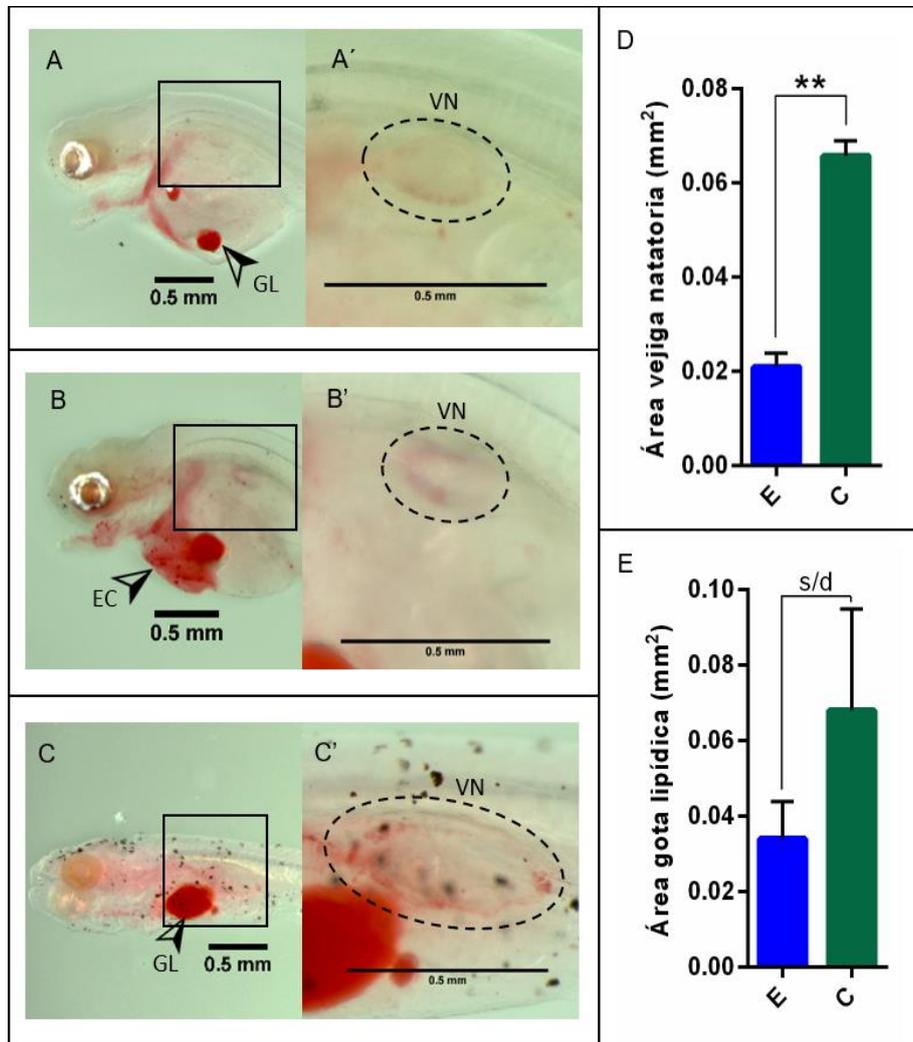
En el caso de las larvas de medaka provenientes de embriones enfriados, se observó, nuevamente, la curvatura atípica del eje corporal respecto de las larvas control. Asimismo, se halló que esta malformación se correspondía con un menor número de vértebras en comparación con las larvas de aspecto normal. En estas larvas, la osificación vertebral dejó de ser visible a partir de las vértebras 18-20 (Figura 34, A, B), mientras que en el grupo control se contabilizaron 27 vértebras (Figura 34, C). Además, en las larvas provenientes de embriones enfriados se detectaron malformaciones craneofaciales (Figura 34, A', B') que las diferenciaron de aquellas provenientes del grupo sin tratar (Figura 34, C'). Estas malformaciones fueron semejantes a las descritas previamente en pejerrey.



**Figura 34.** Tinción con *Alcian Blue* y conteo de vértebras de larvas de *O. latipes* provenientes de embriones enfriados (A, B) y control (C). Las puntas de flecha señalan el máximo número de vertebras (V) que pudieron ser contabilizadas. Los paneles A', B', y C' corresponden a detalles de la cabeza, en vista ventral, de las mismas larvas de las fotomicrografías de los paneles A, B y C, respectivamente.

Por último, en las larvas de pejerrey provenientes de embriones enfriados, gracias a la tinción con *O-Red-Oil*, pudo observarse su vejiga natatoria y la presencia de lípidos en otros compartimentos de su organismo como la gota lipídica y la cavidad cardíaca (Figura 35, A, B). Estas observaciones fueron comparadas con las de las larvas del grupo control (Figura 35, C). En particular, en algunas de las larvas con edema cardíaco, se detectó que su contenido era lipídico (Figura 35, B). A su vez, se observó que la vejiga natatoria (Figura 35, A', B', C') de las larvas con malformaciones presentó menor área que la de las larvas de aspecto normal (Figura 35, D). Esto indicaría que la vejiga natatoria se haya desinflada. Por otro lado, en el

grupo de las larvas provenientes de embriones enfriados se observó una tendencia a poseer una gota lipídica de menor tamaño que las larvas del grupo sin tratar (Figura 35, E).



**Figura 35.** Tinción con *Oil-Red-O* de larvas de *O. bonariensis* provenientes de embriones enfriados (A, B) y control (C). Las puntas de flecha señalan la gota lipídica (GL) y un edema cardíaco (EC). Los paneles A', B', y C' muestran un detalle de la vejiga natatoria (VN - señalada con línea punteada-) correspondiente a las mismas larvas de las fotomicrografías de los paneles A, B, y C, respectivamente. Medición del área de la vejiga natatoria (D) y de la gota lipídica (E) de larvas de pejerrey provenientes de embriones enfriados. Las columnas nombradas como "E" y "C" corresponden a los grupos "enfriados" y "control". Los asteriscos indican diferencias significativas (prueba t de *Student*, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , s/d: sin diferencia).

## 2.6 Discusión

En este primer capítulo se abarcaron diferentes aspectos relacionados con el trabajo con embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) en condiciones de laboratorio; desde la puesta a punto de su incubación, pasando por los ensayos de enfriamiento a temperaturas bajo cero y el seguimiento de

su desarrollo embrionario, hasta la evaluación de la calidad larvaria y el estudio de las anomalías halladas, realizando un estudio comparativo con embriones de otra especie emparentada, el medaka (*Oryzias latipes*). En particular, cabe resaltar que en este trabajo de Tesis fue posible enfriar y almacenar con éxito embriones de pejerrey en estadio medio (vesículas ópticas) durante una hora a -14 y -20 ° C, aplicando dos curvas de enfriamiento y dos formas de suministro de las soluciones crioprotectoras.

Respecto de la incubación de embriones en condiciones de laboratorio, hay elementos como el Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, y K<sup>+</sup> que resultan esenciales para los peces. En las larvas y adultos, una parte de ellos son incorporados con la dieta [78]. Sin embargo, en los embriones, estos elementos son captados desde el agua [79,80]. Se ha reportado que cuando existe deficiencia de un elemento esencial en el medio de incubación, se produce una disrupción del desarrollo embrionario que conlleva a la muerte del individuo [81]. De manera similar a lo mencionado previamente, en esta Tesis se halló que el agua destilada con el agregado de NaCl, como se había empleado en un trabajo previo [56], no resultó un medio adecuado para permitir el correcto desarrollo de los embriones de *O. bonariensis*. De hecho, Pacheco-Marino y Salibián emplearon agua dura reconstituida para la incubación de embriones de pejerrey [82]. Recientemente, en concordancia con este hecho, y con los resultados aquí expuestos, en el Garriz y Miranda reportaron la incubación con éxito de embriones y larvas de pejerrey en el agua corriente declorada de Chascomús [83], caracterizada por su dureza y alcalinidad. Estos resultados en conjunto permiten concluir que es necesaria un agua dura y alcalina para la adecuada incubación de estadios tempranos del desarrollo de esta especie.

Por otro lado, en relación a la salinidad, se conoce que *O. bonariensis* presenta un amplio rango de tolerancia, que va desde el agua dulce hasta salinidades semejantes a la del agua de mar. Además, se ha reportado que cuando los embriones son incubados en agua dulce suelen aparecer crecimientos de color blanco y aspecto algodonoso sobre el corion que se tratarían probablemente de hongos [63]. Por ello, teniendo en cuenta su amplio rango de tolerancia, y que la salinidad puede actuar como antifúngico [82], en

esta Tesis se empleó con buenos resultados una salinidad de 5 g/l como habían hecho previamente Chalde y col. [43].

En relación a la incubación de embriones de pejerrey a muy pequeña escala en condiciones de laboratorio, resultó conveniente la confección de canastillas de malla plástica, facilitando el acceso a los embriones desde la parte superior y permitiendo que los mismos recibieran una correcta oxigenación. De forma semejante a lo aquí expuesto, una metodología similar había sido empleada anteriormente por Tsuzuki y col. [63].

Respecto de la criopreservación, Strüssmann y col. habían reportado anteriormente el congelamiento de blastómeros aislados de embriones de pejerrey durante 90 minutos a -75 °C, obteniendo una supervivencia del 67%. Sin embargo, la misma decayó luego rápidamente en torno al 20% [53]. Por otro lado, no existe hasta el momento ningún informe sobre el congelamiento del embrión completo. A pesar de las desventajas que presenta el embrión de pejerrey para su enfriamiento, como lo son su gran tamaño (1,6-1,7 mm de diámetro [43]) y un corion grueso (> 28  $\mu\text{m}$  [84]) y duro, en este estudio fue posible obtener altas tasas de supervivencia embrionaria (80-100%) y eclosión (68-80%) en prácticamente todos los ensayos de enfriamiento realizados.

Se conoce que, a bajas temperaturas, las células sufren diferentes tipos de lesiones, incluidos daños estructurales y metabólicos [10]. Se ha reportado que el daño por frío disminuye gradualmente a medida que avanza el desarrollo en embriones de *Cyprinus carpio* [10,85], *Danio rerio* [6,86], y *O. latipes* [87]. Los embriones de *C. carpio* en el estadio con latido cardíaco han exhibido la menor sensibilidad a las bajas temperaturas [10]. En concordancia con estos hallazgos, los embriones de pejerrey de los estadios más tempranos (8- y 48-hpf, 20 °C) mostraron la menor tolerancia al enfriamiento, presentando malformaciones severas y una alta tasa de mortalidad temprana. En cambio, los embriones en estadio medio (96-hpf, 20 °C), seleccionados a partir de los primeros ensayos, toleraron los protocolos de enfriamiento mostrando altas tasas de supervivencia y eclosión. En ensayos de enfriamiento en otras especies como *O. latipes*, *Piaractus brachypomus*, *Steindachneridion parahibae* y *Epinephelus moara*, se han empleado con éxito estadios embrionarios similares al seleccionado en este trabajo [26,29,87,88].

La toxicidad y la permeabilidad del DMSO en embriones de pejerrey han sido estudiadas anteriormente por Suzuki y colaboradores (1995) demostrando que estos embriones pueden tolerar altas concentraciones del mismo (2 M) [9]. Además, se ha observado que la exposición previa de los embriones a trehalosa 1 M aumentó la absorción del DMSO [54]. Asimismo, la combinación de un crioprotector interno (DMSO o metanol) con uno externo (sacarosa) ofreció protección contra los daños causados por el frío en embriones de *D. rerio* [86] y de *C. carpio* [10]. Con respecto a esta combinación, el efecto beneficioso de la sacarosa puede estar relacionado con un nivel moderado de deshidratación que ayuda a proteger las membranas celulares a bajas temperaturas [10].

Las concentraciones de los componentes crioprotectores de las soluciones empleadas en este trabajo de Tesis fueron similares a las utilizadas en estudios previos con buenos resultados [22,26–29,87–89]. Además, las curvas de enfriamiento del presente estudio fueron: una lenta, similar a las utilizadas en el congelamiento de embriones de mamíferos [90], y una rápida, similar a la reportada por Alam y colaboradores (2018) en ensayos de enfriamiento de embriones de *Sillago japonica* [20].

Respecto a la temperatura de almacenamiento final, se esperaba que la supervivencia y la eclosión fueran mayores en los ensayos a -14 °C en comparación con aquellos realizados a -20 °C, ya que la temperatura tiene una fuerte incidencia sobre estos parámetros [22]. En este sentido, los embriones de *P. brachypomus* y *S. parahybae* han presentado tasas de eclosión entre 50 y 70 % cuando se han almacenado hasta seis horas a una temperatura entre -5 y -10 °C [26,29]. Mientras que en las pruebas realizadas con embriones de *E. moara*, la tasa de supervivencia se redujo a alrededor del 20 % cuando se enfriaron a -26 °C durante 45 minutos [88].

Los resultados del presente estudio muestran que la mayoría de los tratamientos a -14 °C (T1, T3, T4) tuvieron tasas de supervivencia embrionaria y eclosión similares a las del grupo control. Solo los embriones que se expusieron a la solución que contenía DMSO y se enfriaron rápidamente (T2) tuvieron una ligera disminución en estos parámetros. En este caso, la adición de DMSO 1,4 M (10% v/v) podría estar resultando tóxico para los embriones.

En relación con esta observación, Zhang y Rawson (1995) informaron una reducción de la supervivencia de los embriones de *D. rerio* cuando emplearon este crioprotector para su enfriamiento [86]. Aunque nuestros resultados mostraron que los embriones de pejerrey presentaron menor sensibilidad al enfriamiento que embriones de otros peces como *D. rerio* [86], el enfriamiento rápido podría ser perjudicial para ellos. Por otro lado, en T3 y T4, se obtuvieron los mismos resultados con o sin DMSO cuando la curva de enfriamiento fue lenta. Entonces, se puede sugerir que la adición de DMSO podría no ser necesaria para este tipo de enfriamiento. En este sentido, será necesario a futuro evaluar diferentes curvas de enfriamiento. Además de las altas tasas de eclosión obtenidas, las larvas de todos los tratamientos presentaron un PNR similar al del grupo control y al reportado previamente por Gárriz y Miranda [83]. Asimismo, cabe destacar que en T2, T3 y T4 se halló entre un 20 y un 30% de larvas de aspecto normal, mientras que en ensayos de enfriamiento de embriones de *S. parahybae* durante seis horas a una temperatura promedio de  $-6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las larvas viables representaron el 12% de las eclosionadas [29].

Los embriones expuestos a la solución crioprotectora con DMSO y enfriados rápidamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (T6), a diferencia de lo observado para el enfriamiento a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no mostraron una diferencia en su tasa de eclosión con respecto al control. En este caso, la adición del DMSO parece ser importante para prevenir los daños causados por el frío. En este sentido, se conoce que las tasas de supervivencia y eclosión reflejan un equilibrio entre los efectos tóxicos y la acción benéfica de los crioprotectores a bajas temperaturas [10]. En el caso de la curva de enfriamiento lento, es posible sugerir nuevamente que la adición de DMSO podría no ser necesaria porque no se encontraron diferencias entre las tasas de eclosión de los tratamientos T7 y T8. A pesar de que en general las tasas de eclosión fueron buenas, las larvas obtenidas a partir de embriones enfriados  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  presentaron mortalidad temprana. En este sentido, las larvas nacidas de embriones enfriados con la curva lenta (T7 y T8) presentaron PNR más altos y menor prevalencia de malformaciones severas que aquellas provenientes de embriones enfriados rápidamente (T5 y T6). Este hecho podría explicarse debido a que los crioprotectores pudieron difundir más tiempo dentro de los embriones antes de que estos alcanzaran la temperatura

final (-20 °C). Respecto a esto, Zhang y Rawson mencionaron que el efecto protector de los azúcares podría estar relacionado debido a la deshidratación de los embriones antes y durante el almacenamiento. Como resultado de esto, la cantidad de agua desplazada de las células sería mayor. Entonces, dicho volumen sería reemplazado por el DMSO o el metanol, evitando la formación de cristales de hielo intracelulares [86].

Es importante destacar los promisorios resultados obtenidos en *O. bonariensis* ya que es la primera vez que se obtienen altas tasas de supervivencia embrionaria y eclosión después de enfriar a -20 °C. La mayoría de los ensayos de enfriamiento publicados anteriormente fueron realizados a temperaturas entre 0 y -10 °C [10,22,26–29,89]. Además, Zhang y Rawson reportaron que la supervivencia de embriones de *D. rerio* fue nula luego de una hora de enfriamiento a -20 °C [86].

A fin de obtener protocolos de crioconservación exitosos, se ha informado que la microinyección de soluciones crioprotectoras puede ser una buena opción para superar las barreras físicas de los embriones de peces y lograr así una concentración adecuada y homogénea de los crioprotectores dentro del embrión [91]. Esta técnica se ha realizado con éxito en *D. rerio* [12,92,93], *Sparus aurata* [91,94], *Scophthalmus maximus* [95] y *S. japonica* [20]. También se ha reportado que la sacarosa no puede penetrar el corion de los embriones de *D. rerio* [86], y que el metanol puede difundir dentro del vitelo de estos embriones cuando han sido decorionados previamente [12]. En ese caso, la microinyección de los crioprotectores en el espacio perivitelino mejoraría el ingreso de los crioprotectores al vitelo y al embrión completo, sin ningún daño mecánico de estas estructuras.

Por lo tanto, a fin de optimizar los resultados obtenidos en pejerrey, las mismas soluciones crioprotectoras (S1 y S2) que se evaluaron en los protocolos de enfriamiento por exposición, se incorporaron a los embriones por microinyección. Los resultados demostraron que la microinyección de crioprotectores en el espacio perivitelino no mejoró la tasa de eclosión después del enfriamiento en comparación con la exposición directa (T6: 60 ± 10%; T10: 67.93 ± 8.31%). En este sentido, sería conveniente evaluar y cuantificar la cantidad efectiva de crioprotectores dentro de los embriones después de la

exposición y después de la microinyección, como se ha realizado en otros trabajos [9,12,54]. Además, es necesario resaltar que solo los embriones tratados con la solución con DMSO y enfriados rápidamente (T10) tuvieron una tasa de eclosión similar en comparación con el control. Los otros tres grupos (T9, T11, T12) probablemente fueron influenciados negativamente por la combinación de lesión mecánica causada por la microinyección más el daño por las temperaturas bajo cero del enfriamiento. Además, los embriones de T11 y T12, que fueron enfriados a -20°C mediante la curva lenta, tuvieron la menor tasa de eclosión probablemente debido también al largo tiempo de exposición a estas temperaturas sub-cero.

A pesar de que la microinyección de S1 y S2 no pudo optimizar los resultados del enfriamiento a -20 ° C, cabe resaltar que en T9 y T10 se obtuvo una pequeña proporción de larvas de aspecto normal. Además, se debe remarcar que los resultados obtenidos fueron más exitosos, en términos de temperatura y tiempo de almacenamiento y eclosión, que todos aquellos que se han presentado anteriormente en trabajos con otras especies. Los embriones de *S. aurata* y *S. japonica* han sido microinyectados con crioprotectores convencionales (DMSO, metanol, etilenglicol) y enfriados a -10 °C durante 20-30 minutos obteniendo una tasa de eclosión del 10-16% [20,94]. Asimismo, los embriones de *S. aurata* fueron microinyectados con proteína anticongelante del tipo I (AFPI) y enfriados a la misma temperatura durante 15 minutos, logrando el 60% de eclosión [91]. También, debe resaltarse que los embriones de pejerrey microinyectados mostraron una tasa de eclosión de alrededor del 70% con S2 en el enfriamiento rápido a -20 ° C (T10) y una hora de almacenamiento a esta temperatura.

Aunque no se encontró una disminución en la tasa de eclosión en la mayoría de los protocolos empleados, las larvas provenientes de embriones enfriados presentaron malformaciones. Estas incluyeron colas curvadas, edema cardíaco y malformaciones craneofaciales, similares a las que habían sido mencionadas previamente en aquellas provenientes de embriones triploides generados por shock térmico frío (temperaturas cercanas a 0 °C) [96]. Las malformaciones halladas en esta Tesis fueron más severas en los enfriamientos a -20°C que en aquellos a -14°C, y fueron semejantes a las

reportadas anteriormente en el enfriamiento de embriones de otras especies como *Brycon orbignyanus* [27], *S. parahybae* [29] y *D. rerio* [72]. Asimismo, debe tenerse en cuenta que, aunque una larva no presente alteraciones macroscópicas, el desarrollo de sus órganos y/o metabolismo podría estar alterado como fue reportado por Faria Paes y Satiko en *D. rerio* [72]. Es necesario continuar trabajando en la búsqueda de un protocolo de enfriamiento que minimice las alteraciones en el desarrollo ya que, aunque éstas puedan resultar no letales, podrían disminuir la capacidad de natación, alimentación, crecimiento y/o reproducción.

Los embriones de medaka de ambas líneas empleadas en este estudio presentaron alteraciones en el desarrollo similares a las mencionadas previamente para los embriones de pejerrey posenfriamiento como enrollamiento y/o acortamiento de la cola y presencia de edema cardíaco. Asimismo, en la línea TG955 de medaka se observó la pérdida de fluorescencia en la región caudal y la falta de plegamiento del corazón. Del mismo modo, las larvas de medaka provenientes de embriones enfriados presentaron fenotipos semejantes a los descritos previamente para pejerrey como colas curvadas, edema cardíaco, malformaciones craneofaciales y dificultad para nadar.

Se ha demostrado que los daños por enfriamiento son mayores en embriones de rápido desarrollo como los de algunos teleósteos tropicales [10]. Teniendo en cuenta que el desarrollo embrionario hasta el momento de la eclosión toma alrededor de 11 días a 19 °C en el pejerrey [49] y 10 días a 26 °C en el medaka [67], esto podría explicar en parte su alta tolerancia a los protocolos evaluados. Además, tanto en pejerrey como en medaka, se ha reportado que poseen una llamativa tolerancia a grandes amplitudes térmicas: desde 2 a 34 °C en el caso del primero [52], y desde 4 a 40 °C, en el caso del segundo [57].

Por último, considerando que el desarrollo del embrión de pejerrey conlleva más tiempo que en la mayoría de las especies de peces subtropicales mencionadas anteriormente, sería conveniente extender el tiempo de almacenamiento reduciendo, en lo posible, la aparición de malformaciones en las larvas obtenidas.

## 2.7 Conclusiones

En este capítulo se alcanzaron todos los objetivos planteados inicialmente:

1) se logró la incubación de embriones de pejerrey a pequeña escala y bajo condiciones de laboratorio;

2) se seleccionó al estadio 96-hpf (20 °C) como el más tolerante para los ensayos de enfriamiento;

3) se establecieron las mejores condiciones (solución crioprotectora y descenso de temperatura) para el enfriamiento a -14 y -20 °C;

4) se empleó la microinyección como método de incorporación de los crioprotectores;

5) se evaluó la calidad larvaria posenfriamiento y se estudiaron las anomalías halladas.

Además, se confirmó que el enfriamiento altera el desarrollo normal tanto de las estructuras preformadas (región cefálica y torácica) como de aquellas que derivan del mesodermo no segmentado al momento de realizar los ensayos. Por otro lado, dado que se hallaron resultados similares en ambas especies, podrían emplearse embriones de medaka para optimizar los protocolos en pejerrey. Esto permitiría realizar ensayos a lo largo de todo el año y no solo durante la época reproductiva del pejerrey. Por último, la utilización de líneas transgénicas para genes reporteros en medaka brinda la posibilidad de detectar de forma temprana las alteraciones producidas por el enfriamiento.

En resumen, este trabajo establece las bases para futuros desarrollos en el área e informa, por primera vez, un método novedoso como es la microinyección para incorporar crioprotectores u otros compuestos dentro del embrión de pejerrey *O. bonariensis*. A fin de lograr un protocolo de enfriamiento adecuado para los embriones de pejerrey, esta técnica podría aplicarse para introducir otros crioprotectores, como las proteínas anticongelantes (AFPs), tal como se ha realizado en *S. maximus* [95] y *S. aurata* [91], o en el empleo de

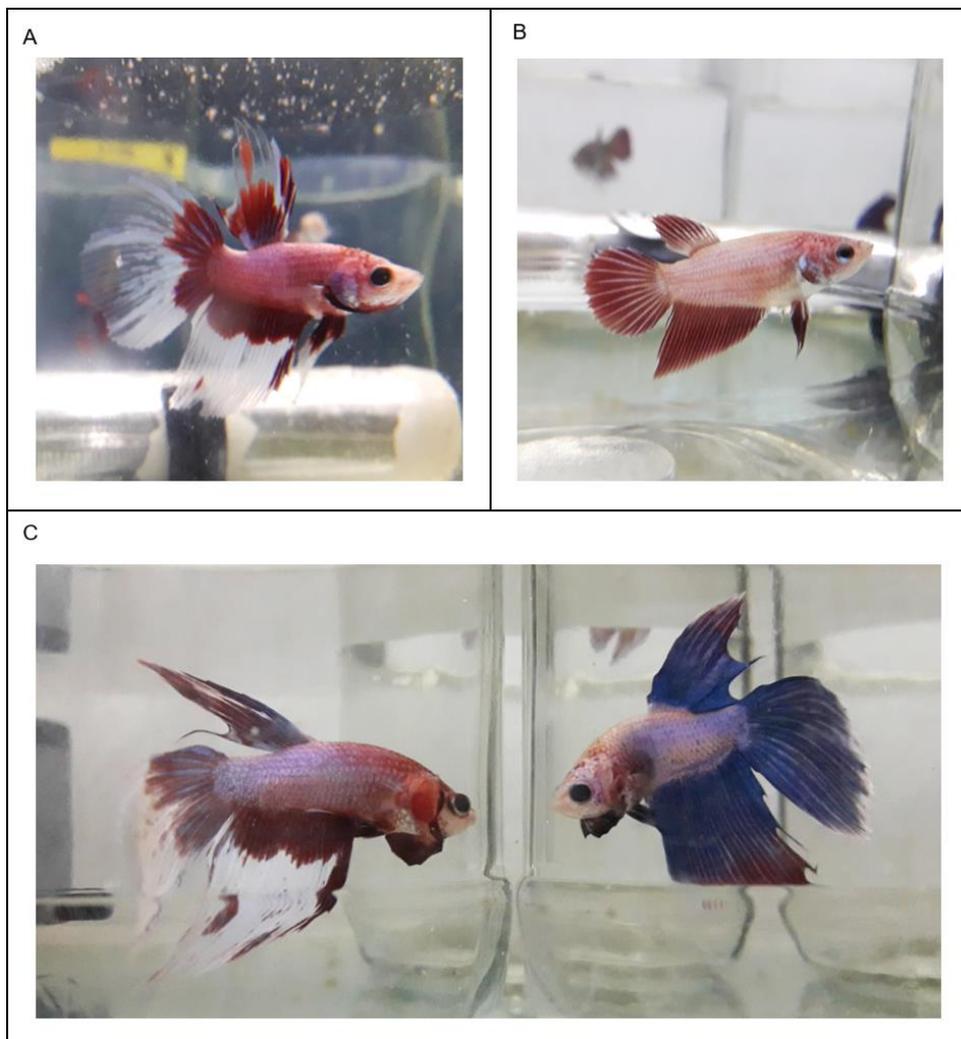
*nanorods* de oro y protocolos de vitrificación que han mostrado resultados prometedores [97,98].

### 3 Capítulo 2: Enfriamiento de embriones del pez beta (*Betta splendens*)

#### 3.1 Introducción

##### 3.1.1 El pez beta

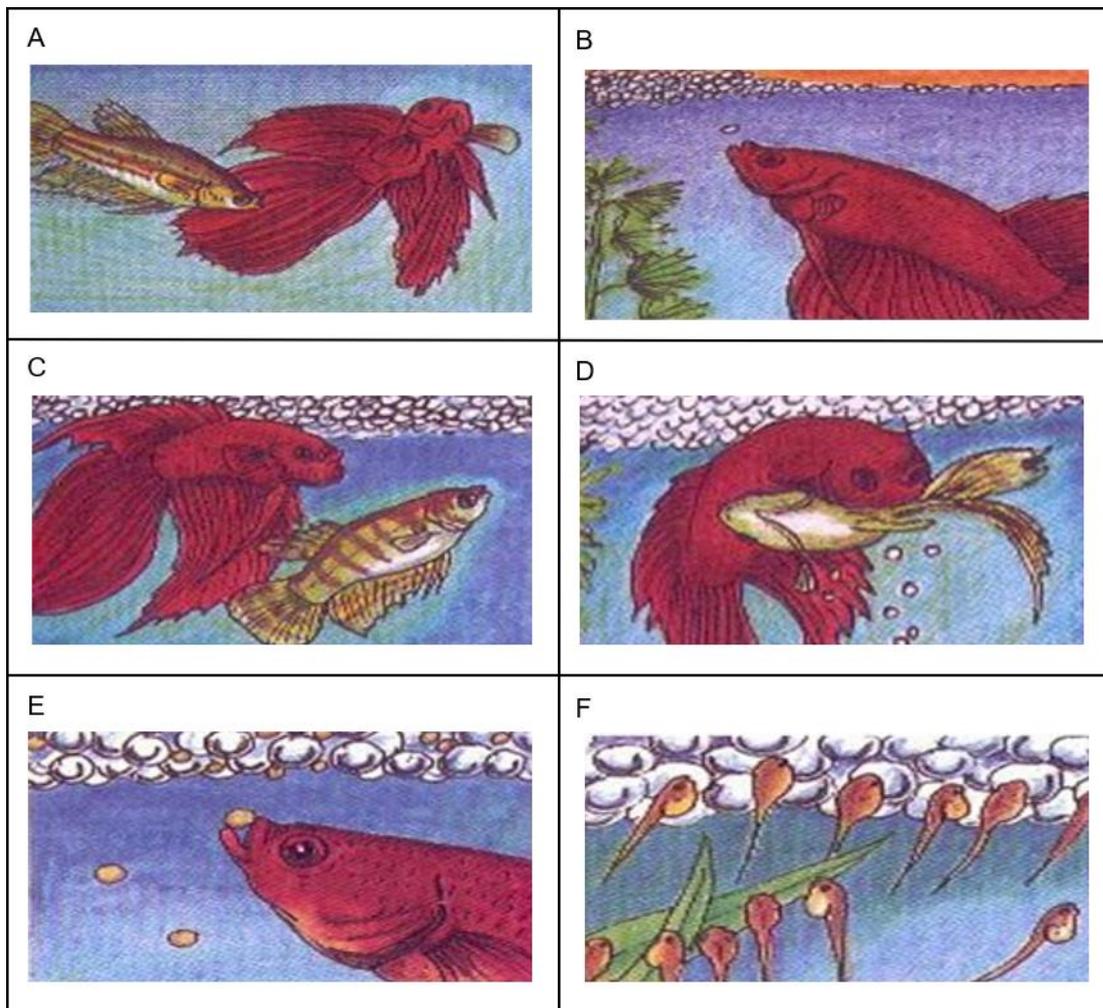
El pez beta (*Betta splendens*) es una especie de agua dulce perteneciente al orden Anabantiformes. Este grupo, también conocido como “peces laberíntidos”, se caracteriza por la presencia de un órgano suprabranquial llamado laberinto que les permite captar oxígeno atmosférico [30]. Además, *B. splendens*, es una de las especies más representativas de este grupo de teleósteos, y se la reconoce por su llamativo dimorfismo sexual (Figura 36, A, B) y por el comportamiento agresivo y territorial de los machos (Figura 36, C) [99–101].



**Figura 36.** Individuos adultos de pez beta, *Betta splendens*: (A) macho, (B) hembra, y (C) dos machos enfrentados.

### 3.1.2 Reproducción y desarrollo embrionario

En muchos trabajos se ha estudiado ampliamente el cortejo nupcial y el cuidado parental de las crías en *B. splendens* [99–101]. Respecto a la reproducción, el macho construye un nido de burbujas en la superficie del agua, en el cual adhiere uno a uno los huevos liberados por la hembra y los embriones se desarrollan bajo su cuidado [99,101,102]. La eclosión ocurre entre las 29- y 38-horas-post-fecundación (hpf) a 28 °C, de acuerdo a diferentes autores [103,104]. En la Figura 37 se muestra un esquema de los momentos previos y posteriores al desove.



**Figura 37.** Esquema del desove de *B. splendens*. (A) Cortejo del macho hacia la hembra extendiendo sus aletas y opérculos. (B) Construcción del nido de burbujas por parte del macho. (C) Acercamiento de la hembra receptiva al nido. (D) Abrazo nupcial y desove debajo del nido. (E) Adhesión de los embriones a las burbujas del nido por parte del macho. (F) Eclosión de las larvas en el nido bajo la supervisión del macho. Los dibujos fueron tomados y modificados de <https://bettafishzidan.wordpress.com/2012/10/28/betta-fish-farming/>

### 3.1.3 Cría del pez beta en cautiverio, acuarismo y comercio internacional

El pez beta es nativo del sudeste asiático y ha sido domesticado por siglos [102]. Su cría selectiva se ha orientado tanto con fines de lucha (combates entre peces macho) como ornamentales, buscando continuamente nuevos patrones de color y formas de aletas [104,105]. Este último aspecto es muy importante ya que el acuarismo de peces ornamentales se encuentra entre los *hobbies* más populares a nivel mundial [106]. En este sentido, de acuerdo a la FAO, la cría de animales acuáticos con fines ornamentales es una actividad económica bien establecida, distribuida mundialmente, y cuyo comercio involucra altos ingresos [2]. En este sentido, se ha reportado que el comercio de peces para acuario implica el movimiento de al menos 1,3 miles de millones de peces vivos por año alrededor del mundo, por un valor de 15 a 20 miles de millones de dólares estadounidenses. Además, se ha reportado que alrededor del 90% de las especies de peces de agua dulce que se comercializan son criadas en cautiverio [107]. En particular, *B. splendens* es una de las especies más populares, con alta demanda y mejor vendida dentro del acuarismo mundial [105,108].

### 3.1.4 El pez beta como especie modelo

Además de su importancia como pez ornamental, *B. splendens* se ha convertido también es una especie modelo de laboratorio. Se la ha empleado para estudios comportamentales relacionados a su reproducción y comportamiento agresivo, y también en ensayos de fisiología y toxicología relacionados con la prueba de fármacos y la exposición a contaminantes ambientales [109–111].

## 3.2 Hipótesis

Los embriones del pez beta (*Betta splendens*) pueden ser enfriados, empleando soluciones crioprotectoras, y dar lugar a larvas viables luego de cortos periodos de almacenamiento a bajas temperaturas.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 Objetivo general

Desarrollar e implementar protocolos de enfriamiento para embriones de pez beta (*Betta splendens*)

#### 3.3.2 Objetivos específicos

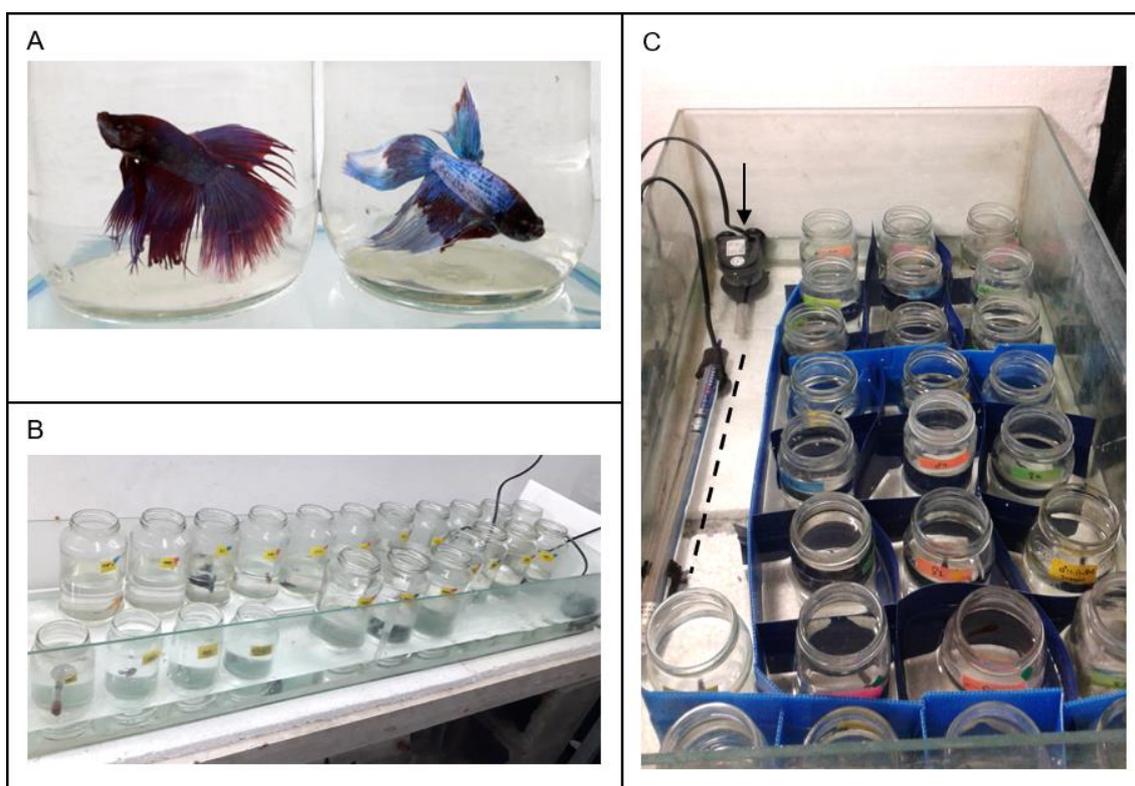
- 1) Evaluar la posibilidad de incubar a los embriones sin cuidado parental;
- 2) obtener oocitos y espermatozoides para realizar fecundaciones *in vitro*;
- 3) criopreservar espermatozoides;
- 4) lograr el enfriamiento de embriones y determinar:
  - a) el estadio embrionario que mejor tolera el enfriamiento;
  - b) la combinación de crioprotectores internos y externos;
  - c) la viabilidad embrionaria y larval posenfriamiento.

### 3.4 Materiales y métodos

#### 3.4.1 Mantenimiento y reproducción de *B. splendens* en las instalaciones del INTECH

Para iniciar el plantel de reproductores de peces beta del INTECH se compraron 30 individuos adultos (10 machos y 20 hembras) a mediados de mayo de 2016 en un acuario local (Acuario Piracambú, Munro, Buenos Aires, Argentina). Cada pez fue identificado con un número y fue colocado individualmente dentro de un frasco cilíndrico de vidrio de 300-500 ml (Figura 38, A). Dado que, como se mencionó en el Capítulo 1, el agua corriente del INTECH tiene una dureza muy elevada, esta debió ser ajustada para el mantenimiento de la especie. Para ello, el agua de los frascos se preparó mezclando dos partes de agua destilada con una parte de agua corriente clorada. El volumen total de cada recipiente fue renovado dos veces por semana para garantizar bajos niveles de amonio y nitrito. Para asegurar que la temperatura fuera uniforme en todos los frascos, éstos fueron sumergidos hasta  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  de su altura en un acuario de vidrio de 60 litros (Figura 38, B), equipado con bomba de recirculación de 350 l/h y calentador regulable de 300 *watts* (Atman, Zhongshan, Guangdong, China), que funcionó como baño termostático (Figura 38, C). Para el caso de los individuos seleccionados

para criar, tanto machos como hembras, fueron aislados visualmente durante 4- a 7-días previos a formar la pareja. Para ello se construyó una cuadrícula de láminas plásticas de color azul [112], que se colocó dentro de la pecera (baño termostatzado), y a su vez, dentro de dicha cuadrícula se colocaron los frascos conteniendo los peces (Figura 38, C). La temperatura se ajustó en  $27\pm 1$  °C y el fotoperíodo empleado fue de 14h L: 10h O. Todos los animales fueron alimentados con nauplios de *Artemia sp.* y alimento balanceado en escamas (*Tetra*, Melle, Niedersachsen, Germany), *ad-libitum*, 3 veces por día.

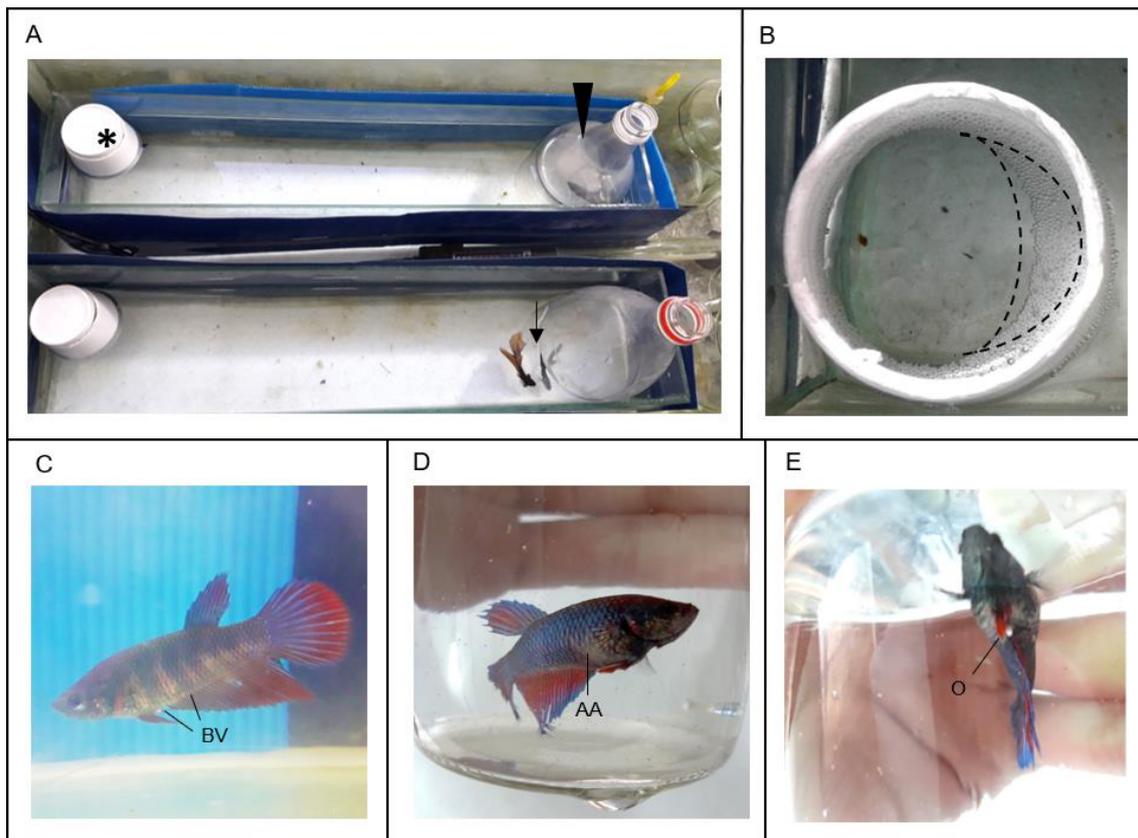


**Figura 38.** Fotografías representativas de dos individuos machos de *B. splendens* en frascos de vidrio (A), y acuarios de mantenimiento (B) y de aislamiento visual (C) empleados para garantizar una temperatura constante y uniforme en todos ellos. En el panel C, la flecha señala la bomba de recirculación y la línea punteada, la posición del calentador.

A continuación, la pareja fue trasladada a un acuario de 45x10x10 cm (largo x ancho x alto), donde al macho se lo colocó suelto, y a la hembra dentro de un recipiente plástico transparente cribado que permitió el contacto visual y el flujo de agua, pero no el contacto físico entre ellos. Además, dentro de este acuario se colocó un vaso de telgopor que sirvió como soporte para la construcción del nido de burbujas (Figura 39, A). A los acuarios de cría se les colocaron láminas de color azul en sus caras laterales para evitar que la pareja observara a los otros peces y disminuir así el estrés. A su vez, estos acuarios

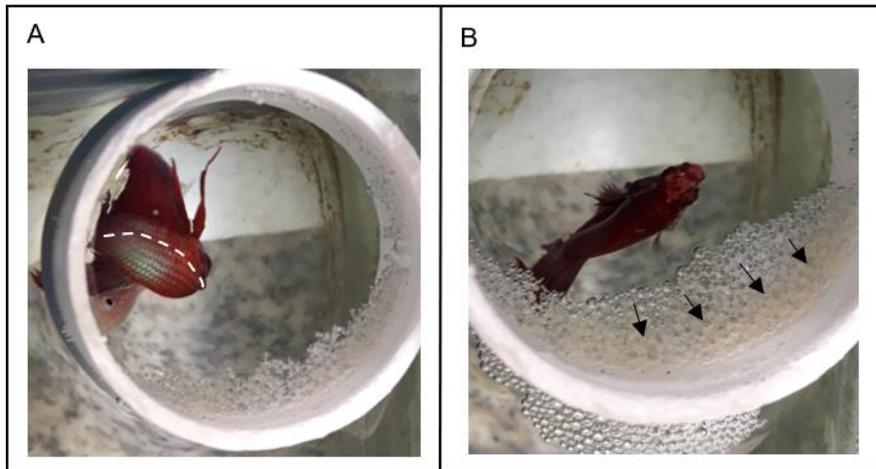
fueron ubicados dentro de un acuario de mayor tamaño que actuó como baño termostático como se comentó anteriormente.

Luego, una vez que el nido fue construido por el macho (Figura 39, B), y la hembra se mostró receptiva (marcación de bandas verticales, abdomen abultado, y oviducto claramente visible, Figura 39, C, D, y E, respectivamente), la hembra fue liberada a última hora de la tarde para disminuir así las lesiones causadas por el macho durante el cortejo.



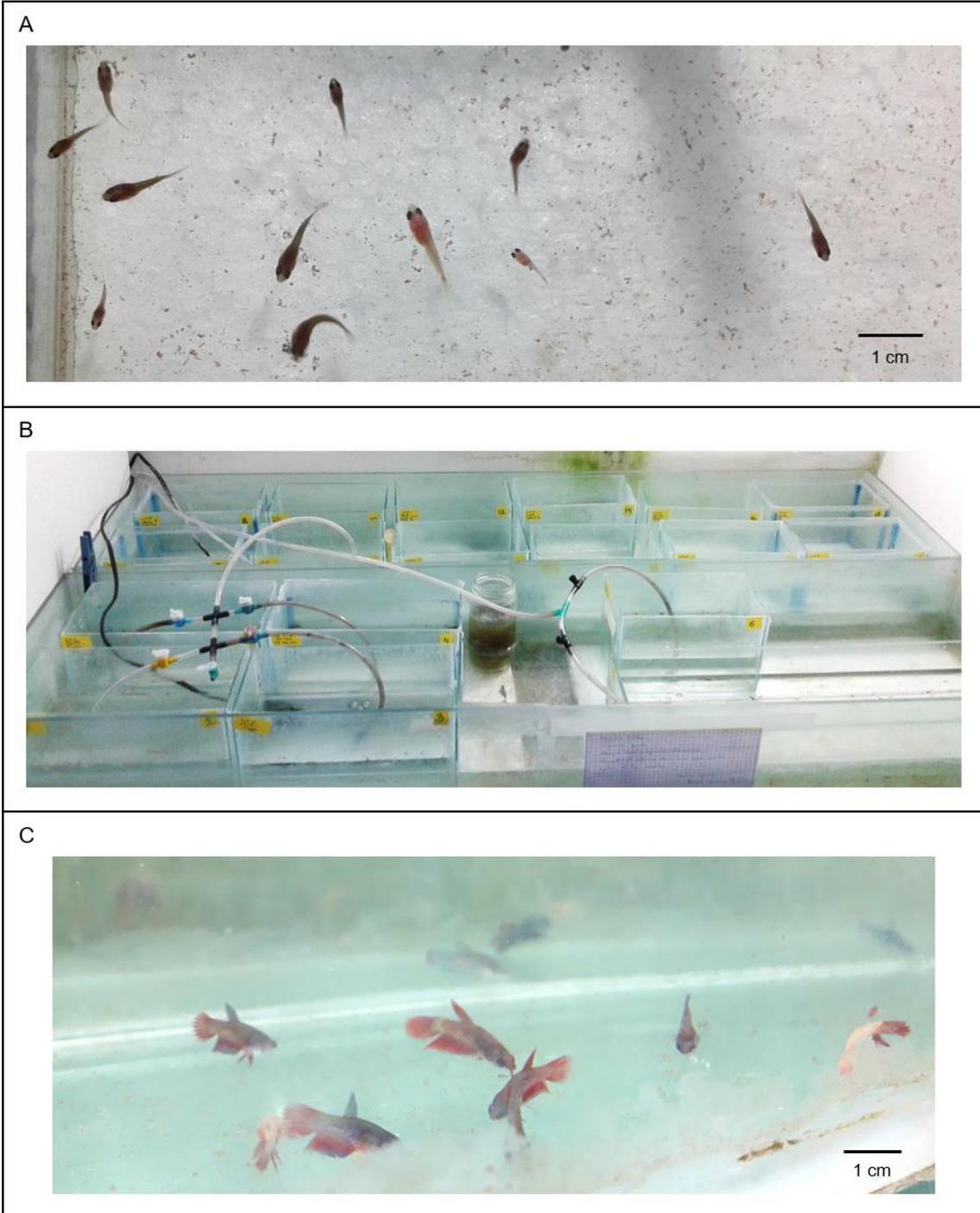
**Figura 39.** Fotografías representativas del día previo al desove de *B. splendens*. (A) Acuarios de cría con soporte flotante para el nido (indicado con un asterisco), y recipiente que mantiene aislada a la hembra (indicado con una punta de flecha). La flecha señala al macho que se encuentra cortejando a la hembra. (B) Detalle del nido de burbujas (línea punteada) debajo del soporte. Para tomar dicha fotografía fue necesario remover la tapa del mismo. (C, D, E) Hembras que muestran signos de estar listas para la puesta: marcación de bandas verticales (BV), abdomen abultado (AA), y ovopositor (O) visible, respectivamente.

Por último, la puesta de huevos ocurrió generalmente a primera hora de la mañana del día siguiente, cuando se encendieron las luces, y duró entre 3- y 4-horas (Figura 40, A). Una vez finalizado el desove, la hembra fue retirada para evitar lesiones debidas al comportamiento agresivo del macho. Este último, en los casos en que se le permitió, permaneció al cuidado del nido con los embriones y de las larvas durante sus primeros días (Figura 40, B).



**Figura 40.** Fotografías del momento del desove (A) y del macho de *B. splendens* al cuidado del nido con los embriones (B). La línea punteada blanca señala la curvatura en forma de U que adopta el macho al momento de abrazar con su cuerpo a la hembra (“abrazo nupcial”). Las flechas negras señalan la región más opaca del nido que corresponde al sitio donde se encuentran los embriones adheridos a las burbujas.

Para el engorde y crecimiento de las larvas (Figura 41, A) hasta adultos, éstas fueron ubicadas en pequeños acuarios de 1-5 litros, dentro de acuarios de mayor tamaño como se mencionó previamente (Figura 41, B), y se las alimentó inicialmente exclusivamente con nauplios de artemia, luego se incorporó alimento balanceado en micro gránulos (*Otohime, Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd.*, Tokio, Japón), y finalmente, alimento balanceado en escamas (*Tetra, Melle, Niedersachsen, Germany*). Cuando en los peces juveniles (Figura 41, C) se hizo evidente el dimorfismo sexual, se los identificó con un código de letras y números, y se los mantuvo individualmente en frascos como se explicó anteriormente.



**Figura 41.** Fotografías de larvas de *B. splendens* de alrededor de 15 días de edad (A), acuarios destinados para su crecimiento (B), y peces juveniles obtenidos al cabo de 4 meses (C).

En la Tabla 10 se resumen los pasos y acontecimientos necesarios del método empleado en esta Tesis para lograr los desoves de *B. splendens*.

**Tabla 10.** Resumen de los pasos y acontecimientos necesarios para la obtención de embriones de *B. splendens*.

Días previos	Aislamiento visual de los individuos.
Día 0	Presentación de la pareja e inicio del cortejo.
Día 1	Mañana → Construcción del nido.
	Tarde → Liberación de la hembra.
Día 2	Mañana → Desove.
	Mediodía → Fin de la puesta y separación de la pareja.
Día 3	Permanencia del macho al cuidado del nido con los embriones.
Día 4	Eclosión de las larvas.

La metodología mencionada fue empleada tanto para obtener embriones para los ensayos como para incrementar y renovar el plantel de reproductores originales desde mayo de 2016 hasta marzo de 2020, llevando un registro minucioso de todos los cruces. En este sentido, también se hallaron embriones sin melanóforos y se generó una línea con esta característica dentro del laboratorio.

#### 3.4.2 Incubación de los embriones sin cuidado parental

Con el objetivo de evaluar si era posible incubar a los embriones desprovistos de cuidado parental, se recolectaron, luego de finalizado el desove, los nidos de 10 parejas. Los nidos se tomaron con una cucharilla metálica y se los transfirió cuidadosamente a una placa de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro con agua de incubación (AI, preparada de la misma forma que se mencionó en 3.4.1) y autoclavada. Los fragmentos de nido fueron separados de forma tal de obtener 12 porciones de tamaño semejante para evaluar cuatro condiciones de incubación, por triplicado. De este modo, las condiciones puestas a prueba fueron: (a) sin desarmar el nido de burbujas, (b) evitando la adherencia de los embriones empleando una solución de PBS:leche 2,5% p/v (leche en polvo descremada *La Serenísima*, General Rodríguez, Buenos Aires, Argentina), y (c, d) disminuyendo la tensión superficial empleando dos

soluciones de *Tween 20* (0,1 y 0,05% v/v, *Biopack*, Zárate, Buenos Aires, Argentina).

Para el caso de los tratamientos b, c, y d, las soluciones se agregaron gota a gota con una pipeta Pasteur mientras se agitaba suavemente de forma circular la placa de Petri. Una vez que los embriones se desprendieron de las burbujas, fueron transferidos empleando una pipeta Pasteur diferente y con la punta cortada, a otra placa con agua de incubación nueva y se les realizaron tres lavados. La incubación se realizó en la misma placa de Petri recién mencionada, con agua de incubación autoclavada con el agregado de azul de metileno 0,01% v/v (*Bonaqua*, CABA, Argentina) como antifúngico, sin agitación, a 26 °C, 12 h L: 12 h O, dentro de una incubadora programable (*Ingelab*, Almirante Brown, Buenos Aires, Argentina). Se evaluó la supervivencia embrionaria a las 24-horas, la eclosión y la presencia de malformaciones en las larvas.

Adicionalmente, se aislaron e identificaron los microorganismos que se hallaron contaminado el medio de incubación de aquellos embriones separados empleando la solución de PBS:leche. Para ello, se tomaron muestras de los embriones y larvas que resultaron afectados. En colaboración con la Dra. Mariana Odriozola (Laboratorio de Ecología Acuática, INTECH), dichas muestras fueron observadas en fresco empleando un microscopio óptico Eclipse 80i (*Nikon*, Minato, Tokio, Japón), y se aislaron microorganismos con diferentes morfologías. Estos microorganismos fueron fotografiados empleando una cámara DS-F11 acoplada al microscopio antes mencionado y del mismo fabricante. Las fotografías obtenidas fueron enviadas a la Dra. Ángela Juárez (Laboratorio de Biología de Protistas, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA) y al Dr. Alejandro Perreta (Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay) para su identificación.

### 3.4.3 Ensayos de enfriamiento

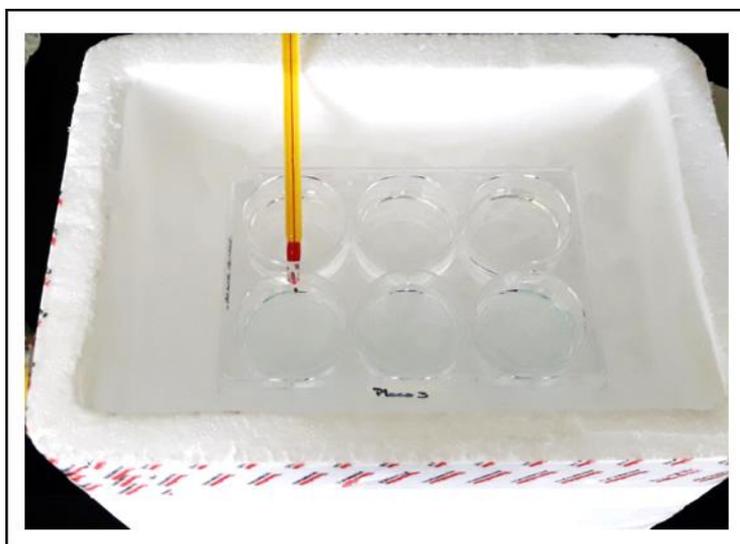
#### 3.4.3.1 Soluciones crioprotectoras

Se emplearon tres soluciones crioprotectoras (SCs). La solución 1 (S1) había sido reportada previamente para el enfriamiento de embriones de carpa (*C. carpio*) y su composición fue sacarosa 0,5 M (17,1 % p/v) y metanol 1,5 M

(4,8 % v/v) [22]. Las soluciones 2 (S2) y 3 (S3) fueron diluciones seriadas a la mitad de la S1 (S2: sacarosa 0,25 M, metanol 0,75 M; S3: sacarosa 0,125 M, metanol 0,375 M).

#### 3.4.3.2 Elección del estadio embrionario

Con el objetivo de determinar el estadio embrionario más conveniente para realizar los ensayos de enfriamiento, se llevó a cabo un ensayo preliminar. Del mismo modo que se mencionó en 3.4.2, se recolectaron nidos con embriones inmediatamente luego de que hubiese finalizado la puesta, y otros a las 24-horas de dicho momento. En este último caso, durante ese tiempo el nido permaneció al cuidado del macho. En ambos casos los nidos se disgregaron empleando la solución de *Tween 20* 0,05% v/v que había dado previamente los mejores resultados. Los embriones fueron transferidos a placas de cultivo celular de seis pocillos. Se colocaron en grupos de a 10 individuos por pocillo y se completó el volumen del mismo con 10 ml de la S1. Las placas fueron colocadas inmersas en hielo granizado dentro de una caja de telgopor, y permanecieron allí durante 1-hora. Se colocó un termómetro dentro de uno de los pocillos para corroborar el descenso de temperatura dentro de los mismos (Figura 42).



**Figura 42.** Materiales empleados para el enfriamiento de los embriones de *B. splendens*. Termómetro y placa de cultivo celular de 6-pocillos inmersa en hielo granizado dentro de caja de telgopor.

Pasado ese tiempo, se retiró la solución crioprotectora, y a los embriones se les realizaron tres lavados con A1 a temperatura ambiente. A

continuación, las placas fueron colocadas en la incubadora programable bajo las mismas condiciones que se mencionaron en 3.4.2. Se realizaron tres réplicas para cada estadio embrionario. Como control se emplearon grupos de embriones de ambos estadios que no fueron enfriados. En todos los casos se evaluó la supervivencia embrionaria, la eclosión y la morfología de las larvas obtenidas.

#### 3.4.3.3 *Enfriamiento a 5 °C*

Teniendo en cuenta que en el ensayo preliminar (3.4.3.2) se encontró que los embriones de 24-hpf toleraban sin inconvenientes su manipulación, incubación sin cuidado parental, exposición a la S1 y enfriamiento durante 1-hora, se utilizó este estadio para realizar los ensayos de enfriamiento. Los embriones fueron colocados en grupos de 10-15 individuos en cada pocillo de una placa de cultivo de seis pocillos. A cada pocillo se le agregó 10 ml de las SCs o AI, y todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas fueron colocadas en hielo granizado como se mencionó en 3.4.3.2, lográndose una tasa de enfriamiento de  $-0,5$  °C/m. Cuando se alcanzó la temperatura de  $5$  °C, las placas fueron trasladadas y almacenadas en heladera por 3-, 6-, 9-, 12-, 15- y 24-horas. Luego, el volumen de cada pocillo fue retirado y a los embriones se les realizaron tres lavados con AI a temperatura ambiente. Las placas fueron incubadas de la misma forma que se mencionó previamente en 3.4.2 hasta el momento de la eclosión.

Dado el elevado número de individuos necesarios para estos ensayos, se utilizaron tres lotes distintos de embriones. Estos lotes provinieron de la recolección de los desoves de dos o más parejas en el mismo día. Por esta razón, se emplearon 3 grupos control, uno por cada lote de embriones (Control 1, 2, y 3). En particular, el Control 1 corresponde al enfriamiento de 3- y 24-horas; Control 2, a los enfriamientos de 6- y 9-horas; y el Control 3, a los enfriamientos de 12- y 15-horas.

Los embriones y las larvas se observaron bajo lupa estereoscópica cada 24-horas. Se estableció como tiempo inicial ( $t=0$ ) al momento en que finalizó el enfriamiento y comenzó la incubación a  $26$  °C. Se evaluó la supervivencia embrionaria, la tasa de eclosión, el retraso en la eclosión, y la morfología larval. Para este último parámetro, las larvas fueron fotografiadas bajo una lupa estereoscópica *Discovery V20* equipada con la cámara *Axiocam 12 Color*

(Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) y clasificadas en cinco categorías: aspecto normal (AN, larvas sin ninguna malformación externa), malformación leve (ML, larvas con cola corta), malformación moderada (MM, larvas con cola corta o curvada -cifosis- y edema cardíaco), malformación severa (MS, larvas con cola enrollada y gran edema cardíaco), y aberrantes (A, larvas sin cola). Además, se registró la frecuencia de larvas nadadoras (larvas con vejiga natatoria inflada).

#### 3.4.3.4 *Enfriamiento a 14 °C*

A fin de evaluar el uso de otra temperatura para mejorar los resultados obtenidos luego de 24-horas de almacenamiento, se realizó un segundo ensayo de enfriamiento a 14 °C por triplicado con grupos de 10-15 embriones. Además de los parámetros ya mencionados en 3.4.3.3, también se evaluó la supervivencia larvaria a 144-horas-post-enfriamiento (hpe).

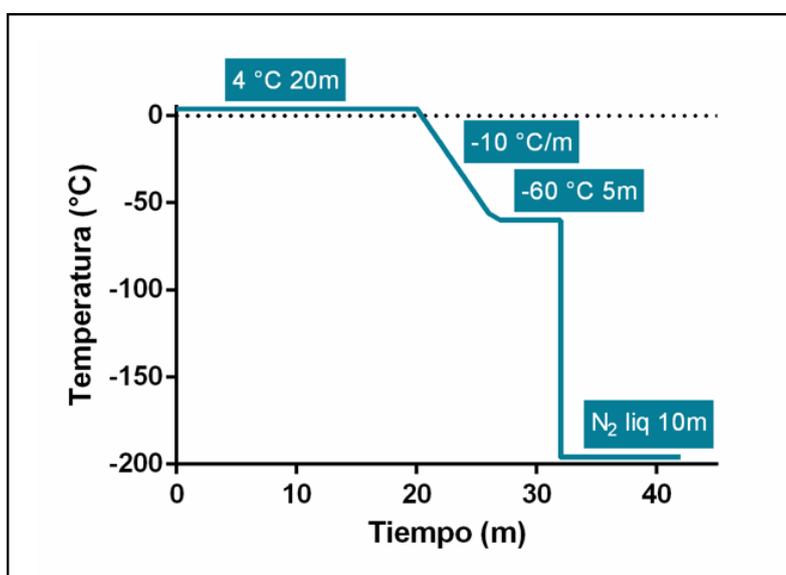
#### 3.4.4 *Obtención de gametas*

Por otro lado, teniendo en cuenta que se logró la incubación de los embriones sin cuidado parental, y con el objetivo de poder producirlos mediante fecundación artificial, evitando así la disgregación del nido de burbujas, se intentaron extraer gametas de los peces adultos. Para ello, se formaron parejas y se dejó que el cortejo avanzase hasta el momento del abrazo nupcial (instante previo al desove). Luego, se retiraron a ambos peces y se les realizó un suave masaje abdominal, en dirección antero-posterior para lograr la expulsión de los oocitos y el esperma. La morfología e integridad de los mismos se evaluó bajo lupa estereoscópica y microscopio, respectivamente.

#### 3.4.5 *Congelamiento de esperma*

Para el caso de los machos, dado que no se lograron obtener muestras de esperma mediante masaje abdominal, se procedió a obtenerlo mediante la disección y disgregado de cada uno de los testículos. Para ello, se sacrificaron cinco peces adultos y se les extrajeron sus gónadas. Luego, cada testículo fue colocado en un tubo Eppendorf de 500 µl al que se le agregaron 25 µl de solución diluyente y el tejido fue disgregado mecánicamente empleando una tijera y una pinza de microcirugía. Se evaluaron dos diluyentes distintos: diluyente A: NaCl 94mM, KCl 27mM, Tris-HCl 15mM, Glicina 50mM; y diluyente

B: NaCl 128mM, CaCl<sub>2</sub> 18mM, KCl 27mM, NaHCO<sub>3</sub> 24mM. Por último, dichas muestras fueron colocadas en crioviales, diluidas a la mitad con el agregado de DMSO (concentración final 10% v/v) y criopreservadas empleando una curva de descenso de temperatura controlada (4°C 20 m, -10 °C/m, -60 °C 5 m, -196 °C 10 m, Figura 43) empleando una congeladora programable (*CryoLogic*, Melbourne, Victoria, Australia) y nitrógeno líquido para su almacenamiento final. Las muestras fueron descongeladas rápidamente en un baño termostatzado a 38 °C, y observadas inmediatamente en un microscopio *Olympus CX41* (Shinjuku, Tokio, Japón).



**Figura 43.** Curva de descenso de temperatura controlada empleada para el congelamiento de las muestras de esperma de *B. splendens*.

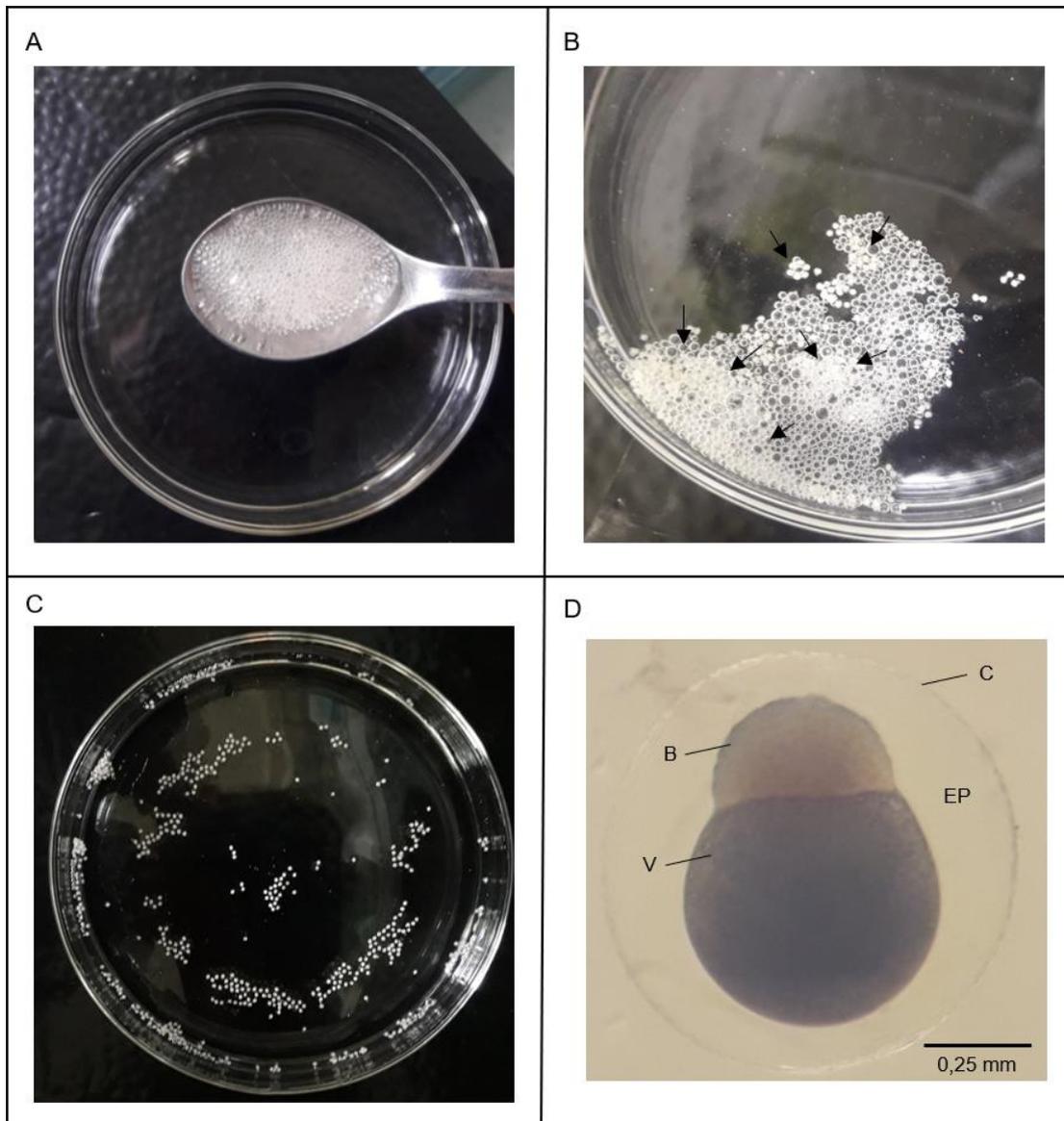
### 3.5 Resultados

#### 3.5.1 Incubación de los embriones sin cuidado parental

Fue posible retirar el nido de burbujas con los embriones adheridos desde el soporte de telgopor en la pecera de cría empleando una cucharilla metálica (Figura 44, A) y depositándolos cuidadosamente en una caja de Petri (Figura 44, B). Sin embargo, dada la alta adherencia y gran fragilidad de estos, algunos embriones no pudieron ser recuperados ya que permanecieron en el soporte o se adhirieron a los elementos recién mencionados.

Tanto con la solución de PBS:leche como con las de *Tween 20* se logró dispersar el nido y liberar a los embriones de las burbujas a las que estaban

adheridos (Figura 44, C). El estadio embrionario hallado mayoritariamente fue el de blástula (Figura 44, D).



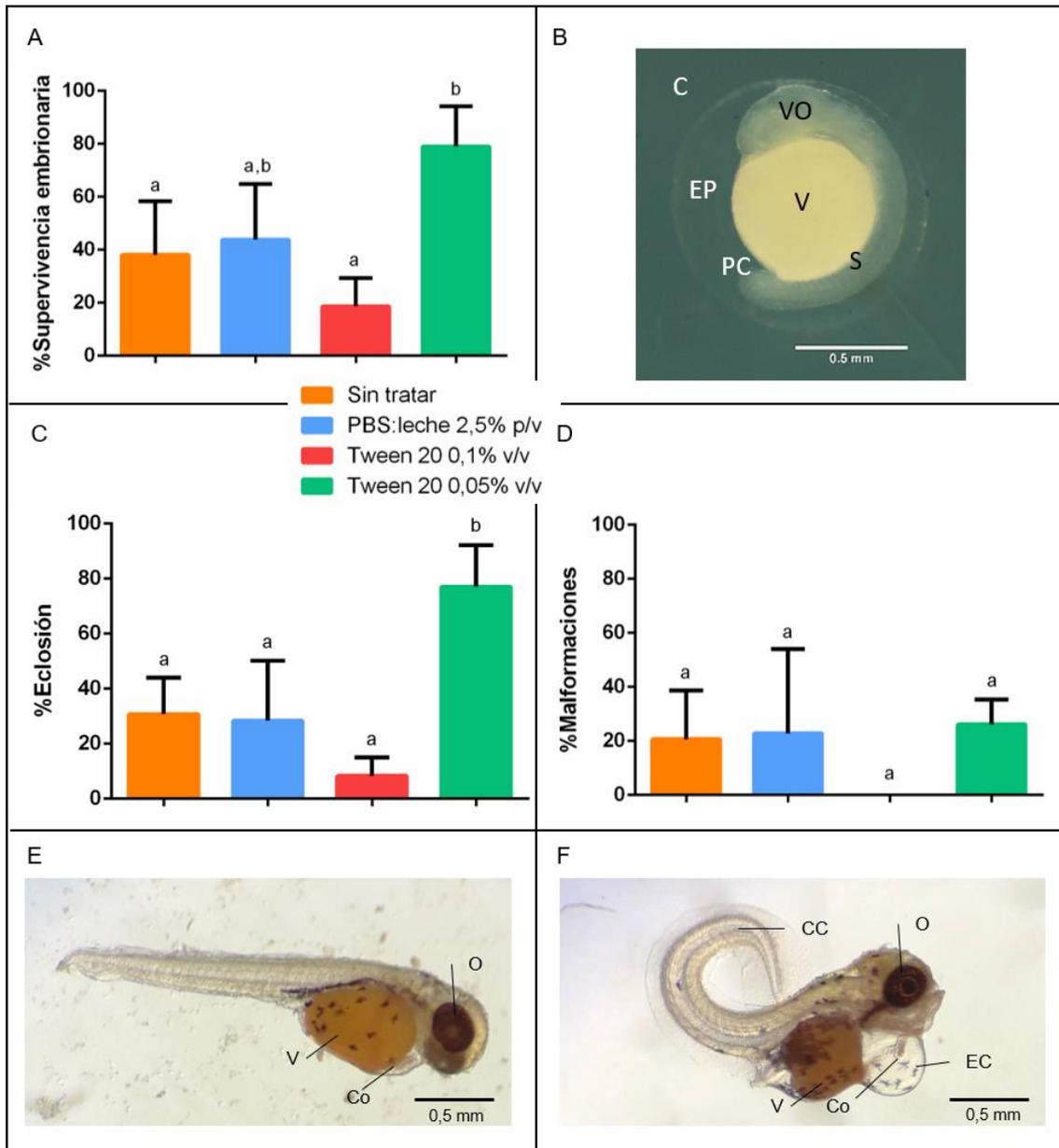
**Figura 44.** Traslado del nido de burbujas con los embriones de *B. splendens* (A) a una caja de Petri (B) para su posterior separación (C). Fotomicrografía representativa del estadio embrionario hallado (blástula). Las flechas señalan los agregados de embriones entre sí y las zonas de mayor densidad dentro del nido. C: corion, EP: espacio perivitelino, B: blastómeros, V: vitelo.

La mayor supervivencia embrionaria, a las 24-horas de incubación, se obtuvo en el grupo tratado con la concentración más baja de *Tween 20* (0,05% v/v) y fue del  $79,00 \pm 15,16$  %. Este valor fue significativamente mayor respecto del obtenido para el grupo tratado con la concentración más alta de *Tween 20* (0,1% v/v) y el grupo sin tratar. En estos últimos se registró una supervivencia del  $18,68 \pm 10,60$  % y  $38,12 \pm 20,17$  %, respectivamente. Los embriones

tratados con la solución de PBS:leche 2,5% p/v presentaron una supervivencia del  $43,89 \pm 20,87$  % que no se diferenció de la de los otros tres grupos antes mencionados (Figura 45, A). En los cuatro tratamientos, la mayoría de los embriones presentaron desarrollo normal, con diferenciación de la región cefálica con vesículas ópticas sin pigmento, somitos a lo largo de la notocorda, y primordio caudal. En este estadio no se evidenciaron movimientos de la cola ni latidos cardíacos (Figura 45, B).

En relación a la eclosión, una vez más, el mayor porcentaje se obtuvo en el grupo tratado con la concentración más baja de *Tween 20* (0,05% v/v) que fue del  $77,00 \pm 15,24$  %. Este valor fue significativamente mayor respecto de los porcentajes obtenidos en los grupos de embriones sin tratar, tratados con PBS:leche, y tratados con *Tween 20* 0,1% v/v. La eclosión en estos últimos fue del  $30,73 \pm 13,27$  %,  $28,38 \pm 21,81$  %, y  $8,28 \pm 6,67$ %, respectivamente (Figura 45, C).

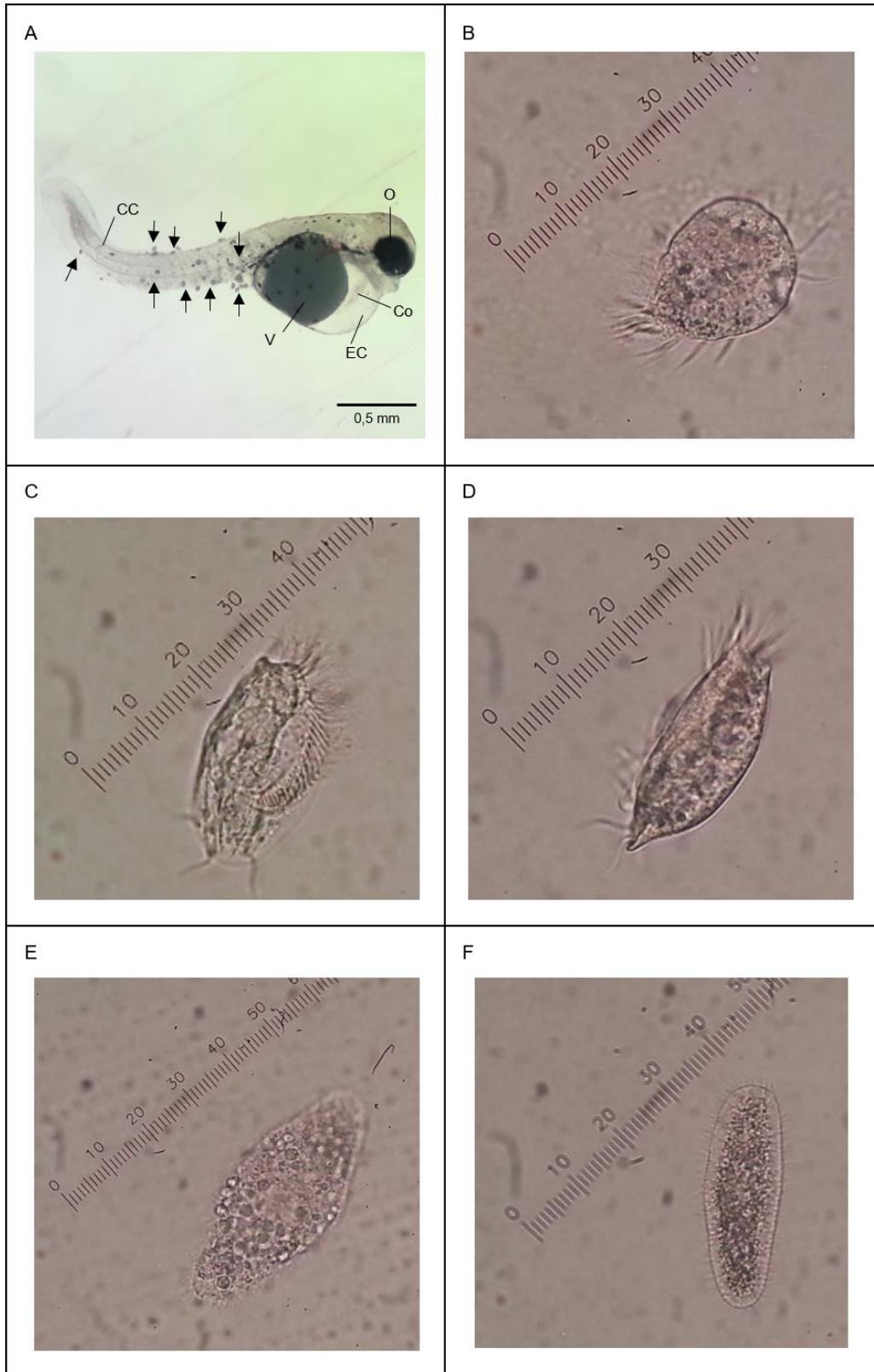
Entre las larvas eclosionadas provenientes de los embriones de los grupos sin tratar, tratados con PBS:leche, y tratados con *Tween 20* 0,05 % v/v, se hallaron individuos con malformaciones. La incidencia de estas últimas fue del  $20,62 \pm 18,11$  %,  $22,76 \pm 31,25$  %, y  $26,11 \pm 9,26$  %, respectivamente (Figura 45, D). Las pocas larvas provenientes del grupo tratado con la concentración más alta de *Tween 20* (0,1 % v/v) presentaron morfología normal (Figura 45, E) mientras que la malformación predominante en los otros grupos fue la presencia de cola curvada o enrollada acompañada de edema cardíaco (Figura 45, F).



**Figura 45.** Efecto de la disgregación del nido de burbujas y la incubación de los embriones de *B. splendens* sin cuidado parental sobre la supervivencia (A), el desarrollo embrionario (B), la eclosión (C), la presencia de malformaciones (D) y la morfología de las larvas obtenidas (E, F). (A, C, D) Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). (B, E, F) Microfotografías representativas de un embrión de 24-hpf incubado a 26 °C con desarrollo normal, de una larva recién eclosionada de aspecto viable y de una larva con malformaciones, respectivamente. C: corion, EP: espacio perivitelo, V: vitelo, VO: vesícula óptica, S: somitos, PC: primordio caudal, O: ojo, Co: corazón, EC: edema cardíaco, CC: cola curvada.

Tanto en la superficie como en el interior de embriones y larvas provenientes del grupo tratado con PBS:leche se detectó la presencia de microorganismos visibles (Figura 46, A). A partir de muestras de los mismos, se lograron aislar y fotografiar individuos con cinco morfologías diferentes, y un tamaño de entre 30 y 50  $\mu\text{m}$  de largo. A partir de dichas fotografías, fueron

identificados como protistas, ciliados, de los géneros *Strombidium* (Figura 46, B), *Euplotes* (Figura 46, C, D), y *Holosticha* (Figura 46, E, F).

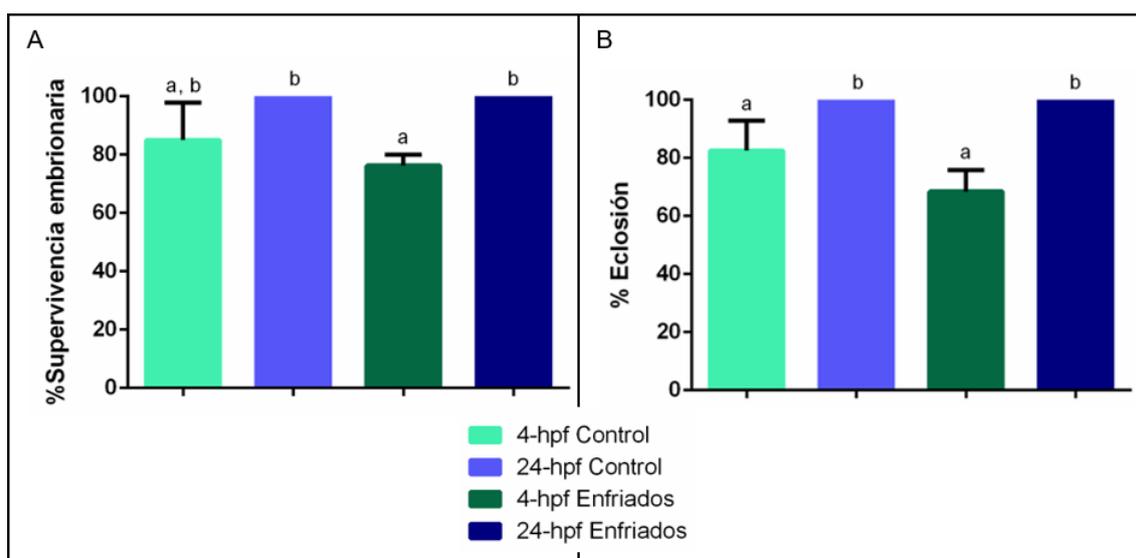


**Figura 46.** Fotomicrografías representativas de larva de *B. splendens* (A) y protistas ciliados de los géneros *Strombidium* (B), *Euplotes* (C, D), y *Holosticha* (E, F) hallados en su superficie

(señalados con flechas). (B-F) La reglilla junto a los individuos señalados es milimétrica. O: ojo, CC: cola curvada, V: vitelo, Co: corazón, V: vitelo.

### 3.5.2 Elección del estadio embrionario

La supervivencia de los embriones de 24-hpf fue del 100% tanto en el grupo enfriado como en el grupo control. Por otro lado, la supervivencia de los embriones del estadio más temprano (4-hpf) enfriados fue del  $76,31 \pm 3,72$  % y resultó significativamente menor que la de los embriones más avanzados con el mismo tratamiento (Figura 47, A). Del mismo modo, la eclosión de ambos grupos de embriones de 4-hpf, enfriados y control, fue del  $68,42 \pm 7,44$  % y  $82,50 \pm 10,41$  %, respectivamente. Estos valores resultaron significativamente menores en comparación a los de ambos grupos de embriones de 24-hpf, donde todos los individuos eclosionaron (100%, Figura 47, B). En este último caso, las larvas provenientes de los dos grupos de embriones de 24-hpf presentaron aspecto normal.



**Figura 47.** Efecto de la exposición a una solución crioprotectora (S1) y enfriamiento sobre la supervivencia (A) y la eclosión (B) de embriones de 4- y 24-hpf de *B. splendens*. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 3.5.3 Enfriamiento a 5 °C

Los embriones inmersos en las diferentes SCs o AI, y enfriados durante 3-horas a 5 °C, no mostraron diferencias en su supervivencia ni su tasa de eclosión, siendo en todos los casos del  $100,00 \pm 0,00$ % (Figura 48, A, B). Además, la mayoría de los grupos enfriados durante 6- y 9-horas, no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control en los parámetros antes mencionados. La excepción a esta situación fueron los grupos S1 (a ambos

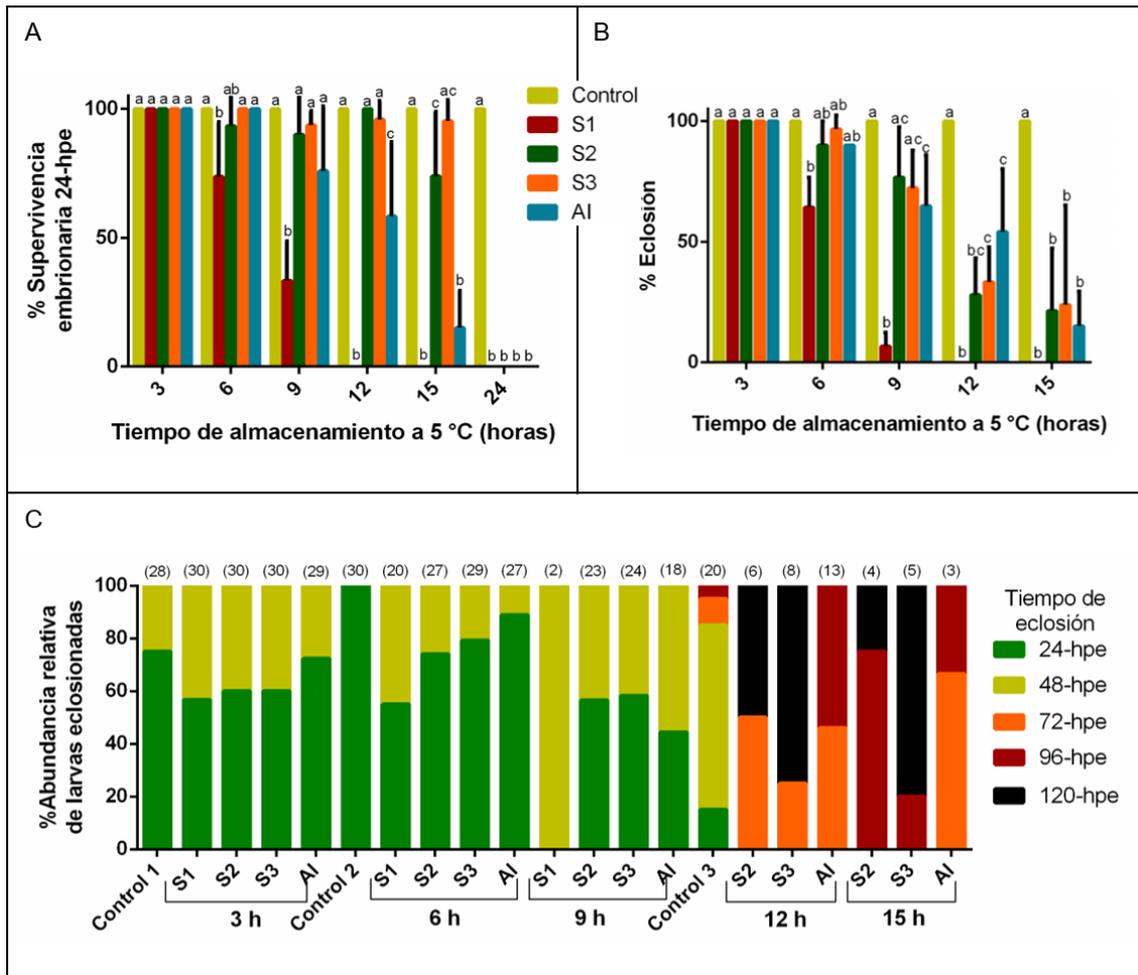
tiempos) y AI (a 9-horas de enfriamiento). En particular, la supervivencia de los embriones del grupo S1 disminuyó ligeramente luego de 6-horas ( $73,63 \pm 21,18\%$ , Figura 48, A) y, más pronunciadamente, luego de 9-horas ( $33,33 \pm 15,27\%$ , Figura 48, A). La tasa de eclosión de este grupo disminuyó de la misma forma luego de ambos tiempos de enfriamiento mencionados previamente ( $64,24 \pm 12,40\%$ ,  $6,67 \pm 5,77\%$ , respectivamente, Figura 48, B). Además, a pesar de que la supervivencia de los embriones del grupo AI no difirió de la del grupo control luego de 9-horas ( $75,95 \pm 25,05\%$ , Figura 48, A), su tasa de eclosión disminuyó significativamente luego del tiempo de almacenamiento mencionado ( $p < 0,05$ ,  $64,81 \pm 21,03\%$ , Figura 48, B).

Luego, los efectos del almacenamiento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12-horas fueron variables entre los grupos tratados: los embriones inmersos en S1 no sobrevivieron, la supervivencia de los embriones de los grupos S2 y S3 no difirió de la de los del grupo control ( $100,00 \pm 0,00\%$ ,  $95,85 \pm 7,21\%$ , respectivamente), y la supervivencia del grupo AI disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ,  $58,33 \pm 28,87\%$ , Figura 48, A). De la misma forma, la tasa de eclosión de los grupos S2, S3, y AI disminuyó significativamente luego del mencionado tiempo de enfriamiento ( $p < 0,05$ ,  $27,97 \pm 15,18\%$ ,  $33,33 \pm 14,43\%$ ,  $54,16 \pm 26,03\%$ , respectivamente, Figura 48, B).

Finalmente, la supervivencia de los embriones del grupo S3 fue la única que no difirió de la del grupo control luego de 15-horas de enfriamiento ( $p < 0,05$ ,  $95,23 \pm 8,24\%$ , Figura 48, A). Sin embargo, su tasa de eclosión fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ,  $28,81 \pm 41,24\%$ ) que la del grupo control ( $100,00 \pm 0,00\%$ , Figura 48, B). En el caso del enfriamiento por 24-horas, ninguno de los embriones tratados sobrevivió.

En la mayoría de los grupos enfriados, se observó un retraso en la eclosión respecto de su grupo control. También se observaron diferencias en relación a este parámetro entre los distintos grupos control. Mientras que el 75 y 100% de las larvas de los controles 1 y 2 fueron registradas a 24-hpe, el 70% de las larvas del Control 3 fueron halladas a las 48-hpe (Figura 48, C). Los embriones enfriados en las distintas SCs (S1, S2, S3) y almacenados durante 3-horas a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  mostraron un leve retraso en su tiempo de eclosión (57-60% de larvas eclosionadas a las 24-hpe), mientras que el tiempo de eclosión de los embriones enfriados en AI no difirió de el del grupo control. Por otro lado, luego

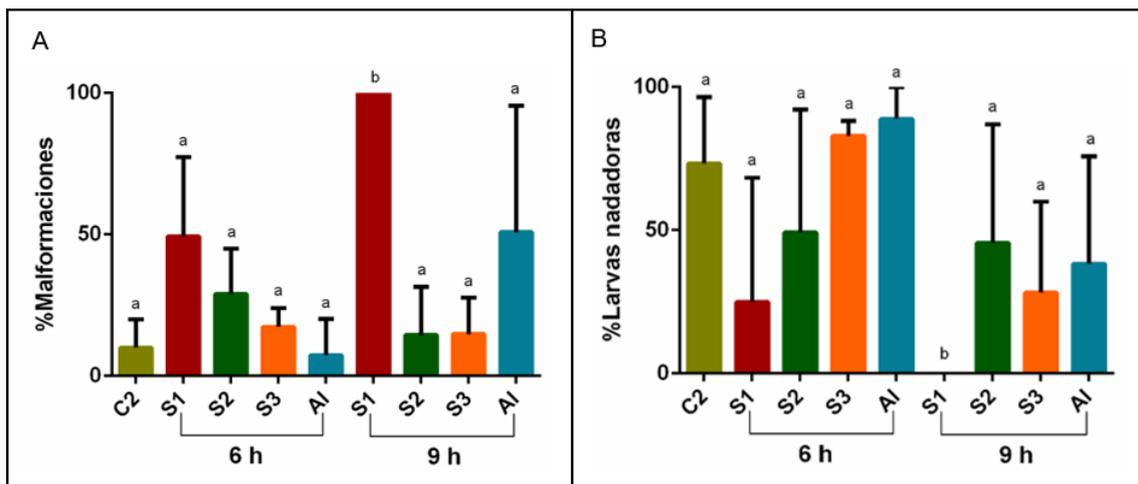
del enfriamiento por 6- y 9-horas, el retraso en la eclosión fue más pronunciado en la mayoría de los grupos tratados, con excepción del grupo enfriado por 6-horas en AI (90% de larvas eclosionas a las 24-hpe). Específicamente, la proporción de larvas obtenidas de los grupos S1, S2, y S3, luego de 6-horas de almacenamiento, fueron 55, 74, y 79%, respectivamente, a las 24-hpe. Siguiendo esta tendencia, luego de 9-horas de enfriamiento, todas las larvas de grupo S1 fueron halladas a las 48-hpe, mientras que algún porcentaje de las larvas provenientes de los grupos S2, S3, y AI fue registrado a las 24-hpe (56, 58, y 44%, respectivamente). Por último, los casos de mayor retardo en la eclosión se dieron luego de los almacenamientos a 5 °C durante 12- y 15-horas. Particularmente, en el enfriamiento de 12-horas, las primeras larvas de los grupos S2, S3, y AI fueron halladas a las 72-hpe (50, 25, 46%, respectivamente). Por otro lado, las primeras larvas obtenidas luego del enfriamiento por 15-horas fueron las del grupo AI (67% a las 72-hpe), seguidas de las de los grupos S2 y S3 (75 y 20% a las 96-hpe, respectivamente, Figura 48, C).



**Figura 48.** Efecto del enfriamiento de los embriones de *B. splendens* a 5 °C durante 3- a 24- horas sobre la supervivencia embrionaria a las 24-hpe (A), la eclosión (B), y el retraso en la misma (C). A, B: Se presentan los valores promedios y el desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). C: Los números entre paréntesis sobre cada columna indican la cantidad total de larvas evaluadas.

Se registró la proporción de larvas provenientes de los ensayos de enfriamiento que presentaron anomalías. Las larvas provenientes de ambos extremos de los tiempos de enfriamiento evaluados (3-horas y 12- y 15- horas) mostraron nula (0%) o total (100%) presencia de anomalías, respectivamente. A pesar de que no se hallaron diferencias significativas entre los grupos enfriados a 5 °C por 6-horas, la frecuencia de larvas con malformaciones siguió una tendencia decreciente a medida que disminuyó la concentración de los crioprotectores en las SCs. En particular, esta proporción de larvas con malformaciones fue de 49, 29, 17, 7, y 10% en los grupos S1, S2, S3, AI, y Control 2, respectivamente (Figura 49, A). Luego de 9-horas de enfriamiento, se invirtió la tendencia mencionada previamente. La proporción

de larvas con malformaciones siguió una tendencia creciente a medida que la concentración de los crioprotectores disminuyó en las SCs. En particular, el porcentaje de malformaciones en este caso fue de 14, 15, y 51%, para las larvas provenientes de los grupos S2, S3, y AI, respectivamente. Las larvas de S1 fueron la excepción a esta tendencia ya que todas ellas (100%) presentaron malformaciones y difirieron estadísticamente respecto del control y de los otros grupos (Figura 49, A). En el caso de la proporción de larvas nadadoras, la mayoría de las larvas provenientes del enfriamiento por 3-horas fueron capaces de nadar adecuadamente como las larvas de los grupos control y las tendencias mencionadas previamente se invirtieron. Aunque no se hallaron diferencias significativas entre los grupos enfriados a 5 °C durante 6-horas, la proporción de larvas nadadoras siguió una tendencia creciente a medida que la concentración de los crioprotectores disminuyó en las SCs. De hecho, este porcentaje fue del 25, 49, 83, 89, y 73% en las larvas de los grupos S1, S2, S3, AI, y Control 2, respectivamente (Figura 49, B). En el caso del enfriamiento por 9-horas, todas las larvas del grupo S1 presentaron la vejiga natatoria desinflada, mientras que no se hallaron diferencias significativas entre las larvas de los grupos S2, S3, y AI ni el control (Figura 49, B). Finalmente, luego de los ensayos de almacenamiento por 12- y 15-horas, todas las larvas presentaron la vejiga natatoria desinflada.

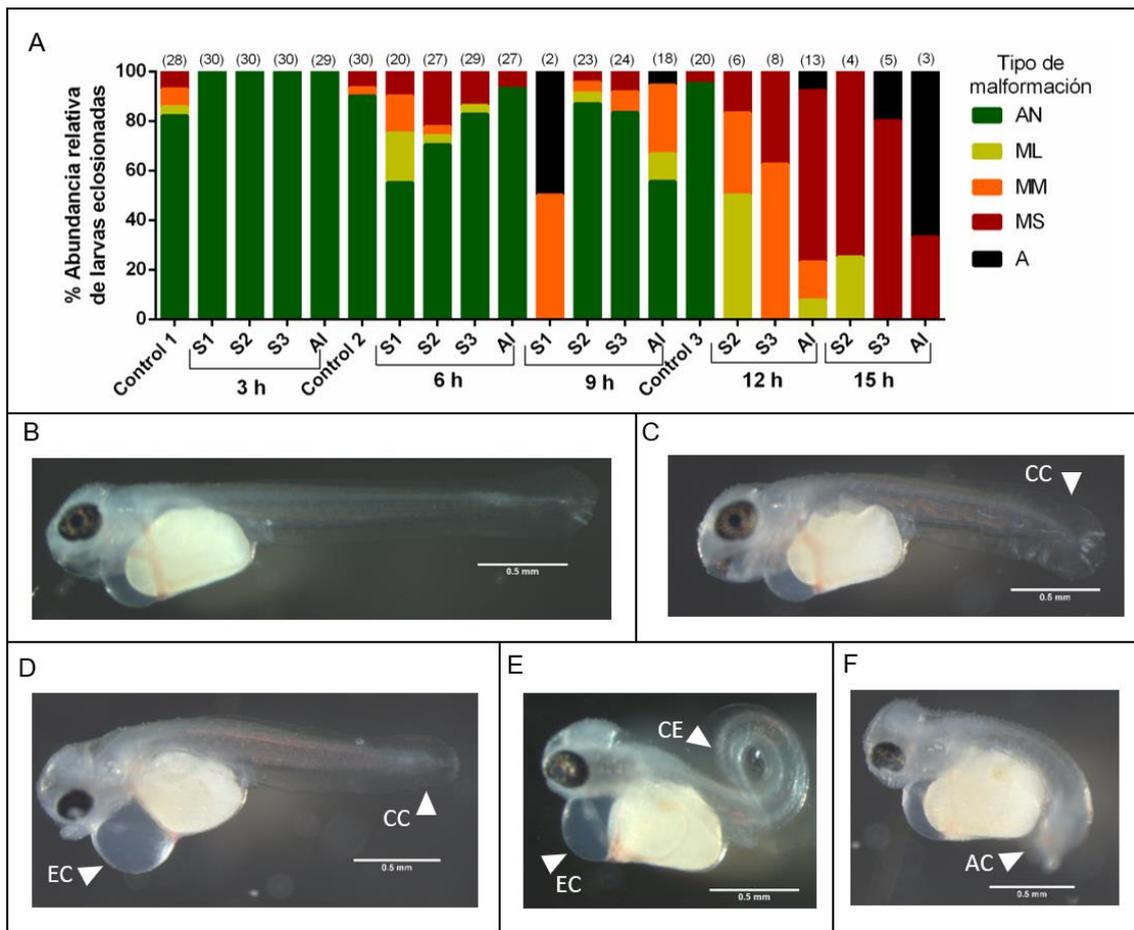


**Figura 49.** Porcentajes de malformaciones (A) y larvas nadadoras (B) de *B. splendens* provenientes de embriones enfriados durante 6- y 9-horas a 5 °C. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ).

Se hallaron diferentes tipos de anomalías en las larvas provenientes del grupo control y aquellos enfriados a 5 °C. En base a estas anomalías,

las larvas fueron clasificadas en distintas categorías como se muestra en la Figura 50, A. Por ejemplo, todas las larvas provenientes de los grupos enfriados por 3-horas presentaron aspecto normal (AN, Figura 50, A, B), mientras que luego del enfriamiento por 6-horas, las larvas del grupo S1 fueron clasificadas el 20% como de malformación leve (ML, Figura 50, A, C), el 15%, moderada (MM, Figura 50, A, D), y el 10%, severa (MS, Figura 50, A, E) a continuación, luego de 9-horas de enfriamiento, todas las larvas del grupo S1 presentaron malformaciones, siendo el 50% de fenotipo aberrante (A, Figura 50, A, F).

Finalmente, todas las larvas provenientes de embriones enfriados por 12- y 15-horas presentaron algún tipo de malformación. Su severidad se incrementó a medida que la concentración de los crioprotectores disminuyó en las SCs y el tiempo de almacenamiento se prolongó. Por ejemplo, las larvas provenientes del grupo S2 enfriado 12-horas se clasificaron en 50% malformación leve, 33%, moderada, y 17%, severa, mientras que los porcentajes para las larvas provenientes del mismo tratamiento, pero con el enfriamiento de 15-horas, fueron 20, 0, y 75%, respectivamente. Del mismo modo, las larvas provenientes de embriones enfriados en AI durante 12-horas fueron categorizadas en 8, 15, 69, y 8% como de malformación leve, moderada, severa y aberrante, respectivamente, mientras que los porcentajes para estos mismos fenotipos fueron de 0, 0, 33, y 67%, luego de las 15-horas de enfriamiento (Figura 50, A).



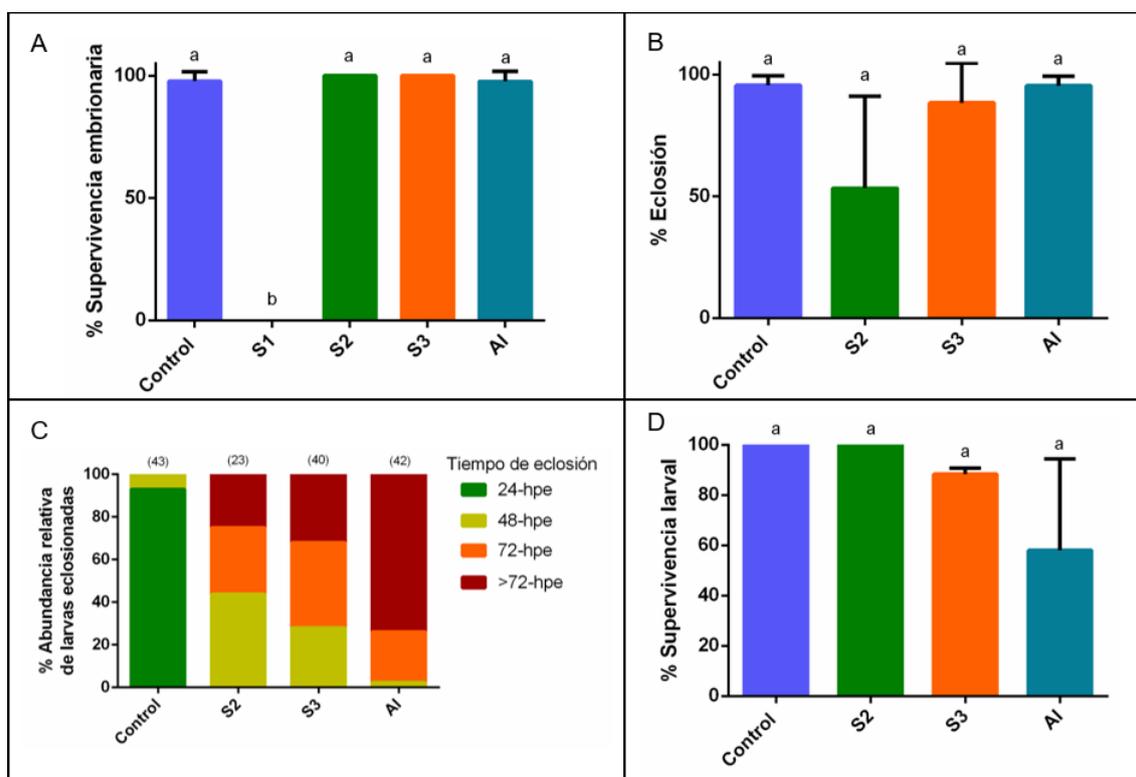
**Figura 50.** Efecto del enfriamiento a 5 °C sobre la morfología larval de *B. splendens*. Frecuencia de malformaciones larvales (A) y fotomicrografías representativas de larvas con aspecto normal (AN, B), malformación leve (ML, C), malformación moderada (MM, D), malformación severa (MS, E), y fenotipo aberrante (A, F). Las puntas de flecha indican las anomalías observadas: cola corta (CC), cola enrollada (CE), edema cardíaco (EC), y ausencia de cola (AC). Los números entre paréntesis sobre las columnas del panel A indican la cantidad total de larvas evaluadas.

### 3.5.4 Enfriamiento a 14 °C

Se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia embrionaria (97,61-100%) luego del enfriamiento a 14 °C durante 24-horas en los grupos tratados con S2, S3, y AI. De forma contraria, los embriones inmersos en S1 no sobrevivieron luego del mencionado tiempo de almacenamiento (Figura 51, A). Además, no se hallaron diferencias significativas entre la tasa de eclosión de los grupos tratados (S2: 53,33 ± 37,71%, S3: 88,46 ± 16,32%, AI: 95,39 ± 3,99%) y el grupo control (95,55 ± 3,85%, Figura 51, B).

Las larvas provenientes de los embriones tratados presentaron una eclosión tardía respecto de aquellas del grupo control. Particularmente, la frecuencia de larvas con retraso en la eclosión aumentó a medida que

disminuyó la concentración de los crioprotectores en las SCs. Por ejemplo, el porcentaje de larvas eclosionadas a las 48-hpe para el grupo S2 fue del 44%, mientras que para aquellas que estuvieron enfriadas en AI fue del 2%. Al contrario, la proporción de larvas eclosionadas a las 72-hpe en el grupo S2 fue del 25%, mientras que el AI fue del 74% (Figura 51, C). Sin embargo, a pesar del retraso en la eclosión, la supervivencia larval a las 144-hpe de aquellas provenientes de los grupos tratados (S2: 100,00 ± 0,00%, S3: 83,33 ± 2,36%, AI: 58,06 ± 36,35%) no difirió de las del grupo control (100,00 ± 0,00%, Figura 51, D).



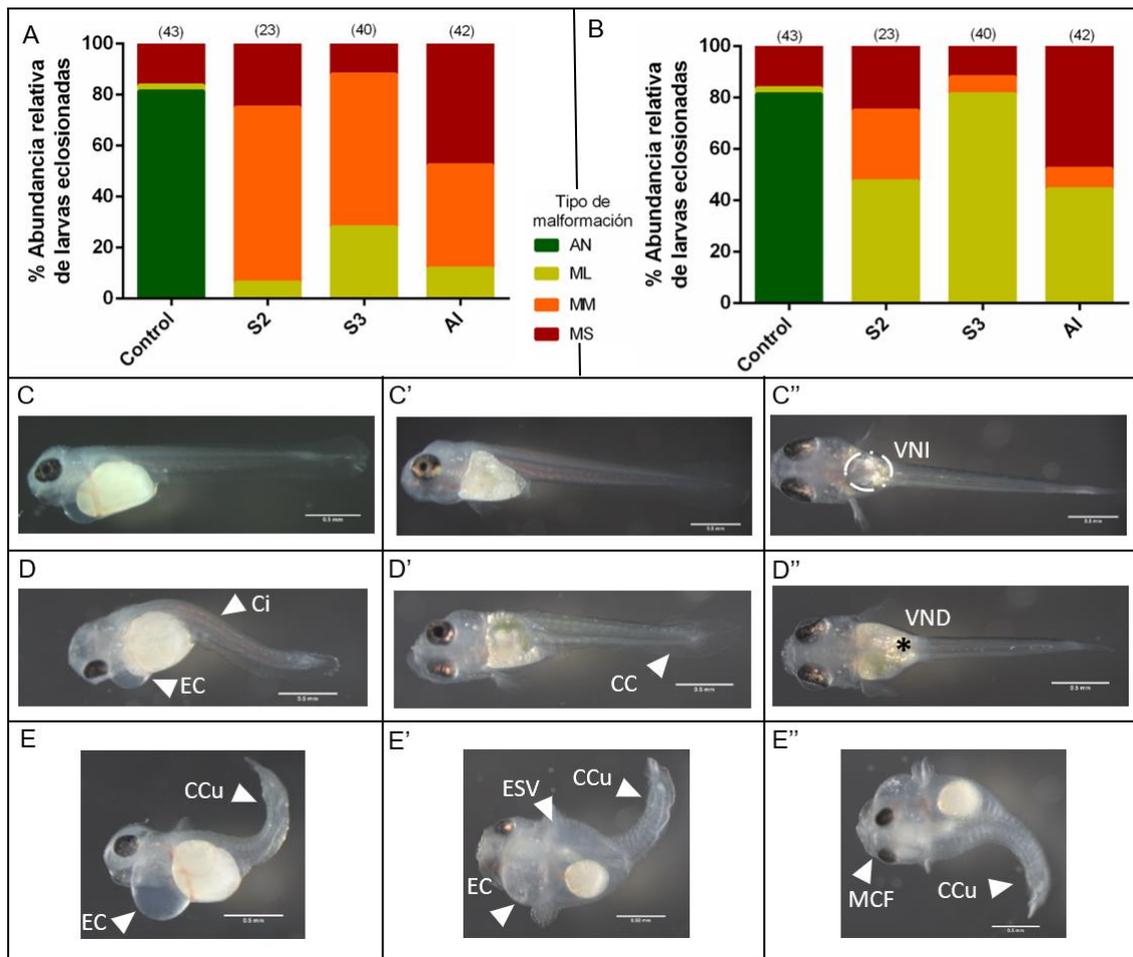
**Figura 51.** Efecto del enfriamiento por 24-horas a 14 °C de los embriones de *B. splendens* sobre la supervivencia embrionaria (A), la eclosión (B), y el retraso en la misma (C), y la supervivencia larval a las 144-hpe (D). A, B, D: se presentan los valores promedios y el desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey,  $p < 0,05$ ). C: Los números entre paréntesis sobre cada columna indican la cantidad total de larvas evaluadas.

Las larvas provenientes del grupo S3 presentaron la menor prevalencia de malformaciones severas (12,0%) luego del enfriamiento por 24-horas a 14 °C, similar a lo observado en el grupo control sin enfriamiento (16,3%). Además, en estas larvas (S3) se observó la mayor frecuencia de malformaciones leves (28,0%), seguidas de las larvas provenientes de los grupos AI (11,9%), S2 (6,2%), y el control (2,3%, Figura 52, A).

Algunas larvas que habían sido clasificadas originalmente como de malformación moderada fueron reclasificadas como de malformación leve 48 horas después de la primera evaluación antes mencionada. En particular, el porcentaje de individuos que fueron recategorizados osciló entre 32,4 y 53,3% para las larvas provenientes de los grupos A1 y S3, respectivamente. En el caso de las larvas clasificadas como de malformación severa, no se observaron cambios durante la segunda revisión (Figura 52, B).

A pesar de que ninguna de las larvas provenientes de los ensayos de enfriamiento presentó aspecto normal (Figura 52, C), algunas en las que se habían observado malformaciones moderadas (Figura 52, D) mostraron cambios morfológicos a las 120-hpe. Estos cambios en sus fenotipos las hicieron verse más similares a las larvas del grupo control (Figura 52, C') y fueron reclasificadas como de malformaciones leves. Estas mejorías incluyeron la disminución en el tamaño del edema cardíaco y el enderezamiento de la región caudal. Sin embargo, sus colas continuaron siendo más cortas que las de las larvas de aspecto normal (Figura 52, D'). Del mismo modo, en las larvas de aspecto normal se pudo observar claramente la vejiga natatoria inflada (VNI, Figura 52, C'') mientras que en las larvas reclasificadas como de malformación leve la vejiga natatoria permaneció desinflada (VND, Figura 52, D'').

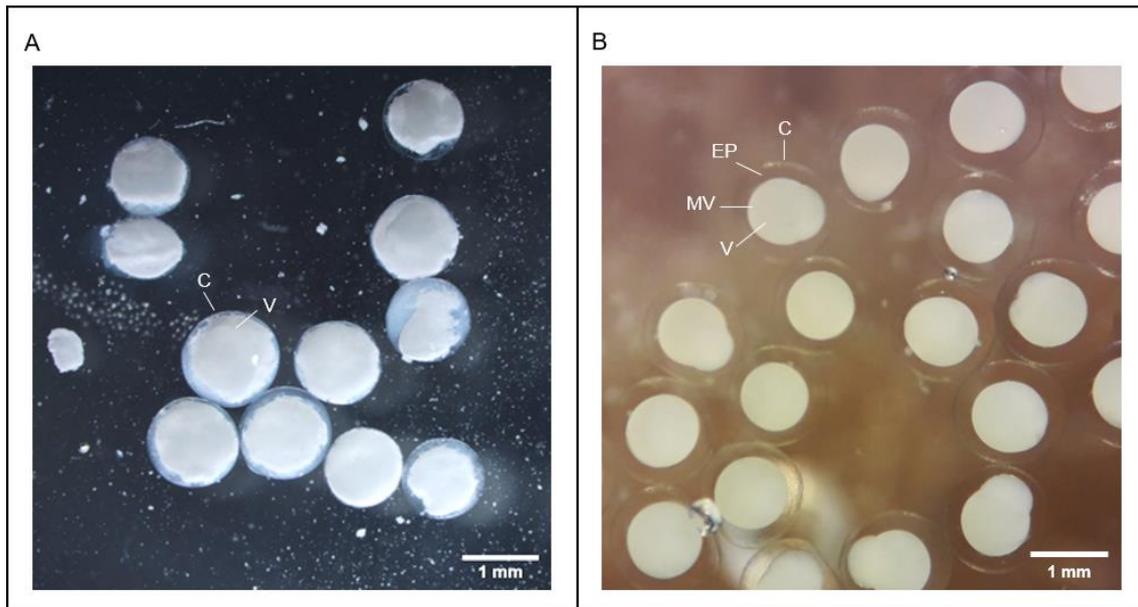
En el caso del grupo de larvas con malformaciones severas, no se observaron mejorías (Figura 52, E). De forma contraria, en estos individuos, se incrementó el tamaño del edema cardíaco que también afectó al saco vitelino, y mantuvieron la curvatura de la cola (Figura 52, E''). Además, estas larvas presentaron malformación craneofacial, reducción en el tamaño de los ojos y, su vejiga natatoria no pudo ser observada a las 120-hpe (Figura 52, E'').



**Figura 52.** Efecto del enfriamiento a 14 °C durante 24-horas sobre la morfología larval de *B. splendens*. Frecuencia de las malformaciones larvales a las 72- (A) y 120- (B) hpe. Fotomicrografías representativas de larvas de aspecto normal (AN, C), con malformación moderada (MM, D), y severa (MS, E) a las 72- (C-E) y 120- (C'-E', C''-E'') hpe, en vista lateral (C-E, C'-E') y dorsal (C''-E''). Las puntas de flecha señalan las malformaciones observadas: edema cardíaco (EC), cifosis (Ci), cola curvada (CCu), cola corta (CC), edema del saco vitelino (ESV), y malformación craneofacial (MCF). El círculo de línea punteada señala la vejiga natatoria inflada (VNI), y el asterisco, la vejiga natatoria desinflada (VND). A, B: Los números entre paréntesis sobre cada columna indican la cantidad total de larvas evaluadas.

### 3.5.5 Obtención de gametas

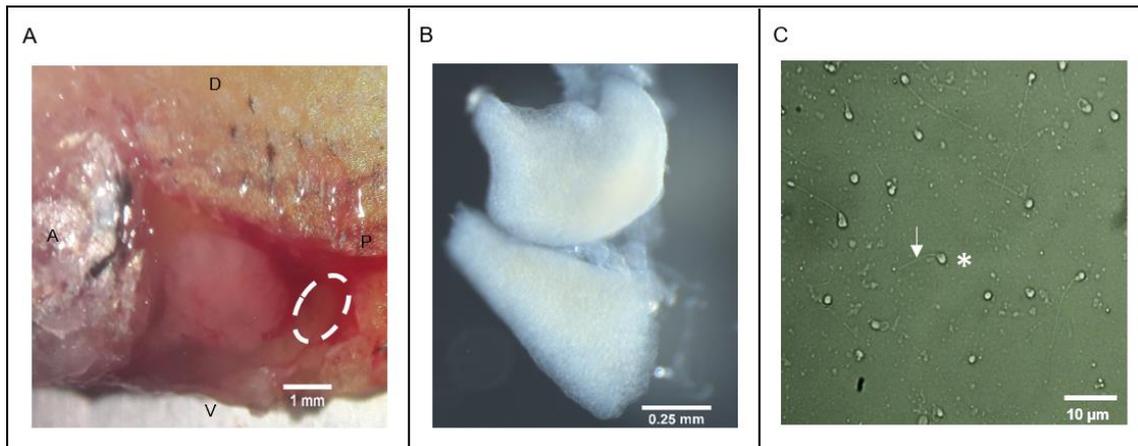
Mediante el masaje abdominal solo fue posible obtener gametas a partir de las hembras. Sin embargo, los oocitos obtenidos se observaron dañados (Figura 53, A) en comparación con aquellos oocitos sin fecundar (y embriones tempranos) que se obtuvieron de un desove natural (Figura 53, B). En los primeros, el contenido del vitelo se hallaba ocupando la totalidad del espacio limitado por el corion (Figura 53, A), mientras que, en los segundos, este estaba contenido por la membrana vitelina y se diferenciaba claramente el espacio perivitelino (espacio que se encuentra entre el vitelo y el corion, Figura 53).



**Figura 53.** Fotomicrografías representativas de un grupo de oocitos de *B. splendens* obtenidos mediante masaje abdominal (A) y de un desove natural (B). C: corion, V: vitelo, MV: membrana vitelina, EP: espacio perivitelino.

### 3.5.6 Congelamiento de espermia

Para realizar la disección, los individuos machos debieron ser colocados de forma lateral, con la región anterior del cuerpo hacia la izquierda, y la posterior hacia la derecha. En aquellos individuos a los que se los colocó de forma contraria a la recién mencionada, resultó sumamente difícil localizar los testículos. Éstos se hallaron aparentemente del lado izquierdo del animal, en la zona posterior de la cavidad abdominal, ubicados entre el intestino y la vejiga natatoria (Figura 54, A). En todos los individuos evaluados, los testículos fueron pares, de forma ligeramente arriñonada, de color blanquecino, y de tamaño promedio de 2 mm x 1 mm (eje mayor x eje menor, en individuos adultos de longitud estándar de entre 3 y 4 cm, Figura 54, B). Al disgregarlos en los dos diluyentes, se obtuvieron espermatozoides, de cabeza esférica (Figura 54, C). Algunos de éstos ya eran móviles, aún sin haber sido activados.



**Figura 54.** Disección de individuo macho adulto de *B. splendens* (A) para la obtención de los testículos (B) y espermatozoides (C). La elipse de línea punteada indica la posición de los testículos dentro de la cavidad abdominal del pez. A: anterior, P: posterior, D: dorsal; V: ventral. El asterisco señala la cabeza esférica de un espermatozoide, y la flecha, su cola.

Luego del descongelamiento de las muestras de espermatozoides, tanto empleando el diluyente A como el B, se obtuvieron espermatozoides móviles. Si bien no pudo emplearse el sistema CASA (sigla en inglés de *Computer Assisted Semen Analysis*) para su evaluación, cualitativamente se determinó que hubo mayor cantidad de espermatozoides móviles cuando se empleó el diluyente A.

### 3.6 Discusión

El pez beta (*Betta splendens*), al igual que otras especies de peces con cuidado parental, se caracteriza por su especializado comportamiento durante el período reproductivo que incluye la construcción de un nido de burbujas en la superficie del agua por parte del macho. Se ha reportado que estas burbujas son generadas a partir de moco producido en la cavidad bucal. Este moco contiene gran cantidad de glicoproteínas que le confieren la propiedad de ser muy viscoso y permiten que las burbujas permanezcan formadas durante largos períodos de tiempo. Se ha sugerido también que estas burbujas recubiertas con moco podrían reducir la incidencia de infecciones bacterianas y fúngicas en los embriones favoreciendo su eclosión [113].

En esta Tesis se evaluaron distintas metodologías para aislar a los embriones del nido de burbujas e incubarlos hasta su eclosión sin el cuidado parental. Una de ellas fue la de emplear una suspensión de leche, como se ha utilizado tradicionalmente en el cultivo de carpa [114]. Posiblemente, las proteínas de la leche se unan inespecíficamente a las glicoproteínas del corion,

neutralizando su adherencia [115,116]. Si bien esta metodología permitió disgregar el nido de burbujas, se detectaron protistas ciliados de los géneros *Strombidium*, *Euplotes*, y *Holosticha* en el medio de cultivo y sobre los embriones y larvas. A partir de su identificación, se pudo saber que los mismos eran de vida libre, filtradores bacterívoros. Esto último fue el indicador de que, probablemente a raíz de la utilización de leche para la separación de los embriones, y a pesar de los sucesivos lavados, hubiesen quedado restos que dieron lugar a una gran proliferación de bacterias, y estas últimas a los protistas hallados. Por este motivo se decidió emplear la otra metodología que implicó el uso de un detergente para disolver el nido de burbujas. Además, para evitar las infecciones bacterianas y fúngicas, el agua de incubación se autoclavó y se le agregó azul de metileno como se recomienda en la incubación de embriones de medaka (*O. latipes*) [57]. Este protocolo permitió obtener excelentes resultados como altas tasas de eclosión en los grupos control (96-100%) con un bajo porcentaje de larvas con malformaciones (5-18%).

Se tiene conocimiento de que la temperatura tiene un impacto muy importante sobre la fisiología de los organismos poiquiloterms como es el caso de los peces, afectando directamente la supervivencia y desarrollo embrionarios, y el crecimiento [117]. Respecto del enfriamiento, las células sufren diferentes tipos de daños metabólicos y estructurales al ser expuestas a bajas temperaturas [10]. Los ensayos de enfriamiento no pudieron realizarse con los embriones de estadios tempranos de *B. splendens* debido a su gran fragilidad y adherencia, y su baja tolerancia a los distintos tipos de manipulación como el aislamiento del nido de burbujas empleando *Tween-20*, agitación, y pipeteo. A pesar de estos obstáculos en la realización de los ensayos de esta Tesis, en numerosos trabajos se ha reportado que el daño por enfriamiento decrece gradualmente en los estadios embrionarios más avanzados de numerosas especies de peces como *D. rerio* [6,86], *O. latipes* [87], *C. carpio* [10,85], y *Channa striata* [118], entre otras. De hecho, se observó que los embriones del estadio de latido cardíaco de *C. carpio* y *C. striata* presentaron la menor sensibilidad a las bajas temperaturas [10,118]. Coincidiendo con estas evidencias, en esta Tesis se observó que los embriones de 24-hpf de beta toleraron los protocolos de enfriamiento y se obtuvieron altas tasas de eclosión. De forma semejante, en otras especies

como *Piaractus brachypomus* [26], *Piaractus mesopotamicus* [119], *Steindachneridion parahibae* [29], *Epinephelus moara* [88], y *Odontesthes bonariensis* [120] se obtuvieron resultados promisorios al emplear embriones de estadio medio en ensayos de enfriamiento.

Los porcentajes de supervivencia y eclosión obtenidos luego de los ensayos de enfriamiento reflejan un balance entre la toxicidad y los efectos protectivos de los crioprotectores a bajas temperaturas [10]. En este Segundo Capítulo, los crioprotectores empleados fueron sacarosa y metanol, los cuales han mostrado su efecto protector frente al daño por frío en embriones de pez cebra y carpa [10,86]. Además, se evaluaron tres SCs, de las cuales la S1 había sido reportada previamente para el enfriamiento de embriones de carpa con resultados promisorios (eclosión en torno al 38% luego de 72-horas a 4 °C) c. Sin embargo, la S1 presentó la mayor toxicidad y el menor efecto protector sobre los embriones de *B. splendens* a ambas temperaturas de almacenamiento (5 y 14 °C).

Aunque la toxicidad de los crioprotectores podría reducirse en algunos casos disminuyendo la temperatura a la que son llevados los embriones [10], los efectos tóxicos de S1 se observaron incluso a 5 °C, a partir de las 6-horas de almacenamiento. Esta toxicidad implicó un descenso de la supervivencia embrionaria y la tasa de eclosión, y un incremento en el retraso en la eclosión y la incidencia de malformaciones severas respecto de otros tratamientos. En particular, los embriones de beta enfriados con S1 durante 12-horas a 5 °C no sobrevivieron, mientras que, en condiciones semejantes, para embriones de carpa se reportó un 41% de eclosión [22]. Entonces, estos resultados demuestran que los embriones de *B. splendens* son menos tolerantes a estos protocolos de enfriamiento que los de *C. carpio*.

Las otras SCs evaluadas, con menor concentración de sacarosa y metanol (S2: sacarosa 0,25 M, metanol 0,75 M y S3: sacarosa 0,125 M, metanol 0,375 M), resultaron menos tóxicas y con mejor efecto protector que la S1 en los embriones de *B. splendens*. En particular, la eclosión de los grupos S2 y S3 fueron similares a la del grupo control, cuando fueron enfriados durante 9-horas a 5 °C y 24-horas a 14 °C. De manera similar, en estudios previos con embriones de *C. striata* enfriados a 15 °C durante 3-horas

empleando sacarosa 0,1 M o metanol 1 M, se registró una eclosión en torno al 90% [118]. Además, así como no se observaron efectos negativos cuando los embriones de beta se enfriaron a 5 °C por hasta 6-horas sin crioprotectores (AI), una situación similar fue observada en trabajos realizados con embriones de *Paralichthys orbignyanus* y *C. striata*, enfriados a 5 °C por 30-minutos y 15 °C por 3-horas, respectivamente [118,121]. Este hallazgo proporciona al menos dos ventajas. En primer lugar, el agregado de la solución crioprotectora podría realizarse a baja temperatura cuando el metabolismo celular ya se encuentra reducido, disminuyendo así su toxicidad [121]. Y, en segundo lugar, el tiempo de almacenamiento podría extenderse combinando un primer enfriamiento sin crioprotectores seguido de un reemplazo del AI por alguna SC. Se requieren más estudios en este aspecto a fin de poder extender el tiempo de almacenamiento de los embriones de *B. splendens* a 5 °C. Una nueva estrategia podría ser el reemplazo del AI por alguna SC luego de las primeras 6-horas de enfriamiento.

Por otro lado, una SC con mayor concentración de metanol (sacarosa 0,5 M, metanol 2,2 M) que las empleadas en este segundo capítulo, se ha evaluado en el enfriamiento de embriones de peces de diferentes especies [26–29,119]. De forma similar al resultado obtenido con la S1 luego de 9-horas a 5 °C, en el enfriamiento de embriones de *B. orbignyanus* por 6-horas a  $8\pm 2$  °C empleando la SC de mayor concentración de metanol antes mencionada, se obtuvo una eclosión del 0-5 % [27]. Sin embargo, cuando esta misma SC fue evaluada en *S. parahybae*, *Rhinelepis aspera*, *P. brachypomus*, y *P. mesopotamicus* para el enfriamiento a temperaturas bajo cero (entre -5 y -10 °C), se obtuvieron porcentajes de eclosión entre 30 y 60% [26,28,29,119]. Este hecho podría explicarse a razón de que la concentración óptima de metanol, en combinación con la sacarosa, resulta temperatura-dependiente (por ejemplo, metanol 1 M a 0 °C hasta 3 M a -15 °C) [86]. Teniendo esto en cuenta, y considerando que cada protocolo de enfriamiento debe ser especie- específico y que su éxito depende también del estadio embrionario empleado, no se descarta evaluar nuevamente la S1 para enfriar embriones de pez beta a temperaturas bajo cero en futuros ensayos. Asimismo, tampoco se descarta incorporar la SC mediante microinyección ya que existe un reporte donde se ha

empleado esta técnica, pero con otros fines, en embriones de *B. splendens* [122].

Los factores ambientales como la temperatura del agua, el oxígeno disuelto, y el fotoperíodo influyen el tiempo de eclosión. En particular, al disminuir la temperatura, el período de tiempo entre el comienzo y el final del proceso de eclosión se extiende como consecuencia de la disminución de la tasa metabólica [123,124]. De hecho, todas las larvas de pez beta provenientes de los ensayos de enfriamiento por 12- y 15-horas a 5 °C y 24-horas a 14 °C presentaron eclosión tardía con respecto al grupo control. Así, se podría pensar que el metabolismo de los embriones enfriados resultó aletargado o se encontró alterado aún cuando fueron incubados a la temperatura óptima para esta especie (alrededor de 27 °C) [125]. Una situación similar fue descrita por Silva Lopes y col. en su trabajo con embriones de *S. parahybae* [29]. Asimismo, se podría hipotetizar que el estadio embrionario empleado, dada su complejidad, requiere un mayor período de tiempo para restablecer su metabolismo luego del enfriamiento. Además, comparando los tratamientos a 14 °C, se puede observar una tendencia creciente en el retardo de la eclosión a medida que disminuyeron las concentraciones de los crioprotectores en las SCs (A1>S3>S2). También se observó una importante heterogeneidad en el momento de la eclosión. Esto podría ser una desventaja a la hora de aplicar estos protocolos en un contexto de producción acuícola, dada la diferencia de edad entre las larvas provenientes de un mismo lote de huevos. Por último, teniendo en cuenta que los embriones y larvas de peces son más sensibles que los individuos adultos a las fluctuaciones ambientales [126], el retraso en la eclosión podría ser consecuencia del daño por enfriamiento a causa de una falta de crioprotección por parte de las SCs.

La viabilidad de las larvas provenientes de embriones enfriados es un factor crítico al momento de determinar la factibilidad del protocolo empleado. Sin embargo, este parámetro solo ha sido tenido en cuenta en pocos trabajos [72,120]. En el caso de este segundo capítulo, se evaluó durante 6-días (144-hpe) la supervivencia de las larvas provenientes de los embriones enfriados a 14 °C, y se observó que aún cuando no se habían hallado diferencias entre los tratamientos y el grupo control, las larvas provenientes del grupo A1 presentaron la menor supervivencia. Este hecho, al igual que el mayor retraso

en la eclosión mencionado previamente, podría explicarse también a causa del daño por enfriamiento por la falta de crioprotección.

Las variaciones de temperatura durante la embriogénesis afectan significativamente diferentes procesos fisiológicos implicados en el desarrollo y esto se ve reflejado luego en el aspecto externo de las larvas obtenidas [127]. En concordancia con este hecho, en las larvas de pez beta provenientes de embriones enfriados se observaron diferentes malformaciones. Las anomalías que se describieron en este segundo capítulo fueron similares a otras descritas en ensayos de enfriamiento de embriones de otras especies como *B. orbignyanus* [27], *S. parahybae* [29], *D. rerio* [72], y *O. bonariensis* [120].

Los principales efectos de las temperaturas extremas durante la esqueletogénesis son curvaturas en la columna vertebral, y deformaciones del cráneo y las mandíbulas [127]. En el caso de las larvas de salmónidos provenientes de embriones incubados fuera de su rango óptimo de temperatura (a menores o mayores temperaturas), se han observado malformaciones de la notocorda y de las vértebras como la fusión de condrocentros y/o malformación de los elementos asociados, donde las vértebras poscraneales, transicionales y caudales son las más afectadas [128]. En particular, los fenotipos externos de las larvas del salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) con las malformaciones antes mencionadas [129] han sido muy similares a los descritos en este segundo capítulo. En próximos estudios, sería conveniente incluir técnicas histológicas como el protocolo sin ácidos para la tinción de cartílago y hueso [130] para evaluar la osificación temprana de las larvas de *B. splendens* provenientes de embriones enfriados.

La clasificación de las malformaciones larvales en distintas categorías y la evaluación de su frecuencia, fueron realizadas previamente en *O. bonariensis* [120]. Teniendo en cuenta estos resultados de malformaciones, se pudo determinar cuál de las SCs fue la más conveniente para el almacenamiento de los embriones de *B. splendens* a cada temperatura. En este sentido, la S2 fue la más conveniente para el enfriamiento a 5 °C por 9-, 12- y 15-horas, obteniendo 87% de larvas de aspecto normal, y 50% y 25% de larvas con malformaciones leves, respectivamente. Por otro lado, la S3 fue la más conveniente para el almacenamiento a 14 °C por 24-horas. Estos

resultados coinciden con el hecho de que la concentración óptima de crioprotectores es temperatura-dependiente [86].

La temperatura es también el factor ambiental que induce la mayor plasticidad fenotípica en peces [127]. Es importante remarcar que se observó una recuperación parcial en las larvas provenientes de embriones enfriados a 14 °C que habían presentado curvatura del eje axial y pequeño edema cardíaco. Esta mejoría se detectó a las 120-hpe y tomó al menos 48-horas de incubación de las larvas malformadas a su temperatura óptima (26 °C), obteniéndose 81% de larvas con malformaciones leves en el grupo S3. Una situación similar había sido descrita en larvas de *C. carpio* expuestas a una concentración de cobre durante la embriogénesis [131]. Hasta el momento de la escritura de esta Tesis, este es el primer reporte de un evento de este tipo luego de un ensayo de enfriamiento. Además, este resultado mostró que es posible que las larvas se recuperen luego del enfriamiento. En este sentido, sería necesario realizar nuevos estudios para evaluar su estatus metabólico.

Si bien se obtuvieron altos porcentajes de larvas con aspecto normal o con malformaciones leves a partir de los embriones enfriados, se decidió también evaluar su capacidad de inflar la vejiga natatoria. En este sentido, la vejiga natatoria desinflada, en conjunto con las malformaciones mencionadas previamente, afecta negativamente la correcta natación y alimentación de las larvas, impidiendo su normal desarrollo hasta individuos adultos [27]. En particular, las larvas provenientes de los embriones enfriados a 14 °C que habían presentado una recuperación parcial no lograron continuar con su desarrollo probablemente a causa de esta anormalidad, entre otras. Las temperaturas subóptimas y subletales durante el desarrollo embrionario producen alteraciones fisiológicas que pueden causar una organogénesis inadecuada o incompleta [127]. En particular, en el pez cebra, el desarrollo de la vejiga natatoria comienza durante la embriogénesis a las 36-horas-post-fecundación y el inflado ocurre a los 5-días-post-fecundación. Además, se ha reportado que una falla en el sistema circulatorio durante este período de tiempo es suficiente para que el desarrollo de la vejiga natatoria quede arrestado [132]. Teniendo en cuenta el estadio de los embriones de pez beta empleados en este estudio (24-hpe, 26 °C) y que la mayor proporción de las larvas con vejiga natatoria desinflada se obtuvieron luego de los enfriamientos

de 9- a 15-horas a 5 °C y 24-horas a 14 °C, se puede plantear la hipótesis de que el enfriamiento prolongado interrumpe el momento crucial del desarrollo del sistema circulatorio y la vejiga natatoria.

En numerosas especies de peces es posible realizar fecundaciones artificiales o *in vitro*, utilizando gametas obtenidas a partir del masaje abdominal de los individuos maduros sexualmente. Incluso se ha descrito esta metodología para peces de tamaño semejante a *B. splendens* como es *O. latipes* [57]. En el caso del pez beta, esta metodología se reportó inicialmente en dos trabajos a comienzos de la década de los '90 [133,134] pero posteriormente, y coincidiendo con lo expuesto en esta Tesis, se refutó la posibilidad de obtener esperma a partir del masaje abdominal [135]. En este sentido, una de las causas podría ser que los testículos en esta especie no son de forma alargada ni se ubican en la dirección antero-posterior como en muchos otros teleósteos. Además, a partir de lo observado en las disecciones, parecerían estar ubicados del lado izquierdo del animal. Coincidiendo con esta observación, recientemente se describió en *Colisa lalia*, especie muy emparentada con *B. splendens*, que efectivamente, los testículos en los individuos adultos se ubican en el lado izquierdo de la cavidad abdominal [136,137]. Por otro lado, el protocolo que se empleó en este trabajo para obtener el esperma a partir del macerado de los testículos se había utilizado previamente con éxito tanto en pez beta [110,138,139] como en el congelamiento de esperma de otras especies de peces ornamentales [140]. Sin embargo, se requieren más trabajos en el área para que la obtención de esta gameta no implique el sacrificio del animal. De la misma forma, debe hallarse un método de obtención de los oocitos sin que estos resulten dañados.

Por último, cabe resaltar que los resultados aquí presentados refuerzan la idea de emplear crioprotectores aún cuando los protocolos de enfriamiento de embriones no involucran la formación de cristales de hielo, como había sido mencionado previamente por Costa y col. [141]. En este sentido, la función de las SCs fue probablemente la de estabilizar las membranas plasmáticas a bajas temperaturas, permitiendo que las mismas preservaran su estructura y función [142,143]. En ese capítulo, los mejores resultados se obtuvieron empleando la S2 para el enfriamiento a 5 °C por 9-horas obteniendo 77% de

eclosión y 52% de larvas con aspecto normal y vejiga natatoria inflada, y el uso de la S3 para el enfriamiento a 14 °C por 24-horas obteniendo 88% de eclosión y 81% de larvas con malformaciones leves. Finalmente, esta Tesis sienta las bases para futuros ensayos que permitan optimizar los protocolos de enfriamiento para los embriones de *B. splendens*.

### 3.7 Conclusiones

En este segundo capítulo se alcanzaron la mayoría de los objetivos planteados inicialmente:

- 1) se desarrolló un protocolo para separar a los embriones del nido de burbujas y se los incubó con éxito sin el cuidado parental;
- 2) se estableció al estadio de 24-hpf (26 °C) como el más tolerante a la manipulación y al enfriamiento;
- 3) se seleccionó a la SC compuesta por sacarosa 0,25 M y metanol 0,75 M como la más conveniente para el almacenamiento de los embriones a 5 °C durante 9 horas, y una dilución a la mitad de la misma, para el almacenamiento a 14 °C por 24 horas;
- 4) se lograron obtener muestras de esperma y criopreservarlas.

En resumen, este trabajo informa, por primera vez, la posibilidad del enfriamiento de embriones y la criopreservación de esperma de *B. splendens*. Además, establece las bases para futuros ensayos en el área, como evaluar las muestras de esperma pre- y post-congelamiento empleando el sistema CASA, y estudiar su capacidad fecundante, a fin de obtener embriones *in vitro*. Asimismo, presenta un protocolo para la separación de embriones del nido de burbujas que puede emplearse tanto para su uso en nuevos ensayos de enfriamiento como en otros campos de aplicación en los que se requieran a los embriones individualizados, como estudios de biología del desarrollo o toxicología.

## 4 Conclusiones generales

Tanto en pejerrey como en pez beta, se lograron desarrollar y aplicar protocolos de enfriamiento de embriones, obteniéndose altas tasas de supervivencia y eclosión. Si bien el estadio embrionario hallado como el más

tolerante y las malformaciones descritas fueron semejantes en ambas especies, los protocolos debieron adecuarse a las particularidades de cada una de ellas. Así, quedó demostrado una vez más, que los protocolos de enfriamiento para embriones de peces resultan especie-específicos. El tema de trabajo de esta Tesis fue completamente novedoso en el país, y de ella se desprendieron los primeros dos trabajos en revistas científicas internacionales acerca del enfriamiento de embriones de *Odontesthes bonariensis* y *Betta splendens* que existen hasta el momento. Los resultados aquí presentados sientan las bases para próximos desarrollos tecnológicos en este campo y evidencian la necesidad de nuevos estudios para optimizar los protocolos desarrollados y minimizar la presencia de malformaciones.

## 5 Anexo 1: Normativa vigente y vacíos legales que atañen al Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral

Esta sección fue desarrollada en el marco de la asignatura “Legislación Pesquera y Acuícola” de la Carrera de Especialización en Pesca y Producción Acuícola (CEPPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires en el año 2019. Fue corregida por los Dres. Pablo Filippo y Daniel Seitune, y obtuvo la máxima calificación (10/10). Como prólogo de esta sección se incluye la devolución realizada por los docentes recién mencionados.

### 5.1 Prólogo

- *El trabajo abarca íntegramente la normativa aplicable a la investigación propuesta.*
- *Desarrolla una didáctica presentación sobre la actividad científica para entender su encuadre legal, integrando normativas vinculadas a la ciencia (Ley 25467 de Ciencia, Tecnología e Innovación) y sectoriales (Ley 11477 de la Provincia de Buenos Aires, Ley Nacional de Acuicultura 27231), como asimismo del SENASA y legislación comparada. Las normas identificadas en el trabajo que atañen a la investigación están dispersas (no están en una sola ley), y el valor especial del trabajo es su sistematización para su comprensión.*
- *La forma en que se integra la información en el trabajo permite entender con claridad la legislación vigente y los vacíos (brechas) legales. Identifica adecuadamente la distinción entre las competencias provinciales y nacionales en los temas que aborda.*
- *Aporta bibliografía concreta y referencias normativas que permiten acreditar las opiniones vertidas en el trabajo.*
- *Identifica tendencias legislativas en curso respecto de la experimentación de animales (Proyecto en el Senado S-0048/18) y las necesidades para el futuro desarrollo en estas materias, actualmente reguladas por normas que requieren ser reformuladas.*
- *Prolijo formato de presentación.*

***Es un trabajo que genera aportes concretos, contribuyendo a identificar asuntos que posteriormente podrían ser ampliados por el autor u otros interesados. Los mismos podrían ser segmentados en su análisis -por la diversidad de normativas que identifica- y que pueden ayudar al desarrollo normativo de estos temas de ciencia y acuicultura que siguen siendo novedosos/escasamente explorados en la normativa actual.***

## 5.2 Lugar de trabajo

El desarrollo de la investigación que implicó esta Tesis Doctoral se llevó a cabo en el Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura perteneciente al Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina). El INTECH es un instituto de doble dependencia: depende por un lado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y, por otro, de la Universidad Nacional General San Martín (UNSAM). Además, es un instituto asociado del Consejo de Investigaciones Científicas (CIC) –Provincia de Buenos Aires e integra el grupo de Unidades Ejecutoras del Centro Científico Tecnológico (CCT) – La Plata.

## 5.3 Normativa vigente

El desarrollo de este trabajo de investigación se encuentra contemplado por la Ley de Ciencia, Tecnología e Innovación (Ley 25.467) que tiene por objeto establecer un marco general que structure, impulse y promueva las actividades de ciencia, tecnología e innovación, a fin de contribuir a incrementar el patrimonio cultural, educativo, social y económico de la Nación. Asimismo, en esta ley se establecen los objetivos de la política científica y tecnológica nacional, entre los que se encuentran estimular y garantizar la investigación aplicada, el desarrollo tecnológico y la formación de investigadores. Además, esta ley fija las responsabilidades del Estado nacional, la estructura del sistema, y la planificación, financiamiento y evaluación de las actividades de investigación y desarrollo.

Por otro lado, en el año 2013, el entonces Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, a través de su resolución 673/13 dio lugar

a la creación del Sistema Nacional de Bioterios (SNB) que tiene como principal propósito optimizar el estado, funcionamiento y prestación de servicios de los bioterios que alojen animales de laboratorio en todas sus categorías (cría, experimentación, ensayo biológico, docencia), que se encuentren instalados en instituciones del sistema académico y científico argentino. Este sistema tiene por objetivo contribuir al desarrollo armónico y sostenible de la ciencia del animal de laboratorio mediante el establecimiento de planes de gestión integral de cuidado y uso de los animales, instalaciones mejoradas con equipamiento adecuado y personal capacitado en aspectos técnicos y sensibilizados acerca de criterios éticos. Asimismo, busca lograr la visibilidad y documentar la existencia de los bioterios, promoviendo mecanismos de cooperación.

En particular, el Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, CONICET-UNSAM), en el cual se está llevando a cabo el desarrollo de la investigación de esta tesis, desde el año 2015, a través de la Resolución 072/15 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, se encuentra adherido al SNB y cuenta con dos unidades: un bioterio de ratones y uno de peces.

Actualmente, el Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología, en su Plan de Actividades para el Fortalecimiento del SNB, dentro de las bases para la Solicitud de Apoyo Económico para el Fortalecimiento de Bioterios, exige, entre otros requisitos, que estos deben contar con un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) o de Experimentación (CICUAE).

Los CICUAEs tienen como objetivo apoyar y promover el uso racional y humanitario de los animales de experimentación en base al principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) y certificar las Buenas Prácticas de Bienestar Animal (BPBA) en las actividades de investigación, docencia universitaria y formación profesional específica para el ejercicio de actividades relacionadas con la investigación. Se entienden por BPBA: la prevención y el tratamiento de enfermedades y lesiones; la prevención y atenuación del dolor, el sufrimiento y otros estados negativos; el suministro de dietas y condiciones de vida que satisfagan las necesidades de los animales experimentales y se

adaptan a su necesidad. Estos Comités han sido creados para apoyar, recomendar y avalar a los investigadores cuyo trabajo involucre el uso de animales de experimentación.

En particular, la Universidad de San Martín (UNSAM), de la cual depende el INTECH, posee un CICUAE que es un cuerpo colegiado formado por investigadores usuarios de animales, elegido por el Consejo Superior de la Universidad ([Resolución UNSAM 262/10](#)), cuyo objetivo principal es asegurar el cuidado y uso de los animales de experimentación con propósitos de investigación y enseñanza y, que este sea apropiado y humanitario. Por este motivo cualquier proyecto de investigación o docencia que involucre experimentos con animales a realizarse en la Universidad deberá contar con el aval del CICUAE-UNSAM.

Por último, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) a través de su resolución 1/2013 regula las condiciones sanitarias para autorizar la importación a la República Argentina de organismos acuáticos vivos con destino a investigación.

#### 5.4 Vacíos legales

Hasta la actualidad, en la Argentina, no existen leyes específicas que regulen la experimentación con animales ni que los protejan. Lo regulado en la materia sólo contempla los requisitos y condiciones para la habilitación técnica de bioterios que realizan ensayos biológicos y químicos (Resolución 617/2002 del SENASA), y los bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o de análisis para terceros (Disposición ANMAT 6344 /96). La protección de los animales de experimentación, sólo es mencionada en la Ley 14.346 de Malos Tratos y Actos de Crueldad a los Animales que data de 1954. Y en lo referente a criopreservación, solo se encuentran reguladas las actividades relacionadas con la inseminación artificial de animales (mamíferos de producción) por la Ley 20.425 del año 1973. Asimismo, el SENASA, a través de sus resoluciones, ha establecido los requisitos zoonosanitarios para la importación de mercancías de origen animal, que incluyen semen y embriones de mamíferos como bovinos, equinos y ovinos, entre otros.

En el año 2018, el Senador Nacional Julio Cobos, presentó un proyecto de ley (S-0048/18) titulado “Protección de los animales de experimentación”. Este proyecto tiene como objeto la protección de los animales utilizados o destinados a ser utilizados con finalidades experimentales, científicas o educativas, a fin de garantizar los cuidados necesarios, evitando causarles algún tipo de sufrimiento y reducir al mínimo el número de animales empleados y la repetición innecesaria e injustificada de procedimientos experimentales. En caso de sancionarse dicho proyecto de ley, su aplicación alcanzaría a todo animal vivo, vertebrado no humano y cefalópodos, incluso en su etapa de desarrollo fetal, y a todas aquellas especies para las que se demuestre con pruebas científicas válidas y actualizadas la capacidad de experimentar sufrimiento.

En el marco de este proyecto de ley, esta investigación de tesis quedaría catalogada como “Investigación zootécnica” ya que mediante la utilización de animales de producción (en este caso, un plantel de peces reproductores y su descendencia -embriones-) tiende al mejor aprovechamiento en materia de crianza, manejo y producción de animales (mediante el enfriamiento de embriones que presenta las ventajas mencionadas en la Introducción de este Trabajo Práctico).

El mencionado proyecto de ley se basa, entre otras, en normativas europeas como la Ley 5/1995 de Protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas de la Comunidad Autónoma de Cataluña; la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; y, del Real Decreto 53/2013 de España para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

En el caso de la Ley 5/1995 de la Comunidad Autónoma de Cataluña, esta no hace especial mención a los peces y excluye explícitamente de su ámbito de aplicación a las formas fetales y embrionarias. Por otra parte, la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea debe ser aplicada tanto a fetos de mamíferos como a larvas de peces autónomas para su alimentación. Además, cabe resaltar que en la mencionada Directiva y en el Real Decreto 53/2013 de

España se regula el mantenimiento y la experimentación con peces haciendo especial énfasis en diversos aspectos como la calidad del agua y sus parámetros físico-químicos (oxígeno, compuestos nitrogenados, salinidad, y temperatura); los acuarios (tamaño, densidad poblacional, iluminación, enriquecimiento ambiental, ubicación lejos de fuentes de ruido y/o vibraciones); la aclimatación de los animales a los mismos; su manipulación y alimentación; y, los métodos aprobados para su eutanasia.

## 5.5 Alcances de la investigación

### 5.5.1 Acuicultura

La presente investigación tiene su campo de aplicación inmediato en la Acuicultura. La administración de dicha actividad a nivel nacional es responsabilidad de la Dirección de Acuicultura. Esta Dirección depende de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). Así, mediante la Resolución SAGPyA 1314/04 se reguló la producción de organismos acuáticos vivos en el territorio de la República Argentina. De este modo, todo proyecto que sea presentado a nivel provincial y en el que se prevea la comercialización de la producción en distintas jurisdicciones o esté destinado a la exportación, deberá cumplir con todos los requisitos exigidos por la Nación. Asimismo, la Nación no admite proyectos que no hayan sido previamente aprobados por las respectivas provincias. Esto último es válido también para el ingreso de organismos acuáticos o subproductos de estos, como podrían ser los embriones (“ovas embrionadas” en el texto de la mencionada resolución). Cabe destacar que esta resolución aclara que entiende por emprendimiento de producción acuícola a toda instalación situada en un lugar geográfico seleccionado, en el que se produzcan, cultiven o mantengan organismos acuáticos vivos mediante metodologías existentes o que pudieran surgir con el avance de las tecnologías destinadas a la actividad. Dentro de este grupo de nuevas tecnologías aplicadas a la producción de organismos acuáticos vivos podría incluirse el tema de esta investigación: el enfriamiento de embriones.

Además, esta legislación establece como obligatoria la inscripción de los establecimientos productivos en el Registro Único Nacional de

Establecimientos de Acuicultura (RENACUA), con el fin de poder realizar un seguimiento sobre los mismos. Asimismo, es requisito fundamental para los establecimientos que pretendan realizar la importación o exportación de organismos acuáticos vivos o sus subproductos estar inscriptos en el mencionado Registro.

A finales del año 2015, se promulgó la Ley Nacional 27.231 de Desarrollo Sustentable del Sector Acuícola. Sin embargo, la provincia de Buenos Aires, uno de los sitios dónde se realiza la acuicultura del pejerrey, no se encuentra adherida a la mencionada ley. La provincia de Buenos Aires cuenta con su propia normativa en el área de Pesca y Acuicultura que es la Ley Provincial 11.477.

#### 5.5.2 Comercio de “ovas embrionadas”

Actualmente, en el país se comercializan embriones (“ovas embrionadas”) de dos especies: de un salmónido, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y, de pejerrey bonaerense (*O. bonariensis*), que es el modelo de estudio de esta investigación. En ambos casos, se aprovechan particularidades de estas especies como la tolerancia a bajas temperaturas (no congelamiento) y el extenso período de desarrollo embrionario (en comparación con otras especies de acuicultura) para ser trasladados entre estaciones de piscicultura. Sin embargo, estos embriones no pueden ser almacenados y su comercio se encuentra supeditado a la época de reproducción de cada especie.

En el caso de la trucha arcoiris, en el RENACUA solo se encuentran registrados tres proveedores de ovas: uno ubicado en la provincia de Santa Cruz; otro, en Rio Negro; y, el tercero, en Buenos Aires. Es este último proveedor el que las importa desde el establecimiento *TroutLodge* (Washington, EE UU) que es el mayor productor a nivel mundial de ovas embrionadas de trucha arcoíris. Estas ovas se envían acondicionadas bajo hielo en el estadio embrionario “con ojos”.

En referencia a este tipo de importaciones, el SENASA ha emitido la Resolución 853/2011 acerca de las “Condiciones Sanitarias para el Registro y

Funcionamiento de Predios Cuarentenarios en la Importación de Salmónidos, sus Ovas y/o sus Gametas a la República Argentina”.

En el caso del pejerrey, la producción de “ovas embrionadas” se realiza en la Estación Hidrobiológica de Chascomús (EHCh, Buenos Aires), dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires. La EHCh suministra embriones, larvas (“alevinos”) o juveniles de pejerrey para la siembra de espejos de agua de la Provincia o para el inicio de proyectos de acuicultura de esta especie. Pueden acceder a ellos: municipios, clubes o federaciones de pesca deportiva, productores independientes o nucleados en sociedades, titulares de estaciones de alevinaje de pejerrey y organismos de investigación, como es el caso del laboratorio donde se está llevando a cabo esta tesis (los embriones empleados en los distintos ensayos son brindados por la EHCh). Para acceder a los productos antes mencionados que ofrece la Estación debe solicitarse y cumplimentarse debidamente una planilla de la Dirección de Desarrollo de Aguas Continentales y Acuicultura dependiente de la Dirección Provincial de Pesca (Buenos Aires).

## 5.6 Conclusiones finales

Teniendo en cuenta los avances científicos en los últimos años y la toma de conciencia por el bienestar animal, es necesario contar con legislación acorde a los tiempos que permita proteger a los animales utilizados en experimentación. Así, debería tomarse como referencia la legislación europea antes mencionada y las diferentes guías de buenas prácticas en el uso y cuidado de peces en investigación, docencia y acuicultura como las descritas por el *NSW Fisheries Animal Care and Ethics Committee* (Australia, 2002), el *Canadian Council on Animal Care* (Canadá, 2005) y el *National Research Council* (EE UU, 2011). Además, debería considerarse, como se estipula en el proyecto de ley S-0048/18, la creación de un Comité Nacional de Bioética Animal (CoNaBA) que asesore y brinde capacitación a los responsables de los proyectos, y evalúe y apruebe los mismos teniendo en cuenta la severidad de los procedimientos experimentales, la correcta determinación del punto final de la experiencia, y todo lo referente a la protección y trato humanitario de los animales.

Por último, cabe destacar que toda persona que cuide o utilice animales para investigación o docencia debería asumir que los mismos se encuentran bajo su dependencia y, por lo tanto, interesarse y hacerse responsable por garantizar su bienestar.

## 5.7 Bibliografía

### 5.7.1 Normativa

**Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo.** Protección de los animales utilizados para fines científicos.

<https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf> (Consultada al día 22/10/2019)

**Ley 11.477.** Pesca y Acuicultura.

<http://www.gob.gba.gov.ar/legislacion/legislacion/l-11477.html> (Consultada al día 22/10/2019)

**Ley 20.425.** Regulación de actividades relacionadas con la inseminación artificial de animales. <http://www.infoleg.gob.ar/wp-content/uploads/2014/10/LEY-X-0977.htm> (Consultada al día 22/10/2019)

**Ley 25.467.** Ciencia, Tecnología e Innovación.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=69045> (Consultada al día 22/10/2019)

**Ley 27.231.** Desarrollo Sustentable del Sector Acuícola.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/255000-259999/257444/norma.htm> (Consultada al día 22/10/2019)

**Ley 5/1995 de la Comunidad Autónoma de Cataluña.** Protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.

<https://www.boe.es/buscar/pdf/1995/BOE-A-1995-19103-consolidado.pdf> (Consultada al día 22/10/2019)

**Proyecto de Ley S-0048/18.** Protección de los animales de experimentación.

<https://www.senado.gov.ar/parlamentario/comisiones/verExp/48.18/S/PL> (Consultada al día 22/10/2019)

**Real Decreto 53/2013 de España.** Normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2013/BOE-A-2013-1337-consolidado.pdf> (Consultada al día 22/10/2019)

**Resolución 072/15 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.** (Documentación facilitada por el INTECH)

**Resolución 673/13 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación productiva.** Creación del Sistema Nacional de Bioterios

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/reso\\_673-13\\_creacion\\_snb.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/reso_673-13_creacion_snb.pdf)  
(Consultada al día 22/10/2019)

**Resolución SAGPyA 1314/04**

[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/normativa/archivos//171205\\_Resolucion%201314-2004.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/normativa/archivos//171205_Resolucion%201314-2004.pdf) (Consultada al día 22/10/2019)

**Resolución SENASA 1/2013.**

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/220000-224999/223568/norma.htm> (Consultada al día 21/10/2019)

**Resolución SENASA 853/2011.** <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-8532011>  
(Consultada al día 21/10/2019)

5.7.2 Páginas web

[http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_argentina/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_argentina/es) (Consultada al día 22/10/2019)

[http://www.maa.gba.gov.ar/pesca1/index.php?option=com\\_content&view=article&id=685&Itemid=50](http://www.maa.gba.gov.ar/pesca1/index.php?option=com_content&view=article&id=685&Itemid=50) (Consultada al día 21/10/2019)

<http://www.unsam.edu.ar/investigacion/cicuae.asp> (Consultada el día 18/10/2019)

<https://inta.gob.ar/documentos/cicuae-comite-institucional-para-el-cuidado-y-uso-de-animales-de-experimentacion> (Consultada el día 18/10/2019)

<https://intech.conicet.gov.ar/historia/> (Consultada el día 18/10/2019)

[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/especies/archivos//000006-Salm%C3%B3nidos/071201\\_Cultivo%20de%20aguas%20frias.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/especies/archivos//000006-Salm%C3%B3nidos/071201_Cultivo%20de%20aguas%20frias.pdf)  
(Consultada al día 22/10/2019)

[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/proveedores/archivos//121024\\_Proveedores%20de%20ovas%20y%20alevinos%20de%20Trucha%20Arco%20Iris.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/proveedores/archivos//121024_Proveedores%20de%20ovas%20y%20alevinos%20de%20Trucha%20Arco%20Iris.pdf) (Consultada al día 21/10/2019)

<https://www.argentina.gob.ar/senasa/mercados-y-estadisticas/mercados/importaciones/requisitos-zoosanitarios/requisitos-zoosanitarios-para-la-importacion-de-mercancias-de-origen-animal/semen-y-embriones> (Consultada al día 21/10/2019)

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/fortalecimiento\\_bases\\_-\\_snb.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/fortalecimiento_bases_-_snb.pdf)  
(Consultada al día 22/10/2019)

### 5.7.3 Otros documentos

**Canadian Council on Animal Care** (2005). *Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing.*

**National Research Council** (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals.*

**NSF Fisheries Animal Care and Ethics Committee** (2002). *A guide to acceptable procedures and practices for Aquaculture and Fisheries Research.*

## 6 Bibliografía

- [1] FAO. Pesca y acuicultura. Definición de acuicultura. Portal Termin 2022. <https://www.fao.org/fishery/es/aquaculture>.
- [2] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in Action. Rome: 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- [3] Robles V, Valcarce DG. The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos 2019:1–12.
- [4] Chao N, Liao I. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 2001;197:161–89.
- [5] Mullen SF, Critser JK. The Science of Cryobiology. Oncofertility., Berlin: Springer; 2007, p. 83–109.
- [6] Lahnsteiner F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 2008;69:384–96. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.007>.
- [7] Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993;40:121–34.
- [8] Zhang T, Kawson DM, Morris J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat Living Resour* 1993;6:145–53.
- [9] Suzuki T, Komada H, Takai R, Arii K, Kozima TT. Relation between Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in Several Fish Embryos. *Fish Sci* 1995;61:193–7.
- [10] Dinnyés A, Urbányi B, Baranyai B, Magyary I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 1998:1–13.
- [11] Best BP. Cryoprotectant Toxicity : 2015;18:422–36. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>.
- [12] Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE. New Approaches for Studying the Permeability of Fish Embryos : Toward Successful Cryopreservation. *Cryobiology* 1997;34:335–47.
- [13] Valdez Jr DM, Miyamoto A, Hara T, Edashige K, Kasai M. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 2005;64:112–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.006>.
- [14] Li J, Zhang LL, Liu QH, Xu XZ, Xiao ZZ, Ma DY, et al. Cryobiology Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates. *Cryobiology* 2009;59:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.04.004>.
- [15] Murgas LDS, Miliorini AB, De Freitas RTF, Pereira GJM. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev Bras Zootec* 2007;36:526–31. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000300002>.
- [16] Streit DP, Ribeiro RP, Moraes GV, Mendes LD V, Digmayer M, Galo JM, et al. Sêmen de pacu (*Piaracatus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com

- diferentes meios diluidores. *Rev Biociências* 2008;13:178–87.
- [17] Lichtenstein G, Elisio M, Miranda LA. Development of sperm cryopreservation techniques in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 2010;306:357–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.016>.
- [18] Bart AN. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Tiersch T, Mazik PM, editors. *Cryopreserv. Aquat. Species.*, Louisiana: 2000, p. 179–87.
- [19] Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YJ, Hu JH. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* 2005;63:763–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.011>.
- [20] Alam MA, Rahman SM, Yamamoto Y, Hattori RS, Suzuki T, Watanabe M, et al. Optimization of protocols for microinjection-based delivery of cryoprotective agents into Japanese whiting *Sillago japonica* embryos. *Cryobiology* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.007>.
- [21] Cloud JG, Armstrong R, Wheeler P, Kucera PA, Thorgard GH. The northwest salmonid germplasm repository. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. *Cryopreserv. Aquat. Species*, Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society; 2000, p. 338–42.
- [22] Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. *Theriogenology* 2003;60:1409–22. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00118-3).
- [23] Streit-Jr DP, Digmayer M, Pereira Ribeiro R, Nardez Sirol R, Vanini de Moraes G, Minardi Galo J. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesqui Agropecu Bras* 2007;42:1199–202.
- [24] Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. *Cryobiology* 1998;37:318–24. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2127>.
- [25] Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 2003;46:2–16. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00138-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00138-4).
- [26] Pessoa NO, Galvão JAS, De Souza Filho FGM, De Sousa MLNM, Sampaio CMS. Cooling of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) embryos stored at -10°C. *Zygote* 2014;23:453–9. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000057>.
- [27] Faria Paes M do C, da Silva RC, do Nascimento NF, Valentin FN, Senhorini JA, Nakaghi LSO. Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. *Cryobiology* 2014;69:451–6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.003>.
- [28] Fornari DC, Ribeiro RP, Streit D, Godoy LC, Neves PR, de Oliveira D, et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. *Zygote* 2011;22:58–63. <https://doi.org/10.1017/s0967199411000517>.
- [29] da Silva Lopes T, Sanches EA, Okawara RY, Romagosa E. Chilling of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) embryos. *Theriogenology* 2015;84:538–44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.005>.

- [30] Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. Fishes of the World. Fifth edit. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2016. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>.
- [31] Wingert JM, Ferrer J, Malabarba LR. Review of the *Odontesthes perugiae* species group from Río de La Plata drainage, with the description of a new species (Atherinomorpha: Atherinopsidae). *Zootaxa* 2017;4250:501–28.
- [32] Ringuelet RA, Aramburu RH, Alonso de Aramburu A. Los peces argentinos de agua dulce. La Plata: Gobernación de la Provincia de Buenos Aires; 1967.
- [33] Liotta J. Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. La Plata: ProBiota, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; 2006.
- [34] Avigliano E, Volpedo AV. Actinopterygii, Atheriniformes, Atherinopsidae, *Odontesthes bonariensis* Valenciennes, 1835: New records for the Plata Basin, Argentina. *Check List* 2013;9:640–1. <https://doi.org/10.15560/9.3.640>.
- [35] Somoza GM, Miranda LA, Berasain GE, Colautti D, Remes M. Historical aspects , current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquac Res* 2008;39:784–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01930.x>.
- [36] Dyer H BS. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell* 2006;30:69–88.
- [37] Elisio M, Chalde T, Miranda LA. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis* ) oogenesis in the wild. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol* 2014;175:102–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.020>.
- [38] Elisio M, Chalde T, Miranda LA. Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spermatogenesis in the wild. *Gen Comp Endocrinol* 2015;221:236–43. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.011>.
- [39] Miranda LA, Cassará MC, Somoza GM. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835). *Aquac Res* 2005;36:1473–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01357.x>.
- [40] Miranda LA, Somoza GM. Spawning induction of pejerrey *Odontesthes bonariensis* in captivity using sustained-release gonadotropin releasing hormone agonist implants. *Aquac Res* 2009;41:129–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02314.x>.
- [41] Miranda LA, Berasain GE, Velasco CAM, Shirojo Y, Somoza GM. Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell* 2006;30:157–62.
- [42] Colautti DC, García de Souza JR, Miranda LA. Sistema de cultivo mixto en jaulas y estanques para el pejerrey *Odontesthes bonariensis* . *Biol Acuática* 2009;26:47–54.
- [43] Chalde T, Elisio M, Miranda LA. Quality of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) eggs and larvae in captivity throughout spawning season. *Neotrop Ichthyol* 2014. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20130146>.
- [44] Chalde T, Gárriz Á, Sanches EA, Miranda LA. Influence of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) broodstock age on gamete quality, reproductive performance and plasma sex steroid levels during the spawning season. *Aquac Res* 2016;47:969–82. <https://doi.org/10.1111/are.12555>.

- [45] Calvo J, Morriconi ER. Fenómenos reproductivos en el pejerrey *Basilichthys bonariensis* . III. Estudio de la fecundidad. Época y número de desoves. An La Soc Científica Argentina 1972;93:75–84.
- [46] del Fresno PS, Colautti DC, Berasain GE, Miranda LA. Gonadal development in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) during spawning season in relation with sex steroids and temperature variation in Gómez lake (Pampas region , Argentina). An Acad Bras Cienc 2021;93:1–13. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190795>.
- [47] del Fresno PS, Colautti DC, Berasain GE, Miranda LA. Comparative Analysis of Pejerrey Fish (*Odontesthes bonariensis*) Gonadal Development During Two Consecutive Spawning Seasons in Relation to Sex Steroids and Temperature Variation in Cochicó Lake (Pampas Region , Argentina). Turkish J Fish Aquat Sci 2021;21:347–55. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21\\_7\\_04](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_7_04) P.
- [48] Chalde T, Miranda LA. Characterization of the quality of the gametes and sex steroid levels during spring and summer spawning events in pejerrey *Odontesthes bonariensis* reared under natural conditions of temperature and photoperiod. Aquac Res 2020;00:1–6. <https://doi.org/10.1111/are.14517>.
- [49] Chalde T, Fernández DA, Cussac VE, Somoza GM. The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey , *Odontesthes bonariensis* - Morphological indicators of development 2011.
- [50] Kunz YW. Developmental Biology of Teleost Fishes. Berlin: Springer; 2004.
- [51] Luchini L. La Acuicultura, sus modelos y el potencial actual del pejerrey como pez de cultivo. Sitio Argentino Prod Anim 2010:1–7.
- [52] Berasain GE, Velasco CAM. Registro histórico e importancia del repoblamiento de pejerrey desde la Estación Hidrobiológica de Chascomús . VII Jornada de Historia de Chascomús y la Región, 2019.
- [53] Strüssmann CA, Nakatsugawa H, Takashima F, Hasobe M, Suzuki T, Takai R. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: Effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. Cryobiology 1999;39:252–61. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2208>.
- [54] Routray P, Suzuki T, Strüssmann CA, Takai R. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes* . Theriogenology 2002;58:1483–96. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01076-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01076-2).
- [55] del Fresno P, Miranda LA. Desarrollo de técnicas de congelamiento de embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). XV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología, 2013.
- [56] Asselborn Grinberg I. Implementación de técnicas para el congelamiento de embriones de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* ): Congelamiento por exposición o microinyección de crioprotectores. Universidad Nacional de San Martín, 2016.
- [57] Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. 2009. <https://doi.org/10.1002/9780813818849>.
- [58] Leaf RT, Jiao Y, Murphy BR, Kramer JI, Sorensen KM, Wooten VG. Life-History Characteristics of Japanese Medaka *Oryzias latipes* 2011:559–65. <https://doi.org/10.1643/CI-09-190>.

- [59] Iwamatsu T. Developmental Stages in the Wild Medaka , *Oryzias latipes* . Bull Aichi Univesity Educ 2011;60:71–81.
- [60] Sasado T, Tanaka M, Kobayashi K, Sato T. The National BioResource Project Medaka ( NBRP Medaka ): An Integrated Bioresource for Biological and Biomedical Sciences 2010;59:13–23.
- [61] Shimizu A, Shimizu N. Dual promoter expression system with insulator ensures a stringent tissue-specific regulation of two reporter genes in the transgenic fish. Transgenic Res 2013;22:435–44. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9653-8>.
- [62] Padilla LFA, Rosa IF, Henrique R, Fernandino JI, Group MB. Cystic proliferation of embryonic germ stem cells is necessary to reproductive success and normal mating behavior in medaka. 2020.
- [63] Tsuzuki MY, Aikawa H, Strüssman CA, Takashima F. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. J Appl Ichthyol 2000;16:126–30.
- [64] Fornari DC, Ribeiro RP, Pedro D, Jr S, Vargas L, Barrero NML, et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus* . Zygote 2010;19:345–50. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000432>.
- [65] Panini EB, Mylonas CC, Carrillo M, Ramos J, Bruce MP. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. Aquac Int 2001;9:189–95.
- [66] Mylonas CC, Fatira E, Karkut P, Papadaki M, Sigelaki I, Duncan NJ. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity III . Comparison between GnRHa implants and injections on spawning kinetics and egg / larval performance parameters. Aquaculture 2015;448:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.036>.
- [67] Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mech Dev 2004;121:605–18. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>.
- [68] Chalde T. Caracterización del desarrollo embrionario del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* y el efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval. Universidad de Buenos Aires, 2009.
- [69] Yin MC, Blaxter JHS. Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. J Exp Mar Bio Ecol 1987;105:73–83.
- [70] Fako VE, Furgeson DY. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. Adv Drug Deliv Rev 2009;61:478–86. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.008>.
- [71] Bar-ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. Small 2009;5:1897–910. <https://doi.org/10.1002/smll.200801716>.
- [72] Faria Paes M do C, Satiko Okada Nakaghi L. Post-cooling survival, growth and deformity rates in zebrafish embryos (*Danio rerio*). Zygote 2017;26:76–88. <https://doi.org/10.1017/s0967199417000715>.
- [73] Solomon KS, Kudoh T, Dawid IB, Fritz A. Zebrafish foxi1 mediates otic placode formation and jaw development. Development 2003;130:929–40. <https://doi.org/10.1242/dev.00308>.

- [74] Peralta MSP De, Mouguelar VS, Sdrigotti MA, Ishiy FAA, Fanganiello RD, Passos-bueno MR, et al. Cnbp ameliorates Treacher Collins Syndrome craniofacial anomalies through a pathway that involves redox-responsive genes. *Cell Death Dis* 2016;7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.299>.
- [75] Bhandari S, Lee JN, Kim Y II, Nam IK, Kim SJ, Kim SJ, et al. The fatty acid chain elongase, Elov1, is required for kidney and swim bladder development during zebrafish embryogenesis. *Organogenesis* 2016;12:78–93. <https://doi.org/10.1080/15476278.2016.1172164>.
- [76] Rodríguez Gómez L. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmóticas y lavado de DMSO. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España, 2005.
- [77] ANMAT. Farmacopea Argentina. 7° Edición. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación; 2003.
- [78] Prabhu AJ. Minerals in fish : does the source matter? Wageningen University, Wageningen, Países Bajos, 2015.
- [79] Eddy FB, Talbot C. Sodium balance in eggs and dechorionated embryos of the Atlantic salmon *Salmo salar L.* exposed to zinc , aluminium and acid waters. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol Toxicol* 1985;81:259–66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90003-9).
- [80] Eckhert CD. Boron stimulates embryonic trout growth. *Am Soc Nutr Sci* 1998:2488–93.
- [81] Rowe RI, Eckhert CD. Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J Exp Biol* 1999;202:1649–54.
- [82] Pacheco-Marino SG, Salibián A. Acute toxicity of three antifungal chemicals on silverside *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835) eggs. *Int J Environ Heal* 2010;4:333–41.
- [83] Gárriz Á, Miranda LA. Effects of metals on sperm quality , fertilization and hatching rates , and embryo and larval survival of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicology* 2020;29:1072–82. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02245-w>.
- [84] Strüssmann CA. Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Tokio University of Fisheries, Tokio, Japan, 1989.
- [85] Zhang XS, Zhao L, Hua TC, Zhu HY. A study on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. *CryoLetters* 1989;10:271–8.
- [86] Zhang T, Rawson DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 1995;32:239–46.
- [87] Zhang Q, Zhou G, Wang Y, Fu X, Zhu S. Cyoprotectants protect medaka (*Oryzias latipes*) from chilling injury. *CryoLetters* 2012;33:107–16.
- [88] Tian Y, Chen Z, Tang J, Duan H, Zhai J, Li B, et al. Effects of cryopreservation at various temperatures on the survival of kelp grouper (*Epinephelus moara*) embryos from fertilization with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2017;75:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.02.007>.
- [89] Zhang T, Liu XH, Rawson DM. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 2003;59:1545–56. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01199-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01199-8).

- [90] Youngs CR, Leibo SP, Godke RA. Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species. *CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour* 2010;5. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20105060>.
- [91] Robles V, Barbosa V, Herráez MP, Martínez-Páramo S, Cancela ML. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* 2007;68:284–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.003>.
- [92] Janik M, Kleinhans FW, Hagedorn M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* 2000;41:25–34. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2261>.
- [93] Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cerezales S, Robles V, Herráez MP. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* 2009;58:128–33. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.013>.
- [94] Beirão J, Robles V, Herráez MP, Sarasquete C, Dinis MT, Cabrita E. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 2006;261:897–903. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.039>.
- [95] Robles V, Cabrita E, Anel L, Herráez MP. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. *Aquaculture* 2006;261:1299–306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.047>.
- [96] Strüssmann CA, Choon NB, Takashima F, Oshiro T. Triploidy Induction in an Atherinid Fish , the Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Progress Fish-Culturist* 1993;55:83–9. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1993\)055](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1993)055).
- [97] Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, Qin Z, Bischof J. Gold Nanorod Induced Warming of Embryos from the Cyogenic State Enhances Viability. *Am Chem Soc NANO* 2017. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02216>.
- [98] Khosla K, Kangas J, Liu Y, Zhan L, Daly J, Hagedorn M, et al. Cryopreservation and Laser Nanowarming of Zebrafish Embryos Followed by Hatching and Spawning. *Adv Biosyst* 2020;2000138:1–11. <https://doi.org/10.1002/adbi.202000138>.
- [99] Bronstein PM. Breeding, paternal behavior, and their interruption in *Betta splendens*. *Anim Learn Behav* 1982;10:145–51.
- [100] Clotfelter ED, Curren LJ, Murphy CE. Mate choice and spawning success in the fighting fish *Betta splendens*: The importance of body size, display behavior and nest size. *Ethology* 2006;112:1170–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01281.x>.
- [101] Tate M, McGoran RE, White CR, Portugal SJ. Life in a bubble: the role of the labyrinth organ in determining territory, mating and aggressive behaviours in anabantoids. *J Fish Biol* 2017;91:723–49. <https://doi.org/10.1111/jfb.13357>.
- [102] Sermwatanakul A. Capacitating the local farmers to enhance global marketing of Thailand's National Aquatic Animal, the Siamese fighting fish. *Fish People* 2019;17:42–8.
- [103] Duarte SC, e Vasconcellos B de F, Vidal Júnior MV, Ferreira AV, Mattos D da C, Branco AT. Ontogeny and embryonic description of *Betta splendens*, Perciformes (Regan, 1910). *Rev Bras Saude e Prod Anim* 2012;13:880–93. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402012000300025>.

- [104] Valentin FN, Do Nascimento NF, Da Silva RC, Fernandes JBK, Giannecchini LG, Nakaghi LSO. Early development of *Betta splendens* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Zygote* 2013;23:247–56. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000488>.
- [105] Monvises A, Nuangsaeng B, Sriwattanaarothai N, Panijpan B. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia* 2009;35:8–16. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.008>.
- [106] Yanar M, Erdoğan E, Kumlu M. Thermal tolerance of thirteen popular ornamental fish Species. *Aquaculture* 2019;501:382–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.041>.
- [107] King TA. Wild caught ornamental fish: a perspective from the UK ornamental aquatic industry on the sustainability of aquatic organisms and livelihoods. *J Fish Biol* 2019;94:925–36. <https://doi.org/10.1111/jfb.13900>.
- [108] Engle CR, Quagraine KK, Dey MM. *Seafood and Aquaculture Marketing Handbook*. 2016.
- [109] Lynn SE, Egar JM, Walker BG, Sperry TS, Ramenofsky M. Fish on Prozac: A simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Am J Physiol - Adv Physiol Educ* 2007;31:358–63. <https://doi.org/10.1152/advan.00024.2007>.
- [110] Stevenson LM, Brown AC, Montgomery TM, Clotfelter ED. Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011;60:501–10. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9561-y>.
- [111] MacLaren RD, Wisniewski K, MacLaren C. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *PLoS One* 2018;13:6–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197259>.
- [112] Saekhow S, Thongprajukaew K, Phromkunthong W. Blue aquarium background is appropriate for rearing male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Aquac Int* 2019;27:891–903. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00374-6>.
- [113] Kang CK, Lee TH. The pharyngeal organ in the buccal cavity of the male Siamese fighting fish, *Betta splendens*, supplies mucus for building bubble nests. *Zool Sci* 2010;27:861–6. <https://doi.org/10.2108/zsj.27.861>.
- [114] Linhart O, Rodina M, Gela D, Kocour M, Rodriguez M. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 2003;16:450–6. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(03\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(03)00083-4).
- [115] Ljubobratović U, Csengeri I, Kucska B, Balogh E, Lengyel S. Comparison of the Procedures for Adhesiveness Removal in Pikeperch (*Sander lucioperca*) Eggs with Special Emphasis on the Effect of Tannic Acid. *Turkish J Fish Aquat Sci* 2017:461–9. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17>.
- [116] Maulidiyah V, Sulmartiwi L, Masithah ED. The effect of immersion time in tannin solution towards the adhesiveness and hatching degree of the eggs of common carp (*Cyprinus carpio*). *AAFL Bioflux* 2019;12:1227–33.
- [117] Pankhurst NW, Munday PL. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Mar Freshw Res* 2011;62:1015–26. <https://doi.org/10.1071/MF10269>.

- [118] Mohd Sharifuddin M, Siti Azizah MN. Preliminary studies on cryopreservation of snakehead (*Channa striata*) embryos. *Cryobiology* 2014;69:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.001>.
- [119] da Silva Lopes T, Romagosa E, Streit DP, Ribeiro RP, Digmayer M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* 2011;75:570–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.030>.
- [120] Macoretta CL, Miranda LA. Cooling of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) embryos at sub-zero temperatures. *Theriogenology* 2020;149:123–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.027>.
- [121] Varela Junior AS, Figueredo Cardoso T, Fernandes e Silva E, Hideo Okamoto M, Sampaio LA, Berteaux Robaldo R, et al. Cooling strategies of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* embryos. *CryoLetters* 2017;38:90–4.
- [122] Herpin A, Rohr S, Riedel D, Kluever N, Raz E, Scharl M. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev Biol* 2007;7:1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-3>.
- [123] Korwin-Kossakowski M. Fish hatching strategies: A review. *Rev Fish Biol Fish* 2012;22:225–40. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9233-7>.
- [124] Ferreira-Rodríguez N, Fernández I, Cancela ML, Pardo I. Multibiomarker response shows how native and non-native freshwater bivalves differentially cope with heat-wave events. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 2018;28:934–43. <https://doi.org/10.1002/aqc.2884>.
- [125] Kumar P. Comparative study between natural breeding and induced breeding of *Betta splendens* and evaluation of their efficacy on seed production. West Bengal University of Animal and Fisheries Sciences, 2006.
- [126] Jonsson B, Jonsson N. A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *J Fish Biol* 2009;75:2381–447. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02380.x>.
- [127] Pittman K, Yúfera M, Pavlidis M, Geffen AJ, Koven W, Ribeiro L, et al. Fantastically plastic: Fish larvae equipped for a new world. *Rev Aquac* 2013;5. <https://doi.org/10.1111/raq.12034>.
- [128] De Clercq A, Perrott MR, Davie PS, Preece MA, Owen MAG, Huysseune A, et al. Temperature sensitive regions of the Chinook salmon vertebral column: Vestiges and meristic variation. *J Morphol* 2018;279:1301–11. <https://doi.org/10.1002/jmor.20871>.
- [129] De Clercq A, Perrott MR, Davie PS, Preece MA, Huysseune A, Witten PE. The external phenotype–skeleton link in post-hatch farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Fish Dis* 2018;41:511–27. <https://doi.org/10.1111/jfd.12753>.
- [130] Fernández I, Granadeiro L, Darias MJ, Gavaia PJ, Andree KB, Gisbert E. *Solea senegalensis* skeletal ossification and gene expression patterns during metamorphosis: New clues on the onset of skeletal deformities during larval to juvenile transition. *Aquaculture* 2018;496:153–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.022>.
- [131] Witeska M, Lugowska K. The effect of copper exposure during embryonic development on deformations of newly hatched common carp larvae, and further consequences. *Electron J Polish Agric Univ Ser Fish* 2004;07.

- [132] Yue MS, Peterson RE, Heideman W. Dioxin inhibition of swim bladder development in zebrafish: Is it secondary to heart failure? *Aquat Toxicol* 2015;162:10–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.016>.
- [133] Kavumpurath S, Pandian TJ. Effects of induced triploidy on aggressive display in the fighting fish, *Betta splendens* Regan. *Aquac Res* 1992;23:281–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1992.tb00771.x>.
- [134] Kavumpurath S, Pandian TJ. Induction of heterozygous and homozygous diploid gynogenesis in *Betta splendens* (Regan) using hydrostatic pressure. *Aquac Res* 1994;25:133–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00569.x>.
- [135] Balasubramani A, Pandian TJ. Effect of Commercial Grade Endosulfan on Growth and Reproduction of the fighting fish *Betta splendens*. *Environ Toxicol* 2012;1–9. <https://doi.org/10.1002/tox>.
- [136] Hayakawa Y, Kobayashi M. Clasp behavior and the asymmetrically latitudinal structure of the testes in the male dwarf gourami *Colisa lalia*. *Ichthyology Res* 2010;57:40–8. <https://doi.org/10.1007/s10228-009-0121-2>.
- [137] Hayakawa Y, Kobayashi M. Histological Observations of Early Gonadal Development to Form Asymmetrically in the Dwarf Gourami *Colisa lalia*. *Zool Soc Japan* 2012;29:807–14. <https://doi.org/10.2108/zsj.29.807>.
- [138] Clotfelter ED, Gendelman HK. Exposure to environmentally relevant concentrations of genistein during activation does not affect sperm motility in the fighting fish *Betta splendens*. *Biomed Res Int* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/865741>.
- [139] Montgomery TM, Brown AC, K. GH, Ota M, Clotfelter ED. Exposure to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol decreases motility and ATP in sperm of male fighting fish *Betta splendens*. *Environ Toxicol* 2012. <https://doi.org/10.1002/tox>.
- [140] Umaa Rani K, Pratheeba M, Dhanasekar K, Ramya N, Ramesh B, Munuswamy N. Cryopreservation of sperm in the ornamental black molly fish *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846). *Indo Eur J Sci Discov* 2015;04.
- [141] Costa RS, De Souza FMS, Senhorini JA, Veríssimo-Silveira R, Ninhaus-Silveira A. Effects of cryoprotectants and low temperatures on hatching and abnormal embryo development of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop Ichthyol* 2017;15:1–10. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170043>.
- [142] Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005;20:3385–9. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei236>.
- [143] Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: Mode of action of cryoprotective agents. *Biol Reprod* 2013;88:1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.104661>.