

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Ontogenia del sistema neuroendocrino difuso del tubo digestivo y encéfalo de individuos diploides y triploides de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) y sus posibles implicancias a nivel productivo.

AUTOR: Méd. Vet. Lautaro Hernán Muñoz

DIRECTOR: Dr. Méd. Vet. Vigliano, Fabricio Andrés

CODIRECTOR: Dr. Méd. Vet. Marcaccini, Andrés Jesús

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Histología II y Embriología Especial y Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Germán Alberto Coscelli

Dra. Alcira Ofelia Díaz

Dr. Andrés Ángel Sciara

*Dedico esta tesis a mi familia, por
estar siempre más allá de las
dificultades y las distancias y
acompañarme de cerca en este
camino.*

Agradecimientos.

A mis padres, por enseñarme el camino de la superación constante.

A mis hermanos, por ser siempre un punto de apoyo en los momentos difíciles.

A Isis, por su amor y su acompañamiento incondicional.

A mis amigos, por ser el oxígeno necesario siempre.

A Fabri, mi director y amigo, por recorrer este camino juntos y estar conmigo codo a codo durante todo el trayecto.

A Andrés, mi codirector, que, aunque la vida nos haya llevado por caminos diferentes, su aporte también fue fundamental para desarrollar este trabajo.

A Belén, porque su trabajo fue fundamental para desarrollar esta tesis.

A Patón, Pablo, Agustín, Luli, Sacha, Manu y Cami por su ayuda desinteresada para que esto se pueda realizar.

A Esteban, Andrea M., Andrea B., Pablo, Cuquin, Gabi, por abrirme las puertas del CIPEX y colaborar desinteresadamente.

A todos los ayudantes y concurrentes de Histología I y II, sin ellos nada sería posible.

A Ariel, nuestro consejero en los momentos difíciles.

A Mariano, mi amigo, porque su empuje en otros aspectos también se contagia en lo académico.

A Unidad Veterinaria, por haber sido parte de mi vida y enseñarme a amar a la institución.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de Tesis y/o a la difusión realizada en el marco de reuniones científicas

- **Muñoz L.**, Vigliano F.A., Marcaccini A., Morón-Alcain E., (2014). Estudio estructural del encéfalo del bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*): bases morfológicas del sistema regulador de la ingesta de alimentos. En: Libro de Resúmenes de las XXII Jornadas Jóvenes Investigadores-AUGM, Valparaíso (Chile). 29 y 30 de Setiembre, 1 de Octubre de 2014.
- **Muñoz L.**, Campana M., Morón-Alcain E., Cerruti P., Boaglio A., Marcaccini, A. J., Vigliano F.A. (2015). Variaciones ontogénicas del número y tamaño neuronal en el hipotálamo de triploides de bagre sudamericano (*R. quelen*). En: Memorias de la V Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos y IV Congreso Nacional de Acuicultura, Lima (Perú). 12 al 16 octubre de 2015.
- **Muñoz, L.**, López, P., Mascambroni M.B., Morón Alcain, E., Vigliano, F. (2017). Análisis ontogénico de células mucosas intestinales en juveniles diploides y triploides de *Rhamdia quelen* En: Libro de Resúmenes del V Simposio Argentino de Ictiología. Corrientes (Argentina). 5 al 7 de setiembre de 2017.
- **Muñoz, L.**, López, P., Boaglio A., Mendia A., Mascambroni M.B., Vigliano, F. (2017). Variaciones morfológicas en el intestino de diploides y triploides de *Rhamdia quelen* y sus posibles implicancias a nivel productivo. En: Libro de Resúmenes del V Simposio Argentino de Ictiología. Corrientes (Argentina). 5 al 7 de setiembre de 2017.
- **Muñoz, L.**, Boaglio, A., Mendia, A., Mascambroni, M. B., Vigliano, F. (2018). Modificaciones morfológicas en las células productoras de neuropéptido y en intestino de diploides y triploides de *Rhamdia quelen*. En: Libro de Resúmenes del XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario (Argentina). 27 y 28 de Noviembre de 2018.
- **Muñoz, L.**, Boaglio A., Mendia A., Morón Alcaín, E., Mascambroni, M. B., Vigliano, F.. Modificaciones morfológicas en las células productoras de CCK-8 intestinal de diploides y triploides de *Rhamdia quelen* y sus posibles implicancias productivas. En: Libro de Resúmenes XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario

(Argentina). 24 y 25 de Noviembre de 2019.

- **Muñoz, L.** Boaglio, A., Mendia, A., Morón Alcaín, E., Mascambroni, M. B., Vigliano, F. Inmunolocalización de NPY y CCK-8 en el telencéfalo e hipotálamo de diploides y triploides de *Rhamdia quelen*. En: Libro de Resúmenes XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario (Argentina). 24 y 25 de Noviembre de 2019.
- **Muñoz L.** Marcaccini, A., Vigliano F., (2019). Anatomy, histology and ontogenical morphometry of the encephalon of diploid and triploid south american catfish (*Rhamdia quelen*). (Manuscrito en preparación).

Índice de Contenidos

Resumen	1
Abstract	4
1. Introducción	6
1.1. Actualidad de la acuicultura y piscicultura	6
1.2. Características biológicas de la especie	7
1.3. Cultivo de bagre sudamericano	10
1.4. Triploidización: métodos, ventajas productivas y consecuencias biológicas	11
1.5. Estructura macroscópica y microscópica del encéfalo y tubo digestivo en peces	16
1.5.1. Encéfalo	16
1.5.1.1. Características anatómicas	16
1.5.1.2. Estructura histológica	18
1.5.2. Tubo digestivo	19
1.5.2.1. Características anatómicas	19
1.5.2.2. Estructura histológica	21
1.5.2.2.1. Enterocito	22
1.5.2.2.2. Células mucosas	23
1.5.2.2.3. Células del Sistema Neuroendocrino Difuso	24
1.5.2.2.3.1. Células productoras de neuropéptido Y	25
1.5.2.2.3.2. Células productoras de colecistoquinina 8	26
Objetivos e hipótesis	26
2. Materiales y Métodos	28
2.1. Animales y muestras	28
2.1.1. Obtención de ejemplares	28
2.1.2. Obtención de individuos triploides y evaluación de triploidía	29
2.1.3. Larvicultura y recría	30
2.1.4. Toma y procesamiento de muestras	31
2.2. Técnicas de estudio macro y microscópicas	31

2.2.1. Descripción macroscópica del encéfalo_____	31
2.2.2. Histología_____	32
2.2.3. Inmunohistoquímica_____	32
2.3. Análisis morfométricos_____	33
2.3.1. Encéfalo_____	33
2.3.2. Intestino_____	34
2.4. Análisis Estadístico_____	34
3. Resultados _____	36
3.1.Estructura general del encéfalo_____	36
3.1.1. Anatomía_____	36
3.1.2. Histología_____	37
3.2. Inmunolocalización de neuromoduladores de la ingesta en encéfalo_____	42
3.2.1. Neuropeptido Y_____	42
3.2.2. Colecistoquinina-8_____	44
3.3. Morfometría neuronal_____	45
3.4. Morfometría intestinal_____	48
3.4.1. Longitud de las vellosidades_____	48
3.4.2. Espesor de las vellosidades_____	52
3.4.3. Altura de los enterocitos_____	56
3.4.4. Área de células mucosas_____	60
3.4.5. Cantidad de células mucosas por mm ² de mucosa_____	65
3.5. Inmunolocalización de neuromoduladores de la ingesta en intestino ascendente__	69
3.5.1. Tamaño de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8_____	70
3.5.2. Número de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8_____	72
4. Discusión _____	75
4.1. Anatomía e histología encefálica_____	75
4.2. Expresión de neuropéptidos reguladores de la ingesta a nivel encefálico_____	76
4.3. Efectos de la ontogenia y la triploidización en el tamaño y número de neuronas hipotalámicas_____	78

4.4. Efectos de la ontogenia y la triploidización en las variables morfométricas intestinales _____	80
4.5. Efectos de la ontogenia y la triploidización en el tamaño y número de CEEs inmunorreactivas a neuromoduladores de la ingesta a nivel intestinal _____	84
5. Conclusiones _____	87
6. Referencias bibliográficas _____	88

Índice de Tablas

Tabla 2.1: Parámetros fisicoquímicos del agua registrados en las distintas etapas de la experiencia_____	30
Tabla 2.2: Condiciones de incubación de los anticuerpos primarios utilizados_____	33
Tabla 3.1: Tamaño neuronal medio (μm^2) \pm ES para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	45
Tabla 3.2: Número medio de neuronas $\text{mm}^{-2} \pm$ ES para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	46
Tabla 3.3: Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	48
Tabla 3.4: Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	49
Tabla 3.5: Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	51
Tabla 3.6: Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	52
Tabla 3.7: Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	54
Tabla 3.8: Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	55
Tabla 3.9: Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	56
Tabla 3.10: Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	57
Tabla 3.11: Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	59
Tabla 3.12: Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	61
Tabla 3.13: Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	63
Tabla 3.14: Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	64
Tabla 3.15: Número medio de células mucosas $\text{mm}^{-2} \pm$ ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	65
Tabla 3.16: Número medio de células mucosas $\text{mm}^{-2} \pm$ ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales_____	66

Tabla 3.17: Número medio de células mucosas $\text{mm}^{-2} \pm \text{ES}$ del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales _____	68
Tabla 3.18: Área media de CEEs inmunorreactivas a NPY (μm^2) $\pm \text{ES}$ del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales _____	70
Tabla 3.19: Área media de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 (μm^2) $\pm \text{ES}$ del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales _____	72
Tabla 3.20: Número medio de CEEs inmunorreactivas a NPY $\pm \text{ES}$ del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales _____	73
Tabla 3.21: Número medio de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 $\pm \text{ES}$ del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales _____	73

Índice de Figuras

Figura 1.1. Ejemplar adulto de <i>Rhamdia quelen</i> _____	8
Figura 1.2. Diagrama que muestra los procedimientos para la obtención de peces diploides y triploides_____	12
Figura 1.3. Estructura general del encéfalo en teleósteos_____	16
Figura 1.4. Estructura histológica básica del intestino_____	21
Figura 2.1. Procedimiento para la obtención de gametas realizado en el CIPEX_____	29
Figura 3.1. Vista lateral derecha y ventral del encéfalo de <i>R. quelen</i> _____	36
Figura 3.2. Histología de distintas regiones del telencéfalo_____	38
Figura 3.3. Histología de distintas regiones del diencéfalo_____	40
Figura 3.4. Histología de distintas regiones del hipotálamo_____	41
Figura 3.5. Distribución del inmunomarcaje a NPY y CCK-8 en el telencéfalo_____	43
Figura 3.6. Distribución del inmunomarcaje a NPY y CCK-8 en el diencéfalo_____	44
Figura 3.7. Evolución del tamaño neuronal y cantidad de neuronas por mm ² en el hipotálamo de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	47
Figura 3.8. Evolución de la longitud de las vellosidades en el intestino ascendente, descendente y convoluto de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	50
Figura 3.9. Evolución del espesor de las vellosidades en el intestino ascendente, descendente y convoluto de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	53
Figura 3.10. Evolución de la altura de los enterocitos en el intestino ascendente, descendente y convoluto de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	58
Figura 3.11. Células mucosas en las distintas regiones del intestino de los tres grupos experimentales_____	60
Figura 3.12. Evolución del área de células mucosas en el intestino ascendente, descendente y convoluto de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	62
Figura 3.13. Evolución del número de células mucosas en el intestino ascendente, descendente y convoluto de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	67
Figura 3.14. Células enteroendócrinas inmunorreactivas a NPY y CCK-8 en el intestino ascendente de los tres grupos experimentales_____	69
Figura 3.15. Evolución del área de células enteroendócrinas en el intestino ascendente de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	71
Figura 3.16. Evolución del número de células enteroendócrinas en el intestino ascendente de <i>R. quelen</i> en los distintos grupos experimentales_____	74

Abreviaturas

CCK-8: Colecistoquinina-8

CEEs: Células enteroendócrinas

dpe: Días post eclosión

GC: Grupo diploides control

IA: Intestino ascendente

IC: Intestino convoluto

ID: Intestino descendente

NPY: Neuropeptido Y

SNC: Sistema Nervioso Central

SNED: Sistema Neuroendocrino Difuso

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TC: Triploides por calor

TF: Triploides por frío

TGI: Tracto Gastrointestinal

Ontogenia del sistema neuroendocrino difuso del tubo digestivo y encéfalo de individuos diploides y triploides de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) y sus posibles implicancias a nivel productivo.

Palabras clave: *Rhamdia quelen*, triploidía, morfometría, intestino, encéfalo, NPY, CCK-8.

RESUMEN

Rhamdia quelen es una especie ampliamente distribuida en América Latina, desde el sur de Méjico hasta Argentina. Es una especie con características favorables para su cría, debido a su fácil manejo, su buen sabor de carne y su adaptación a un amplio rango térmico. No obstante, presenta como desventaja su precocidad sexual destinando durante la reproducción gran parte de la energía suministrada en el alimento al desarrollo gonadal en detrimento del crecimiento somático, repercutiendo negativamente en los índices productivos.

Para salvar esta situación, se han desarrollado herramientas biotecnológicas como la triploidización por choque térmico que permiten obtener individuos estériles evitando esta pérdida energética destinada a la reproducción. Trabajos de nuestro grupo de investigación, han demostrado que *R. quelen* responde satisfactoriamente a esta técnica obteniendo mejores parámetros productivos respecto a los individuos diploides.

Estudios realizados en otras especies de peces han demostrado que los individuos triploides poseen células de mayor tamaño que los diploides y que este aumento genera consecuentemente una disminución en la cantidad de células en los tejidos. Por ello, nos propusimos evaluar en *R. quelen* la existencia de cambios morfológicos en el tubo digestivo y el encéfalo a los fines de justificar tanto la mejora productiva como los cambios en el comportamiento observados en triploides de la especie en trabajos previos.

Teniendo en cuenta que no existen estudios básicos a nivel encefálico en *R. quelen*, inicialmente describimos la conformación anatómica y la estructura histológica del telencéfalo y diencéfalo. Asimismo, se midió el área y se cuantificaron las neuronas hipotalámicas por mm² tanto para los individuos triploides obtenidos por choque térmico por frío (TF) y por calor (TC)

como para el grupo diploide control (GC). Posteriormente, se describió la inmunolocalización de dos neuromoduladores de la ingesta, el neuropéptido Y (NPY) y la colecistoquinina-8 (CCK-8) en telencéfalo e hipotálamo debido a su amplia interconexión y el rol regulador en la ingesta de alimentos de estas dos regiones. A nivel intestinal, se evaluaron la longitud y espesor de las vellosidades y la altura de los enterocitos. A su vez, se registró el área y número de las células mucosas y de células enteroendócrinas (CEEs) productoras de NPY y CCK-8.

A nivel encefálico, observamos que las neuronas presentaron un área de mayor tamaño en ambos grupos tratados respecto al grupo control, y comparativamente entre grupos tratados se evidenció en el TC un mayor tamaño respecto al TF. Como se plantea en otras especies, este aumento de tamaño generó una disminución en la cantidad de neuronas. La inmunolocalización de las neuronas productoras de NPY y CCK-8 no mostraron diferencias ni respecto a lo descrito en otras especies como tampoco entre triploides y diploides de *R. quelen*.

A nivel intestinal, los triploides presentaron vellosidades significativamente más largas que los diploides en todas las regiones intestinales. Esto podría representar una adaptación funcional ante una mayor demanda energética justificada por el crecimiento diferencial observado en triploides de *R. quelen*. Respecto a las diferencias en el número de células mucosas entre triploides y diploides, si bien no fue una generalidad a lo largo del ensayo, cuando se encontraron diferencias significativas entre grupos fueron los triploides los que presentaron un mayor número de células mucosas en comparación con sus hermanos diploides en las tres porciones del intestino.

Las CEEs NPY⁺ y CCK-8⁺ del intestino ascendente fueron identificadas tempranamente durante el desarrollo, apareciendo inicialmente a los 5 días posteclosión (dpe). El área de CEEs CCK-8⁺ en los triploides del grupo TC fue menor hasta los 33 dpe mientras que el área de CEEs NPY⁺ exhibió en este grupo un incremento significativo a los 62 dpe. Esto podría indicar que el mayor crecimiento descrito en los triploides del TC estaría acompañado inicialmente por una reducción en el volumen celular de CEEs productoras de un péptido anorexigénico como CCK-8 y posteriormente por un aumento en el tamaño celular de CEEs que sintetizan NPY, estimulador del apetito.

Así, podemos afirmar que los peces triploides sufren cambios morfológicos que brindarían bases teóricas a la performance productiva observada en triploides de *R. quelen*. En un futuro será necesario realizar estudios moleculares que permitan ampliar la información sobre la biología de los triploides de *R. quelen*.

Ontogeny of the diffuse neuroendocrine system of the digestive tract and encephalon in diploid and triploid South American Catfish (*Rhamdia quelen*) and its implications in fish production.

Key words: *Rhamdia quelen*, triploidy, morphometry, gut, encephalon, NPY, CCK-8.

ABSTRACT

Rhamdia quelen is a freshwater fish widely distributed in Latin America from Mexico to Argentina. It is considered a promising species for aquaculture due to its easy handling, good meat taste and its adaptation to a wide thermal range. However, its main drawback is the early gonadal maturation since energy is derived to sexual maturation instead of somatic development, generating an impairment in productive results.

To avoid this situation, many biotechnological tools, such as triploidization by shock temperature, have been developed in order to obtain sterile fish in which there is no gonadal energetic requirements, being the one of them. Previous works of our research group demonstrated that *R. quelen* has a positive response to this technique exhibiting better productive parameters in comparison with diploid fish.

Studies performed in other species have demonstrated that triploid fish has bigger cells compared with diploids and that this hypertrophy generates a consequently decrease in the number of cells in different tissues. Due to this, we proposed to evaluate morphological changes in the gut and encephalon of *R. quelen* in order to justify the better productive performance and behavioral changes observed in triploids of the species observed in previous works.

Considering the fact that no previous studies in the brain of *R. quelen* have been performed, we first described the anatomy and histology of the telencephalon and diencephalon. In addition, neuronal size was measured and the amount of hypothalamic neurons in mm² of tissue was quantified for diploid and triploid fish obtained by heat (HT) or cold (CT) shock treatment as well as for the diploid control group (CG). After that, the immunolocalization of two peptides involved in food intake was described in telencephalon and hypothalamus due to the

extensive interconnection and food intake regulation role of these two encephalic regions. In the gut, the length of lamellae, villi thickness and enterocyte height were measured. Moreover, size and amount of mucous cells and NPY- and CCK-8-producing enteroendocrine cells (EECs) were registered.

In the encephalon, we observed that neurons of both triploid groups exhibited a higher neuronal size compared with diploids, and between groups, the HT fish exhibited a higher cell size compared with those from CT groups. As stated for other species, the increase in cell size generated a decrease in cells quantity. The immunolocalization of NPY- and CCK-8-EECs did not show difference nor in comparison with that previously reported for other teleost fish neither between diploid and triploid *R. quelen*.

In the gut, triploid fish exhibited significant longer villi than diploids in all gut segments. This could represent a functional adaptation to a higher energetic demand due to the bigger body size observed in *R. quelen* triploids. Considering the differences observed in the amount of mucous cells between triploids and diploids, although it was not a generality throughout the experiment, when differences were observed between groups, triploid fish showed a major quantity of mucous cells compared with diploids in the three parts of the gut.

The NPY⁺ and CCK-8⁺ EECs of the ascending intestine were early identified during ontogeny, being immunopositive at 5 days post hatching (dph). The size of CCK-8⁺ EECs in HT triploids was lower until 33 dph while the size of NPY⁺ EECs in this group exhibited a significant increase at 62 dph. This could indicate that the bigger size observed in HT triploids is accompanied by an initial reduction in size of CCK-8⁺ EECs, an anorexigenic peptide, and subsequently by an increase in size of NPY⁺ EECs, an orexigenic peptide.

Therefore, we can affirm that triploid fish suffers morphological changes which provide theoretical basis to the productive performance observed in *R. quelen* triploids. In a future, molecular studies will be need to increase the information about the biology of triploids of *R. quelen*.

INTRODUCCION

1.1. Actualidad de la acuicultura y piscicultura.

La acuicultura puede definirse como la actividad de cultivo de organismos, tanto vegetales como animales, cuyo ciclo de vida se desarrolle total o parcialmente en el agua bajo prácticas sustentables que garanticen seguridad alimentaria (FAO, 2012, 2010)

En los últimos años esta actividad ha presentado un crecimiento mucho más acelerado que cualquier otra producción de alimentos de origen animal. Entre 1980 y 2010 ha crecido un 8,8% interanualmente, mientras que las producciones de animales de tierra no superan el 3% (FAO, 2012). A partir de 2011, se observó una disminución importante en su tasa de crecimiento interanual, la cual pasó de un 8,8 a un 5,75% en el 2016 (FAO, 2016). Esto, se debió a problemas económicos y financieros sufridos por el sector productivo y particularmente en el NEA por factores climáticos. No obstante, continúa siendo la producción animal con mayor tasa de crecimiento. Durante los últimos 30 años este incremento ha sido impulsado por la demanda de proteínas de origen animal a nivel mundial, la necesidad de gestionar sosteniblemente los recursos naturales y el estancamiento de la pesca extractiva (FAO, 2016).

América latina formó parte importante de este crecimiento en la producción de peces de consumo debido principalmente a un incremento poblacional que trajo aparejado un aumento en el consumo de pescado. Además, la contaminación, la sobrepesca y la modificación de los ecosistemas acuáticos contribuyeron al desarrollo de la actividad. Así, en América Latina, los principales productores son Chile, Brasil, México, Ecuador y Colombia con un 89% de la producción total obtenida (FAO, 2016).

En Argentina la piscicultura representa el 78,6% del total de la producción acuícola nacional. El ranking de producción era liderado por la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) hasta 2012, año en el que fue superada por el pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Estas especies presentan una distribución geográfica característica debido a las condiciones climáticas más favorables para su desarrollo, siendo la región norte y sur de elección para la cría del pacú y la trucha respectivamente (Ministerio de Agricultura, 2012; Ministerio de Agricultura, 2010). Por otra parte, desde los estados nacional y provinciales se han motorizado iniciativas tendientes a

diversificar la producción de otras especies acuícolas de interés comercial como el surubí (*Pseudoplatystoma sp.*), la boga (*Megaleporinus obtusidens*) o el dorado (*Salminus brasiliensis*) (Panné Huidobro, 2017)

Otra zona con un importante potencial para la cría de peces, debido a la gran cantidad de espejos de agua, es la pampa húmeda. No obstante, resulta primordial encontrar una especie que se adapte favorablemente a su rango climático. En los últimos años, gracias a una adecuada campaña de *marketing* en la que se promocionaron diferentes cortes de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) junto a distintas recetas para su elaboración se generó una creciente demanda de su consumo (Panné y Luchini, 2008). Además, cuenta con un alto potencial de comercialización debido a un buen rendimiento de la carcasa, carne sabrosa con baja cantidad de grasa y ausencia de espinas intramusculares que permiten la obtención de un filete que aumenta su valor agregado (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004; Luchini, 1988).

Paralelamente, la Red de Fortalecimiento de la Acuicultura en Argentina (ReFACUA) determinó que *R. quelen* es la especie de elección para cultivo en la región pampeana ya que es una especie endémica en la zona y adaptada al clima continental de la región. Esto, sumado a la aprobación en el año 2015 de la Ley 27.231 de “Desarrollo sustentable del sector acuícola”, hacen que el futuro de la acuicultura y de *R. quelen* como especie productiva en nuestra región sean promisorios.

1.2. Características biológicas de la especie.

El bagre sudamericano (Fig. 1.1), es una especie autóctona de América Latina ampliamente distribuida desde el sur de Méjico hasta Argentina. Antiguamente se describían cerca de cien especies diferentes de bagres para luego quedar resumidas en solo once y reconociendo en Argentina solamente a *R. quelen* (Silfvergrip, 1996).

Su posición taxonómica es la siguiente:

Superclase: Actinopterygii

Clase: Teleostei

Orden: Siluriformes

Familia: Heptapteridae

Género: *Rhamdia*

Especie: *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen es una especie que en su estado adulto puede alcanzar los 50 cm de longitud y un peso de aproximadamente 3 kg (Mérigoux *et al.*, 2001). Externamente, su piel carece de escamas, presenta una coloración marrón grisáceo a amarillento y manchas negras, siendo la superficie ventral más clara (Silfvergrip, 1996). Según Silfvergrip (1996) se la puede reconocer debido a su cabeza de gran desarrollo y boca amplia, alrededor de la cual se encuentran varios pares de barbillas sensoriales. Además, presenta aletas pectorales y dorsal con bordes aserrados y su aleta caudal con lóbulos desiguales.



Figura 1.1. Ejemplar adulto de *Rhamdia quelen*.

Sus hábitos de vida se caracterizan por desarrollarse en ambientes de agua calma y poco profunda de los ríos o lagunas. Suele encontrarse en las zonas de mayor vegetación de estas corrientes de agua, generalmente escondidos entre troncos o piedras durante el día y saliendo a cazar por la noche (Guedes, 1980). Su alta capacidad de adaptación a las amplitudes térmicas

favorece la amplia distribución a lo largo de América Latina y lo convierte en una especie de interés para regiones de climas templados (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004).

Son peces omnívoros, que en ambientes naturales se alimentan principalmente de peces, crustáceos, insectos y detritus orgánicos (Gomes *et al.*, 2000; Souza-Bastos y Freire, 2009) y que en cultivo se adaptan fácilmente al consumo de ración balanceada (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004), pudiendo alcanzar muy buenos niveles de conversión alimentaria (1,5 a 1,8) (Altevir *et al.*, 2004). En los primeros años de vida tiene un crecimiento muy rápido, siendo mayor en los machos hasta el cuarto año de vida, situación que luego se invierte (Gomes *et al.*, 2000).

En cuanto a su desarrollo reproductivo, es una especie que alcanza la madurez sexual aproximadamente al año de edad en ambos sexos. Se estima que alrededor de los 13 cm para los machos y 16 cm de longitud para las hembras los ejemplares se encuentran aptos para la reproducción (Narahara *et al.*, 1985). Debido a la ausencia de dimorfismo sexual, para la identificación de los reproductores es necesaria la observación de la papila urogenital durante el período reproductivo. En el caso de los machos, la papila urogenital presenta una protrusión externa al ser sexualmente maduros, en tanto que las hembras presentan la papila urogenital enrojecida (Mardini *et al.*, 1981).

El periodo reproductivo está ligado íntimamente a la época del año y la temperatura. En nuestra región, la época reproductiva se extiende de octubre a febrero debido al incremento de la temperatura y el fotoperiodo positivo. En su hábitat natural, la especie procura para la desova ambientes limpios, de agua calma y fondo de piedras. Debido a que no hay un cuidado parenteral y que los huevos no son adherentes, los reproductores tienen una perfecta sincronización de la desova y la espermiación, que suele ocurrir pasado el amanecer (Godinho *et al.*, 1978). Para lograr la reproducción en cautiverio de *R. quelen* es necesaria la inducción hormonal mediante la administración de extracto bruto de hipófisis u hormonas sintéticas que aseguren la ovulación. Estos métodos ya se encuentran estandarizados en la literatura (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004) y han sido reproducidos con éxito en nuestro laboratorio (Morón Alcain *et al.*, 2017). En condiciones de cultivo la especie posee hasta un 95% de fertilidad y un 90% de eclosión (Luchini, 1988).

1.3. Cultivo de bagre sudamericano.

La cría de *R. quelen* en Argentina está destinada a regiones donde la producción de otras especies animales o vegetales no es viable. Es llevada a cabo, en su mayoría en estanques excavados, teniéndose en cuenta el tipo de suelo, clima, cantidad y calidad de agua (Sánchez *et al.*, 2008). Como se mencionó previamente, su adaptación a diferentes rangos climáticos ha permitido su cría en regiones de gran amplitud térmica anual como la región Pampeana de nuestro país o el sur de Brasil donde se observó que el 50% de los animales en producción puede alcanzar los 300 g de peso en un periodo de 160 días (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004).

Para su cría, es importante considerar los parámetros fisicoquímicos que determinan la calidad del agua, entre ellos, temperatura, pH, oxígeno disuelto, dureza, alcalinidad y nitratos y nitritos.

La temperatura óptima para el cultivo de *R. quelen* es de 17 a 27°C. Si bien la especie tiene una buena adaptación a las amplitudes térmicas, las bajas temperaturas de agua generan una disminución del consumo de alimento, por lo cual su cantidad debe ajustarse (Rossi y Luchini, 2003).

Respecto a la cantidad de oxígeno disuelto, cuanto mayor es su concentración, hasta los 7,5 mg L⁻¹, mejor es el crecimiento, siendo el nivel óptimo superior a 6 mg L⁻¹. Valores por debajo de 1,3 mg L⁻¹ afectan gravemente la sobrevivencia de los ejemplares (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004).

El pH óptimo para el cultivo de *R. quelen* se sitúa en valores que oscilan entre 6 y 8, tolerando mejor aguas alcalinas. El rango de dureza adecuado es entre 30 y 70 mg L⁻¹ CaCO₃ para larvas, en tanto que los ejemplares adultos toleran muy bien durezas elevadas de hasta 300 mg L⁻¹. La alcalinidad total óptima varía entre 30 y 60 mg L⁻¹, mientras que los nitratos y nitritos deben mantenerse por debajo de 1,0 mg L⁻¹ y 0,1 mg L⁻¹, respectivamente (Baldisserotto y Radunz Neto, 2004).

Si bien la especie cuenta con gran cantidad de características favorables para su cultivo, presenta como desventaja la rapidez con que alcanza la madurez sexual, alrededor de los 8 meses de edad. Esta precocidad determina que parte de la energía destinada al crecimiento somático sea

derivada al desarrollo gonadal, lo que se traduce en una pérdida de kilos de carne por año en las piscifactorías (Gomes *et al.*, 2000).

En latitudes como la de la región pampeana, debido a factores climáticos, los días necesarios para terminar un animal son mayores que en otras regiones. Esto último, sumado a la temprana maduración sexual de *R. quelen*, genera un impacto negativo en los parámetros productivos y consecuentemente en los rendimientos económicos.

A la actualidad, se han desarrollado diferentes técnicas que permiten mejorar los índices productivos. Dos de las más utilizadas son la obtención de individuos monosexo y de ejemplares estériles. La generación de peces monosexo se emplea en especies donde el crecimiento somático es mayor en un sexo que en otro, siendo la reversión sexual mediante la administración de hormonas exógenas uno de los métodos más utilizados (Pandian y Sheela, 1995).

Respecto a la obtención de individuos estériles, la principal ventaja radica en evitar el gasto energético destinado a la maduración gonadal. Para ello, se han desarrollado diferentes técnicas como la esterilización quirúrgica, a través de inmunología, radiación química o métodos de manipulación genética como la hibridación, manipulación de ploidía o transgénesis (Dunham, 2011). Entre estos últimos, la obtención de individuos triploides ha adquirido relevancia por su bajo costo, seguridad, efectividad y facilidad de aplicación (Rottmann *et al.*, 1991).

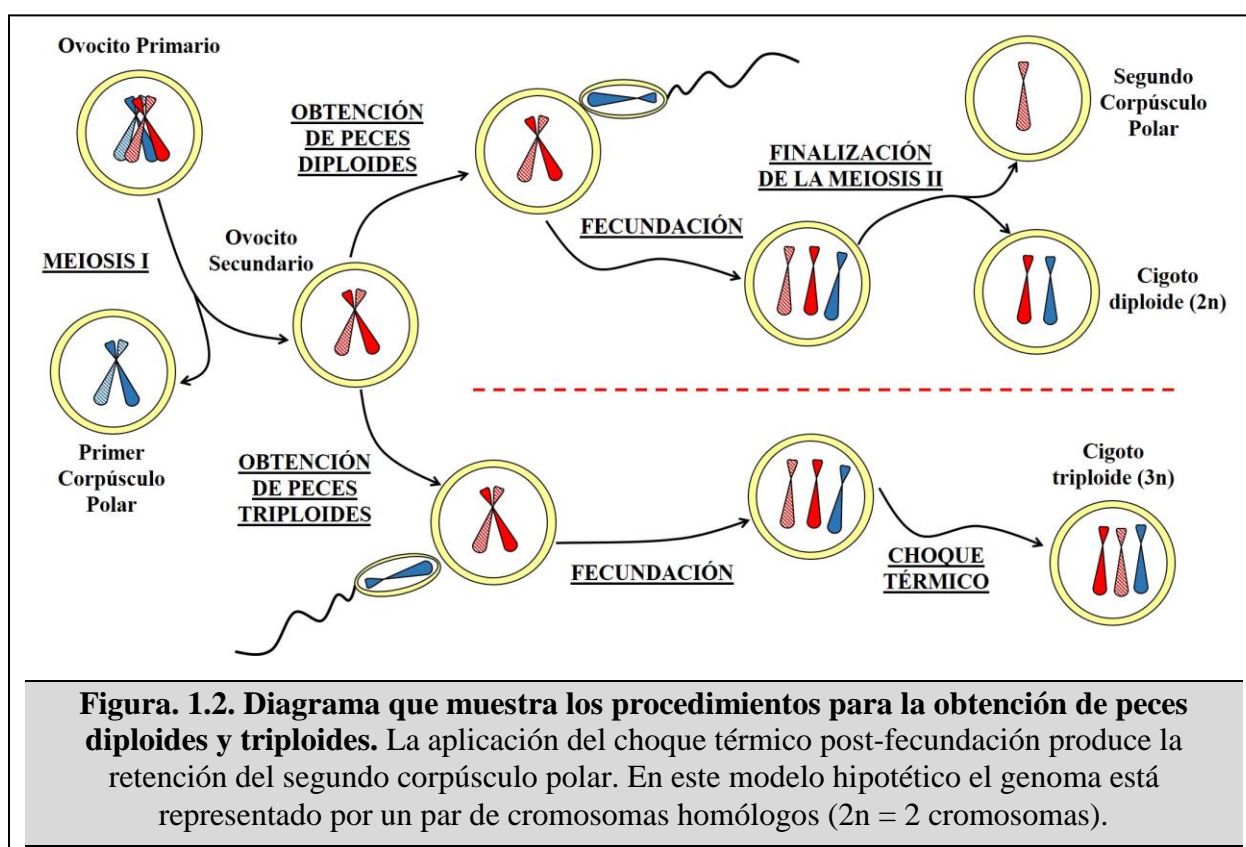
1.4. Triploidización: métodos, ventajas productivas y consecuencias biológicas.

El término ploidía se utiliza para indicar la cantidad de conjuntos de cromosomas de una determinada célula u organismo. Las células somáticas de la mayoría de las especies presentan cromosomas en grupos de dos y se denominan, por tanto, diploides. Sin embargo, algunos animales pueden presentar tres o cuatro conjuntos completos de cromosomas, de manera natural o inducida, y se los designa como triploides o tetraploides, respectivamente (O'Keefe y Benfey, 1995; Rottmann *et al.*, 1991).

La poliploidía en peces, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos y aves, tiene la particularidad de ser completamente compatible con el desarrollo y la vida del animal afectando

principalmente su reproducción dado que son individuos estériles (Le Comber y Smith, 2004). Esta infertilidad resulta de utilidad en especies productivas de peces en los que, como se mencionó previamente, la maduración sexual repercute negativamente en la ganancia de peso (Cachafeiro, 1984).

La obtención de individuos triploides puede lograrse mediante el bloqueo de la expulsión del segundo corpúsculo polar (Fig. 1.2). El corpúsculo polar es un conjunto materno de cromosomas que normalmente es eliminado del ovocito al finalizar la meiosis II luego de la fusión el espermatozoide (Chourrout, 1984).



Existen distintos métodos para la obtención de peces triploides (Tiwarly *et al.*, 2004). Entre ellos podemos mencionar los siguientes:

a. **Métodos genéticos.** Estas técnicas se basan en el cruzamiento de hembras diploides con machos tetraploides;

- b. **Métodos químicos.** Mediante la aplicación de fármacos como la colchicina o la citocalasina B;
- c. **Métodos físicos.** choques térmicos de calor o frío, de presión o termoeléctricos.

De todos los métodos anteriormente mencionados, los choques térmicos por frío o calor son los más utilizados debido a su fácil aplicación y bajo costo. La técnica consiste en la inmersión de los huevos recién fecundados en agua a una temperatura por debajo o por encima del óptimo fisiológico para la especie (Chourrout, 1984; O'Keefe y Benfey, 1995; Thorgaard *et al.*, 1981). Con la aplicación de estos métodos, ya sea mediante frío o calor, se logra una inhibición de la formación de microfilamentos y microtúbulos durante la mitosis, lo cual ocasiona que la segunda división meiótica del ovocito se detenga debido a que los cromosomas no pueden migrar a los polos y, por ende, el ovocito retiene la dotación cromosómica del segundo corpúsculo polar (Fig. 1.2) (Díaz y Neira, 2005).

Ambos métodos han sido estandarizados para *R. quelen* por diferentes autores. En la técnica por frío, da Silva *et al.* (2007) determinaron que los mejores resultados se obtienen sumergiendo los huevos fecundados a 4 °C durante 20 minutos a los 3 minutos posfertilización, consiguiendo resultados de 97.9% de triploides. En cuanto a la técnica de choque térmico por calor, se describió que el mejor protocolo para inducir triploidía en *R. quelen*, consiste en una temperatura de choque de 36 ± 1 °C; durante 5 minutos a los 5 minutos posfecundación, obteniendo una eficiencia de triploidización del 74,8% (Vozzi *et al.*, 2003).

La generación u obtención de individuos triploides tiene varias ventajas a los fines productivos que radican principalmente en el hecho que los individuos sean estériles. Así, una consecuencia directa de esto es la eliminación del gasto energético destinado a la madurez sexual siendo este derivado al crecimiento somático, lo cual permite obtener peces de mayor tamaño en menor tiempo (Tiwary *et al.*, 2004).

Este mayor crecimiento somático, fue descrito en diferentes especies como tilapia azul (*Oreochromis aureus*), trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el pez gato europeo (*Silurus glanis*) donde se observó un mayor tamaño corporal en triploides comparados con diploides (Krasznai y Márían, 1986; Thorgaard y Gall, 1979; Valenti, 1975). Otro beneficio de la técnica son los cambios

observados en el comportamiento, ya que los triploides suelen ser menos agresivos comparados con los diploides como se describió en ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Aliah *et al.*, 1990) y en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Allen y Wattendorf, 1987). Debido también a la esterilidad de estos individuos, otra ventaja es que posibilita la introducción de especies exóticas en nuevos ecosistemas, lo cual permite evitar daños ambientales como consecuencia del escape, siendo además una medida de control sobre individuos transgénicos (Thorgaard *et al.*, 2011).

En *R. quelen*, nuestro equipo de investigación determinó numerosas ventajas de los triploides en comparación con los individuos diploides. En primer lugar, los juveniles triploides inducidos mediante tratamientos por calor o frío fueron significativamente más pesados que los diploides. Respecto al rendimiento de carcasa, los triploides obtenidos por frío exhibieron un mayor tamaño de carcasa. En cuanto al comportamiento, los triploides por calor fueron menos agresivos que los diploides, determinándose esto a través de una menor tasa de canibalismo, y teniendo como consecuencia una mayor sobrevivencia durante la etapa de larvicultura (Morón Alcain *et al.*, 2017).

A nivel celular, la triploidización produce un incremento del tamaño nuclear como consecuencia del aumento del número de cromosomas. Esto provoca que para mantener la relación núcleo citoplasma, los animales triploides incrementen su citoplasma aumentando de este modo el tamaño de la célula. Así, diferentes autores han descrito células más grandes en diversos tejidos (sangre, cartílago, músculo, epitelio) y órganos (cerebro, retina, hígado, riñón, testículos y ovarios) de peces triploides en comparación con individuos diploides (Benfey, 1999; Maxime, 2008).

En *R. quelen*, únicamente se describieron las modificaciones celulares en sangre producto de la triploidía inducida por presión. En este tejido, se observó que los individuos triploides exhibían eritrocitos de mayor tamaño y volumen respecto a los diploides. Al mismo tiempo, se observó que disminuyó la cantidad circulante de eritrocitos, leucocitos y trombocitos de triploides. También los valores del conteo hematológico fueron diferentes entre ambos grupos (Fukushima *et al.*, 2012). Similares resultados fueron obtenidos por nuestro grupo de trabajo en triploides de *R. quelen* inducidos por choques térmicos (Campana *et al.*, 2015).

Este incremento en el tamaño celular causado por efecto de la triploidía podría alterar procesos fisiológicos regulados en la homeostasis. No obstante, los peces son capaces de adaptarse y compensar estos cambios de manera que no alteren su normal funcionamiento (Tiwary *et al.*, 2004). Aunque el tamaño de las células es más grande en organismos triploides, el tamaño de los órganos no se altera (Otto, 2007). De esta manera, al sufrir la triploidización, los peces reducen el número total de células, lo que les permite mantener el tamaño de los diferentes órganos (Mable, 2004).

La mayor ganancia de peso observada en triploides de *R. quelen* (Morón Alcain *et al.*, 2017) podría estar vinculada a los mecanismos que regulan la ingesta de alimento que presentan su base estructural en el sistema nervioso y el sistema neuroendocrino difuso (SNED), así como también a adaptaciones del sistema digestivo tendientes a aumentar la captación de nutrientes. En el tejido nervioso, se han descrito en triploides de ayu (*P. altivelis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) una reducción en la cantidad de neuronas que fue asociado a una menor sensibilidad visual o menor capacidad de aprendizaje (Aliah *et al.*, 1990; Small y Benfey, 1987). Como se indicó anteriormente, las larvas triploides de *R. quelen* obtenidas por choques térmicos por calor presentan una tasa de canibalismo significativamente menor que sus hermanos diploides lo cual se asocia a un comportamiento menos agresivo. No obstante, a la fecha no existe bibliografía que aborde las modificaciones histológicas en las regiones encefálicas con participación en la alimentación como es el hipotálamo. Respecto al SNED, tampoco existen publicaciones que establezcan las modificaciones en las células productoras de neuropéptidos como consecuencia de la triploidía en ninguna especie. Resultados previos descritos en células de diferentes tejidos en otras especies (Aliah *et al.*, 1990; Kavumpurath y Pandian, 1992; Small y Benfey, 1987), o las modificaciones observadas en *R. quelen* en el tejido sanguíneo (Fukushima, 2012), nos permiten hipotetizar que estas células también podrían verse afectadas en su tamaño y número y, consecuentemente, en su rol regulador.

En intestino se han descrito variaciones morfométricas como consecuencia de la triploidía en especies como el salmón del Atlántico (*S. salar*) y el bacalao (*Gadus morhua*), donde las variaciones en las variables morfométricas analizadas podrían influir directamente en la ingesta de alimentos (Peruzzi, *et al.*, 2013; 2015)

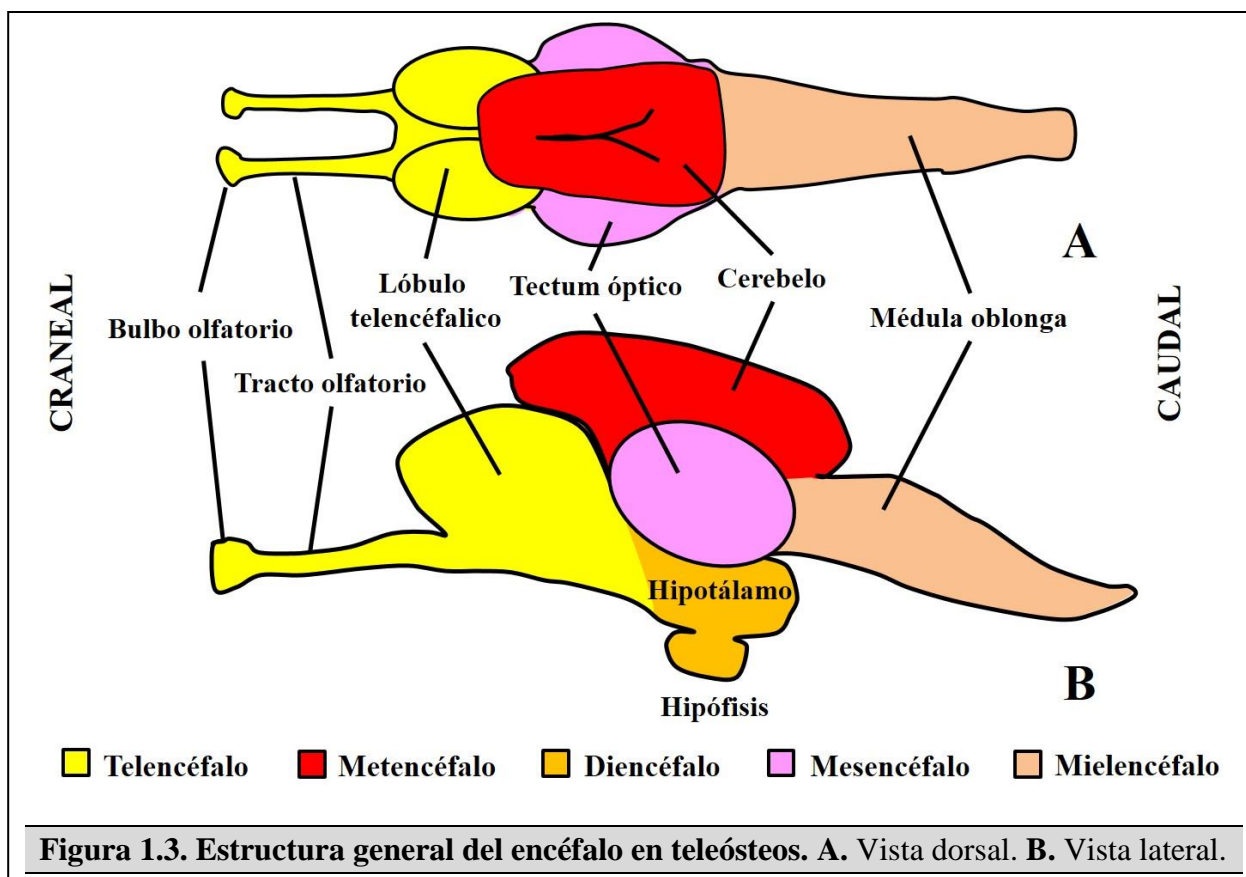
De esta manera, el estudio de las modificaciones morfológicas como consecuencia de la triploidía en determinadas células, tejidos y órganos nos permitirá dar sustento teórico a los beneficios productivos ya reportados por nuestro grupo de investigación en triploides de *R. quelen* (Moron Alcain *et al.*, 2017).

1.5. Estructura macro y microscópica del encéfalo y tubo digestivo en peces.

1.5.1. Encéfalo.

1.5.1.1. Características anatómicas.

Para su estudio anatómico, el cerebro de los peces se divide en 5 regiones que, de craneal a caudal, se denominan telencéfalo, diencéfalo, metencéfalo, mesencéfalo y mielencéfalo (Fig. 1.3).



El telencéfalo es una estructura formada por dos lóbulos externamente identificables en la porción más craneal del encéfalo, a partir de cuál se desprenden los tractos olfatorios que terminan en dos ensanchamientos conocidos como bulbos olfatorios (Hamdani y Døving, 2007). Los lóbulos del telencéfalo se dividen en dos en su línea media por un surco que se denomina surco medio o telencefálico. Sobre su cara dorsal podemos encontrar los plexos coroideos e internamente se encuentra un ventrículo (Nieuwenhuys, 2011). El telencéfalo está vinculado a la regulación del comportamiento, la alimentación, la reproducción, y el cuidado parenteral entre otros (de Bruin, 1980; Savage, 1980).

El diencefalo se encuentra cubierto externamente por el *tectum* óptico siendo ésta la estructura más visible del mesencéfalo. El diencefalo se divide en epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo. Presenta en su superficie dorsal un plexo coroideo conocido como saco vasculoso y además posee un ventrículo a la altura del hipotálamo (Fernald y Shelton, 1985; Nieuwenhuys y Bodenheimer, 1966). El epitálamo posee una proyección caudal conocida como epífisis, con importante función endocrina y fotosensible (Concha y Wilson, 2001; Facchin *et al.*, 2008). El tálamo dorsal y el tálamo ventral ocupan la región central del diencefalo cumpliendo funciones de integración neuronal. El hipotálamo está conectado con la hipófisis, siendo el encargado de regular sus actividades. Entre las funciones más importantes del diencefalo, se describen la regulación del medio interno, la regulación de la alimentación y la estimulación endocrina (Fernald y Shelton, 1985; Machluf *et al.*, 2011).

Por su parte, el mesencéfalo está formado por el *tectum* óptico y el tegmento ventral. Es visible externamente delante del cerebelo y su función es coordinar los estímulos visuales con las actividades motoras (Harder y Sokoloff, 1976; Kotrschal *et al.*, 1998).

El metencéfalo está representado por el cerebelo, el cual se ubica inmediatamente dorsal y caudal al *tectum* óptico. Sus funciones son controlar el nado, el tono muscular y el equilibrio regulando la motricidad fina (Bae *et al.*, 2009; Voogd y Glickstein, 1998).

El mielencéfalo, conformado por la médula oblonga, regula la relación entre la médula espinal y el encéfalo. Si bien existen publicaciones en otros siluriformes como *Ictalurus punctatus* (Bass, 1981) y *Clarias gariepinus* (Finger, 1978) en los cuáles las regiones

previamente descritas son semejantes a otros teleósteos, aunque con diferencias anatómicas marcadas en el metencéfalo y el bulbo olfatorio del telencéfalo, a la fecha no existen trabajos que aborden la anatomía encefálica de *R. quelen*.

1.5.1.2 Estructura histológica.

Histológicamente, el telencéfalo se puede dividir en dos grandes áreas, un área dorsal o *pallium* y un área ventral o *subpallium*. En teleósteos se describen cinco zonas para el área dorsal o *pallium*: zona dorsocentral, zona dorsal, zona dorsolateral, zona dorsomedial y zona dorsoposterior. Estos núcleos grises se caracterizan por poseer neuronas de pequeño tamaño y en abundante cantidad. El área ventral o *subpallium* presenta acúmulos celulares formando núcleos principalmente rodeando el ventrículo, siendo estos desde dorsal a ventral el núcleo supracomisural, el núcleo dorsal del área ventral telencefálica, y el núcleo ventral. Hacia la porción caudal del telencéfalo, se describen otros dos núcleos fácilmente identificables por el gran tamaño de sus neuronas, el núcleo ventrolateral y el núcleo entopeduncular se ubican hacia la periferia del cerebro en la región más caudal del telencéfalo (Adrian *et al.*, 1983; Genten, 2009; Huang *et al.*, 1996; Menke *et al.*, 2011).

El epitálamo es la región más rostral del diencefalo. Se caracteriza principalmente por poseer la glándula pineal y dos núcleos habenuares. En teleósteos la glándula pineal se caracteriza por poseer un neuroepitelio principalmente conformado por pinealocitos fotorreceptores, mientras que los núcleos habenuares están constituidos por acúmulos de células a ambos lados de la comisura habenuar (Birba *et al.*, 2014; Herrera-Perez *et al.*, 2011). El tálamo se encuentra ventral al epitálamo y se divide en tálamo dorsal y ventral con dos grandes núcleos ubicados en dorsal (núcleo talámico) y en ventral (núcleo talámico ventral). El hipotálamo es la región del diencefalo con mayor celularidad. En este se describe el núcleo periventricular y el núcleo anterior tuberal, ubicado en lateral del núcleo periventricular. Unida al hipotálamo se encuentra la hipófisis con sus porción nerviosa y glandular (Ostrander y Hopkins, 2000; Tsuneki, 1986; Yeo y Savage, 1976).

El cerebelo es semejante en sus capas histológicas a los mamíferos, donde se encuentran las regiones molecular, de Purkinje y granular (Ostrander y Hopkins, 2000).

Tampoco existen a la fecha estudios histológicos del sistema nervioso de *R. quelen*.

1.5.2. Tubo digestivo.

1.5.2.1. Características anatómicas.

El sistema digestivo de los teleósteos está representado por el tracto o tubo gastrointestinal (TGI) y las glándulas anexas. El TGI es un tubo que se extiende desde la boca al ano. En *R. quelen* se divide en cavidad bucofaríngea, esófago, estómago, intestino y recto (Hernández *et al.*, 2009). Las glándulas anexas son el hígado, el páncreas o el hepatopáncreas dependiendo de la especie. Dependiendo de la dieta y hábitos alimenticios la estructura anatómica general puede variar, no obstante, esa descripción aplica para la mayoría de los teleósteos.

La boca de los peces puede tener distinta ubicación en la cabeza, pudiendo ser bocas terminales, localizadas en la porción más craneal de la cabeza o subterminales, donde pueden situarse en la región dorsal del extremo de la cabeza (superior) o por debajo (inferior) (Fugi *et al.*, 2001).

La cavidad bucofaríngea está delimitada cranealmente por la apertura bucal y caudolateralmente por los arcos branquiales. El esófago es un tubo relativamente corto, que une la cavidad bucofaríngea con el estómago. El estómago es una dilatación del tubo digestivo, interpuesto entre el esófago y el intestino. En la mayoría de los peces posee forma de J, su tamaño varía dependiendo de los hábitos alimenticios de la especie, pudiendo estar ausente en otras (Gerking, 2014; Wilson y Castro, 2010).

El intestino es un tubo de longitud variable, dependiendo también de los hábitos alimenticios de la especie. En la mayoría de los teleósteos se lo divide en anterior y posterior. Internamente se caracteriza por presentar pliegues de la mucosa que protruyen hacia la luz. Estos pliegues son de disposición circular en intestino anterior y longitudinal en intestino posterior. El

recto posee paredes sin pliegues y se abre al exterior mediante el ano (Elliott y Bellwood, 2003; Grosell *et al.*, 2010).

El hígado de los peces es generalmente de gran tamaño, bilobulado o multilobulado y de color pardo rojizo a amarillento dependiendo de la especie, sexo y estado reproductivo. El páncreas es una glándula alargada, de color blanquecino con una porción más delgada y alargada denominada cola. En los teleósteos inferiores esta glándula se encuentra claramente diferenciada del hígado, pero en los teleósteos superiores el parénquima pancreático se encuentra dentro del hígado formando el hepatopáncreas (Al-Hussaini, 1949; Geyer *et al.*, 1996; Nejedli y Gajger, 2013; Petcoff *et al.*, 2006).

Rhamdia quelen presenta una boca subterminal inferior, alrededor de la cual se pueden encontrar barbillones en la mandíbula superior. Su esófago y estómago no presentan diferencias con el resto de los teleósteos. El intestino, en su primera porción se ubica de manera postero-anterior, y luego se curva y adquiere una disposición antero-posterior, lo cual le da el nombre de porción ascendente. Luego forma una segunda curvatura y continua como intestino descendente hasta la porción convoluta donde se pueden visualizar una gran cantidad de pliegues para luego terminar en el recto. Internamente, el segmento ascendente presenta gran cantidad de pliegues de mucosa longitudinales con diferentes alturas denominándose primarios y secundarios. En la porción descendente los pliegues se ramifican y se hacen menos evidentes mientras que en la porción convoluta vuelven a formarse bien definidos al igual que en intestino anterior (Hernández *et al.*, 2009). Desde el punto de vista del desarrollo ontogénico de esta última porción del tubo digestivo, Hernández *et al.* (2014) describieron la formación de la válvula intestinal a los 5 días posteclosión (dpe) diferenciándose una separación entre el intestino anterior (ascendente) y el posterior (descendente). A los 10 dpe, el intestino experimenta una rotación de 180° curvándose hacia craneal, posicionándose en la región antero-derecha dentro de la cavidad abdominal y desplazando el estómago hacia medial de la cavidad. Posteriormente, el intestino se pliega por detrás del estómago diferenciándose un intestino medio. A los 15 dpe el intestino presenta tres porciones morfológicas distintas, intestino anterior, medio y posterior. Finalmente, a los 20 dpe esta última porción presenta un trayecto ondulante y quedan configuradas las tres regiones

descritas en los ejemplares adultos de *R. quelen*, intestino ascendente, descendente y convoluto (Hernández *et al.*, 2014)

1.5.2.2. Estructura histológica.

Histológicamente el intestino se organiza en cuatro tunicas bien diferenciadas (Ostrander y Hopkins, 2000):

- **Túnica Mucosa:** Formada por el epitelio cilíndrico simple de revestimiento con células mucosas, el cual apoya sobre una membrana basal. Por debajo se ubica la lámina propia de tejido conectivo laxo y a continuación una capa de músculo liso denominada muscular de la mucosa, aunque en algunos casos puede no estar presente. En el caso del intestino, la mucosa se dispone en forma de vellosidades las cuales permiten aumentar la superficie de absorción (Fig. 1.4.A y 1.4.B).

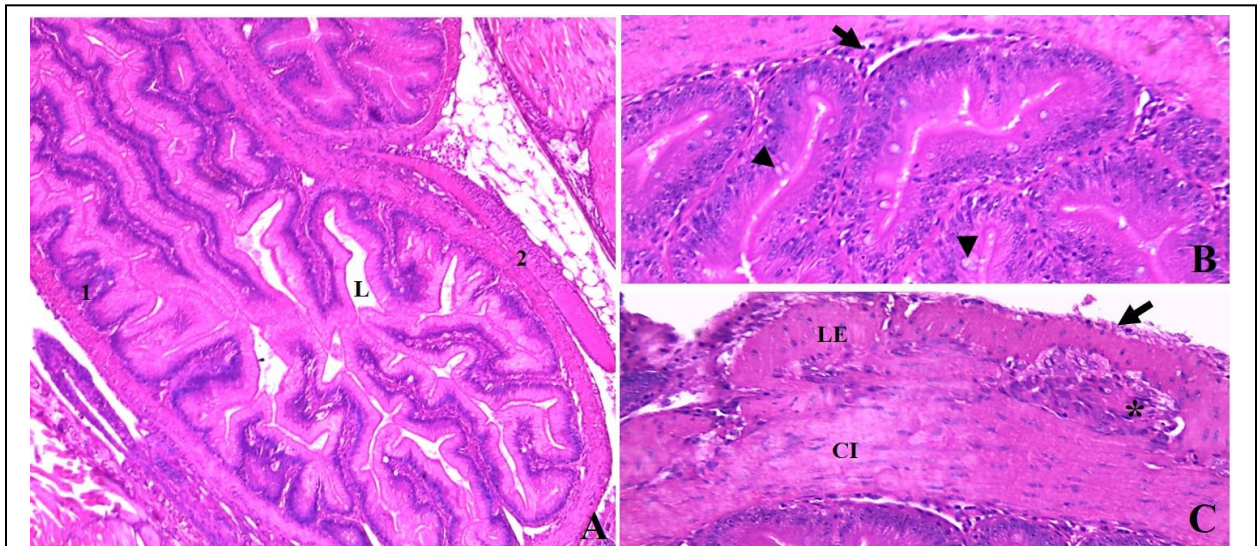


Figura 1.4. Estructura histológica básica del intestino. A. Vista panorámica del intestino ascendente de *R. quelen*, en el que se observan las tunicas mucosa-submucosa (1) y muscular-serosa (2). L: luz del tubo. B. Microfotografía de la mucosa intestinal en el que puede apreciarse el epitelio cilíndrico simple con células mucosas (cabezas de fecha). Obsérvese el poco desarrollo de la túnica submucosa subyacente (flecha). C. Imagen en la que se observan la capa muscular circular interna (CI) y longitudinal externa (LE). La flecha indica la túnica serosa.

- **Túnica Submucosa:** Formada por tejido conectivo laxo con gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos. En algunas especies puede presentar escaso desarrollo (Fig. 1.4.A y 1.4.B).
- **Túnica Muscular:** Constituida por dos capas de músculo liso, una circular interna y una longitudinal externa (Fig. 1.4.A y 1.4.C).
- **Túnica Adventicia o Serosa:** Formadas por tejido conectivo laxo o tejido conectivo más mesotelio, respectivamente (Fig. 1.4.C).

Entre las células que componen el epitelio de la mucosa a lo largo del TGI, podemos destacar al enterocito, las células mucosas y las neuroendocrinas por su función asociada a la digestión y absorción de nutrientes, así como su rol en la regulación de la ingesta.

1.5.2.2.1. Enterocito.

El enterocito es una de las principales células que forman parte del epitelio intestinal. Entre sus funciones destaca la absorción de nutrientes, que puede desarrollarse mucho más eficientemente gracias a la presencia de microvellosidades dispuestas sobre su superficie apical. Éstas, asociadas a la presencia de vellosidades intestinales permiten aumentar considerablemente la superficie de absorción (Ugolev y Kuz'mina, 1994). El enterocito posee un núcleo basal grande que ocupa casi todo el ancho de la célula, el REL en posición apical y el RER en la porción basal de la célula, además de un Aparato de Golgi supranuclear. Como se mencionó anteriormente, destaca su borde en cepillo (microvellosidades apicales) y sobre este un glucocálix que cumple una función relevante en el proceso de digestión terminal (Kuperman y Kuz'mina, 1994). Diferentes autores reportaron un aumento del tamaño nuclear como consecuencia de la triploidía y consecuentemente un mayor tamaño celular (Benfey, 1999; Small y Benfey, 1987; Tiwary *et al.*, 2004). Estas modificaciones en células con una participación directa en la digestión y absorción como los enterocitos podría afectar directamente el crecimiento y desarrollo de los animales.

1.5.2.2.2. Células mucosas.

Las células mucosas son las encargadas de la producción de mucinas en distintas regiones del TGI, así como también en otros tejidos donde están presentes. Poseen forma redondeada y en su porción basal presentan retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y el núcleo, mientras que en su porción apical se encuentran el aparato de Golgi y las vesículas que contienen el producto de secreción (Elbal *et al.*, 2004; Gargiulo *et al.*, 1998). Las mucinas son proteínas de alto peso molecular y altamente glucosiladas, con la particularidad de formar geles que contribuyen a desarrollar sus diferentes funciones. Tanto en peces como en mamíferos, las mucinas se pueden encontrar de dos formas diferentes, formando parte de la membrana celular o como producto de secreción, como es el caso de la función de las células mucosas (Diaz *et al.*, 2005; Plaul *et al.*, 2016). Actualmente, y gracias a los avances de la biología molecular, se sabe que las mucinas tienen un rol fundamental en procesos de coordinación de respuestas celulares como la proliferación o diferenciación, en la respuesta inmune, en la apoptosis, filtración, protección antibacteriana y también en procesos digestivos (Shephard, 1994). En cuanto a los procesos digestivos, las mucinas juegan un papel fundamental en la protección de la mucosa, la filtración de partículas, la adhesión, la digestión y la absorción de sustancias fácilmente digeribles (Domeneghini *et al.*, 1999; Shephard, 1994).

Estas funciones tienen lugar en las distintas porciones del TGI. Así, la filtración de partículas se desarrolla principalmente a nivel de la cavidad bucal, eliminando partículas de gran tamaño, participando también aquí la función de adhesión. La adhesión, a su vez, permite que se formen complejos entre el moco y el alimento, lo cual facilita su transporte. A su vez a nivel del tubo digestivo posibilita un mayor contacto entre el alimento y las enzimas digestivas. Tal como hemos mencionado, y como ha sido demostrado, las mucinas también tienen una participación activa en los procesos digestivos posteriores al paso del alimento por el estómago (Baglolle *et al.*, 1998).

Esta multifuncionalidad de las mucinas hace que las células productoras adquieran especial relevancia a la hora de analizar los procesos digestivos en individuos genéticamente modificados. Así los posibles cambios que sufrieran estas células como consecuencia de la triploidía, pueden repercutir directamente en el aprovechamiento y la digestión del alimento.

1.5.2.2.3. Células del Sistema Neuroendocrino Difuso.

En los peces, la regulación del apetito y el peso corporal está modulada por una delicada interacción entre el sistema nervioso central y sistemas periféricos. En esta integración, el lóbulo inferior del hipotálamo posee un rol fundamental en la interacción de distintas las señales (Delgado *et al.*, 2017). Entre los sistemas periféricos, podemos encontrar dos vías de regulación con funciones en la alimentación, uno de largo plazo y otro de corto plazo (Jensen, 2001). El sistema de largo plazo, está modulado principalmente por una hormona con funciones anorexigénicas denominada leptina (Copeland *et al.*, 2011). El sistema de corto plazo, está regulado por el sistema nervioso entérico y el SNED.

Este último, está compuesto por un conjunto de células endocrinas o paracrinas diseminadas en el epitelio y las neuronas intrínsecas del tubo digestivo (Volkoff *et al.*, 2005). Las células enteroendócrinas (CEEs) localizadas en el epitelio intestinal poseen una forma alargada, con una porción central ensanchada donde se localiza un núcleo esférico (Vigliano *et al.*, 2011). Por encima del núcleo poseen un aparato de Golgi de gran desarrollo, al igual que el retículo endoplásmico rugoso. Su citoplasma se caracteriza por poseer gránulos de secreción electrodensos (Pearse, 1977).

Entre las hormonas que producen las células que conforman el SNED podemos encontrar aquellas que van a incrementar la ingesta de alimento (NPY, orexinas) o inhibirlo (CCK-8, CGRP) (Domeneghini *et al.*, 1999; Himick y Peter, 1994; Silverstein y Plisetskaya, 2000).

A la fecha, existe una gran cantidad de estudios que describen la presencia de estos péptidos en mamíferos (Sobrino Crespo *et al.*, 2014; Valassi *et al.*, 2008; Wren y Bloom, 2007) y en peces cada vez más grupos de investigación han determinado la presencia de estos péptidos en el TGI de distintos teleósteos (Bjenning y Holmgren, 1988; Danger *et al.*, 1985; Perea-Ganchou *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2015, 2017; Vigliano *et al.*, 2011; Volkoff *et al.*, 2005). En *R. quelen*, Hernández *et al.* (2012) inmunolocalizaron los principales péptidos asociados a la ingesta en el TGI.

1.5.2.2.3.1. Células productoras de neuropéptido Y.

El neuropéptido Y (NPY) pertenece a la familia de péptidos NPY, junto con el péptido YY y el polipéptido pancreático (PP). El NPY fue descrito por primera vez por Tatemoto (1982), aislado del cerebro de porcinos. Es un péptido que presenta una secuencia muy conservada filogenéticamente y una amplia distribución en el organismo, siendo expresado tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el TGI (Bi *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 1989; Danger *et al.*, 1985; Silverstein y Plisetskaya, 2000). Este péptido a través de la regulación de vías neuronales actúa en múltiples funciones del organismo como la regulación térmica y ritmos circadianos, así como también la liberación de hormonas en la adenohipófisis (Danger *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 2000). Además, otra de las importantes funciones desarrolladas por el NPY es la relacionada con su potente actividad orexigénica o estimulante del apetito (Domeneghini *et al.*, 1999).

Así, en *Oncorhynchus kisutch* y *Oncorhynchus tshawytscha*, Silverstein *et al.* (1998), demostraron que luego de un periodo de ayuno la expresión de este péptido aumentaba significativamente. En *I. punctatus*, se demostró que inyecciones intracerebrales de NPY aumentan la toma de alimento de manera dosis – dependiente (Peterson *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, este péptido modifica la secreción de insulina, causando hiperinsulinemia (MacKenzie *et al.*, 1998). En estudios realizados sobre distintos modelos animales, se observó obesidad a consecuencia de su administración, como resultado de una sobreingesta de alimentos como así también por aumento de la lipasa lipoproteica del tejido adiposo y la disminución del metabolismo basal (MacKenzie *et al.*, 1998).

En cuanto a su inmunolocalización, en *R. quelen* se describió la presencia de este péptido en CEEs del SNED localizadas en el intestino ascendente, descendente y convoluto, siendo su marcaje más numeroso para las primeras porciones del intestino, disminuyendo en las porciones caudales y sin marcaje en el recto. Cabe destacar que el esófago y el estómago no mostraron inmunopositividad a este neuropéptido (David Roque Hernández *et al.*, 2012).

1.5.2.2.3.2. Células productoras de colecistoquinina-8.

Aunque en mamíferos se conocía la participación de la colecistoquinina-8 (CCK-8) en procesos digestivos y como inhibidor del apetito, los primeros trabajos sobre CCK-8 en peces demostraron que este octapéptido actuaba solamente en la digestión, principalmente a través de la contracción de la vesícula biliar y el vaciado gástrico. Posteriormente, a través de inyecciones intracerebrales de CCK-8 en *goldfish* (*Carassius auratus*), se demostró que, al igual que en mamíferos también presentaba funciones en la regulación de la ingesta con un rol anorexigénico (Himick y Peter, 1994; Holmgren *et al.*, 1982; Hur *et al.*, 2016; Jensen *et al.*, 2001; Kurokawa *et al.*, 2000).

Al igual que el NPY, CCK-8 se expresa en el SNC y en el TGI. En *R. quelen*, Hernández *et al.* (2012), describieron la presencia de este péptido en células del SNED, principalmente en el intestino ascendente y descendente, en menor cantidad en intestino convoluto y ausente en el recto. En comparación con el número de células que expresan NPY en esta especie, estos autores determinaron que la cantidad de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 en cada porción fue significativamente menor.

A pesar de la importancia funcional de este conjunto de células en la ingesta de alimento, a la fecha no existen trabajos publicados que expliquen cómo afecta la triploidía la estructura y función de las células del SNED en estos peces.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Contribuir, mediante estudios morfofuncionales, al conocimiento de la biología de triploides de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) para dar sustento a esta herramienta biotecnológica en su transferencia al cultivo de la especie.

Objetivos Específicos

- Establecer la estructura histológica del tracto gastrointestinal y el encéfalo de individuos diploides y triploides de *R. quelen* a diferentes edades.

- Determinar la presencia y distribución de células mucosas en el TGI de individuos diploides y triploides de *R. quelen*.
- Analizar las variables morfométricas que influirían en la absorción de nutrientes.
- Determinar la presencia y comparar la distribución de diferentes neuropéptidos en el TGI y encéfalo durante el desarrollo ontogénico de individuos diploides y triploides de *R. quelen*.

HIPOTESIS

- La triploidía induce cambios profundos en la estructura del TGI y el encéfalo, así como en el número de células productoras de distintos neuropéptidos en ambas localizaciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y muestras.

2.1.1. Obtención de ejemplares.

Los peces utilizados en este trabajo de tesis se obtuvieron por inducción artificial de ejemplares adultos de *R. quelen* pertenecientes al plantel de reproductores del Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental (CIPEX) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Los reproductores machos y hembras fueron mantenidos durante todo el año en tanques de 10.000 l de capacidad con circulación abierta de agua proveniente de la napa freática, bajo condiciones de fotoperiodo natural, aireación continua y alimentados con una ración comercial a razón de 1% del peso vivo día⁻¹ (28% proteína cruda, Kilomax®, Mixes del Sur). Aproximadamente un mes antes del comienzo de la etapa reproductiva se les suministró una ración pelletizada rica en energía y proteínas (372 kcal g⁻¹ energía metabolizable; 40% proteína cruda) preparada en las instalaciones del CIPEX.

La calidad fisicoquímica del agua fue monitoreada periódicamente con un equipo multiparamétrico y kits de determinación semicuantitativos, siendo los valores registrados los indicados en la Tabla 2.1.

Para la obtención de las unidades experimentales se seleccionaron dos machos (208,5±9,2 g) y cuatro hembras (283,5±7,8 g) del plantel de reproductores, teniendo en cuenta características sexuales secundarias que indicaban su madurez sexual como dilatación y enrojecimiento de la papila urogenital en hembras y liberación de esperma por presión abdominal en machos. Para la inducción al desove se utilizó extracto de hipófisis de sábalo (*Prochilodus lineatus*). Esta última se aplicó de manera intramuscular, debajo de la aleta dorsal (Fig. 2.1.A), a dosis de 5 mg Kg⁻¹ en las hembras y 2,5 mg Kg⁻¹ en machos según lo descrito por Baldisserotto y Radünz Neto (2004). Las gametas se obtuvieron por extrusión manual de machos y hembras, y fueron mezcladas en un recipiente plástico seco (Fig. 2.1.B) y luego activadas con el agregado de agua para la fertilización.



2.1.2. Obtención de individuos triploides y evaluación de triploidía.

Posteriormente a la fertilización *in vitro*, los huevos fecundados se separaron al azar en tres grupos experimentales:

- A) Grupo diploide control (**GC**).
- B) Grupo triploides por calor (**TC**), obtenidos por inmersión de los huevos fecundados en agua a 36°C durante 5 minutos a los 5 minutos de haber realizado la fertilización *in vitro* (Vozzi et al., 2003).
- C) Grupo triploides por frío (**TF**), producidos sometiendo los huevos fecundados a 4°C durante 20 minutos a los 3 minutos post-fertilización (da Silva *et al.*, 2007).

Transcurridos los tiempos de choque térmico indicados arriba, los huevos fueron colocados por separado en tres incubadoras tipo Zoug de 60 l de flujo ascendente con renovación constante de agua a una temperatura de 24±1°C. Periódicamente se eliminaron huevos no fecundados y embriones muertos para mantener la sanidad de los lotes. Luego de la eclosión de los huevos (aproximadamente a las 36 horas post-fecundación), las larvas fueron trasladadas a tanques de fibra de vidrio con circulación abierta hasta los 4-5 días post-eclosión (dpe), momento de absorción total del saco vitelino. Durante este período, se inició el suministro de alimento vivo (nauplios de *Artemia* sp) para adaptar los ejemplares a la ingesta exógena.

La eficiencia de la técnica de triploidía se comprobó mediante la técnica de AgNOR (Howell y Black, 1980; Ploton *et al.*, 1986) en sesenta peces elegidos al azar de cada grupo tratado, obteniéndose 77% y 87% de triploides en TC y TF, respectivamente (Morón Alcain *et al.*, 2017).

2.1.3. Larvicultura y Recría.

Desde los 5 y hasta los 33 dpe, las larvas fueron alojadas en acuarios de 6 l de capacidad con una densidad de 30 larvas l⁻¹ con renovación de agua y aireación suplementaria constante. A los 33 dpe las larvas de cada grupo experimental fueron transferidas a tanques de 300 l de capacidad en un sistema de recirculación de agua con filtración mecánica, biológica y de luz ultravioleta y recriadas hasta la finalización de la experiencia (148 dpe). Los parámetros de calidad de agua registrados durante la larvicultura y recría se indican en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Parámetros fisicoquímicos del agua registrados en las distintas etapas de la experiencia.

Parámetro	Reproductores	Larvicultura	Recría
Temperatura (°C)	22,9 ± 0,3	23,7 ± 0,2	18,5 ± 0,3
pH	8,5 ± 0,04	7,6 ± 0,05	7,6 ± 0,1
Conductividad (µS cm ⁻¹)	1719 ± 13	1895 ± 109	2633 ± 66
TDS (mg l ⁻¹)	1238 ± 9,6	1433 ± 109	1300 ± 30
Dureza (mg l ⁻¹ de CaCO ₃)	-	112 ± 4,5	89 ± 10.4
Nitratos (mg l ⁻¹)	0	0	0
Nitritos (mg l ⁻¹)	0	0	0

La alimentación de los ejemplares se realizó desde los 5 a los 26 dpe suministrando nauplios de *Artemia sp.* a razón de 100, 200 y 300 nauplios larva⁻¹ durante la primera, segunda y tercera semana de larvicultura, respectivamente. De los 26 a los 33 dpe se alimentaron con una

dieta mixta de ración viva y balanceado comercial y a partir de los 33 dpe pasaron a una dieta exclusiva de alimento balanceado comercial molido y tamizado de acuerdo a la apertura de boca, a razón de 2% del peso vivo día⁻¹ (32% proteína cruda, Kilomax ®, Mixes del Sur). La frecuencia de alimentación fue de 6 veces por día hasta los 33 dpe y de 4 tomas diarias desde los 33 dpe hasta la finalización de la experiencia.

2.1.4. Toma y procesamiento de muestras.

Previo a los muestreos, los ejemplares fueron eutanasiados con una sobredosis de benzocaína (150 ppm) y posterior sección de la médula espinal. Las muestras para los distintos estudios microscópicos se tomaron a los 5, 12, 19, 26, 33, 48, 62, 86, 113 y 148 dpe. A los 5 dpe las larvas fueron fijadas *in toto* debido a su talla, mientras que en los muestreos posteriores se separó la cabeza y la cavidad celómica para disponer de muestras de SNC e intestino, respectivamente. Todas las muestras fueron fijadas en líquido de Bouin durante 12 a 16 horas dependiendo del tamaño de las muestras y posteriormente fueron transferidas a etanol 70% y almacenadas hasta su procesamiento. A continuación, las muestras fueron deshidratadas en una batería de etanol a concentraciones crecientes para luego ser incluidas en parafina. Una vez conformados los bloques, se realizaron cortes de entre 3 y 5 µm de espesor.

2.2. Técnicas de estudio macro y microscópicas.

2.2.1. Descripción macroscópica del encéfalo.

Teniendo en cuenta que no existen estudios anatómicos previos en la especie estudiada, se realizó una descripción externa general del encéfalo marcando los accidentes anatómicos más importante y comparando estos con las especies en las cuales ya había sido descrito, con particular énfasis en silúridos.

Para ello se tomaron muestras de encéfalo de juveniles de *R. quelen* que se fijaron en formaldehído tamponado al 10%. Posteriormente se realizaron varias secciones del mismo para la descripción y visualización de las porciones internas del mismo. De todo lo descrito se tomaron fotografías macroscópicas utilizando una cámara Nikon Coolpix 100P.

2.2.2. Histología.

Los cortes de las distintas muestras fueron desparafinados y rehidratados para posteriormente ser coloreados con hematoxilina eosina. Además, las secciones de cavidad celómica fueron teñidas con PAS para la identificación de mucinas neutras en células mucosas intestinales.

Para el estudio histológico del encéfalo, se lo dividió siguiendo la nomenclatura utilizada en neuroanatomía. Se procedió exclusivamente a la descripción de la estructura histológica del telencéfalo y diencéfalo, debido a que son las principales regiones del encéfalo implicadas en la regulación de la ingesta de alimento.

En todos los casos se tomaron fotografías a diferentes aumentos utilizando una cámara digital Leica EC3 adaptada a un microscopio óptico Leica DM 750.

2.2.3. Inmunohistoquímica.

Los cortes histológicos de encéfalo e intestino fueron desparafinados y rehidratados según protocolo histológico de rutina para posteriormente realizar una técnica inmunohistoquímica indirecta. A menos que se aclare lo contrario, todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C) en cámara húmeda y los lavados se realizaron con buffer fosfato salino 0.1 M (PBS) consistiendo en tres inmersiones sucesivas de 5 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de bloqueo de peroxidasa (0,3% H₂O₂ en metanol). Previo lavado, se realizó una recuperación antigénica en olla a presión durante 11 minutos a vapor fluyente utilizando un tampón de recuperación Tris-Edta (10 mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.05 Tween, pH 9.0). Posteriormente, las muestras fueron lavadas y se bloquearon las reacciones cruzadas inespecíficas con suero normal equino durante 15 minutos. Luego de esto, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario correspondiente respetando las condiciones de incubación que se indican en la Tabla 2.2. Pasado el tiempo correspondiente de incubación, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con un polímero de dextrano y peroxidasa (ImmPRESS Reagent Kit Peroxidase[®], Anti-RABBIT Ig, MP-7401, Vector Laboratories) durante 30 minutos para luego ser reveladas con una solución cromógena de

diaminobencidina (DAB) (Cell Marque[®], 957D-40) en dilución 1:50. La reacción fue controlada bajo la observación de las muestras en microscopio óptico, finalizando la reacción sumergiendo los cortes en agua destilada cuando se observó un marcaje claro del tipo celular buscado con el menor fondo posible. Posteriormente, las muestras se contrastaron con hematoxilina, deshidrataron y montaron con Depex[®]. En todos los casos se incluyeron controles positivos y negativos, reemplazando para este último el anticuerpo primario por PBS.

Tabla 2.2. Condiciones de incubación de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo de incubación	Marca (Código)
Policlonal anti-NPY	1:1500	TN a 4°C	Bachem Lab (T-4454)
Policlonal anti-CCK-8	1:1000	3 hs a TA	Bachem Lab (T-4254)

TN: Toda la noche. TA: Temperatura ambiente.

Posteriormente, en las muestras de encéfalo se realizó una descripción de las áreas que presentaron inmunorreactividad a neuromoduladores para cada día de muestreo. En las muestras de intestino se registraron las variables morfométricas que se detallan más abajo.

2.3. Análisis morfométrico.

2.3.1 Encéfalo.

En la región hipotalámica del encéfalo se tomaron 10 fotografías para cada día de muestreo en ejemplares de todos los grupos experimentales. En las mismas se analizaron las siguientes variables:

- *Número de neuronas mm⁻² de tejido nervioso.* Se contabilizó la cantidad total de neuronas por mm².
- *Tamaño neuronal (μm²).* De cada una de las neuronas contabilizadas se midió el área de sección a nivel del soma.

2.3.2. Intestino.

Para el análisis morfométrico, se tomaron 8 fotografías de intestino ascendente, descendente y convoluto para cada día de muestreo en ejemplares de todos los grupos experimentales. En cada imagen se midieron las siguientes variables:

- *Longitud de las vellosidades (μm)*. Se midió desde la base hasta la punta de la vellosidad, totalizando 3 mediciones por cada fotografía.
- *Espesor de las vellosidades (μm)*. Esta variable se registró en tres porciones de la vellosidad, base, centro y ápice incluyendo la lámina propia.
- *Altura de los enterocitos (μm)*. Se midió el eje mayor de la célula desde la membrana basal al borde apical en tres áreas diferentes al igual que en las variables anteriores.
- *Cantidad de células mucosas por mm^2 de mucosa*. Se contabilizó el total de células mucosas y se midió la superficie de la imagen ocupada por la porción mucosa del tubo digestivo.
- *Área de células mucosas (μm^2)*. Para cada una de las células mucosas contabilizadas se registró el área de sección.
- *Cantidad de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8 por mm^2 de mucosa en intestino ascendente*. Se contabilizó el total de células inmunorreactivas y se midió la superficie de la imagen ocupada por la porción mucosa del tubo digestivo. Esta variable solamente se analizó en intestino anterior debido a la escasa inmunoreactividad presente en otras porciones del TGI.
- *Área de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8 (μm^2) en intestino ascendente*. Para cada una de las células inmunopositivas contabilizadas se registró el área de sección. Esta variable solo se registró en esta porción del TGI debido a lo fundamentado en el párrafo anterior.

Para las variables analizadas se tomaron fotografías con una cámara digital Leica EC3 adaptada a un microscopio óptico Leica DM750. Todos los análisis morfométricos se realizaron utilizando el software de análisis de imágenes de distribución gratuita Image J (v. 1.43).

2.4. Análisis estadístico.

Para evaluar diferencias significativas en las variables analizadas entre grupos para un mismo día de muestreo o diferencias dentro de grupo entre distintas fechas de muestreo se realizó

un ANOVA a un criterio de clasificación con posttest de Tukey. Previamente los datos fueron sometidos a un test de normalidad de Shapiro-Wilk y en el caso de no poseer una distribución normal fueron analizados mediante un test de Kruskal-Wallis con posttest de Dunn's. Para el análisis estadístico se utilizó el software JMP vs 5.1.1 (SAS Institute Inc.) y se consideraron diferencias significativas a $p < 0,05$.

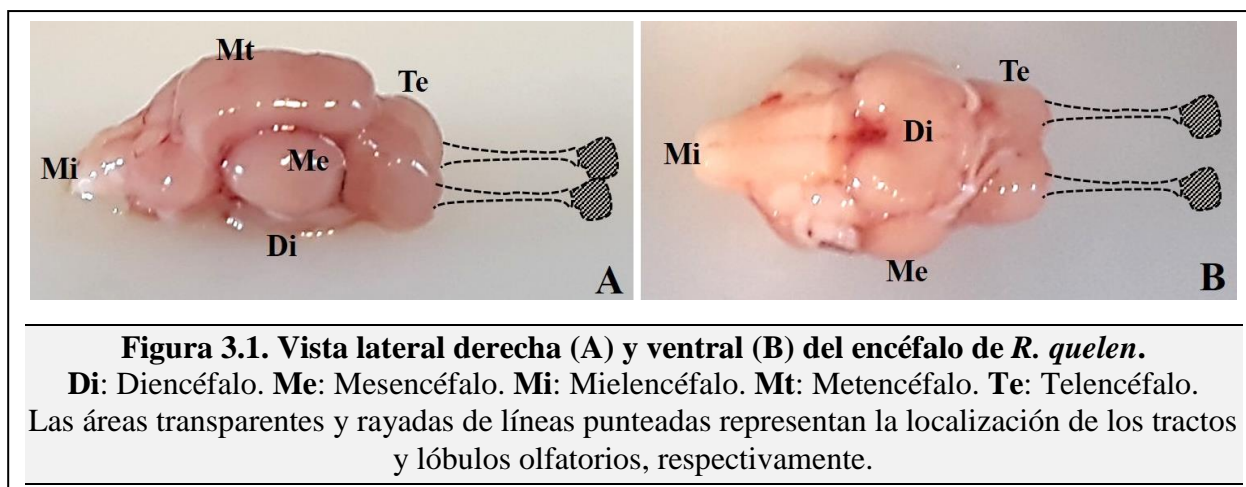
3. RESULTADOS

3.1. Estructura general del encéfalo.

3.1.1. Anatomía.

El encéfalo de *R. quelen* presentó numerosas similitudes con lo descrito en otras especies de teleósteos con algunas características particulares a destacar. Para su estudio anatómico, este se dividió en tres regiones bien diferenciadas: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo.

El **prosencefalo** se dividió en dos grandes regiones fácilmente identificables. El telencéfalo y el diencefalo. El telencéfalo se observó en la región dorsocraneal del encéfalo reconociéndose como dos lóbulos que sobresalen marcadamente (Fig. 3.1.A y 3.1.B). Una de las particularidades de la especie, es la localización de los bulbos olfatorios los cuáles se observaron separados de la masa encefálica ubicándose rostralmente unidos por los tractos olfatorios muy delgados. Debido a esto, durante la necropsia no pudieron extraerse de la cavidad craneana (Fig. 3.1.A y 3.1.B). Caudoventral al telencéfalo comenzó la región diencefálica, la cual pudo observarse en la porción más ventral en una vista lateral del encéfalo (Fig. 3.1.A), o más fácilmente en la vista ventral del órgano (Fig. 3.1.B).



La región más notoria del **mesencéfalo** fue el *tectum* óptico, el cual se encontró dorsalmente al diencefalo y caudal al telencéfalo, ocupando gran parte de la superficie exterior

lateral encefálica. Se visualizó como dos grandes estructuras redondeadas sobre las cuales apoyó el cerebelo (Fig. 3.1.A y 3.1.B)

El **rombencéfalo** estuvo conformado por el mielencéfalo y el metencéfalo representados por la médula oblonga y el cerebelo, respectivamente. Este último presentó una forma trapezoidal con la base dispuesta hacia caudal y se extendió cranealmente hasta aproximadamente el límite entre el telencéfalo y el *tectum* óptico constituyendo una gran parte de la masa encefálica (Fig. 3.1.A).

3.1.2. Histología.

Para una correcta descripción de la estructura histológica se realizaron cortes seriados del encéfalo tanto sagitales como transversales (Fig. 3.2.A). El telencéfalo presentó dos regiones claramente definidas, el *pallium* (dorsal) y el *subpallium* (ventral) (Fig. 3.2.B y 3.2.C).

En la zona más rostral del *subpallium* se identificaron varios núcleos neuronales, entre ellos, los denominados ventrodorsal, ventroventral y ventrolateral. Más cercano a la región de la comisura se encontró el núcleo ventrocentral y el núcleo supracomisural situado por encima de la comisura anterior (Fig. 3.2.C). Situado alrededor del ventrículo lateral se encontró un acúmulo celular formando el núcleo gris periventricular (Fig. 3.2.D). Más caudalmente, se observó el núcleo intermedio (Fig. 3.2.E), el núcleo postcomisural (Fig. 3.2.E, *inset*) y el núcleo entopeduncular (Fig. 3.2.F).

En el *pallium*, se identificaron los núcleos dorsolateral, dorsolateral ventral, dorsomedial y dorsocentral (Fig. 3.2.C). Cabe destacar que estas agrupaciones neuronales se observaron compuestas por dos o más núcleos, no obstante, mediante técnicas histológicas de rutina su identificación fue difícil, por lo que se describieron conjuntamente como un grupo grande y único.

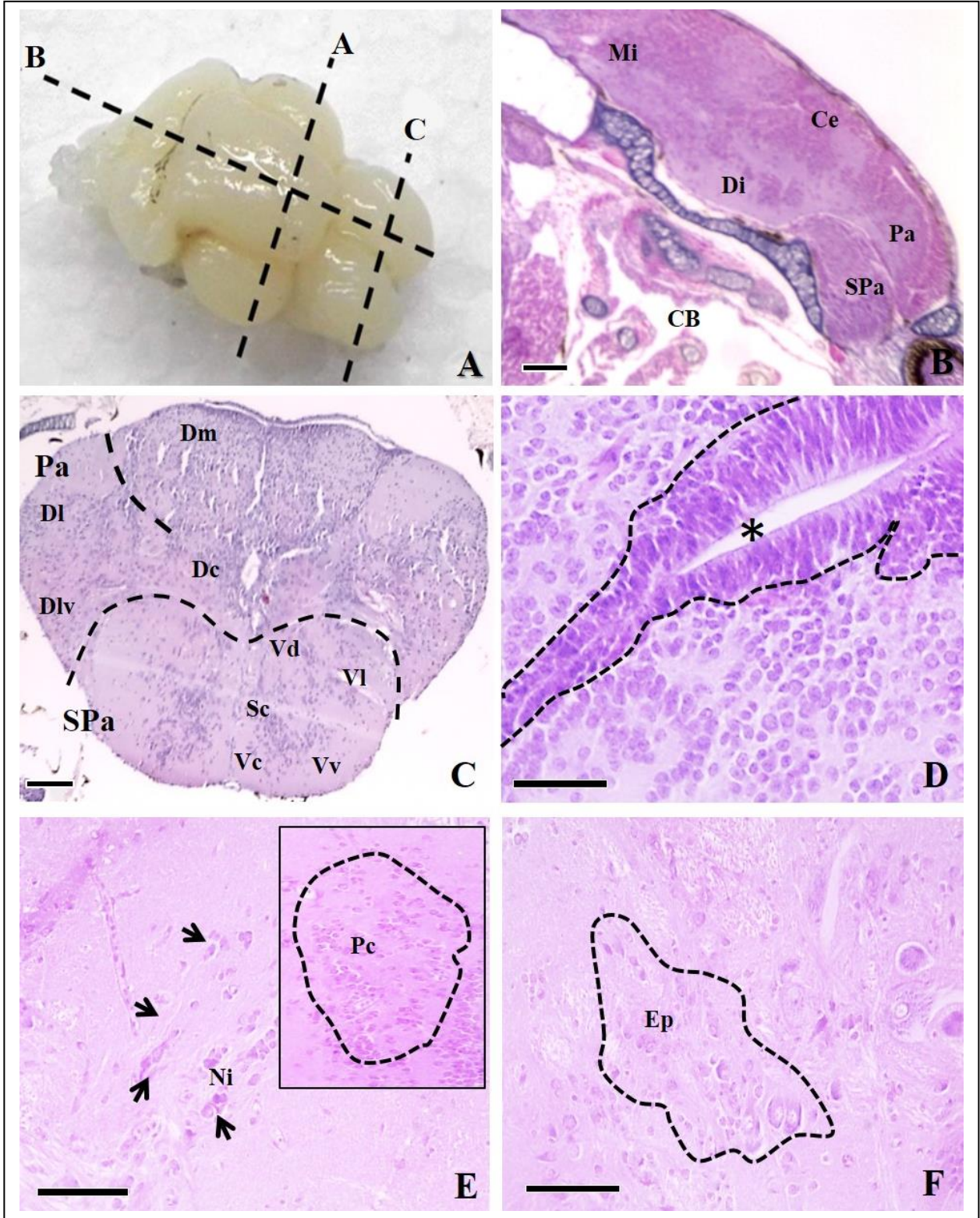


Figura 3.2. Histología de distintas regiones del telencefalo. **A.** Vista dorsolateral anterior derecha del encéfalo de *R. quelen* donde se indican con líneas punteadas los planos de sección de las figuras B, C de esta lámina. La sección A se corresponde con el corte observado en la figura 3.3.A. **B.** Corte sagital de encéfalo. **C.** Sección transversal del telencefalo que permite observar las relaciones topológicas entre los núcleos del *pallium* y *subpallium*. **D.** Imagen del núcleo gris periventricular (área punteada) del *subpallium* dispuesto alrededor del ventrículo lateral (asterisco). **E.** Núcleo intermedio del *subpallium* (flechas) junto con el postcomisural (área punteada, inset). **F.** Núcleo entopenducular del *subpallium*. **Hematoxilina-Eosina. Barras:** Figuras **B y C:** 50 μm . Figuras **D, E y F:** 20 μm . **CB:** cavidad branquial. **Ce:** cerebelo. **Dc:** núcleo dorsocentral. **Di:** diencefalo. **DI:** núcleo dorsolateral. **Dlv:** núcleo dorsolateral ventral. **Dm:** núcleo dorsomedial. **Ep:** núcleo entopeduncular. **Mi:** mielencéfalo. **Ni:** núcleo intermedio. **Pa:** *pallium*. **Pc:** núcleo postcomisural. **Sc:** núcleo supracomisural. **Spa:** *subpallium*. **Vc:** núcleo ventrocentral. **Vd:** núcleo ventrodorsal. **VI:** núcleo ventrolateral. **Vv:** núcleo ventroventral.

Respecto al diencefalo, se dividió en cuatro regiones bien delimitadas, el epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral y el hipotálamo (Fig. 3.3.A).

El epitálamo presentó la habénula y la comisura habenular. Rodeando la comisura habenular se encontró una fina capa celular (entre 6 a 10 células). Lateralmente se encontraron dos grandes núcleos que conforman la habénula, uno menor que el otro denominados izquierdo y derecho, siendo este último el de mayor tamaño (Fig. 3.3.B)

En el tálamo dorsal, se observaron tres grandes núcleos de disposición rostrocaudal que se denominaron anterior, medio y posterior (Fig. 3.3.C, 3.3.D y 3.3.E).

El tálamo ventral en su porción rostral evidenció el núcleo de la eminencia talámica, compuesto por una capa celular delgada a lo largo del epéndimo. Lateral a este último, esta región exhibió el núcleo ventromedial de gran desarrollo (Fig. 3.3.F).

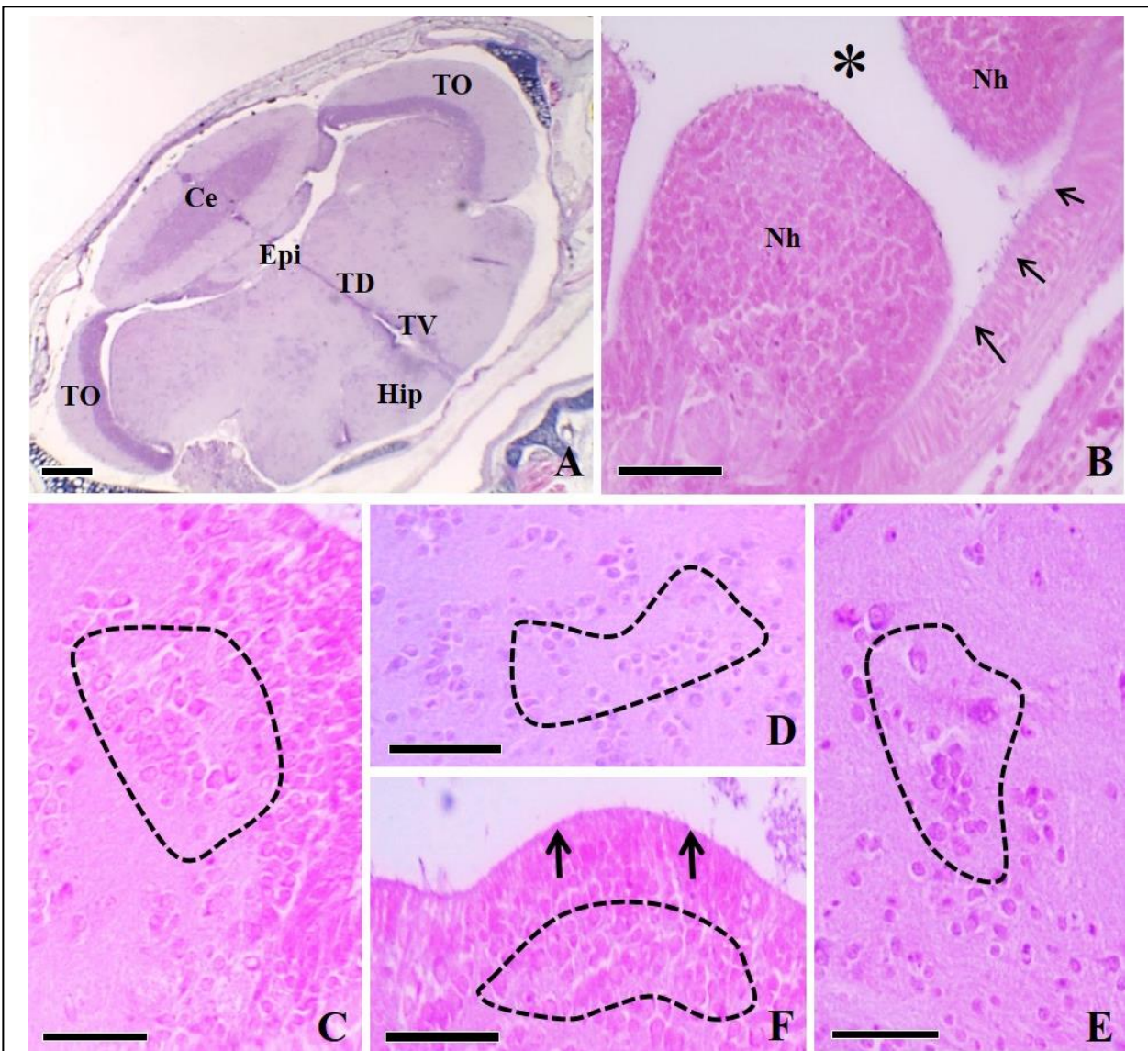
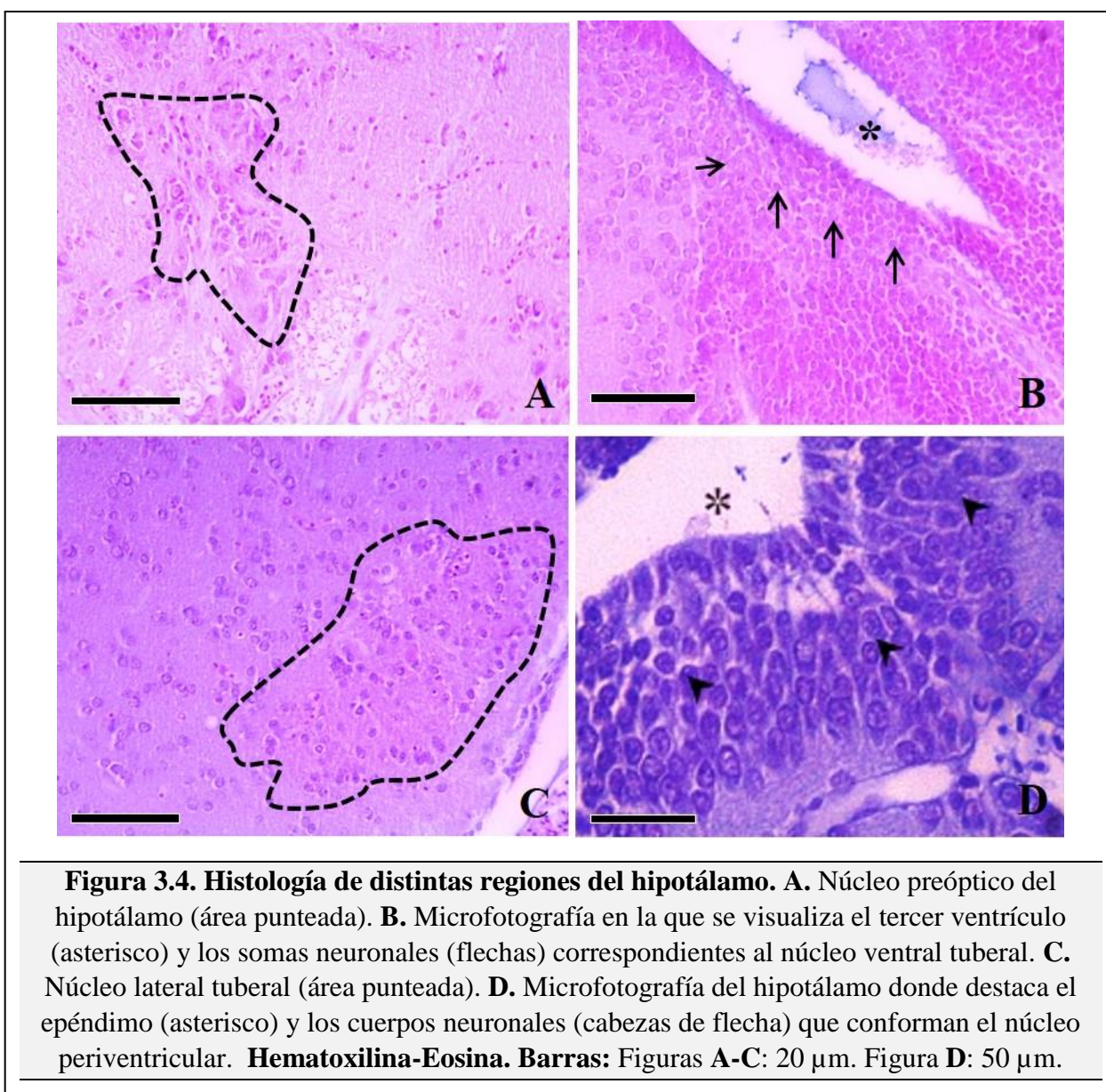


Figura 3.3. Histología de distintas regiones del diencefalo. **A.** Corte transversal de la región del diencefalo donde se observan las distintas regiones del mismo, además del *tectum* óptico y el cerebelo. **B.** Microfotografía del epitálamo en la que se observa la comisura habenular (asterisco) y los núcleos habenulares izquierdo y derecho. Las flechas indican la capa celular que rodea la comisura. **C.** Núcleo talámico anterior (área punteada). **D.** Núcleo talámico medio (área punteada). **E.** Núcleo talámico posterior (área punteada). **F.** Microfotografía del tálamo ventral en la que se muestra el núcleo de la eminencia talámica (flechas) y el núcleo ventromedial (área punteada). **Hematoxilina-Eosina. Barras:** Figura A: 50 μm . Figuras B-F: 20 μm . **Ce:** Cerebelo. **Epi:** Epitálamo. **Hip:** Hipotálamo. **Nh:** núcleos habenulares. **TD:** Tálamo dorsal. **TV:** Tálamo ventral. **TO:** *Tectum* óptico.

En la región del hipotálamo se observaron cinco núcleos. El núcleo preóptico, caracterizado por un conglomerado celular (Fig. 3.4.A), el núcleo ventral tuberal (Fig. 3.4.B) conformado por una delgada capa celular levemente separada del tercer ventrículo, el núcleo lateral tuberal (Fig. 3.4.C) compuesto por una capa de grandes células ubicadas ventrolateralmente al anterior. El núcleo anterior tuberal se encontró ventrolateral al núcleo ventral tuberal y se caracterizó por un grupo de células difusas. Por último, el núcleo periventricular (Fig. 3.4.D) se compuso de varias capas de células rodeando el epéndimo.



3.2. Inmunolocalización de neuromoduladores de la ingesta en encéfalo.

3.2.1. *Neuropéptido Y.*

Se observó inmunoreacción a NPY principalmente en áreas del telencéfalo e hipotálamo con variaciones a lo largo del desarrollo ontogénico. La inmunorreactividad telencefálica se observó a partir de los 12 dpe, principalmente en fibras localizadas en el núcleo dorsolateral del *pallium*. A los 19 dpe se registró reacción fibrilar, y en menor cantidad nuclear, en los núcleos dorsomedial y dorsocentral. En el *subpallium* la inmunopositividad también se observó a partir de los 12 dpe en los núcleos ventroventral y ventrolateral, para posteriormente encontrarse en las regiones pericomisurales a partir de los 19 dpe. En menor cantidad se observó inmunopositividad a NPY a los 62 dpe en los restantes núcleos del tálamo dorsal y ventral del diencéfalo. En el tálamo dorsal se evidenció marcaje en sus cuatro núcleos mientras que a nivel del tálamo ventral se observó principalmente en la región de la eminencia talámica.

En los ejemplares desde los 86 dpe en adelante, en la porción más craneal del telencéfalo se registró inmunopositividad tanto en fibras nerviosas como en somas neuronales de distintos núcleos. La región del *pallium* anterior mostró mayor concentración fibrilar mientras que en el *subpallium* se visualizan núcleos inmunorreactivos alrededor de la comisura y el ventrículo (Fig. 3.5.A). Las regiones con mayor inmunorreactividad fibrilar en el *pallium* se observaron en los núcleos dorsomedial y dorsocentral (Fig. 3.5.B), mientras que en la parte posterior fue mayor en el núcleo dorsolateral. Los somas neuronales inmunopositivos se visualizaron principalmente en la región de los núcleos entopeduncular, pericomisural y supracomisural (Fig. 3.5.A y 3.5.C). También se observó un leve marcaje a nivel del núcleo ventrolateral.

En cuanto a la distribución hipotalámica de estructuras inmunorreactivas a NPY, se observó marcaje en cuerpos neuronales y fibras, siendo esta última en menor cantidad. Las zonas donde se observó mayor cantidad de somas neuronales inmunopositivos fue el núcleo periventricular y en la región correspondiente a los núcleos lateral tuberal y anterior tuberal que guardan estrecho contacto con el telencéfalo (Fig. 3.6.A y 3.6.C).

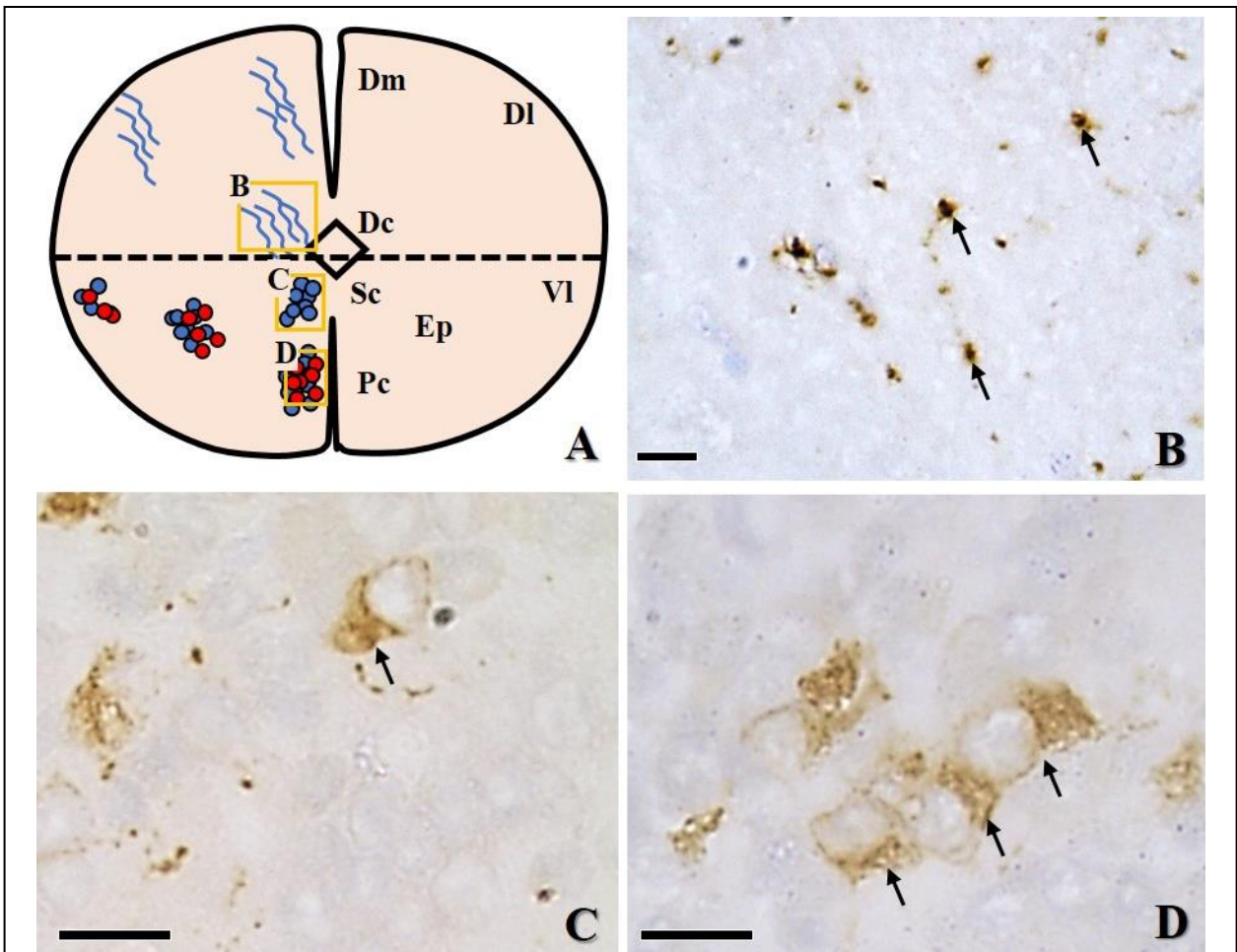


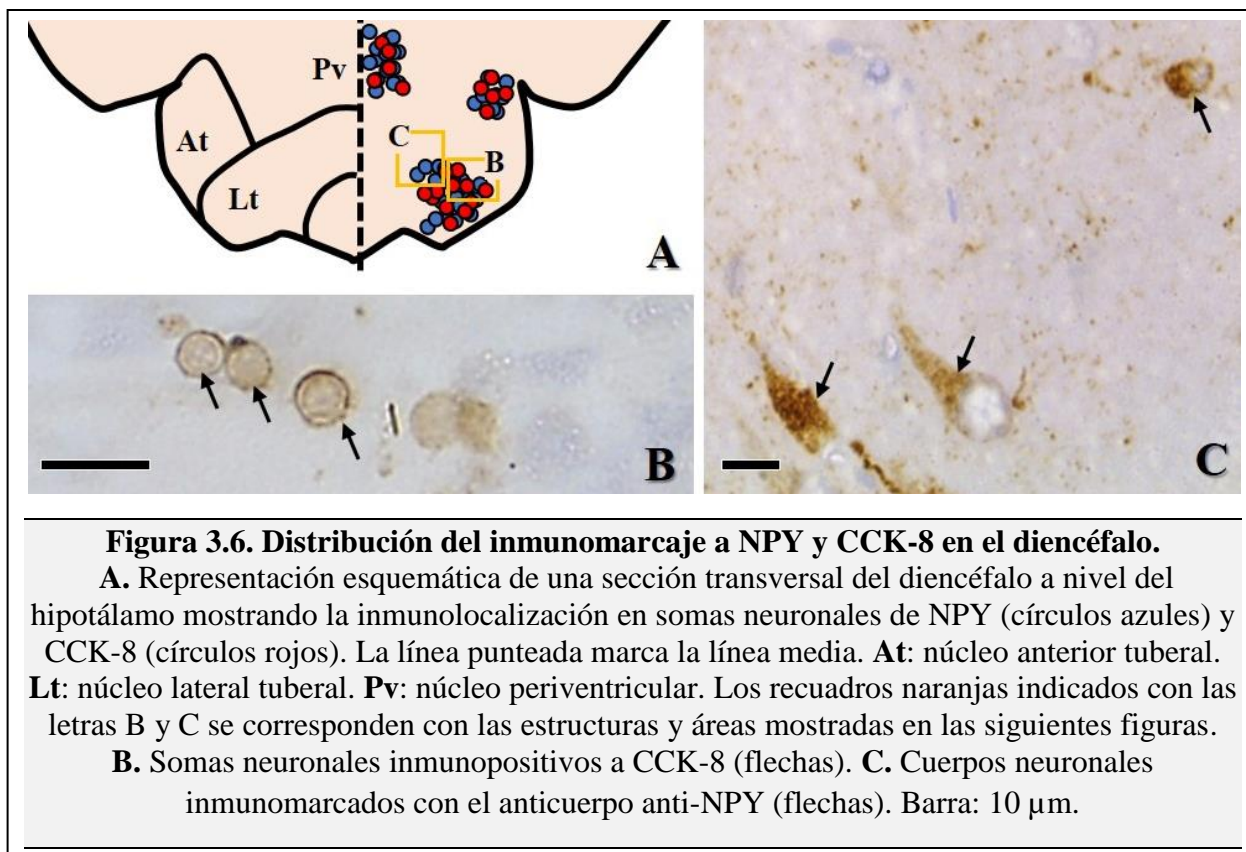
Figura 3.5. Distribución del inmunomarcaje a NPY y CCK-8 en el telencéfalo.

A. Representación esquemática de una sección transversal del telencéfalo mostrando la inmunomarcación fibrilar (líneas celestes) y en somas neuronales para NPY (círculos azules) y CCK-8 (círculos rojos). La línea punteada marca la separación entre *pallium* y *subpallium*.

Dc: núcleo dorsocentral. **Dl:** núcleo dorsolateral. **Dm:** núcleo dorsomedial. **Ep:** núcleo entopeduncular. **Pc:** núcleo pericomisural. **Sc:** núcleo supracomisural. **VI:** núcleo ventrolateral. Los recuadros naranjas indicados con las letras B, C y D se corresponden con las estructuras y áreas mostradas en las siguientes figuras. **B.** Fibras inmunoreactivas a NPY (flechas) en el núcleo dorsocentral. **C.** Soma neuronal inmunopositivo a NPY (flecha) en el núcleo supracomisural. **D.** Somas neuronales inmuno-marcados con el anticuerpo anti-CCK-8 (flechas) en el núcleo pericomisural. Barra: 10 μ m.

Respecto a la aparición ontogénica de la inmunoreactividad a NPY en fibras y somas neuronales en el hipotálamo se observó inicialmente a los 12 dpe en el núcleo lateral tuberal. A

partir de los 19 dpe se observó inmunopositividad en el resto de los núcleos hipotalámicos antes mencionados.



3.2.2. Colecistoquinina-8.

Para CCK-8, las regiones de distribución telencefálica fueron semejantes a las descritas para NPY, a excepción del espacio supracomisural donde no se evidenció marcaje (Fig. 3.5.A y 3.5.D).

En cuanto a la distribución diencefálica, todos los núcleos descritos para NPY fueron inmunopositivos a CCK-8 (Fig. 3.6.A). Las neuronas inmunorreactivas a CCK-8 fueron pequeñas y mostraron un citoplasma escaso (Fig. 3.6.B). La aparición de inmunomarcaje de este péptido, acorde avanzaron los días de muestreo, fue similar al descrito para NPY.

No se registraron variaciones entre diploides y triploides en las áreas encefálicas que expresaron ambos neuropéptidos.

3.3. Morfometría neuronal.

Si bien no se observaron diferencias entre diploides y triploides en la estructura anatómica e histológica general ni en la distribución de los neuropéptidos reguladores de la ingesta evaluados, si pudieron encontrarse variaciones apreciables en las variables morfométricas analizadas. Aunque a lo largo de la experiencia el tamaño de las neuronas hipotalámicas tendió incrementarse en todos los grupos experimentales, la evolución ontogénica de esta variable mostró diferencias considerables entre los distintos grupos evaluados.

Así, en el grupo control el tamaño neuronal fue relativamente constante hasta los 48 dpe, momento en cual se observaron diferencias significativas respecto a los muestreos previos. Posteriormente, la variable registró un incremento significativo a los 86 dpe, para luego mantenerse constante hasta la finalización del ensayo (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Tamaño neuronal medio (μm^2) \pm ES para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	13,4 \pm 0,38 ^c	13,1 \pm 0,38 ^d	14,1 \pm 0,45 ^h
12	12,3 \pm 0,37 ^c	15,8 \pm 0,41 ^d	17,3 \pm 0,51 ^g
19	11,7 \pm 0,59 ^c	21,9 \pm 0,72 ^c	18,8 \pm 0,66 ^{f,g}
26	12,9 \pm 0,29 ^c	24,9 \pm 0,47 ^c	19,8 \pm 0,4 ^{f,g}
33	12,9 \pm 0,27 ^c	41,5 \pm 0,92 ^{b,a}	26,7 \pm 0,77 ^e
48	16,4 \pm 0,36 ^b	40,5 \pm 0,48 ^{b,a}	28,3 \pm 0,46 ^{d,e}
62	18,3 \pm 0,39 ^b	39,0 \pm 0,86 ^c	30,4 \pm 0,39 ^{c,d}
86	22,9 \pm 0,42 ^a	42,9 \pm 0,57 ^a	33,5 \pm 0,40 ^c
113	23,4 \pm 0,59 ^a	43,5 \pm 0,79 ^a	39,5 \pm 0,52 ^b
148	23,4 \pm 0,31 ^a	43,7 \pm 0,52 ^a	44,2 \pm 0,52 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Por otra parte, los peces correspondientes a ambos grupos triploides presentaron un tamaño neuronal mayor en un menor período de tiempo. Así, los ejemplares del grupo tratado por calor mostraron un área neuronal significativamente superior a partir de los 19 y 33 dpe respecto de los muestreos anteriores (Tabla 3.1). En las larvas y juveniles triploides obtenidos por frío el incremento de esta variable fue más paulatino, encontrándose diferencias significativas a los 12, 33, 62, 113 y 148 dpe en comparación con los muestreos previos (Tabla 3.1).

Cuando se compararon los grupos para un mismo día de muestreo se observó que, si bien al inicio de la experiencia (5 dpe) no existieron diferencias en el tamaño neuronal, desde los 12 dpe y hasta el final del ensayo los ejemplares triploides exhibieron valores medios significativamente superiores a sus hermanos diploides (Fig. 3.7.A). Además, desde los 19 a los 113 dpe los ejemplares del grupo TC mostraron un área neuronal significativamente superior en comparación con los peces del grupo TF (Fig. 3.7.A).

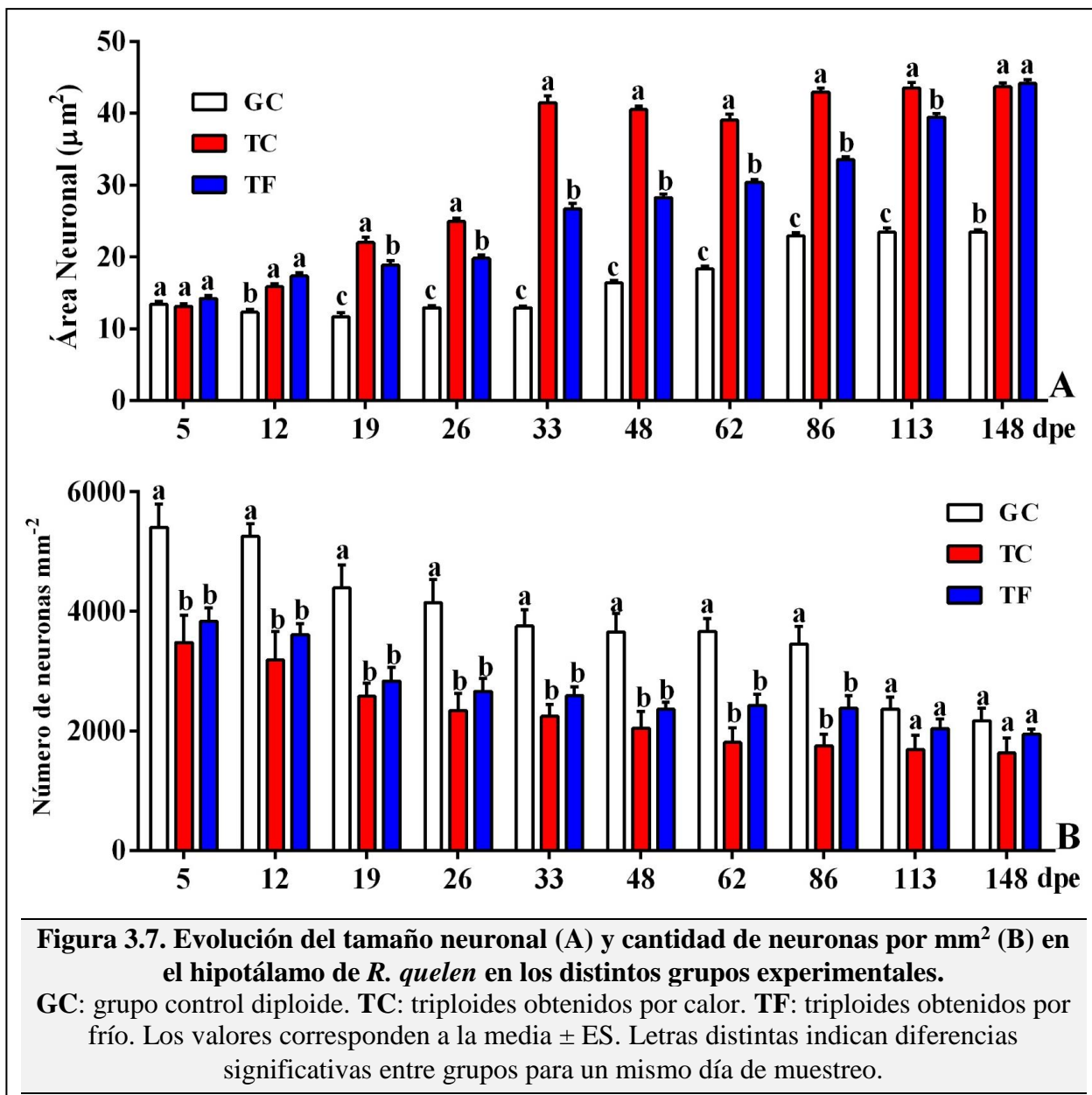
El número de neuronas por mm^2 en el hipotálamo mostró una tendencia a la reducción similar en todos los grupos a lo largo del ensayo, observándose las primeras diferencias significativas en relación al inicio de la experiencia dentro de cada grupo a los 33, 48 y 19 dpe para los peces del GC, TC y TF, respectivamente (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Número medio de neuronas $\text{mm}^{-2} \pm \text{ES}$ para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	5409 \pm 389 ^a	3482 \pm 453 ^a	3836 \pm 224 ^a
12	5255 \pm 214 ^a	3191 \pm 469 ^{a,b}	3609 \pm 188 ^{a,b}
19	4391 \pm 384 ^{a,b}	2582 \pm 214 ^{a,b,c}	2836 \pm 224 ^{b,c}
26	4145 \pm 389 ^{a,b}	2345 \pm 282 ^{a,b,c}	2664 \pm 213 ^{c,d}
33	3754 \pm 275 ^b	2245 \pm 196 ^{a,b,c}	2591 \pm 147 ^{c,d}
48	3654 \pm 310 ^{b,c}	2045 \pm 283 ^{b,c}	2364 \pm 122 ^{c,d}
62	3664 \pm 215 ^{b,c}	1809 \pm 248 ^c	2427 \pm 185 ^{c,d}
86	3454 \pm 293 ^{b,c,d}	1755 \pm 190 ^c	2382 \pm 205 ^{c,d}
113	2364 \pm 206 ^{c,d}	1691 \pm 244 ^c	2037 \pm 160 ^{c,d}
148	2173 \pm 204 ^d	1636 \pm 244 ^c	1945 \pm 87 ^d

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al cotejar la cantidad de neuronas entre grupos para un mismo día de muestreo, los diploides controles presentaron valores significativamente superiores a los de sus hermanos triploides hasta los 86 dpe inclusive, no encontrándose diferencias significativas con posterioridad (Fig. 3.7.B).



3.4. Morfometría intestinal.

Debido al escaso desarrollo de las vellosidades previo a los 20 dpe, las variables morfométricas para las distintas regiones intestinales fueron evaluadas a partir los 26 dpe.

3.4.1. Longitud de las vellosidades.

La longitud de la vellosidad en el intestino ascendente presentó una tendencia general al crecimiento a lo largo de la experiencia en todos los grupos experimentales, aunque con algunas variaciones temporales entre los mismos (Tabla 3.3). Así, en peces diploides la variable se mantuvo constante hasta los 48 dpe, momento en el que se registraron diferencias significativas con los muestreos anteriores, al igual que a los 62 y 148 dpe (Tabla 3.3). En los ejemplares del grupo TC, la longitud de las vellosidades también mostró un incremento significativo respecto a días anteriores a los 48, 62 y 113 dpe y reducciones temporales respecto a los días previos durante los 86 y 148 dpe (Tabla 3.3). Por otra parte, en los peces del grupo TF esta variable presentó un comportamiento similar al observado en TC aunque su incremento inicial fue más progresivo con variaciones significativas a los 33 y 48 dpe (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	50,3 \pm 1,30 ^d	79,8 \pm 0,55 ^f	60,1 \pm 1,30 ^e
33	51,5 \pm 1,30 ^d	76,3 \pm 0,56 ^f	86,1 \pm 1,52 ^d
48	63,4 \pm 1,38 ^c	94,3 \pm 1,59 ^e	120,4 \pm 1,86 ^a
62	95,0 \pm 1,86 ^b	116,5 \pm 0,54 ^c	125,8 \pm 1,86 ^a
86	94,4 \pm 1,69 ^b	101,4 \pm 1,35 ^d	101,7 \pm 1,39 ^c
113	95,7 \pm 1,70 ^b	134,9 \pm 1,51 ^a	125,3 \pm 1,86 ^a
148	105,7 \pm 1,86 ^a	123,3 \pm 1,79 ^b	111,0 \pm 1,30 ^b

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

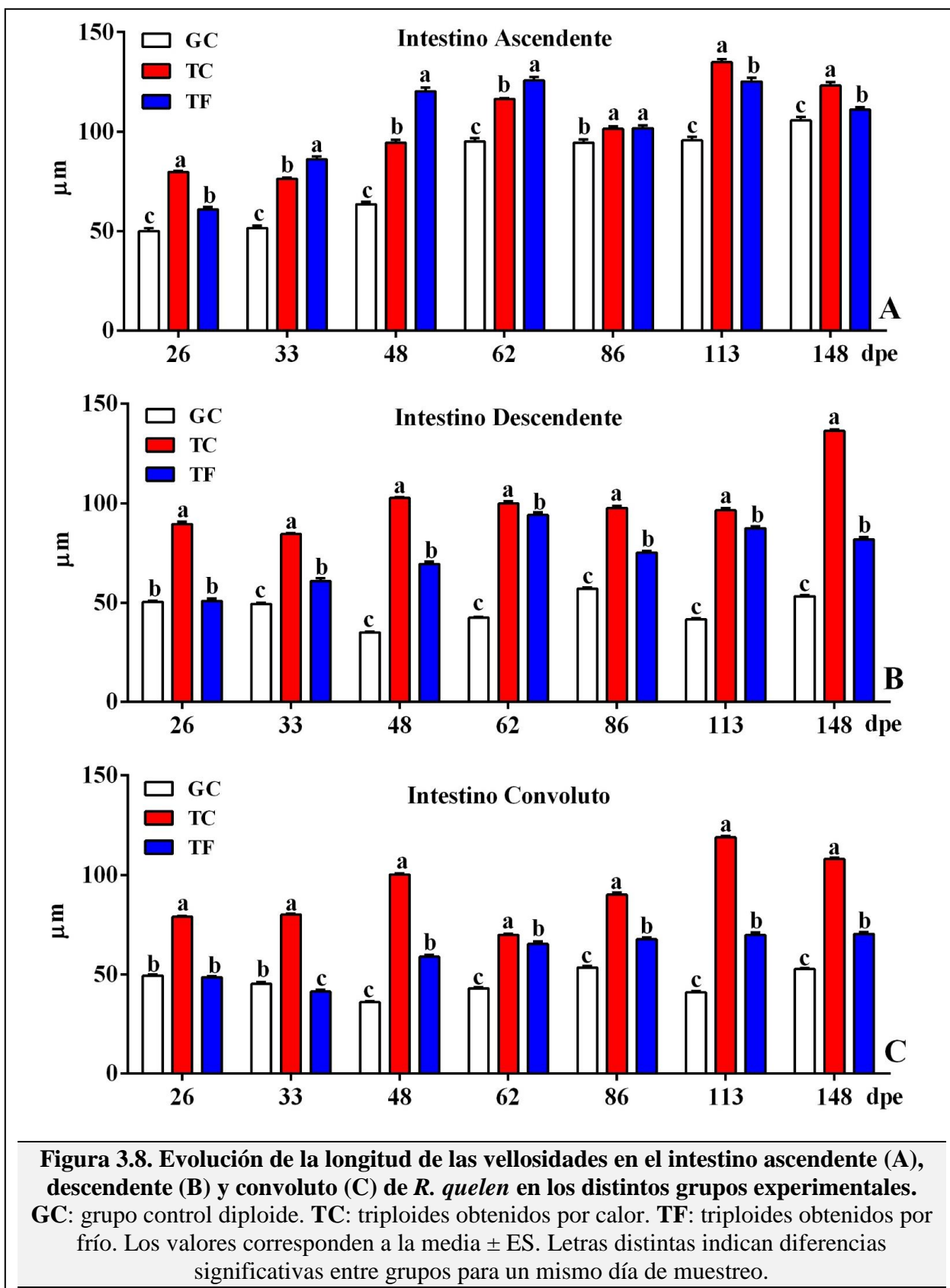
Cuando se analizaron las diferencias entre los grupos experimentales para un mismo día de muestreo se observó que la longitud de las vellosidades del intestino ascendente fue siempre significativamente superior en los grupos triploides en comparación con el grupo diploide control, siendo mayor en TC a los 26, 113 y 148 dpe y en TF a los 33, 48 y 62 dpe (Fig. 3.8.A).

En intestino descendente, la longitud de las vellosidades en el GC mostró una evolución que no guarda relación con lo observado en la porción ascendente. Se registró un descenso significativo a los 48 dpe y un incremento a los 62 y 86 dpe. Posteriormente, disminuyó significativamente a los 113 dpe para finalmente aumentar al final del ensayo, aunque sin llegar a los valores observados a los 86 dpe (Tabla 3.4). Los ejemplares del TC mostraron una reducción significativa en la variable a los 33 dpe, con un incremento posterior a los 48 dpe. Luego se registró un nuevo descenso significativo a los 86 dpe, finalizando la experiencia con un incremento significativo en la longitud de las vellosidades (Tabla 3.4). En los triploides del TF se observó un incremento paulatino significativo hasta los 62 dpe, con descensos y ascensos posteriores (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	50,4 \pm 0,55 ^c	89,5 \pm 1,23 ^d	50,9 \pm 1,14 ^g
33	49,3 \pm 0,57 ^c	84,5 \pm 0,50 ^e	60,9 \pm 1,50 ^f
48	35,0 \pm 0,42 ^e	102,6 \pm 0,50 ^b	69,3 \pm 1,20 ^e
62	42,3 \pm 0,53 ^d	99,8 \pm 1,04 ^b	94,0 \pm 1,29 ^a
86	56,9 \pm 0,59 ^a	97,6 \pm 1,10 ^c	75,2 \pm 0,90 ^d
113	41,7 \pm 0,53 ^d	96,9 \pm 1,08 ^c	87,3 \pm 1,05 ^b
148	53,2 \pm 0,50 ^b	136,3 \pm 0,77 ^a	81,7 \pm 1,30 ^c

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.



Cuando se compararon las diferencias entre los grupos para un mismo día de muestreo se observó que la longitud de las vellosidades en el intestino descendente fue siempre significativamente superior en TC durante todo el ensayo (Fig. 3.8.B). Por otra parte, los triploides del TF también exhibieron valores significativamente mayores a los controles diploides, aunque recién a partir de los 33 dpe (Fig. 3.8.B).

La longitud de las vellosidades en el intestino convoluto presentó una evolución irregular en el GC con reducciones significativas desde el primer día de muestreo hasta los 48 dpe y luego con incrementos a los 86 y 148 dpe (Tabla 3.5). Los valores medios de la variable en los peces del TC mostraron una tendencia al crecimiento a lo largo del ensayo con aumentos significativos respecto a los muestreos previos a los 48, 86 y 113 dpe (Tabla 3.5). Por su parte, en los ejemplares del TF la longitud de las vellosidades en esta porción del intestino disminuyó significativamente a los 33 dpe y aumentó de manera constante hasta el final del ensayo (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Longitud media de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	49,3 \pm 0,55 ^b	78,9 \pm 0,56 ^e	48,4 \pm 0,72 ^d
33	45,2 \pm 0,77 ^c	79,9 \pm 0,54 ^e	41,3 \pm 0,88 ^e
48	35,6 \pm 0,56 ^e	100,2 \pm 0,56 ^c	58,9 \pm 0,86 ^c
62	42,9 \pm 0,53 ^{c,d}	69,9 \pm 0,61 ^f	65,3 \pm 1,30 ^b
86	53,3 \pm 0,77 ^a	89,9 \pm 1,06 ^d	67,7 \pm 0,71 ^{a,b}
113	40,9 \pm 0,53 ^d	119,0 \pm 0,55 ^a	69,7 \pm 1,30 ^a
148	52,6 \pm 0,50 ^a	108,0 \pm 0,55 ^b	70,3 \pm 0,99 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Finalmente, cuando se compararon las diferencias entre los distintos grupos experimentales para un mismo día de muestreo se observó que la longitud de las vellosidades en el intestino convoluto, al igual que en el descendente, fue siempre significativamente mayor en

TC durante toda la experiencia (Fig. 3.8.C). Por otra parte, los triploides del TF también exhibieron valores significativamente mayores a los controles diploides desde los 48 a los 148 dpe (Fig. 3.8.C).

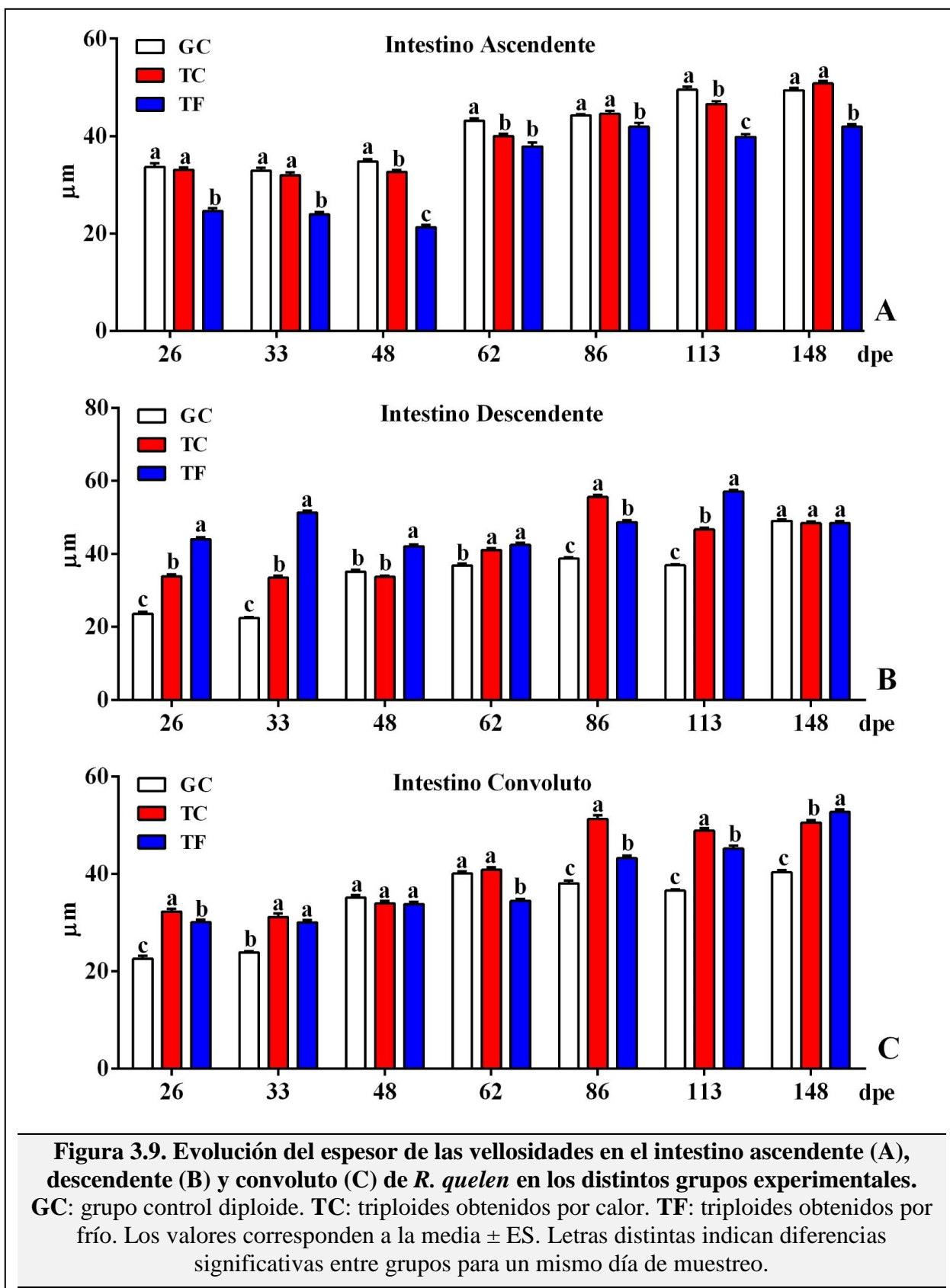
3.4.2. *Espesor de las vellosidades.*

En el intestino ascendente, el espesor de las vellosidades en los peces diploides se incrementó significativamente a los 48, 62 y 86 dpe respecto de los muestreos previos y luego se mantuvo constante hasta el final del ensayo (Tabla 3.6). En los alevinos y juveniles del TC la variable presentó la misma tendencia al aumento a lo largo de la experiencia con valores significativamente superiores a los 62, 86 y 148 dpe en relación a los días anteriores (Tabla 3.6). Por su parte, los peces del TF mostraron una evolución similar en el espesor de las vellosidades, aunque con un descenso significativo a los 48 dpe. Posteriormente, se registraron incrementos significativos a los 62 y 113 dpe (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	33,7 \pm 0,75 ^d	33,1 \pm 0,55 ^d	24,6 \pm 0,54 ^c
33	32,9 \pm 0,53 ^d	31,9 \pm 0,57 ^d	23,9 \pm 0,48 ^c
48	34,8 \pm 0,52 ^c	32,7 \pm 0,42 ^d	21,3 \pm 0,49 ^c
62	43,2 \pm 0,48 ^b	39,9 \pm 0,53 ^c	37,9 \pm 0,82 ^b
86	44,2 \pm 0,32 ^a	44,6 \pm 0,59 ^b	41,9 \pm 0,75 ^b
113	49,5 \pm 0,57 ^a	46,6 \pm 0,56 ^b	39,9 \pm 0,57 ^a
148	49,4 \pm 0,43 ^a	50,8 \pm 0,50 ^a	41,9 \pm 0,50 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.



Cuando se compararon los valores medio del espesor de las vellosidades del intestino ascendente entre distintos grupos para un mismo muestreo, de manera inversa a lo descrito para la longitud de las vellosidades, los peces diploides presentaron vellosidades significativamente más anchas que los triploides del TF a lo largo de toda la experiencia (Fig. 3.9.A). Estas diferencias fueron menores o inexistentes cuando se compararon GC y TC, ya que sólo se observaron variaciones significativas a los 48, 62 y 113 dpe (Fig. 3.9.A).

El espesor de las vellosidades del intestino descendente en el GC aumentó significativamente a los 48, 86 y 148 dpe (Tabla 3.7). Un comportamiento similar se observó en los ejemplares del grupo TC donde las vellosidades fueron significativamente más anchas a los 62 y 86 dpe, aunque luego se registró un descenso a los 113 dpe y hasta el final del ensayo (Tabla 3.7). Los valores registrados en los peces del TF para la variable en esta región del intestino, a diferencia de lo descrito en los otros grupos, no presentaron una tendencia clara al incremento. Así, se observó un aumento significativo a los 33, 86 y 113 dpe respecto a muestreos anteriores, pero con descensos significativos a los 48 y 148 dpe (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	23,6 \pm 0,57 ^d	33,9 \pm 0,55 ^d	43,9 \pm 0,53 ^d
33	22,5 \pm 0,23 ^d	33,5 \pm 0,57 ^d	51,3 \pm 0,55 ^b
48	35,1 \pm 0,52 ^c	33,7 \pm 0,42 ^d	42,1 \pm 0,53 ^e
62	36,9 \pm 0,58 ^{b,c}	41,0 \pm 0,53 ^c	42,5 \pm 0,53 ^e
86	38,8 \pm 0,34 ^b	55,6 \pm 0,59 ^a	48,7 \pm 0,62 ^c
113	36,9 \pm 0,25 ^b	46,7 \pm 0,59 ^b	57,1 \pm 0,50 ^a
148	49,0 \pm 0,50 ^a	48,4 \pm 0,50 ^b	48,4 \pm 0,66 ^c

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al comparar los grupos entre sí para cada día de muestreo, se observó que los triploides del TF presentaron, en el intestino descendente, vellosidades significativamente más anchas que

los diploides desde los 26 a los 113 dpe, y también que los del grupo TC a los 26, 33, 48 y 113 dpe (Fig. 3.9.B). Este último grupo también presentó valores de la variable significativamente superiores que los registrados en diploides desde los 26 a los 113 dpe, a excepción de los 48 dpe donde no se diferenciaron entre sí (Fig. 3.9.B). No existieron diferencias entre grupos a los 148 dpe (Fig. 3.9.B).

Al analizar la variable en el intestino convoluto ninguno de los grupos presentó diferencias significativas entre los 26 y 33 dpe (Tabla 3.8). Posteriormente, en GC se registró un incremento significativo a los 48 y 62 dpe y un descenso a los 113 dpe (Tabla 3.8). En cambio, en los ejemplares del grupo TC se observaron aumentos significativos a los 48, 62 y 86 dpe para luego mantenerse en valores estables hasta el final de la experiencia (Tabla 3.8). En los triploides del grupo TF se encontraron vellosidades significativamente más anchas a los 48, 86 y 148 dpe en comparación con los muestreos previos (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Espesor medio de las vellosidades (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	22,6 \pm 0,53 ^d	32,3 \pm 0,55 ^d	30,1 \pm 0,53 ^d
33	23,9 \pm 0,27 ^d	31,2 \pm 0,67 ^d	30,1 \pm 0,53 ^d
48	35,2 \pm 0,52 ^c	33,9 \pm 0,56 ^c	33,6 \pm 0,50 ^c
62	40,1 \pm 0,42 ^a	40,9 \pm 0,53 ^b	54,5 \pm 0,46 ^c
86	38,1 \pm 0,54 ^b	51,3 \pm 0,77 ^a	43,3 \pm 0,55 ^b
113	36,6 \pm 0,29 ^{b,c}	48,9 \pm 0,53 ^a	45,3 \pm 0,55 ^b
148	40,4 \pm 0,45 ^a	50,6 \pm 0,50 ^a	52,8 \pm 0,52 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Cuando se contrastó el espesor de las vellosidades en el intestino convoluto entre grupos para un mismo día de muestreo se observó que los peces diploides presentaron vellosidades significativamente más delgadas que sus hermanos triploides durante todo el ensayo, a excepción de los 48 y 62 dpe (Fig. 3.9.C). Los ejemplares del grupo TC mostraron vellosidades

significativamente más anchas a los 26, 86 y 113 dpe, mientras que los peces del grupo TF sólo presentaron valores significativamente superiores a los restantes grupo al final del ensayo (Fig. 3.9.C).

3.4.3. Altura de los enterocitos.

La altura de los enterocitos en las tres regiones intestinales mostró una tendencia al aumento a medida que transcurrió el ensayo en todos los grupos experimentales, aunque con algunas variaciones intrínsecas.

Así, en el intestino ascendente de los peces diploides se observó un incremento significativo de la variable a los 48 y 86 dpe y un descenso significativo a los 148 dpe en comparación con los 86 dpe (Tabla 3.9). En los triploides del grupo TC se observó un comportamiento similar con aumentos significativos en la altura del enterocito a los 48, 62 y 86 dpe (Tabla 3.9). Los triploides del grupo TF, al igual que los diploides controles, mostraron incrementos significativos a los 48, 86 y 113 dpe y una reducción significativa de la variable a los 148 dpe en comparación con el último muestreo (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	11,9 \pm 0,23 ^d	12,1 \pm 0,35 ^d	14,9 \pm 0,22 ^d
33	12,6 \pm 0,19 ^d	12,3 \pm 0,22 ^d	14,8 \pm 0,23 ^e
48	16,5 \pm 0,22 ^c	16,9 \pm 0,20 ^c	17,4 \pm 0,19 ^c
62	16,2 \pm 0,20 ^c	18,2 \pm 0,19 ^b	17,0 \pm 0,16 ^c
86	18,7 \pm 0,19 ^a	25,6 \pm 0,35 ^a	25,4 \pm 0,25 ^b
113	18,3 \pm 0,35 ^{a,b}	25,8 \pm 0,18 ^a	25,6 \pm 0,18 ^a
148	17,7 \pm 0,18 ^b	25,5 \pm 0,18 ^a	25,2 \pm 0,18 ^b

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

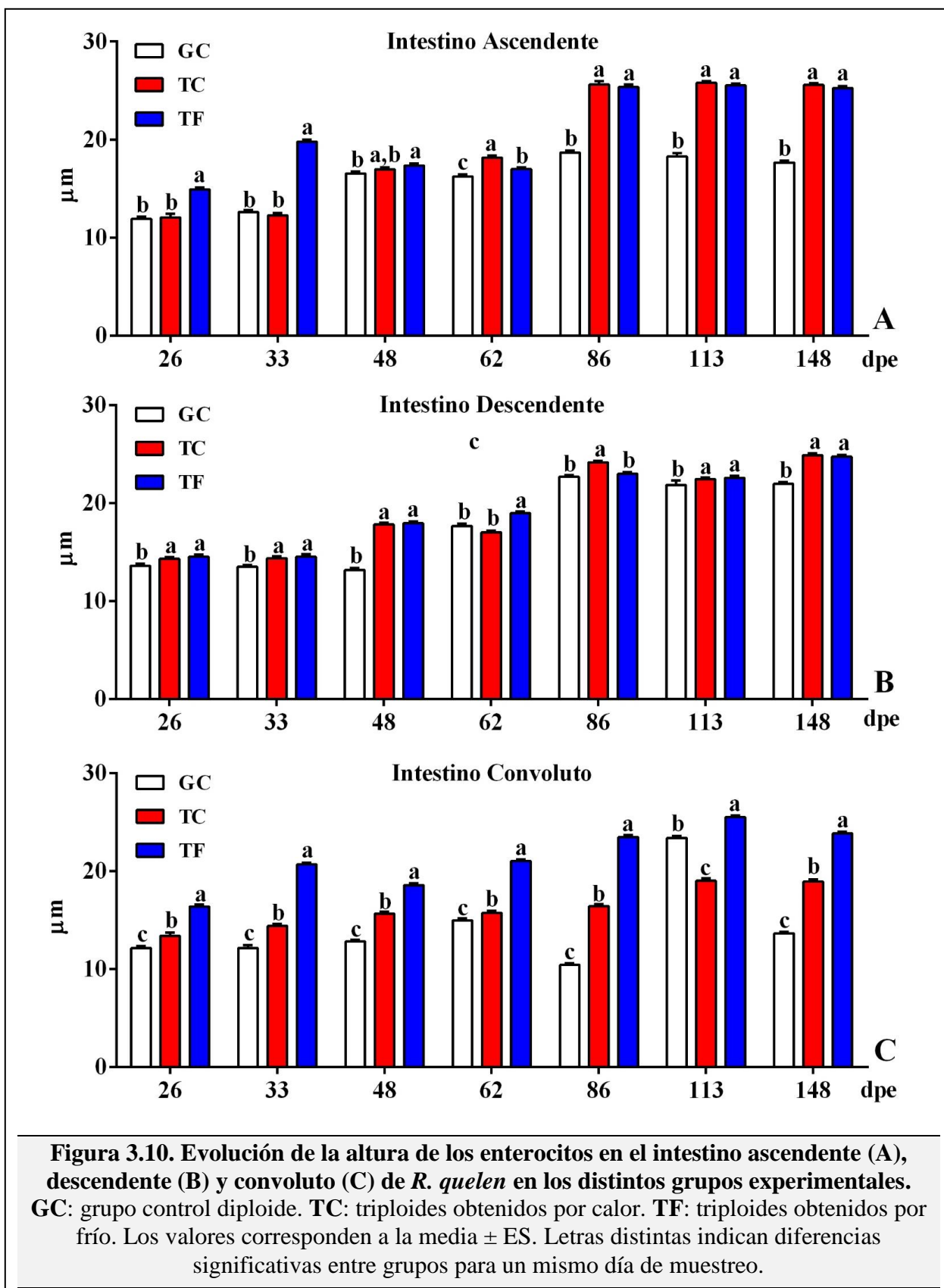
Al cotejar la altura de los enterocitos en el intestino ascendente entre grupos para un mismo día de muestreo, se observó que los triploides obtenidos por frío presentaron valores significativamente superiores a los diploides durante todo el ensayo (Fig. 3.10.A). Por su parte, los triploides del TC presentaron enterocitos significativamente más altos que los diploides controles sólo desde los 62 dpe hasta el final de la experiencia (Fig. 3.10.A). Cuando se compararon los grupos de triploides entre sí, los ejemplares del TF exhibieron valores significativamente superiores al TC a los 26 y 33 dpe, mientras que la relación se invirtió a los 62 dpe (Fig. 3.10.A).

En el intestino descendente, el GC mostró aumentos significativos en la variable a los 62 y 86 dpe, para luego mantenerse constante hasta el final del muestreo (Tabla 3.10). Por otra parte, los triploides por calor exhibieron valores significativamente superiores en la altura del enterocito a los 48 y 86 dpe respecto a los muestreos previos (Tabla 3.10). En el caso de los peces del TF, la variable se incrementó de manera sostenida a los 48, 62, 86 y 148 dpe (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	13,6 \pm 0,18 ^c	14,3 \pm 0,19 ^d	14,5 \pm 0,19 ^e
33	13,5 \pm 0,19 ^c	14,4 \pm 0,17 ^d	14,5 \pm 0,28 ^e
48	17,2 \pm 0,19 ^{b,c}	17,8 \pm 0,19 ^c	17,9 \pm 0,20 ^d
62	17,7 \pm 0,26 ^b	17,0 \pm 0,18 ^c	18,9 \pm 0,18 ^c
86	22,7 \pm 0,49 ^a	24,2 \pm 0,16 ^a	22,9 \pm 0,18 ^b
113	21,8 \pm 0,46 ^a	22,4 \pm 0,18 ^b	22,6 \pm 0,19 ^b
148	21,9 \pm 0,18 ^a	24,9 \pm 0,17 ^a	24,7 \pm 0,18 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.



Cuando se comparó la altura de los enterocitos entre grupos para un mismo muestreo en esta porción del intestino se observó, de manera semejante a lo descrito en el intestino ascendente, que los diploides presentaron enterocitos significativamente más bajos en comparación con sus hermanos triploides (Fig. 3.10.B). No se registraron diferencias en la variable entre TC y TF a lo largo del ensayo a excepción de los 62 y 86 dpe donde los ejemplares del TF y del TC presentaron respectivamente valores significativamente superiores (Fig. 3.10.B).

Finalmente, la altura de los enterocitos en el intestino convoluto presentó incrementos significativos en los peces del GC a los 48, 62 y 113 dpe y descensos significativos a los 86 y 148 dpe en comparación con el muestreo previo (Tabla 3.11). En el TC el aumento de la variable fue progresivo, con diferencias significativas a los 48 y 113 dpe (Tabla 3.11). Los triploides del TF mostraron enterocitos significativamente más altos a los 33, 86 y 113 dpe (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Altura media de los enterocitos (μm) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	12,2 \pm 0,19 ^d	13,4 \pm 0,33 ^c	16,4 \pm 0,20 ^e
33	12,2 \pm 0,28 ^d	14,4 \pm 0,22 ^c	20,7 \pm 0,19 ^c
48	12,8 \pm 0,19 ^c	15,7 \pm 0,19 ^b	18,6 \pm 0,18 ^d
62	14,9 \pm 0,18 ^b	15,7 \pm 0,23 ^b	21,0 \pm 0,19 ^c
86	10,4 \pm 0,17 ^e	16,4 \pm 0,19 ^b	23,5 \pm 0,18 ^b
113	24,4 \pm 0,18 ^a	19,0 \pm 0,26 ^a	25,5 \pm 0,18 ^a
148	13,7 \pm 0,18 ^b	18,9 \pm 0,21 ^a	23,9 \pm 0,18 ^b

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al contrastar la variable entre grupos, se observó que los diploides presentaron valores significativamente inferiores a los de sus hermanos triploides a lo largo de toda la experiencia, a excepción de los 113 dpe donde se registraron valores significativamente superiores en GC

respecto de TC (Fig. 3.10.C). Por otra parte, los triploides del TF mostraron enterocitos significativamente más altos que los del TC a lo largo de todo el ensayo (Fig. 3.10.C).

3.4.4. Área de células mucosas (μm^2).

Este tipo celular se observó en los ejemplares de todos los grupos experimentales y en las tres regiones intestinales analizadas (Fig. 3.11) aunque con variaciones en el número y tamaño.

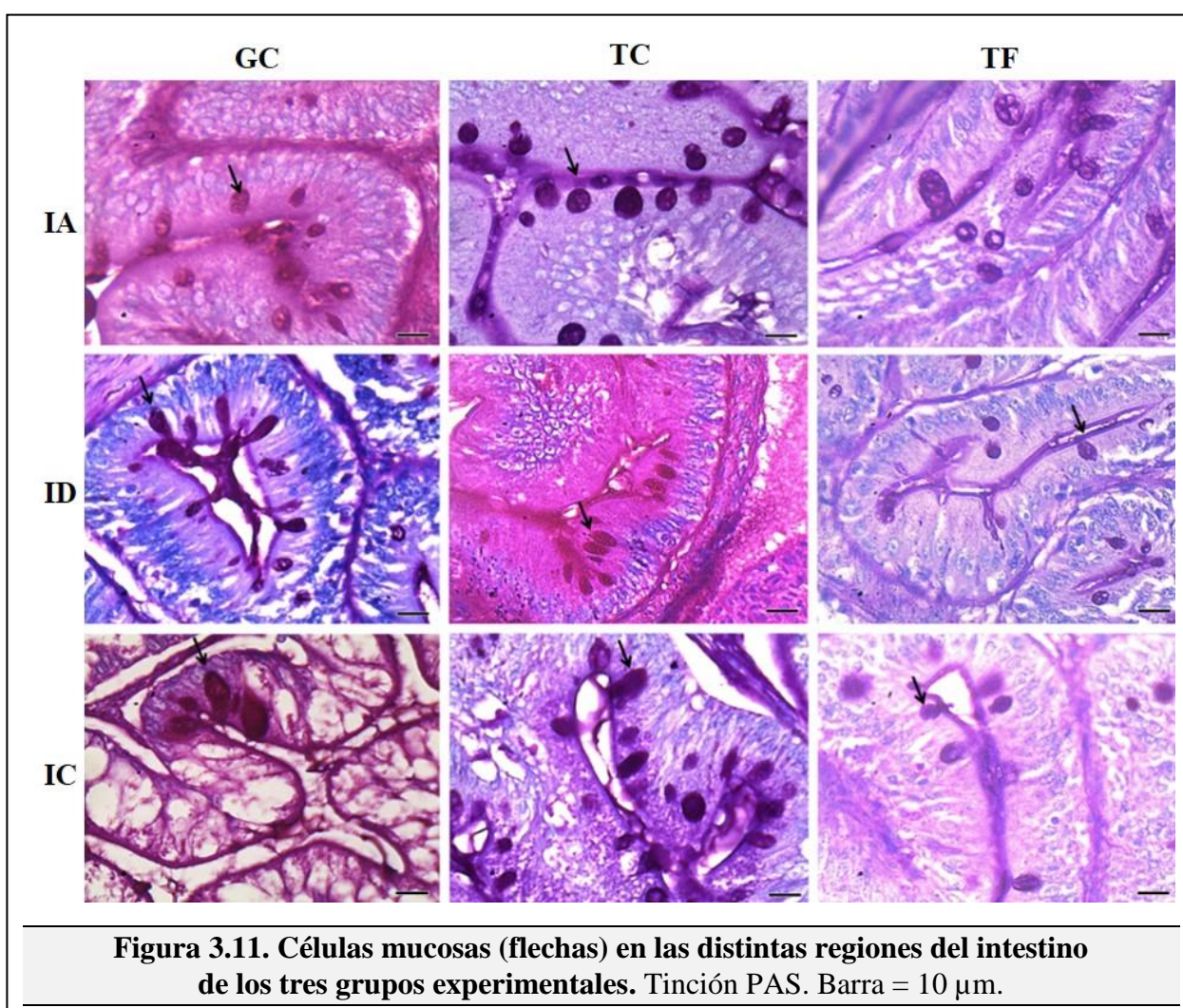


Figura 3.11. Células mucosas (flechas) en las distintas regiones del intestino de los tres grupos experimentales. Tinción PAS. Barra = 10 μm .

El área de células mucosas en las distintas regiones del intestino y en todos los grupos tuvo una tendencia a incrementarse a medida que transcurrió el ensayo, aunque con algunas diferencias. En el intestino ascendente de los peces diploides controles la variable mostró incrementos significativos a los 48 y 148 dpe (Tabla 3.12), mientras que en los triploides del grupo TC estos aumentos se registraron a los 33, 62 y 113 dpe (Tabla 3.12). Por su parte, los triploides del grupo TF mostraron células mucosas significativamente más grandes a los 26 y 148 dpe (Tabla 3.12). En el caso de ambos grupos triploides se observaron además reducciones significativas en los valores de la variable a los 12 y 33 dpe en los peces del TC y TF, respectivamente, en relación con los muestreos previos respectivos (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	26,9 \pm 1,22 ^d	35,4 \pm 1,17 ^d	27,4 \pm 0,98 ^c
12	28,7 \pm 1,03 ^d	24,2 \pm 1,36 ^e	30,7 \pm 1,18 ^c
19	32,1 \pm 1,33 ^d	33,3 \pm 2,21 ^d	34,9 \pm 0,77 ^{b,c}
26	34,7 \pm 2,28 ^d	33,3 \pm 1,18 ^d	42,5 \pm 2,81 ^b
33	25,9 \pm 1,55 ^d	44,8 \pm 1,36 ^c	29,7 \pm 1,61 ^c
48	45,0 \pm 2,09 ^c	47,6 \pm 1,40 ^c	37,8 \pm 1,60 ^b
62	44,7 \pm 1,33 ^c	56,5 \pm 1,60 ^b	49,4 \pm 1,51 ^{a,b}
86	50,7 \pm 1,27 ^{a,b}	60,1 \pm 1,13 ^{a,b}	47,6 \pm 1,54 ^{a,b}
113	46,7 \pm 1,34 ^{b,c}	63,6 \pm 1,47 ^a	50,0 \pm 1,63 ^{a,b}
148	54,0 \pm 1,27 ^a	62,9 \pm 1,27 ^a	53,9 \pm 1,65 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Cuando se compararon los valores medios de la variable entre grupos para cada día de muestreo se observaron valores dispares hasta los 26 dpe ya que inicialmente los triploides del TC presentaron valores significativamente superiores e inferiores en relación a los restantes grupos a los 5 y 12 dpe, respectivamente (Fig. 3.12.A). No se observaron diferencias significativas a los 19 dpe, mientras que en el siguiente muestreo los ejemplares del grupo TF

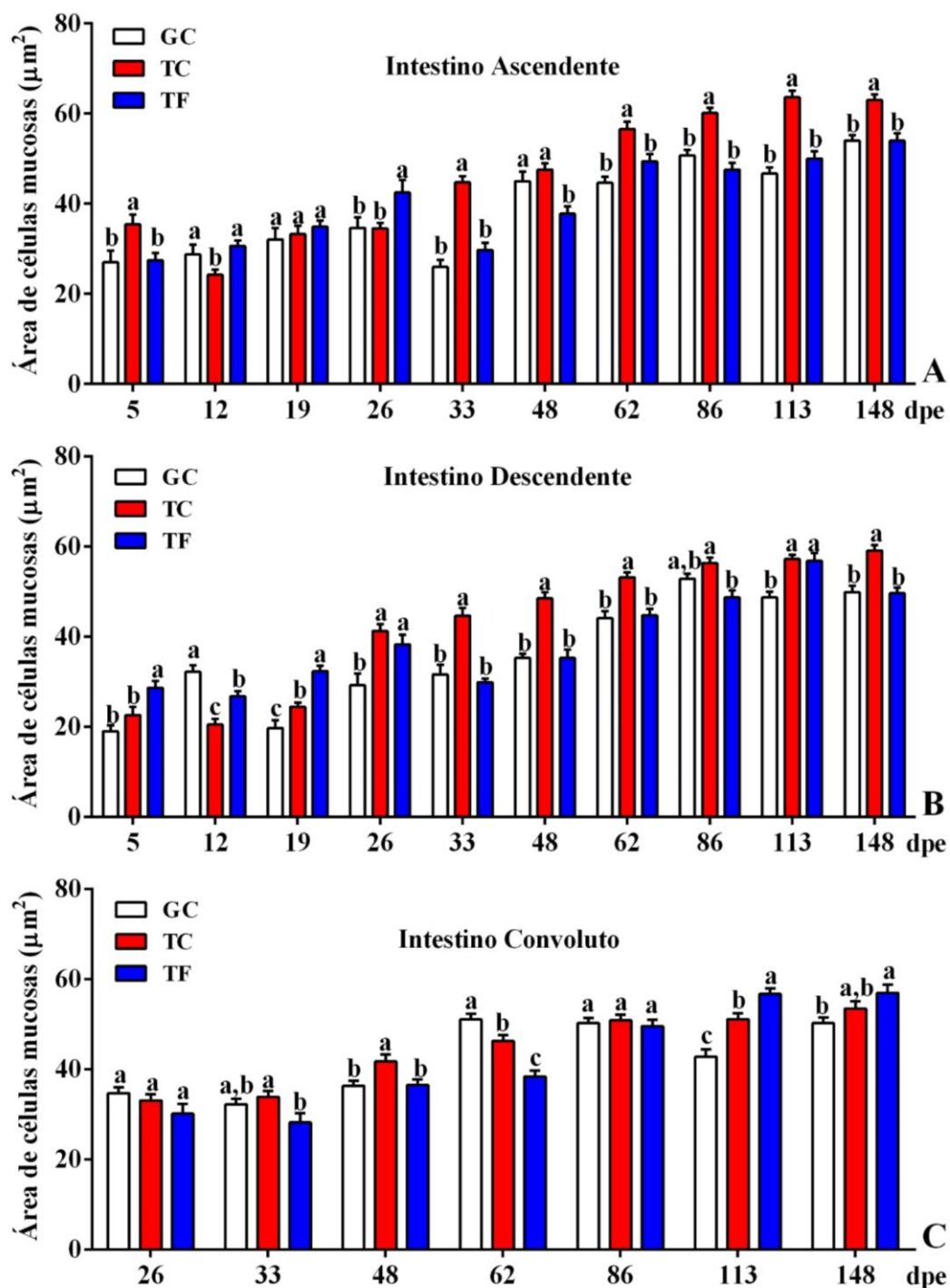


Figura 3.12. Evolución del área de células mucosas en el intestino ascendente (A), descendente (B) y convuelto (C) de *R. quelen* en los distintos grupos experimentales. GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Los valores corresponden a la media \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos para un mismo día de muestreo.

presentaron valores medios de la variable significativamente superiores a los demás grupos (Fig. 3.12.A). Desde los 33 dpe hasta el final de la experiencia, los peces triploides del grupo TC exhibieron células mucosas significativamente más grandes que sus hermanos de los grupos GC y TF (Fig. 3.12.A).

En el intestino descendente de los peces diploides el área de células mucosas aumentó significativamente a los 12, 62 y 86 dpe (Tabla 3.13). En los triploides se registraron incrementos significativos de la variable a los 26, 48 y 86 dpe en los ejemplares del grupo TC y a los 62 y 113 dpe en los peces del TF (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	19,0 \pm 1,25 ^d	22,6 \pm 1,75 ^f	28,6 \pm 1,51 ^{d,e}
12	32,2 \pm 1,46 ^c	20,5 \pm 1,23 ^f	26,7 \pm 1,16 ^e
19	19,7 \pm 1,70 ^d	24,4 \pm 0,87 ^f	32,3 \pm 1,18 ^{d,e}
26	29,2 \pm 2,57 ^c	41,3 \pm 1,52 ^e	38,3 \pm 2,15 ^{c,d}
33	31,6 \pm 2,10 ^c	44,6 \pm 1,73 ^{d,e}	28,9 \pm 0,80 ^d
48	35,3 \pm 0,93 ^c	48,5 \pm 1,36 ^{c,d}	35,2 \pm 1,86 ^d
62	44,1 \pm 1,61 ^b	53,1 \pm 1,12 ^{b,c}	44,8 \pm 1,43 ^{b,c}
86	52,9 \pm 1,10 ^a	56,4 \pm 1,22 ^{a,b}	48,7 \pm 1,53 ^b
113	48,7 \pm 1,26 ^{a,b}	57,3 \pm 0,97 ^{a,b}	56,8 \pm 1,77 ^a
148	49,9 \pm 1,39 ^{a,b}	59,1 \pm 1,19 ^a	49,6 \pm 1,20 ^b

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al cotejar los grupos entre sí para un mismo día muestral, la variable en el intestino descendente mostró un comportamiento similar al descrito en la región anterior del órgano. Así, a los 5 y 19 dpe fueron los triploides del grupo TF los que presentaron valores significativamente superiores, mientras que a los 12 dpe los valores mayores los exhibieron los peces diploides (Fig. 3.12.B). Posteriormente, desde los 26 dpe y hasta el final del ensayo, los ejemplares triploides del

grupo TC presentaron células mucosas significativamente más grandes que sus hermanos de ambos grupos (Fig. 3.12.B).

En el intestino convoluto, teniendo en cuenta que el mismo se diferencia a partir de los 20 dpe, la variable comenzó a registrarse desde el siguiente día de muestreo en el esquema experimental, es decir, desde los 26 dpe. El tamaño de las células mucosas aumentó significativamente a los 62 dpe en los diploides controles, mostrando una reducción significativa temporal a los 113 dpe (Tabla 3.14). En los peces triploides del grupo TC se observaron aumentos significativos en la variable a los 48 y 148 dpe, mientras que en los triploides del TF el incremento significativo se registró a los 86 y 113 dpe en relación a los días previos de muestreo (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Área media de células mucosas (μm^2) \pm ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	34,68 \pm 1,32 ^{d,e}	33,1 \pm 1,37 ^d	30,2 \pm 2,12 ^d
33	32,23 \pm 1,26 ^{d,e}	33,9 \pm 1,31 ^d	28,3 \pm 2,06 ^d
48	36,41 \pm 1,11 ^d	41,8 \pm 1,50 ^c	36,5 \pm 1,23 ^{c,d}
62	51,1 \pm 1,31 ^a	46,3 \pm 1,37 ^{b,c}	38,4 \pm 1,28 ^c
86	50,26 \pm 1,17 ^{a,b}	50,9 \pm 1,29 ^{a,b}	49,6 \pm 1,41 ^b
113	42,86 \pm 1,60 ^c	51,2 \pm 1,31 ^{a,b}	56,9 \pm 1,23 ^a
148	50,29 \pm 1,25 ^a	53,5 \pm 1,55 ^a	56,9 \pm 1,88 ^a

GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Cuando se comparó el tamaño de las células mucosas entre grupos en la porción convoluta del intestino para un mismo día de muestreo, no se observó un patrón regular. Así, no existieron diferencias significativas entre grupos a los 26 y 86 dpe, mientras que los valores fueron significativamente superiores en TC respecto de GC y TF a los 48 y 113 dpe y a los 33, 48 y 62 dpe, respectivamente (Fig. 3.12.C). Los triploides del grupo TF mostraron medias significativamente mayores a los restantes grupos a los 113 dpe, diferenciándose también de los

diploides controles a los 148 dpe (Fig. 3.12.C). Por otra parte, este último grupo presentó a los 62 dpe células mucosas significativamente más grandes que sus hermanos triploides (Fig. 3.12.C).

3.4.5. Cantidad de células mucosas por mm^2 de mucosa.

La cantidad de células mucosas presentó una gran variabilidad entre individuos lo que se refleja en los elevados valores de los errores estándares calculados para cada grupo y día de muestreos (Tablas 3.15, 3.16, 3.17). Debido a esto, si bien se observó una tendencia al incremento en número en todos los grupos experimentales en el intestino ascendente y descendente a medida que transcurrió el ensayo, existieron pocas diferencias significativas entre muestreos sucesivos.

Tabla 3.15. Número medio de células mucosas $\text{mm}^{-2} \pm \text{ES}$ del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	364 \pm 55,2 ^{c,d}	272 \pm 35,7 ^c	370 \pm 44,5 ^d
12	435 \pm 72,1 ^{c,d}	493 \pm 120,1 ^{b,c}	264 \pm 28,5 ^d
19	316 \pm 55,3 ^d	549 \pm 81,6 ^{b,c}	320 \pm 90,7 ^d
26	410 \pm 60,2 ^{c,d}	378 \pm 57,9 ^{b,c}	344 \pm 48,9 ^d
33	458 \pm 48,3 ^{c,d}	747 \pm 82,5 ^{a,b}	242 \pm 26,8 ^d
48	569 \pm 73,6 ^{b,c,d}	681 \pm 57,8 ^{a,c}	710 \pm 39,4 ^c
62	669 \pm 106,9 ^{b,c}	769 \pm 79,4 ^{a,b}	1171 \pm 115,0 ^{a,b}
86	662 \pm 79,2 ^{b,c}	755 \pm 78,1 ^{a,b}	736 \pm 63,1 ^c
113	493 \pm 52,9 ^c	773 \pm 36,5 ^{a,b}	866 \pm 126,5 ^{b,c}
148	852 \pm 98,8 ^{a,b}	1118 \pm 145,4 ^a	748 \pm 104,0 ^c

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

En el intestino ascendente, los diploides controles presentaron un incremento significativo a los 148 dpe respecto del muestreo previo (Tabla 3.15). Por su parte los triploides del grupo TC no mostraron diferencias significativas entre muestreos sucesivos, mientras que los ejemplares

del TF revelaron un aumento significativo en el número de células mucosas a los 48 y 62 dpe respecto de los días previos de muestreo inmediatos (Tabla 3.15).

Cuando se cotejaron los valores medios entre los distintos grupos experimentales para un mismo día de muestreo, los ejemplares del TC presentaron un número de células mucosas significativamente superior a sus hermanos de los restantes grupos a los 33 dpe, mientras que a los 62 dpe fueron los peces triploides del grupo TF los que evidenciaron una media mayor (Fig. 3.13.A). A los 113 dpe los ejemplares del TF difirieron significativamente del GC pero no respecto a los triploides del grupo TC (Fig. 3.13.A).

A nivel del intestino descendente, en los diploides controles y los triploides del grupo TC se registró un incremento significativo a los 48 dpe, mientras que en los peces triploides del grupo TF se observó un aumento a los 148 dpe (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Número medio de células mucosas $\text{mm}^{-2} \pm \text{ES}$ del intestino descendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	271 \pm 38,5 ^e	381 \pm 77,9 ^b	381 \pm 63,9 ^f
12	281 \pm 29,4 ^e	297 \pm 40,9 ^b	517 \pm 92,0 ^f
19	469 \pm 56,0 ^{d,e}	417 \pm 86,4 ^b	249 \pm 29,4 ^f
26	517 \pm 87,6 ^{c,d,e}	460 \pm 41,8 ^b	412 \pm 63,8 ^f
33	526 \pm 56,8 ^{c,d,e}	563 \pm 67,1 ^b	279 \pm 21,1 ^f
48	1025 \pm 95,0 ^{a,b}	1546 \pm 247,0 ^a	643 \pm 76,4 ^{c,d,e,f}
62	861 \pm 94,3 ^{a,b,c}	1364 \pm 201,4 ^a	1046 \pm 42,8 ^{a,b,c}
86	676 \pm 64,7 ^{a,b,c,d}	1338 \pm 33,3 ^a	657 \pm 62,3 ^{b,c,d,e,f}
113	752 \pm 111,0 ^{a,b,c,d}	1291 \pm 118,2 ^a	889 \pm 117,9 ^{c,d,e}
148	846 \pm 92,4 ^{b,c}	1258 \pm 162,6 ^a	1395 \pm 219 ^a

GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al comparar el número de células mucosas de esta región intestinal entre grupos para cada día de muestreo no se observaron diferencias significativas hasta los 33 dpe inclusive (Fig.

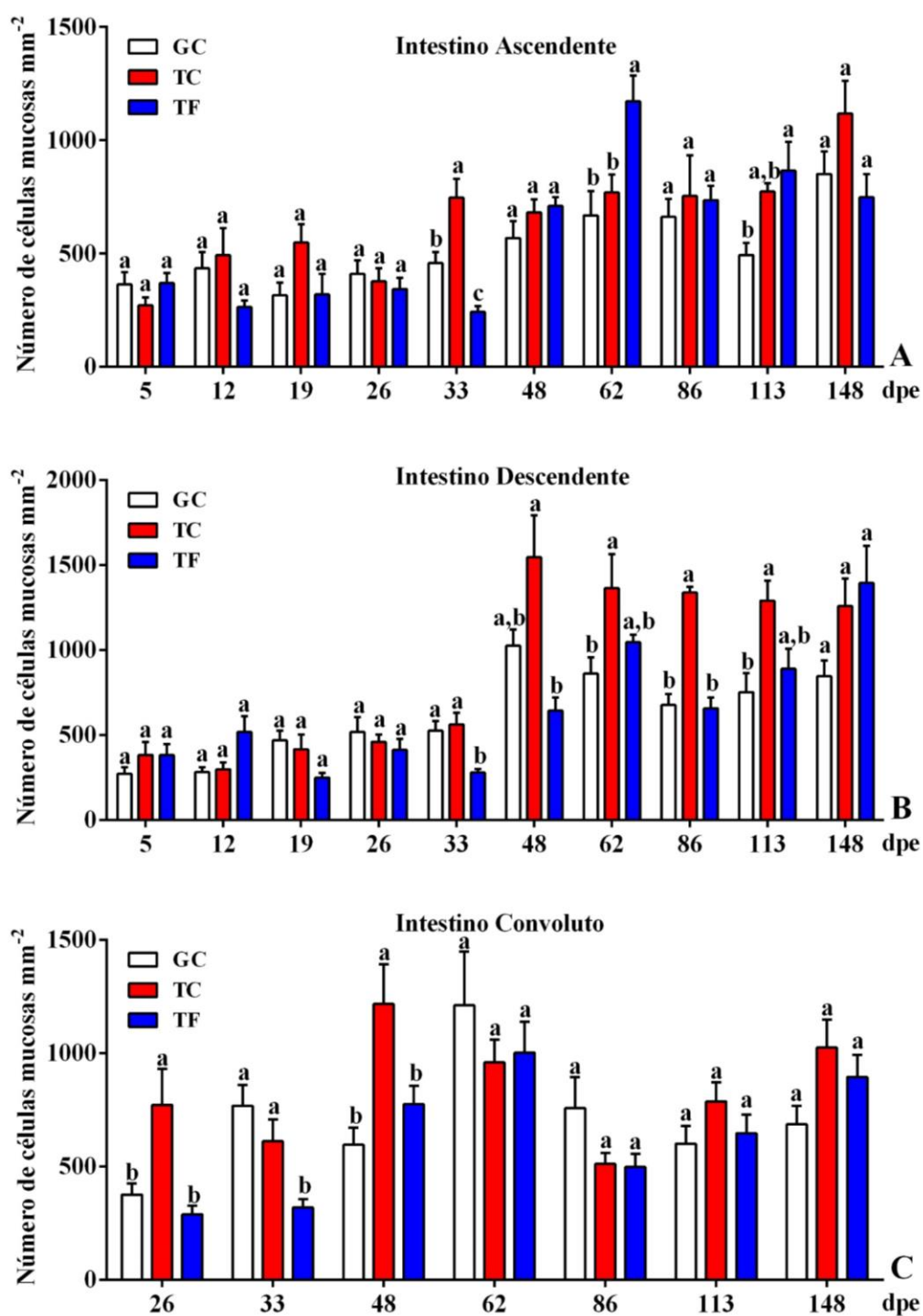


Figura 3.13. Evolución del número de células mucosas en el intestino ascendente (A), descendente (B) y convuelto (C) de *R. quelen* en los distintos grupos experimentales. GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Los valores corresponden a la media \pm ES. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos para un mismo día de muestreo.

3.13.B). Posteriormente, los triploides del grupo TC presentaron mayor cantidad de células mucosas con diferencias significativas respecto de los diploides controles a los 62, 86 y 113 dpe (Fig. 3.13.B). También presentaron valores significativamente superiores en relación a los triploides del TF a los 48 y 86 dpe (Fig. 3.13.B).

Finalmente, en el intestino convoluto el número de células mucosas aumentó significativamente en los ejemplares del grupo GC a los 62 dpe, mientras que en los triploides del grupo TC el incremento se registró a los 48 dpe (Tabla 3.17). Por su parte los peces triploides del grupo experimental TF no mostraron diferencias significativas en los valores de la variable entre muestreos sucesivos (Tabla 3.17).

Tabla 3.17. Número medio de células mucosas mm⁻² ± ES del intestino convoluto para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

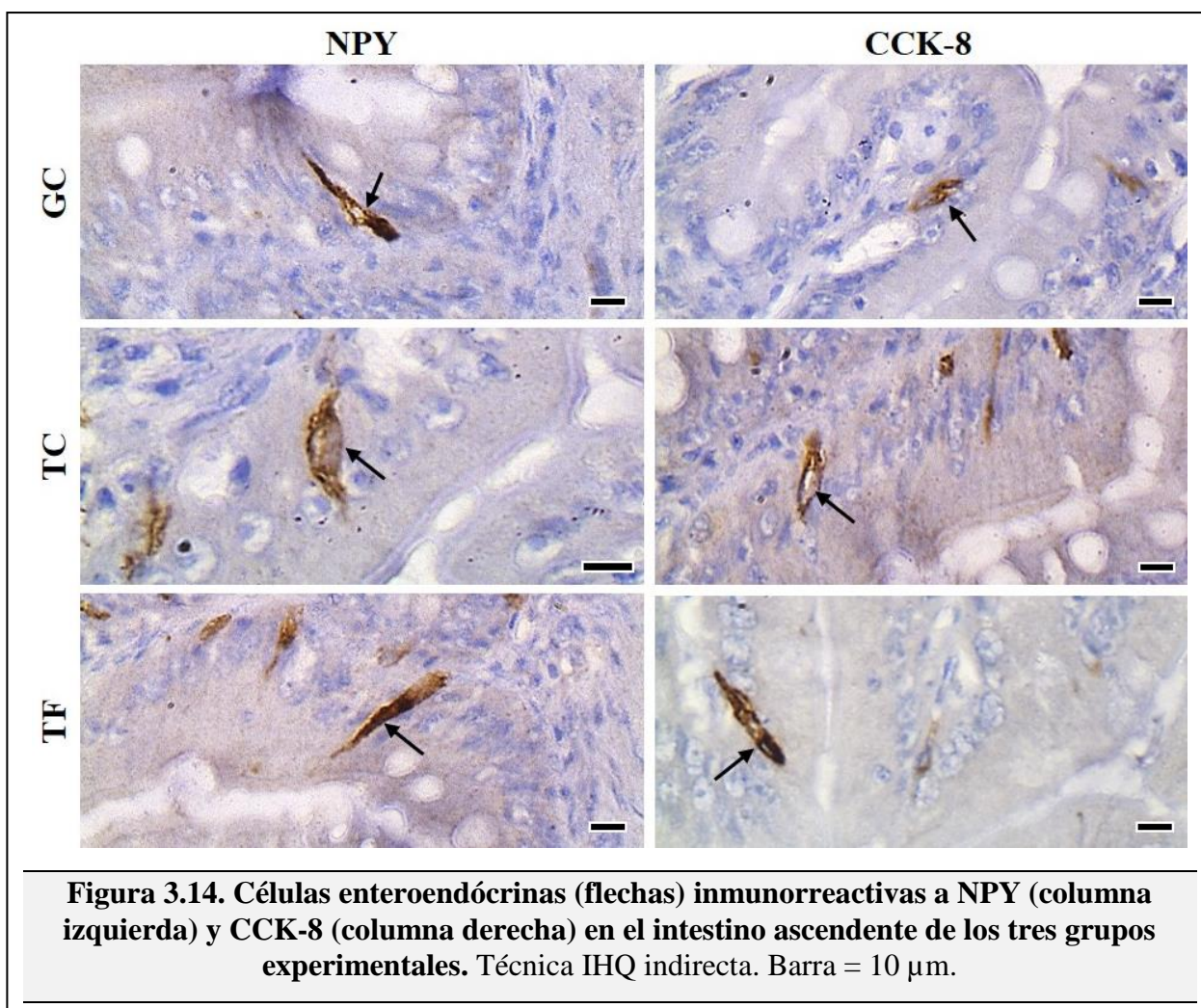
Día \ Grupo	GC	TC	TF
26	376 ± 50,1 ^b	771 ± 160,0 ^{a,b}	289 ± 37,6 ^e
33	768 ± 92,3 ^{a,b}	611 ± 97,3 ^b	319 ± 37,6 ^{d,e}
48	596 ± 76,1 ^b	1217 ± 165,0 ^a	775 ± 80,4 ^{a,b,c}
62	1211 ± 236,7 ^a	960 ± 99,4 ^{a,b}	1002 ± 135,5 ^a
86	757 ± 136,8 ^{a,b}	511 ± 47,7 ^b	498 ± 58,0 ^{c,d,e}
113	600 ± 79,0 ^b	787 ± 83,6 ^{a,b}	647 ± 82,1 ^{b,c,e}
148	687 ± 81,6 ^{a,b}	1024 ± 123,1 ^{a,b}	895 ± 97,3 ^{a,b}

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Cuando se comparó el número de células mucosas en el intestino convoluto entre grupos para un mismo día de muestreo, los ejemplares del grupo TC mostraron valores significativamente superiores a los restantes grupos a los 26 y 48 dpe, mientras que a los 33 dpe tanto los peces del GC como los del TC presentaron valores superiores respecto a sus hermanos del grupo TF (Fig. 3.13.C). No se registraron diferencias significativas entre grupos en los restantes días de muestreo (Fig. 3.13.C).

3.5. Inmunolocalización de neuromoduladores de la ingesta en intestino ascendente.

Las CEEs inmunopositivas a NPY y CCK-8 localizadas en el intestino ascendente mostraron una morfología similar en los distintos grupos experimentales y se caracterizaron por ser alargadas con una porción central ensanchada donde se alojó el núcleo, y disponiéndose con su eje mayor perpendicular a la membrana basal (Fig. 14).



3.5.1. Tamaño de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8.

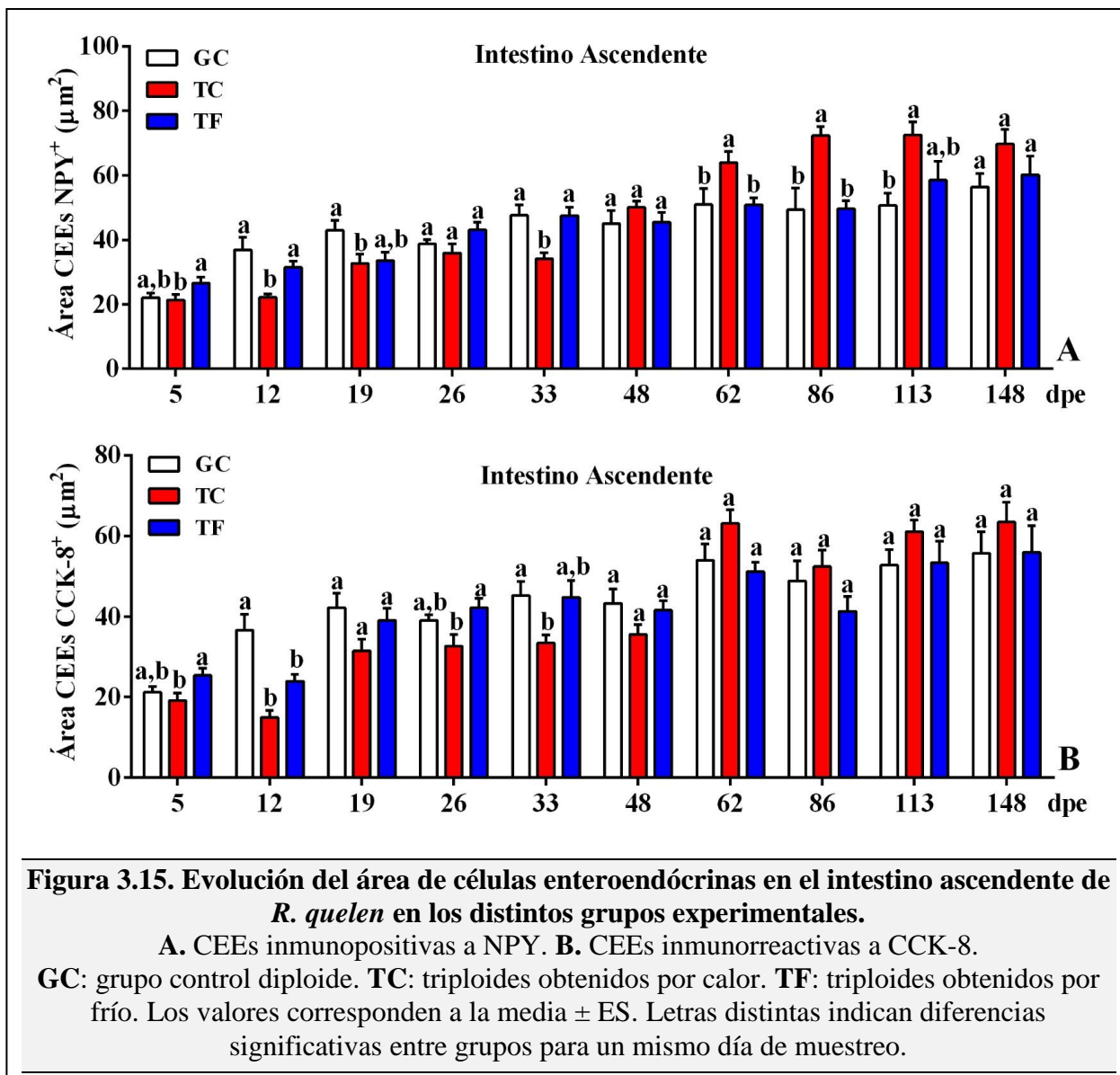
El área celular de las CEEs NPY⁺ presentó en todos los grupos una tendencia al aumento a medida que transcurrió la experiencia en todos los grupos, aunque sin diferencias significativas entre los muestreos sucesivos en los peces del GC y TF, evidenciando incrementos paulatinos en estos grupos (Tabla 3.18). Por otra parte, en los ejemplares triploides del TC se registró un incremento significativo a los 48 y 62 dpe respecto a los muestreos anteriores inmediatos (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Área media de CEEs inmunorreactivas a NPY (μm^2) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	22,0 \pm 3,97 ^c	20,2 \pm 1,50 ^e	26,5 \pm 1,81 ^e
12	36,8 \pm 3,97 ^{b,c}	22,2 \pm 1,03 ^{d,e}	31,5 \pm 1,83 ^{d,e}
19	42,9 \pm 3,08 ^{a,b}	32,6 \pm 2,90 ^{c,d,e}	33,5 \pm 2,62 ^{c,d,e}
26	38,7 \pm 1,40 ^{b,c}	35,9 \pm 2,82 ^c	43,1 \pm 2,35 ^{b,c,d,e}
33	47,6 \pm 3,25 ^{a,b}	34,1 \pm 1,82 ^{c,d}	47,4 \pm 2,69 ^{a,b,c,d}
48	44,9 \pm 4,03 ^{a,b}	50,07 \pm 1,98 ^b	45,4 \pm 2,98 ^{a,b,c,d}
62	50,9 \pm 4,88 ^{a,b}	63,9 \pm 3,40 ^a	50,8 \pm 2,20 ^{a,b}
86	49,2 \pm 6,69 ^{a,b}	72,3 \pm 2,80 ^a	49,6 \pm 2,55 ^{a,b,c}
113	50,6 \pm 3,77 ^{a,b}	72,5 \pm 3,96 ^a	58,5 \pm 5,87 ^{a,b}
148	56,3 \pm 4,23 ^a	69,7 \pm 4,54 ^a	60,1 \pm 5,90 ^a

GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Comparando esta variable entre grupos para un mismo muestreo, se observó que hasta los 33 dpe los triploides del TC presentaron CEEs NPY⁺ de menor tamaño que sus hermanos con diferencias significativas a los 5, 12 y 33 dpe (Fig. 3.15.A). Sin embargo, a partir de los 62 y hasta los 113 dpe inclusive los triploides del TC exhibieron valores medios de la variable significativamente superior a los de los restantes grupos (Fig. 3.15.A).



El área de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 presentó un comportamiento similar a lo descrito para NPY a lo largo del ensayo para los ejemplares del GC y TF, aunque en el primer grupo se evidenció un incremento significativo en la variable a los 12 dpe (Tabla 3.19). En el caso de los triploides del TC, las CEEs CCK-8⁺ aumentaron su tamaño de manera significativa entre muestreos sucesivos a los 19 y 62 dpe (Tabla 3.19).

Tabla 3.19. Área media de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 (μm^2) \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	21,2 \pm 1,39 ^c	19,2 \pm 1,74 ^c	25,3 \pm 1,81 ^b
12	36,6 \pm 3,91 ^b	14,9 \pm 1,74 ^c	23,9 \pm 1,62 ^{b,c}
19	42,2 \pm 3,50 ^{a,b}	31,4 \pm 2,88 ^b	39,7 \pm 2,98 ^{a,b}
26	39,0 \pm 1,38 ^{a,b}	32,6 \pm 2,85 ^b	42,1 \pm 2,36 ^{a,b}
33	45,2 \pm 3,52 ^{a,b}	33,4 \pm 2,06 ^b	44,7 \pm 4,19 ^a
48	43,2 \pm 3,61 ^{a,b}	35,5 \pm 2,36 ^b	41,5 \pm 2,36 ^{a,c}
62	53,9 \pm 4,04 ^{a,b}	57,7 \pm 2,17 ^a	51,1 \pm 2,34 ^a
86	48,7 \pm 4,97 ^{a,b}	87,4 \pm 34,75 ^a	41,3 \pm 3,66 ^{a,b}
113	52,7 \pm 3,90 ^{a,b}	60,9 \pm 2,96 ^a	53,2 \pm 5,37 ^a
148	55,6 \pm 5,35 ^a	63,4 \pm 4,90 ^a	55,9 \pm 6,64 ^a

GC: grupo control diploide. **TC:** triploides obtenidos por calor. **TF:** triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Al cotejar el tamaño de las CEEs CCK-8⁺ entre grupos para un mismo día de muestreo se observó, de manera similar a lo descrito para NPY, que hasta los 33 dpe los triploides del TC presentaron células de menor tamaño en comparación con alguno de los restantes grupos con diferencias significativas a los 5, 12, 26 y 33 dpe (Fig. 3.15.B). Sin embargo, en contraste a lo mencionado para NPY, si bien desde los 62 dpe se incrementó el tamaño de las células en los triploides del grupo TC, estas diferencias no fueron significativas (Fig. 3.15.B).

3.5.2. Número de CEEs inmunorreactivas a NPY y CCK-8.

La cantidad CEEs NPY⁺ no presentó diferencias significativas entre muestreos sucesivos en ninguno de los grupos experimentales a lo largo de todo el ensayo (Tabla 3.20).

De la misma manera, tampoco se observaron diferencias significativas en el número de CEEs inmunopositivas a NPY entre grupos para un mismo día de muestro (Fig. 3.16.A)

Tabla 3.20. Número medio de CEEs inmunorreactivas a NPY \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	236 \pm 32,3 ^a	213 \pm 21,1 ^a	221 \pm 25,6 ^b
12	252 \pm 37,3 ^a	250 \pm 38,2 ^a	173 \pm 23,7 ^b
19	366 \pm 48,8 ^a	293 \pm 59,8 ^a	250 \pm 42,3 ^{a,b}
26	308 \pm 64,9 ^a	303 \pm 36,9 ^a	188 \pm 24,7 ^{a,b}
33	258 \pm 28,9 ^a	201 \pm 30,3 ^a	186 \pm 26,6 ^{a,b}
48	209 \pm 22,3 ^a	218 \pm 30,9 ^a	199 \pm 24,9 ^{a,b}
62	227 \pm 60,2 ^a	281 \pm 25,6 ^a	156 \pm 17,1 ^b
86	231 \pm 51,3 ^a	201 \pm 26,5 ^a	172 \pm 21,8 ^b
113	183 \pm 19,1 ^a	212 \pm 36,4 ^a	181 \pm 28,5 ^{a,b}
148	185 \pm 27,9 ^a	208 \pm 20,7 ^a	316 \pm 51,3 ^a

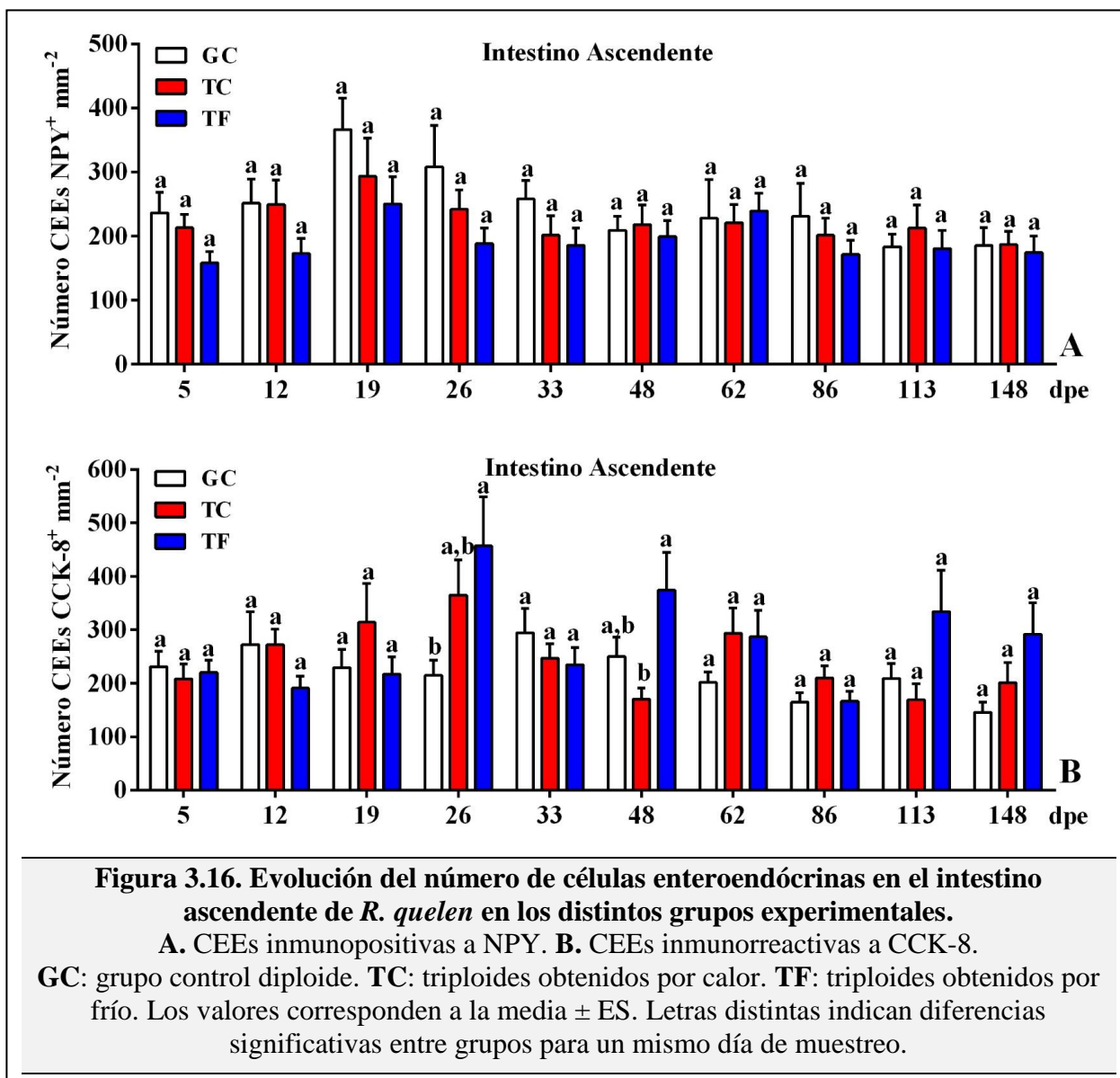
GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.

Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas en la cantidad de CEEs CCK-8⁺ a lo largo del ensayo (Tabla 3.21).

Tabla 3.21. Número medio de CEEs inmunorreactivas a CCK-8 \pm ES del intestino ascendente para cada día de muestreo en los distintos grupos experimentales.

Día \ Grupo	GC	TC	TF
5	231 \pm 29,0 ^a	208 \pm 28,5 ^a	219 \pm 23,3 ^a
12	273 \pm 61,9 ^a	272 \pm 29,4 ^a	191 \pm 21,9 ^a
19	229 \pm 34,0 ^a	314 \pm 72,6 ^a	217 \pm 32,3 ^a
26	215 \pm 27,8 ^a	365 \pm 65,6 ^a	457 \pm 91,1 ^a
33	294 \pm 45,5 ^a	247 \pm 27,2 ^a	234 \pm 32,7 ^a
48	249 \pm 36,2 ^a	170 \pm 20,9 ^a	374 \pm 70,5 ^a
62	202 \pm 19,5 ^a	294 \pm 47,1 ^a	287 \pm 49,5 ^a
86	165 \pm 17,7 ^a	209 \pm 22,6 ^a	167 \pm 58,5 ^a
113	209 \pm 27,8 ^a	169 \pm 30,3 ^a	334 \pm 76,9 ^a
148	146 \pm 18,9 ^a	201 \pm 38,3 ^a	292 \pm 58,8 ^a

GC: grupo control diploide. TC: triploides obtenidos por calor. TF: triploides obtenidos por frío. Letras diferentes indican diferencias significativas a lo largo del ensayo en un mismo grupo experimental.



Cuando se comparó el número de CEEs CCK-8⁺ entre grupos para cada día de muestreo, se observó que los triploides del grupo TF presentaron valores significativamente superiores a los diploides controles y a los triploides del TC a los 26 y 48 dpe, respectivamente (Fig. 3.16.B).

4. DISCUSIÓN

4.1. Anatomía e histología encefálica.

Entre las particularidades anatómicas que pudimos describir en el encéfalo de *R. quelen*, la ubicación del bulbo olfatorio es una característica a destacar. Este último posee diferentes localizaciones en distintas especies. Así, en trucha arcoíris (*O. mykiss*) se ubica inmediatamente por debajo del telencéfalo (Zielinski y Hara, 1988), al igual que en pez cebra (*Danio rerio*) (Byrd y Brunjes, 1995) y anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Giorgi *et al.*, 1994). Otras especies como el *goldfish* (*C. auratus*) presentan un corto tracto olfatorio (Von Bartheld *et al.*, 1984). Por otra parte, al igual que en *R. quelen*, otros siluriformes como el bagre del canal (*I. punctatus*) exhiben su bulbo olfatorio separado del encéfalo por un tracto olfatorio prolongado (Bass, 1981).

El bulbo olfatorio es una estructura de vital importancia en los peces. Varios autores le atribuyen tres funciones principales vinculadas con la alimentación, la reproducción y los mecanismos antipredatorios de alarma (Byrd y Brunjes, 1995; Hamdani y Døving, 2007; Laberge y Hara, 2001; Zielinski y Hara, 1988). Estos tres mecanismos impactarían en regiones diferentes del encéfalo y estas funciones son llevadas a cabo por tres tipos neuronales específicos, las neuronas sensoriales ciliadas, las cuales poseen dendritas largas y cilias apicales, las neuronas sensoriales con microvellosidades, cuya dendrita es de menor longitud que las ciliadas y las células en cripta que poseen cilias y microvellosidades. (Hamdani y Døving, 2007). En cuanto a las diferencias en el tracto olfatorio, los silúridos se caracterizan por poseer largos tractos olfatorios en comparación con otras especies.

Otra región anatómica que presentó grandes diferencias en comparación con otros teleósteos fue el cerebelo. En *R. quelen*, mostró un gran desarrollo, alcanzando a través su vértice al telencéfalo inmediatamente por craneal del *tectum* óptico. En trucha arcoíris, contrariamente a lo observado en *R. quelen*, el cerebelo presenta una dirección caudal con una curvatura que hace que el vértice de este último apoye sobre la médula oblonga (Reid y Westerman, 1975). En *C. auratus* posee una forma redondeada y menor tamaño en comparación con el cerebelo de *R. quelen*, por lo cual no se proyecta sobre otras estructuras encefálicas (Duran *et al.*, 2014). Por el contrario, el gran desarrollo observado en el cerebelo de *R. quelen* parece ser una constante en

siluriformes ya que en otras especies como *I. punctatus* y *C. gariepinus*, el cerebelo también se proyecta cranealmente (Finger, 1978).

En cuanto a la estructura histológica del telencéfalo e hipotálamo, si bien se observan características generales similares a las descritas en otros teleósteos, con las técnicas histológicas de rutina empleadas no fue posible identificar la totalidad de los núcleos por lo cual pueden aparecer diferencias en lo observado en otras especies. Así, en el telencéfalo de *Betta splendens* (Magalhães Horn y Rasia-Filho, 2018) se describen mayor cantidad de subdivisiones del *pallium*, siendo el *subpallium* similar a lo observado en *R. quelen*. Otro ejemplo es lo observado en *Aphyocharax anisitsi* (Obando-bulla *et al.*, 2013) donde en el *subpallium* se describe una subdivisión del núcleo entopeduncular, algo que en *R. quelen* no se pudo observar. En el caso de *Dicentrarchus labrax*, Cerda-Reverter *et al.* (2001) describen una población celular periventricular homóloga a un núcleo descrito en las aves, lo cual no fue observado en *R. quelen* ni descrito por los autores previamente citados. A nivel hipotalámico, los núcleos observados y descritos en *R. quelen* coinciden con lo descrito en otras especies como *Haplochromis burtoni* y *A. anisitsi* (Fernald y Shelton, 1985; Obando-bulla *et al.*, 2013).

4.2. Expresión de neuropéptidos reguladores de la ingesta a nivel encefálico.

Como se estableció previamente, NPY es un péptido con una extensa distribución en el SNC de peces, al igual que en anfibios y mamíferos y fue descrito en todas las regiones encefálicas a excepción del cerebelo (Allen *et al.*, 1983; Danger *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 2000; Andrea Pirone *et al.*, 2004).

Respecto a las regiones estudiadas en este trabajo, Kah *et al.* (1989) describieron en *C. auratus* inmunopositividad celular en las regiones telencefálicas correspondientes a la región ventral y en el núcleo entopeduncular, como así también observaron un débil marcaje alrededor de la comisura. Estos autores destacan la diferencia notoria observada en la expresión diferencial de este péptido entre el *pallium* dorsal y el *subpallium*, donde en el primero se observa un gran marcaje fibrilar y en el segundo solamente en algunos somas neuronales reactivos. En trucha arcoíris, se describieron fibras inmunorreactivas en el telencéfalo dorsal, mientras que la región

ventral e hipotalámica se observaron células y fibras positivas, siendo las regiones del núcleo entopeduncular y el órgano paraventricular las que mayor marcaje inmunohistoquímico presentaron para cada región (Danger *et al.*, 1991). A su vez, en *Sparus aurata* se observaron gran cantidad de fibras inmunoreactivas en el *pallium* y *subpallium* siendo en este último la región donde se observó marcaje somático principalmente en el núcleo ventrolateral (Pirone *et al.*, 2008). Estos resultados son semejantes a los observados en nuestro trabajo, donde la región del telencéfalo dorsal presentó marcaje fibrilar mientras que el *subpallium* evidenció reacción en somas neuronales, coincidiendo las regiones con inmunopositividad con lo descrito por Danger *et al.* (1991), pero difiriendo con Pirone *et al.* (2008) quien describa mayor inmunopositividad en el núcleo ventrolateral. Cabe destacar además que en mamíferos y en anfibios, estas observaciones son coincidentes con las descritas en *R. quelen* (Allen *et al.*, 1983; Danger *et al.*, 1985).

Las regiones inmunopositivas observadas en hipotálamo coinciden tanto en *goldfish* como en trucha, y también con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, siendo el núcleo preóptico y el núcleo periventricular las regiones con mayor positividad celular.

La existencia de regiones con mayor presencia de fibras y otras con mayor presencia de somas da la pauta de que NPY actúa interconectando regiones que poseen una importante participación en la ingesta de alimentos, lo cual coincide con lo expuesto por Danger *et al.* (1991). Estos autores plantean que la participación de NPY en la fisiología neuronal excede su rol en la modulación de la ingesta ya que además estaría relacionado con la producción de gonadotrofinas, melanotrofinas y hormona del crecimiento (Danger *et al.*, 1991).

Estos resultados coinciden con lo observado en mamíferos, donde las regiones inmunorreactivas se asemejan a las observadas en peces, por lo cual se puede suponer que desarrollan funciones semejantes (Bi *et al.*, 2001; Gray y Morley, 1986). Evolutivamente, este es un péptido altamente conservado, tanto en su estructura como en su localización encefálica a nivel inter e intraespecies (Blomqvist *et al.*, 1992; Larhammar, 1996).

Por otra parte, como se ha indicado previamente, CCK-8 es un péptido con funciones anorexigénicas ampliamente conocidas y demostradas por diferentes autores (Le Bail y Rœuf, 1997; Lin *et al.*, 2000; Volkoff *et al.*, 2005). En *C. auratus*, se describió la presencia de fibras

CCK-8 inmunorreactivas en el telencéfalo dorsal e inmunopositividad fibrilar y nuclear en el telencéfalo ventral (Himick y Peter, 1994). Estos resultados fueron coincidentes con la distribución telencefálica reportada en nuestro trabajo, así como en *Poecilia latipinna* donde en las partes lateral y central del área dorsal se observó mayor concentración fibrilar, mientras que en el área ventral se expresó en núcleos y células inmunopositivas (Batten *et al.*, 1990).

En el caso del hipotálamo, tanto en *C. auratus* como en *P. latipinna*, se observaron las mismas regiones inmunorreactivas, siendo el núcleo anterior tuberal y el periventricular las regiones con mayor concentración de células positivas (Batten *et al.*, 1990; Himick y Peter, 1994). En los núcleos lateral tuberal y anterior tuberal, se observó reacción fibrilar. Estos resultados también son coincidentes con los observados en *R. quelen*, lo que demuestra que estos sistemas de regulación se encuentran ampliamente conservados filogenéticamente.

La distribución encefálica de CCK-8 es similar a la observada en NPY, lo que confirmaría la coparticipación de ambos péptidos en su función como reguladores de la ingesta en *R. quelen*.

4.3. Efectos de la ontogenia y la triploidización en el tamaño y número de neuronas hipotalámicas.

El desarrollo neuronal ontogénico de los peces es la consecuencia de un complejo desarrollo embrionario previo caracterizado por una fase de inducción y formación de células progenitoras y posteriormente una diferenciación neuronal regidos por factores intrínsecos y extrínsecos (Schmidt *et al.*, 2013; Spemann y Mangold, 2001). En los últimos años, el conocimiento de la neurogénesis ha adquirido una relevancia fundamental como consecuencia del descubrimiento de la capacidad neurogénica en animales adultos, adquiriendo los peces un lugar de predilección por sus características favorables como modelos de estudio (Appel y Chitnis, 2002; Lindsey *et al.*, 2012; Marz *et al.*, 2011). A grandes rasgos podemos afirmar que las primeras formaciones neuronales se dan durante el desarrollo del tubo neural, una vez formado este, se visualizan conjuntos celulares asimétricos a lo largo del mismo. En esta división se

observa que el grupo celular de disposición apical serán las futuras neuronas y el grupo celular dispuesto en ventral serán progenitoras (Schmidt *et al.*, 2013).

Partiendo de lo antes expuesto, vemos que en el caso del telencéfalo de teleósteos y a diferencia de los mamíferos, la formación del telencéfalo se da por eversión a partir del tubo neural, por lo cual los grupos celulares con capacidad proliferativa se encuentran no solo internamente sino también en las regiones más externas del telencéfalo (Wullimann y Mueller, 2004). Así las regiones con mayores concentraciones celulares en el telencéfalo son las regiones periventriculares en el *subpallium* y los núcleos dorsomedial y dorsocentral en el *pallium* (Garcia-Verdugo *et al.*, 2002). En el caso de *R. quelen*, estas regiones fueron las que mayor celularidad presentaron, mientras que en las demás regiones la celularidad fue más escasa y fue aumentando acorde avanzaron los días de muestreo. Esto coincide con lo descrito en otros teleósteos como zebrafish y pejerrey (Schmidt *et al.*, 2013; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2010).

En el caso del diencefalo, este actúa como centro primario de desarrollo neuronal, durante la fase de formación del tubo neural. El tálamo actúa como centro regulador de la neurogénesis, siendo éste un cluster neuronal a partir del cual se va a dar un desarrollo de las neuronas diencefálicas en una dirección posteroanterior. A diferencia del telencéfalo, la neurogénesis en el diencefalo ocurre en el periodo embrionario (Bayer y Altman, 1987; Scholpp *et al.*, 2009; Scholpp y Lumsden, 2010). Esto en el caso de *R. quelen*, se pudo comprobar por la identificación de la totalidad de los núcleos bien definidos a partir los 5 dpe.

A la fecha no existen trabajos realizados en peces triploides que permitan comparar nuestros resultados con otras especies, por lo cual los resultados observados en este trabajo servirán de sustento para futuros abordajes del desarrollo neuronal en peces triploides.

En lo que respecta a la hipertrofia celular dentro del sistema nervioso como consecuencia de la triploidización, esta fue descrita por varios autores y, dependiendo la zona estudiada, se observaron diferentes tipos de comportamientos. Por ejemplo en ayu (*P. altivelis*), Aliah *et al.* (1990) describieron una disminución en la cantidad de células retinales con una consecuente disminución en la visión. En *S. salar*, Fraser *et al.* (2012) describen un bulbo olfatorio de menor tamaño comparado con los peces diploides, sin mencionar el tamaño de las células que lo

componen. En *B. splendens*, la triploidía generó una disminución en los comportamientos agresivos, no obstante, esto fue atribuido a la ausencia de una conducta reproductiva debido a la esterilidad provocada por la triploidización y no como consecuencia de un menor número de neuronas (Kavumpurath y Pandian, 1992).

Como consecuencia de la triploidía, nuestro grupo de investigación observó que los peces obtenidos mediante inducción por calor presentaban una tasa de canibalismo más baja, comparados con los triploides obtenidos por frío y el grupo control (Morón Alcaín *et al.*, 2017). Algunos estudios sugieren que la reducción en el comportamiento de canibalismo está relacionada a una reducción en el número de neuronas (Fraser *et al.*, 2012; Fukushima *et al.*, 2012; Maxime, 2008; Tiwary *et al.*, 2004). Este hecho relevante se podría relacionar con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde los individuos triploides presentaron un número significativamente menor de neuronas en el hipotálamo, principal centro de integración de información y respuestas comportamentales (Jobling, 2012). De este modo podríamos inferir que la menor tasa de canibalismo observada en los individuos triploides inducidos por calor sería la consecuencia de una menor cantidad de neuronas.

4.4. Efectos de la ontogenia y la triploidización en las variables morfométricas intestinales.

Las modificaciones en variables morfométricas intestinales a nivel histológico han sido documentadas principalmente en las respuestas adaptativas a cambios en la dieta (Dueñas Gibson, 2017; García de la Banda, 2013). Dueñas Gibson (2017) demostró en tilapia roja (*Oreochromis sp.*) que la longitud de las vellosidades aumenta ante el agregado de probióticos y/o prebióticos a una dieta comercial. Resultados similares se observaron en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) alimentados con dietas suplementadas con probióticos (García de la Banda, 2013). En *R. quelen*, Hernández *et al.* (2012) demostró en larvas alimentadas con harina de soja que el crecimiento de los ejemplares se veía afectado negativamente por la adición de este componente en la dieta, observándose modificaciones en variables morfométricas analizadas principalmente en intestino posterior. Estos autores observaron, entre los cambios morfométricos, una disminución tanto del tamaño de enterocito como del espesor de las vellosidades, pero sin

estar afectada la longitud de esta última. Esto se contrapone a lo registrado en nuestro estudio donde se observó un incremento de esta variable en el intestino ascendente en todos los grupos experimentales a los 48 dpe, momento en que los peces presentaron una semana de adaptación a la alimentación exclusiva con ración balanceada. Además, los ejemplares de los grupos triploides exhibieron en ese mismo momento aumentos significativos de la longitud de las vellosidades de las porciones descendente y convoluta del intestino. Sin embargo, como con posterioridad a estos aumentos se registraron nuevos incrementos de la variable en todos los grupos y en todas las regiones a medida que transcurrió el tiempo de muestreo, es posible que los cambios estén asociados principalmente con la mayor demanda energética que ocurre durante el desarrollo muscular.

El análisis del efecto de la ploidía en la longitud de las vellosidades en *R. quelen*, si bien presentó algunas variaciones puntuales en ciertos días de muestreo para cada región del intestino, demostró que los individuos triploides presentaron en general vellosidades más largas que sus hermanos diploides. Esto se contrapone a lo descrito por Ulleberg (2017) en *S. salar* donde no se presentaron diferencias en los valores de la variable entre hermanos diploides y triploides. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo determinaron que tanto los triploides de *R. quelen* obtenidos por choques térmicos de frío o calor presentaron pesos medios significativamente superiores a los diploides controles (Morón Alcain *et al.*, 2017). Así, un mayor tamaño corporal requeriría una mayor cantidad de energía para el crecimiento y, por ende, la presencia de vellosidades más largas en los triploides en todos los tramos intestinales podría aumentar la absorción ante una mayor demanda de nutrientes requeridos para el crecimiento diferencial. Estudios realizados en triploides de salmón del Atlántico (*S. salar*) y bacalao (*G. morhua*) determinaron que estos peces presentaron a nivel macroscópico un intestino relativamente más corto y menor número de ciegos pilóricos en comparación con sus hermanos diploides (Peruzzi *et al.*, 2013; 2015). Si bien los parámetros analizados en ambos estudios se han realizado en distintos niveles de organización estructural, estos resultados se contraponen a los registrados en *R. quelen*.

Respecto al espesor de las vellosidades, Ulleberg (2017) observó al comienzo de la alimentación vellosidades más gruesas en triploides en intestino distal. Sin embargo, a medida

que se avanzó en los días de muestreo hasta llegar a los 147 dpe no se observaron diferencias significativas de esta variable entre diploides y triploides (Ulleberg, 2017). En nuestro trabajo no se pudo analizar esta variable hasta los 26 dpe debido al escaso desarrollo de las vellosidades, aunque posteriormente los triploides de ambos grupos presentaron en general vellosidades más gruesas que sus hermanos diploides en las porciones más distales del intestino como las porciones descendente y convoluta, lo cual estuvo influenciado por el aumento simultáneo de la altura del enterocito. Por otra parte, en el intestino ascendente esta relación se invirtió ya que fueron los peces diploides quienes exhibieron mayor espesor en sus vellosidades.

Varios estudios han confirmado que, como consecuencia de la triploidía, se produce un aumento de tamaño nuclear con el consecuente aumento del tamaño celular (Burke *et al.*, 2010; Goo *et al.*, 2015; Tiwary *et al.*, 2004). En *Oryzias dancena*, Goo *et al.* (2015), demostraron que las células del epitelio intestinal poseen un tamaño dos veces mayor que en los diploides. En otras especies de catfish, como *Silurus asotus*, se describieron las mismas modificaciones en el tamaño celular con respecto a los diploides, no obstante, estos autores no atribuyen una mejor absorción intestinal como consecuencia de un mayor tamaño celular (Gil *et al.*, 2017) sino que el aumento celular compensa la disminución en la cantidad de células sin aumentar la absorción. En *R. quelen*, las tres porciones del intestino aumentaron a partir del 48 dpe tanto para el grupo control como para ambos tratados, lo cual está asociado al cambio de dieta, al igual que para la longitud de la vellosidad, y que coincide con las modificaciones observadas en otras especies en las que las dietas fueron suplementadas con pro y prebióticos (Cornejo, 2017; García de la Banda, 2013). Respecto a los grupos tratados, la mayor altura observada en los enterocitos parecería contraponerse a la necesidad de una mayor absorción de nutrientes ya que el aumento de la altura del enterocito implica un aumento de la distancia de difusión de las moléculas. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de los transportadores de membrana para moléculas no liposolubles son saturables y por ende se requiere mayor superficie de membrana para lograr una mayor eficiencia del proceso (Conde-Sieira y Soengas, 2017), serán necesarios futuros estudios ultraestructurales que permitan confirmar esta hipótesis.

Las células mucosas están presentes en los epitelios de diferentes órganos de los peces, llevando a cabo diversas funciones (Shephard, 2015). En el TGI, estas células tienen diferentes

tipos de acciones según la porción donde se encuentren (Hur *et al.*, 2016; Specian y Oliver, 1991). De este modo, podemos encontrar una función protectora, de transporte de nutrientes, lubricación y digestiva (Bucke, 1971; Khojasteh, 2012). En muchos casos esta función va a depender de la ubicación de las células y, de las características digestivas de la especie. En peces carentes de estómago, como *Arrhamphus sclerolepis krefftii*, se determinó que la secreción de las células mucosas tiene una importante participación en la retención de los nutrientes, así como en la digestión por parte de las mucinas producidas a nivel esofágico y entérico (Tibbetts, 2005). En aquellos gástricos, como *Engraulis anchoíta*, se demostró que la superficie del estómago sintetiza y secreta mucinas ácidas con posibles funciones de movimiento de fluidos y neutras, posiblemente implicadas en la absorción de sustratos fácilmente digeribles (Díaz *et al.*, 2003). Ejemplo de la multifuncionalidad y complejidad de los glicoconjugados de las células mucosas es lo descrito en *Corydoras paleatus* donde las células mucosas de la porción posterior del intestino participarían en el intercambio gaseoso y por ello poseen un alto nivel de complejidad histoquímica (Plaul *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Ostaszewska (2005) en larvas de *Sander lucioperca*, comprobó que a los 20 dpe la cantidad de mucinas era mayor en intestino posterior que en intestino anterior. Resultados similares se observaron en estudios sobre larvas de *Pleuronectes ferruginea* (Baglolle *et al.*, 1998), *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang *et al.*, 2010) y *R. quelen* (Hernández, 2010). En nuestro trabajo, observamos que a partir de los 48 dpe, tanto la cantidad como el área de células mucosas, aumentó de manera significativa en todos los grupos. Teniendo en cuenta que a esta edad los ejemplares presentaron una semana de adaptación a la ración balanceada seca exclusiva, las modificaciones en las variables analizadas podrían relacionarse con la composición de la dieta. Resulta interesante estudiar a futuro si estos cambios morfométricos están acompañados de cambios en la composición de glicoconjugados producidos por las células mucosas.

Respecto a las diferencias en el número de células mucosas entre triploides y diploides, si bien no fue una generalidad a lo largo del ensayo, cuando se encontraron diferencias significativas entre grupos fueron los triploides del TC o del TF los que presentaron un mayor número de células mucosas en comparación con sus hermanos diploides en las tres porciones del

intestino. Esto se contrapone a lo reportado en *S. salar*, donde la cantidad de células mucosas fue significativamente mayor en los diploides respecto de los triploides (Ulleberg, 2017). Cuando se analizaron las diferencias en el tamaño de las células mucosas entre grupos en *R. quelen*, se determinó que en intestino ascendente y descendente los triploides del TC presentaron células más grandes que sus congéneres. Según Tiwary *et al.* (2004), la reducción en la cantidad de células como consecuencia del aumento de su tamaño en individuos triploides, es consecuencia de que no hay modificaciones morfológicas macroscópicas en el órgano. En este sentido, en un órgano de tamaño constante, el número de células de mayor tamaño será menor. Por ello, para confirmar esta hipótesis será necesario realizar estudios que determinen si el aumento en número y tamaño de las células están relacionados con aumentos del intestino en *R. quelen*.

4.5. Efectos de la ontogenia y la triploidización en el tamaño y número de CEEs inmunorreactivas a neuromoduladores de la ingesta a nivel intestinal.

El neuropéptido Y es un péptido distribuido en peces principalmente en SNC y TGI (Silverstein y Plisetskaya, 2000). Esta molécula participa en la estimulación de la ingesta de alimento como un potente factor orexigénico, que fue demostrado con un aumento en la toma de alimentos luego de la aplicación de inyecciones intracerebrales de NPY (Silverstein y Plisetskaya, 2000), o con un aumento en su expresión génica luego de someter a los individuos a un periodo de ayuno (Silverstein *et al.*, 1998).

Por el contrario, CCK-8 es un péptido anorexigénico que regula la ingesta de alimento mediante la emisión de señales de saciedad periférica (Jensen *et al.*, 2001). Así, en *C. auratus* la administración exógena de CCK-8 induce una disminución en la toma de alimento (Volkoff *et al.*, 2005). Este péptido también ha sido descrito por diferentes autores tanto en distintas porciones del encéfalo como del TGI (Bjening y Holmgren, 1988; Himick y Peter, 1994).

En TGI, se demostró la presencia de NPY a través del marcaje mediante técnicas inmunohistoquímicas en esófago e intestino de *Pseudophoxinus antalyae* (Cinar *et al.*, 2006). Domeneghini *et al.* (1999) también demostraron inmunopositividad a este péptido en esófago de *Acipenser transmontanus*, no obstante, en este caso fue observada en terminales nerviosas que se

encontraban en contacto con las fibras musculares estriadas del esófago. Por otra parte, distintos estudios demostraron la presencia de CCK-8 en intestino de teleósteos tanto de agua dulce como marinos (Bermúdez *et al.*, 2007; Holmgren *et al.*, 1982; Pan *et al.*, 2000a, 2000b).

Nuestro grupo de trabajo identificó CEEs NPY⁺ y CCK-8⁺ en el intestino de varias especies de teleósteos exóticas como *Oreochromis niloticus* (Pereira *et al.*, 2017), y nativas como *Odontesthes bonariensis* (Vigliano *et al.*, 2011), *Salminus brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2014) y *R. quelen* (Hernández *et al.*, 2012). En juveniles de esta especie se observó mayor abundancia de CEEs inmunorreactivas a ambos neuropéptidos en el intestino ascendente. De la misma manera, en el presente trabajo fue en esa región intestinal donde se registró un número considerable de CEEs que permitió evaluar los efectos de la ontogenia y el nivel de ploidía.

En relación al desarrollo ontogénico de la expresión de estos neuropéptidos existen escasos trabajos publicados. La aparición de CEEs CCK-8⁺ en el intestino varía mucho entre especies. Así, en *Hippoglossus hippoglossus* se observan células inmunorreactivas a partir de los 45 dpe (Kamisaka *et al.*, 2001). En *Sciaenops ocellatus* se registraron más tempranamente desde los 3 dpe (Webb, 2008) de manera similar a lo descrito en nuestro trabajo donde se identificaron CEEs CCK-8⁺ desde los 5 dpe. Teniendo en cuenta que la regulación de la ingesta de alimento en peces es un proceso complejo que requiere de la integración de múltiples señales provenientes de células del SNED y el SNC (Volkoff, 2016), estas diferencias entre especies en la aparición temporal de la inmunoreactividad a CCK a nivel intestinal podría estar vinculada al sistema de regulación predominante a un momento dado del desarrollo ontogénico. En el caso de *R. quelen*, se observó marcaje a ambos neuropéptidos más tempranamente a nivel intestinal ya en el encéfalo se registró inmunomarcaje a partir de los 12 dpe en el núcleo lateral tuberal del hipotálamo y en los núcleos dorsolateral, ventrolateral y ventroventral del telencéfalo. En relación a la ontogenia en la expresión de NPY, Ping *et al.* (2014) determinaron en larvas de *Megalobrama amblycephala* un incremento significativo en la expresión relativa de este neuropéptido a los 4 dpe. Sin embargo, al utilizar homogenados de larvas enteras para determinar la expresión mediante RT-qPCR no se pudo definir la localización de las células que expresaron NPY (Ping *et al.*, 2014). Por ello, nuestro trabajo es el primero en describir el desarrollo ontogénico de CEEs productoras de NPY en intestino de peces teleósteos. En relación a las

variaciones temporales en el número de CEEs NPY⁺ y CCK-8⁺ dentro de cada grupo experimental no se observaron variaciones significativas entre muestreos sucesivos.

Respecto al efecto de la ploidía en la cantidad de CEEs NPY⁺ no se registraron variaciones significativas entre triploides y diploides a lo largo del ensayo. Por otra parte, el número de CEEs y CCK-8⁺ si bien presentó un comportamiento similar durante la experiencia, los triploides del TF mostraron una cantidad significativamente superior a los 26 y 48 dpe en relación a sus hermanos del GC y TC, respectivamente.

Hasta la fecha, no existen trabajos publicados que evalúen modificaciones en el tamaño de las células productoras de NPY y CCK-8 en intestino en función del desarrollo ontogénico y la triploidización en peces. En este estudio, el área de células productoras de NPY exhibió un incremento significativo a los 62 dpe en los triploides del grupo TC. Al tratarse de un péptido con una potente función orexigénica, y al ser los peces del grupo TC los que mayor tamaño corporal alcanzaron como consecuencia de la triploidía en estudios previos (Morón Alcain *et al.*, 2017), el aumento del área de células que sintetizan este péptido que estimula la ingesta de alimento podría ser consecuencia de una mayor demanda energética.

Respecto al área de células productoras de CCK-8, hasta los 33 dpe los triploides del TC presentaron células de menor tamaño en comparación con alguno de los restantes grupos con variaciones significativas a los 5, 12, 26 y 33 dpe y sin diferencias posteriores. Esto podría indicar que durante el primer mes de desarrollo el mayor crecimiento descrito en los triploides del TC estaría acompañado por una reducción en el volumen celular de CEEs productoras de un péptido anorexigénico como CCK-8 y posteriormente por un aumento en el tamaño celular de CEEs que sintetizan NPY, estimulador del apetito. Sin embargo, para poder corroborarlo serán necesarios futuros estudios que evalúen la expresión génica de estos neuropéptidos mediante RT-qPCR.

5. CONCLUSIONES

Anatómicamente, el encéfalo de *R. quelen* presenta una morfología similar a la descrita en otras especies de silúridos. La descripción de la estructura histológica del telencéfalo y diencéfalo permitió confirmar la presencia de distintos núcleos neuronales asociados a la regulación de la ingesta de alimentos reportados en otros teleósteos.

La triploidización en *R. quelen* produce un aumento del área neuronal a nivel hipotalámico, con la consecuente disminución en la cantidad de neuronas, lo que podría vincularse a comportamientos menos agresivos descritos previamente en triploides por nuestro grupo de trabajo.

La longitud de las vellosidades presentó una tendencia general a incrementarse a medida que transcurrió el ensayo, mientras que los peces triploides exhibieron vellosidades más largas que sus hermanos diploides, lo que podría representar una adaptación funcional relacionada con la mayor demanda energética para el crecimiento durante el desarrollo, así como con el mayor peso medio descrito en triploides por nuestro equipo de investigación.

Las células productoras de los neuropéptidos reguladores de la ingesta, NPY y CCK-8, fueron identificadas tempranamente durante el desarrollo, apareciendo inicialmente a los 5 dpe en las CEEs del intestino ascendente y a partir de los 12 dpe en el núcleo lateral tuberal del hipotálamo y en los núcleos dorsolateral, ventrolateral y ventroventral del telencéfalo. La distribución de NPY y CCK-8 en encéfalo no presentó diferencias entre individuos diploides y triploides.

El desarrollo ontogénico y la triploidización en *R. quelen* indujeron cambios tisulares que permiten dar sustento a características de comportamiento y productivas de los triploides.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian, T.E., Allen, J.M., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Rossor, M.N., Roberts, G.W., Crow, T.J., Tatemoto, K., Polak, J.M., 1983. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306, 584.
- Al-Hussaini, A.H., 1949. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: cytology and physiology. *J. Cell Sci.* 3, 323–354.
- Aliah, R.S., Yamaoka, K., Inada, Y., Taniguchi, N., 1990. Effects of triploidy on tissue structure of some organs in ayu [*Plecoglossus altivelis*]. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*
- Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., Crow, T.J., Bloom, S.R., Polak, J.M., 1983. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221, 877–879.
- Allen, S.K., Wattendorf, R.J., 1987. Triploid grass carp: status and management implications. *Fisheries*, 12, 20-24.
- Altevir, S., Arcangelo, A.S.A.F., Wilson, R.B.A.R., Hayashi, C., 2004. Exigência de proteína bruta para alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. *Varia Sci.* 4, 132–135.
- Appel, B., Chitnis, A., 2002. Neurogenesis and specification of neuronal identity. *Results Probl. Cell Differ.* 40, 237–251. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46041-1_12
- Bae, Y.-K., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., Hibi, M., 2009. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev. Biol.* 330, 406–426.
- Baglolle, C.J., Goff, G.P., Wright, G.M., 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J. Fish Biol.* 53, 767–784. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01831.x>
- Baldisserotto, B., Radunz Neto, J., 2004. Criação do jundiá. Editora UFSM. Santa Maria, Brasil. 390p.
- Bass, A.H., 1981. Olfactory bulb efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Morphol.*

169, 91–111. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051690108>

- Batten, T.F.C., Cambre, M.L., Moons, L., Vandesande, F., 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J. Comp. Neurol.* 302, 893–919.
- Bayer, S.A., Altman, J., 1987. Development of the preoptic area: time and site of origin, migratory routes, and settling patterns of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 265, 65–95. <https://doi.org/10.1002/cne.902650106>
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7, 39–67.
- Bermúdez, R., Vigliano, F., Quiroga, M.I., Nieto, J.M., Bosi, G., Domeneghini, C., 2007. Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol.* 22, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.05.006>
- Bi, S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., Moran, T.H., 2001. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 281, R254–R260.
- Birba, A., Ramallo, M.R., Morandini, L., Villafañe, V., Tubert, C., Guimaraes Moreira, R., Pandolfi, M., 2014. The pineal complex in the cichlid *Cichlasoma dimerus*: effect of different photoperiods on its cell morphology. *J. Fish Biol.* 85, 605–620.
- Bjenning, C., Holmgren, S., 1988. Neuropeptides in the fish gut. *Histochemistry* 88, 155–163.
- Blomqvist, A.G., Söderberg, C., Lundell, I., Milner, R.J., Larhammar, D., 1992. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2350–2354.
- Breton, B., Mikolajczyk, T., Danger, J.-M., Gonnet, F., Saint-Pierre, S., Vaudry, H., 1989. Neuropeptide Y (NPY) modulates in vitro gonadotropin release from rainbow trout pituitary glands. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 77–83.
- Bucke, D., 1971. The anatomy and histology of the alimentary tract of the carnivorous fish the

- pike *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.* 3, 421–431. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1971.tb05914.x>
- Byrd, C.A., Brunjes, P.C., 1995. Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J. Comp. Neurol.* 358, 247–259. <https://doi.org/10.1002/cne.903580207>
- Cachafeiro, M.C.B., 1984. *La trucha: cría industrial*. Mundi-Prensa.
- Campana, M., Morón-Alcain, E., Muñoz, L.H., López, P.A., Boaglio, A.C., Peirone, C.A., Ugalde, J.A., Vigliano, F.A., 2015. Efectos de la triploidización por choques térmicos sobre los parámetros hematológicos de juveniles de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*), in: V Conferencia Latinoamericana Sobre Cultivo de Peces Nativos. pp. 68–68.
- Cerda-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2001. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J. Morphol.* 247, 217–228. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200103\)](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103))
- Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36, 111–126. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90058-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90058-9)
- Cinar, K., Senol, N., Ozen, M., 2006. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gasgointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *World J. Gastroenterol.* 12, 6874–6878.
- Concha, M.L., Wilson, S.W., 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 199, 63–84.
- Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., 2017. Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Front. Neurosci.* 10, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>
- Copeland, D.L., Duff, R.J., Liu, Q., Prokop, J., Londraville, R.L., 2011. Leptin in teleost fishes:

- an argument for comparative study. *Front. Physiol.* 2, 26.
- da Silva, F.S.D., Moreira, R.G., Orozco-Zapata, C.R., Hilsdorf, A.W.S., 2007. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes)(Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture* 272, S110–S114.
- Danger, J.-M., Breton, B., Vallarino, M., Fournier, A., Pelletier, G., Vaudry, H., 1991. Neuropeptide-Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. *Endocrinology* 128, 2360–2368.
- Danger, J.-M., Guy, J., Benyamina, M., Jégou, S., Leboulenger, F., Coté, J., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H., 1985. Localization and identification of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the frog brain. *Peptides* 6, 1225–1236.
- de Bruin, J.P.C., 1980. Telencephalon and behavior in teleost fish, in: *Comparative Neurology of the Telencephalon*. Springer, pp. 175–201.
- Delgado, M.J., Cerdá-Reverter, J.M., Soengas, J.L., 2017. Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: involvement in the control of food intake. *Front. Neurosci.* 11, 354.
- Díaz, A., García, A., Devincenti, C., Goldemberg, A.L., 2003. Morphological and Histochemical Characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935). *Anat. Histol. Embryol.* 32, 341–346. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2003.00490.x>
- Diaz, A.O., Garcia, A.M., Junior, C.P., Lima, F.B.D.E., Braccini, M. Del C., Guimarães, A.C.G., 2005. Análisis histoquímico de los glicoconjugados en las células mucosas de las branquias de *Apareiodon affinis* (STEINDACHNER, 1879) (CHARACIFORMES, PARADONTIDAE). *Rev. Cs. Morfol.* 10, 2-8.
- Díaz, N.F., Neira, R., 2005. Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I . Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. *Cien. Inv. Agr.* 32, 45–59.
- Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G., Berardinelli, P., Vaini, F., Mascarello, F.,

1999. A morphological and histochemical analysis of the neuroendocrine system of the gut in *Acipenser transmontanus*. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 81–86. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1999.tb00212.x>
- Dueñas Gibson, J.C., 2017. Respuesta morfométrica intestinal en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) alimentada con pellets enriquecidos con probióticos y prebióticos. Universidad Nacional de Colombia. 58p.
- Dunham, R.A., 2011. Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic approaches: Second edition. *Aquac. Fish. Biotechnol. Genet. Approaches Second Ed.* 1–495. <https://doi.org/10.1079/9780851995960.0000>
- Duran, E., Ocana, F.M., Martin-Monzon, I., Rodriguez, F., Salas, C., 2014. Cerebellum and spatial cognition in goldfish. *Behav. Brain Res.* 259, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.039>
- Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215–238. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.028>
- Elliott, J.P., Bellwood, D.R., 2003. Alimentary tract morphology and diet in three coral reef fish families. *J. Fish Biol.* 63, 1598–1609.
- Facchin, L., Burgess, H.A., Siddiqi, M., Granato, M., Halpern, M.E., 2008. Determining the function of zebrafish epithalamic asymmetry. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1021–1032.
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2012, Food and Agriculture Organization of United Nations. <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500
- FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010.
- Fernald, R.D., Shelton, L.C., 1985. The organization of the diencephalon and the pretectum in the

- cichlid fish, *Haplochromis burtoni*. J. Comp. Neurol. 238, 202–217.
- Finger, T.E., 1978. Cerebellar afferents in teleost catfish (Ictaluridae). J. Comp. Neurol. 181, 173–181. <https://doi.org/10.1002/cne.901810109>
- Fraser, T.W.K., Fjellidal, P.G., Skjæraasen, J.E., Hansen, T., Mayer, I., 2012. Triploidy alters brain morphology in pre-smolt Atlantic salmon *Salmo salar*: Possible implications for behaviour. J. Fish Biol. 81, 2199–2212. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03479.x>
- Fugi, R., Agostinho, A.A., Hahn, N.S., 2001. Trophic morphology of five benthic-feeding fish species of a tropical floodplain. Rev. Bras. Biol. 61, 27–33.
- Fukushima, H., Bailone, R.L., Weiss, L.A., Martins, M.L., Zaniboni-Filho, E., 2012. Triploidy in the hematology of jundia juveniles (Siluriformes: Heptapteridae). Brazilian J. Biol. 72, 147–151.
- Garcia-Verdugo, J.M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E., Font, E., 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. Brain Res. Bull. 57, 765–775. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00769-9](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00769-9)
- García de la Banda, I., 2013. Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Universidad de León. 206 p.
- Gargiulo, A.M., Ceccarelli, P., Dall’Aglia, C., Pedini, V., 1998. Histology and Ultrastructure of the Gut of the Tilapia (*Tilapia* spp.), a Hybrid Teleost. Anat. Histol. Embryol. 27, 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1998.tb00162.x>
- Genten, F., 2009. Atlas of fish histology. Boca Raton. CRC Press. 224 p.
- Gerking, S.D., 2014. Feeding ecology of fish. Arizona. Elsevier. 416 p.
- Geyer, H.J., Nel, M.M., Swanepoel, J.H., 1996. Histology and ultrastructure of the hepatopancreas of the tigerfish, *Hydrocynus forskahlii*. J. Morphol. 227, 93–100.
- Gil, H.W., Lee, T.H., Han, H.J., Park, I.-S., 2017. Comparative Analysis of Tissue and Cell Cycle

- on the Far Eastern Catfish, *Silurus asotus* between Diploid and Triploid. *Dev. Reprod.* 21, 193–204. <https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.2.193>
- Giorgi, O., Deiana, A.M., Salvadori, S., Lecca, D., Corda, M.G., 1994. Developmental changes in the content of dopamine in the olfactory bulb of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Neurosci. Lett.* 172, 35–38.
- Godinho, H.M., Basile-Martins, M.A., Fenerich, N., 1978. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Rev. Bras. Biol.* 38, 151–156.
- Gomes, L. de C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179–185.
- Goo, I.B., Im, J.H., Gil, H.W., Lim, S.G., Park, I.-S., 2015. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*. *Dev. Reprod.* <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.3.127>
- Gray, T.S., Morley, J.E., 1986. Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* 38, 389–401.
- Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2010. *Fish physiology: the multifunctional gut of fish*. Londres, Elsevier. 460p.
- Guedes, D.S., 1980. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia* spp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).
- Hamdani, E.H., Døving, K.B., 2007. The functional organization of the fish olfactory system. *Prog. Neurobiol.* 82, 80–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.007>
- Harder, W., Sokoloff, S., 1976. *Anatomy of fishes*. Michigan. Schweizerbart. 612p.
- Hernández, D., Santinón, J., Sánchez, S., Domitrovic, H., 2014. Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42, 1136–1147. <https://doi.org/10.3856/vol42-issue5-fulltext-17>

- Hernández, D.R., Pérez Gianceselli, M., Domitrovic, H.A., 2009. Morphology, histology and histochemistry of the digestive system of South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Int J Morphol* 27, 105–111.
- Hernández, D. R., Vigliano, F.A., Sánchez, S., Bermúdez, R., Domitrovic, H.A., Quiroga, M.I., 2012. Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen* juvenile: An immunohistochemical study. *Tissue Cell* 44, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.03.005>
- Herrera-Perez, P., Servili, A., Rendon, M.C., Sanchez-Vazquez, F.J., Falcon, J., Munoz-Cueto, J.A., 2011. The pineal complex of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): I. Histological, immunohistochemical and qPCR study. *J. Chem. Neuroanat.* 41, 170–180.
- Himick, B., Peter, R., 1994. CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 267, R841–R851.
- Holmgren, S., Vaillant, C., Dimaline, R., 1982. VIP-, substance P-, gastrin/CCK-, bombesin-, somatostatin-and glucagon-like immunoreactivities in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 223, 141–153.
- Howell, W.M. t, Black, D.A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014–1015.
- Huang, X., Yang, X., Wang, Q., 1996. Histological study of the telencephalon of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *J. Huazhong (Central China) Agric. Univ.* 15, 168–171.
- Hur, S.-W., Kim, S.-K., Kim, D.-J., Lee, B.-I., Park, S.-J., Hwang, H.-G., Jun, J.-C., Myeong, J.-I., Lee, C.-H., Lee, Y.-D., 2016. Digestive physiological characteristics of the Gobiidae: - characteristics of CCK-producing cells and mucus-secreting goblet cells of stomach fish and stomachless fish. *Dev. Reprod.* 20, 207–217. <https://doi.org/10.12717/DR.2016.20.3.207>
- Jensen, H., Rourke, I.J., Møller, M., Jønson, L., Johnsen, A.H., 2001. Identification and distribution of CCK-related peptides and mRNAs in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1517, 190–201. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00263-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00263-3)

- Jobling, M., 2012. Fish in Aquaculture Environments, in: Huntingford, F., Jobling, M., Kadri, S. (Eds.), *Aquaculture and Behavior*. pp. 36–64.
- Kah, O., Pontet, A., Danger, J.-M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H., Calas, A., 1989. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 69–76.
- Kamisaka, Y., Tagawa, M., Tanaka, M., Totland, G.K., Rønnestad, I., Kurokawa, T., Suzuki, T., 2001. Ontogeny of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 31–37. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7653>
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J., 1992. Effects of induced triploidy on aggressive display in the fighting fish, *Betta splendens* Regan. *Aquac. Res.* 23, 281–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1992.tb00771.x>
- Keast, A., Webb, D., 1966. Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. *J. Fish. Board Canada* 23, 1845–1874.
- Khojasteh, S.M.B., 2012. The morphology of the post - gastric alimentary canal in teleost fishes : a brief review. *Int. J. Aquat. Sci.* 3, 2008–8019.
- Kotrschal, K., Van Staaden, M.J., Huber, R., 1998. Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8, 373–408.
- Krasznai, Z., Márián, T., 1986. Shock-induced triploidy and its effect on growth and gonad development of the European catfish, *Silurus glanis* L. *J. Fish Biol.* 29, 519–527. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb04968.x>
- Kuperman, B.I., Kuz'mina, V. V., 1994. The ultrastructure of the intestinal epithelium in fishes with different types of feeding. *J. Fish Biol.* 44, 181–193. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01197.x>
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Andoh, T., 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of japanese flounder, *Paralichthys*

- olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol. 120, 8–16.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7512>
- Laberge, F., Hara, T.J., 2001. Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res. Rev.* 36, 46–59. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00064-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00064-9)
- Larhammar, D., 1996. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* 62, 1–11.
- Le Bail, P.-Y., Rœuf, G., 1997. What hormones may regulate food intake in fish? *Aquat. Living Resour.* 10, 371–379.
- Le Comber, S., SMITH, C., 2004. Polyploidy in fishes: Patterns and processes. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 431–442. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00330.x>
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N.J., Peyon, P., Peter, R.E., 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 126, 415–434.
- Lindsey, B.W., Darabie, A., Tropepe, V., 2012. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. *J. Comp. Neurol.* 520, 2275–2316. <https://doi.org/10.1002/cne.23065>
- Luchini, L., 1988. Producción de “bagre negro” o catfish sudamericano”. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 8, 433–439.
- Mable, B.K., 2004. ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 453–466. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00332.x>
- Machluf, Y., Gutnick, A., Levkowitz, G., 2011. Development of the zebrafish hypothalamus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1220, 93–105.
- MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A., 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture* 161, 3–25. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00253-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00253-6)
- Mardini, C.V., Silveira, M.A., BarenhO, D.H.L., 1981. Técnica de indução da desova em jundiá

- (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros. *Agricultura* 10, 45–49.
- Marz, M., Schmidt, R., Rastegar, S., Strahle, U., 2011. Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon. *Dev. Dyn.* 240, 2221–2231. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22710>
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish.* 9, 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2007.00269.x>
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A., 2011. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39, 759–775.
- Mérigoux, S., Dolédec, S., Statzner, B., 2001. Species traits in relation to habitat variability and state: neotropical juvenile fish in floodplain creeks. *Freshw. Biol.* 46, 1251–1267.
- Ministerio de Agricultura, G. y P., 2012. Producción del año 2012 de Acuicultura en la República Argentina Producción. Buenos Aires.
- Ministerio de Agricultura, G. y P., 2010. Producción por acuicultura en Argentina 2010. Buenos Aires.
- Morón Alcain, E., Mendiá, A.C., Muñoz, L.H., Boaglio, A.C., Cerutti, P.A., Hernández, D.R., López, P.A., Vigliano, F.A., 2017. Effects of heat and cold shock-induced triploidy on productive parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) late-hatched in the reproductive season. *Aquaculture* 473. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.029>
- Narahara, M.Y., Godinho, H.M. & Romagosa, E., 1985. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). *B. Inst. Pesca* 12 3, 123–137.
- Nejedli, S., Gajger, I.T., 2013. Hepatopancreas in some sea fish from different species and the structure of the liver in teleost fish, common Pandora, *Pagellus erythinus* (Linnaeus, 1758) and whiting, *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann, 1840). *Vet. Arh.* 83, 441–452.
- Nieuwenhuys, R., 2011. The development and general morphology of the telencephalon of

- actinopterygian fishes: synopsis, documentation and commentary. *Brain Struct. Funct.* 215, 141–157. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0285-6>
- Nieuwenhuys, R., Bodenheimer, T.S., 1966. The diencephalon of the primitive bony fish *Polypterus* in the light of the problem of homology. *J. Morphol.* 118, 415–449.
- O’Keefe, R., Benfey, T., 1995. The production of triploid and sex-reversed arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 137, 157.
- Obando-bulla, M.J., Gómez-Ramírez, E., Rincón, M. o. T.L., Hurtado-Giraldo, M.L.C.-M.H., 2013. Estudio morfométrico y topológico del cerebro del pez Neón Cardenal, *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). *Actual Biol.* 35, 45–61.
- Ostaszewska, T., 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). *Electron. J. Ichthyol.* 2, 65–78.
- Ostrander, G.K., Hopkins, J., 2000. *The laboratory fish*. Elsevier. Baltimore. Elsevier. 678p.
- Otto, S.P., 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell* 131, 452–462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>
- Pan, Q.-S., Fang, Z.-P., Huang, F.-J., 2000a. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. *World J. Gastroenterol.* 6, 842–847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i6.842>
- Pan, Q.-S., Fang, Z.-P., Zhao, Y.-X., 2000b. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. *World J. Gastroenterol.* 6, 96–101.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1–22.
- Panné, H., Luchini, S., 2008. Panorama actual del comercio internacional de peces ornamentales. Informe a la Dirección de Acuicultura, Ministerio de Agroindustria. Disponible en: https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/081110_Panorama%20actual%20de%20comercio%20

internacional%20de%20Peces%20Ornamentales.pdf. 18/12/2019.

- Panné Huidobro, S., 2017. Producción por Acuicultura en Argentina en el 2016. Informe a la Dirección de Acuicultura, Ministerio de Agroindustria. Disponible en: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Informaci%C3%B3n%20y%20noticias%20vinculadas%20al%20sector/170605_Producci%C3%B3n%20por%20Acuicultura%20en%20Argentina%20durante%20el%20a%C3%B1o%202016.pdf. 18/12/2019.
- Pearse, A.G., 1977. The diffuse neuroendocrine system and the apud concept: related “endocrine” peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Med. Biol.* 55, 115–125.
- Perea-Ganchou, F., Perdomo-Carrillo, Daniel Antonio Corredor-Zambrano, Z., Moreno-Torres, R., Pereira-Morales, M. y, González-Estopiñán, M., Perdomo-Carrillo, D.A., Corredor-Zambrano, Z., Moreno-Torres, R., Pereira-Morales, M. y, González-Estopiñán, M., 2017. Factores que afectan el desempeño reproductivo de tilapias del género *Oreochromis* en la zona baja del estado Trujillo, Venezuela. *Rev. Científica, FCV-LUZ XXVII*, 78–86.
- Pereira, R.T., Costa, L.S., Oliveira, I.R.C., Araujo, J.C., Aerts, M., Vigliano, F.A., Rosa, P. V., 2014. Relative distribution of gastrin-, CCK-8-, NPY- and CGRP-immunoreactive cells in the digestive tract of dorado (*Salminus brasiliensis*). *Tissue Cell* 47, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.01.009>
- Pereira, R.T., de Freitas, T.R., de Oliveira, I.R.C., Costa, L.S., Vigliano, F.A., Rosa, P.V., 2017. Endocrine cells producing peptide hormones in the intestine of Nile tilapia: distribution and effects of feeding and fasting on the cell density. *Fish Physiol. Biochem.* 43. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0380-1>
- Peruzzi, S., Hagen, Ø., Jobling, M., 2015. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9867-2>
- Peruzzi, S, Jobling, M., Falk-Petersen, I.-B., Lein, I., Puvanendran, V., 2013. Gut morphology of

- diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. J. Appl. Ichthyol. 29, 1104–1108. <https://doi.org/10.1111/jai.12210>
- Peruzzi, Stefano, Jobling, M., Falk-Petersen, I., Lein, I., Puvanendran, V., 2013. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. J. Appl. Ichthyol. 29, 1104–1108.
- Petcoff, G.M., Díaz, A.O., Escalante, A.H., Goldemberg, A.L., 2006. Histology of the liver of *Oligosarcus jenynsii* (Ostariophysi, Characidae) from Los Padres Lake, Argentina. Iheringia. Série Zool. 96, 205–208.
- Peterson, B.C., Waldbieser, G.C., Riley, L.G., Upton, K.R., Kobayashi, Y., Small, B.C., 2012. General and Comparative Endocrinology Pre- and postprandial changes in orexigenic and anorexigenic factors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 176, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.01.022>
- Pineda Santis, H., 2004. Triploidía en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia. Rev. Colomb. Ciencias Pecu. 17, 45–52.
- Ping, H.C., Feng, K., Zhang, G.R., Wei, K.J., Zou, G.W., Wang, W.M., 2014. Ontogeny expression of ghrelin, neuropeptide Y and cholecystokinin in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 98, 338–346. <https://doi.org/10.1111/jpn.12084>
- Pirone, A., Lenzi, C., Betti, L., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Marroni, P., Fabiani, O., 2004. Immunohistochemical distribution of neuropeptide Y in the mesencephalon and rhombencephalon of carp, *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae: Teleostei). Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 138, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.03.017>
- Pirone, A., Lenzi, C., Marroni, P., Betti, L., Mascia, G., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Fabiani, O., 2008. Neuropeptide Y in the brain and retina of the adult teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Anat. Histol. Embryol. 37, 231–240. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2007.00836.x>
- Paul, S.E., Barbeito, C.G., Díaz, A.O., 2016. Histochemical differences along the intestine of *Corydoras paleatus* (Siluriformes: Callichthyidae). Rev. Biol. Trop. 64, 327–340.

- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J.J., 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* 18, 5–14.
- Reid, M.D., Westerman, R.A., 1975. Visual responses in the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* 50, 259–262.
- Rossi, F., Luchini, L., 2003. Tecnologías para cultivo del “Randia” (*Rhamdia quelen*) para fomento de su producción comercial en clima templado-calido. *Dir. Acuic.* 3, 22–25.
- Rottmann, R.W., Shireman, J. V, Chapman, F.A., 1991. Induction and verification of triploidy in fish.. Mississippi, Southern Regional Aquaculture Center Stoneville. 419 p.
- Sánchez, S., Santinón, J.J., Hernández, D.R., Roux, J.P., Domitrovic, H.A., 2008. Cría de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) en estanques luego de diferentes períodos de retención del crecimiento a tres densidades de siembra. *REDVET. Rev. Electrónica Vet.* 9, 1–9.
- Savage, G.E., 1980. The fish telencephalon and its relation to learning, in: *Comparative Neurology of the Telencephalon*. Springer, pp. 129–174.
- Schmidt, R., Strähle, U., Scholpp, S., 2013. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev.* 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
- Scholpp, S., Delogu, A., Gilthorpe, J., Peukert, D., Schindler, S., Lumsden, A., 2009. Her6 regulates the neurogenetic gradient and neuronal identity in the thalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19895–19900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910894106>
- Scholpp, S., Lumsden, A., 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends Neurosci.* 33, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.003>
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Rev. fish Biol. Fish.* 4, 401–429.
- Silfvergrip, A.M.C., 1996. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm University and Swedish Museum History. 156p.
- Silverstein, J.T., Breininger, J., Baskin, D.G., Plisetskaya, E.M., 1998. Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 157–

165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7058>
- Silverstein, J.T., Plisetskaya, E.M., 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Am. Zool.* 40, 296–308. <https://doi.org/10.1093/icb/40.2.296>
- Small, S.A., Benfey, T.J., 1987. Cell size in triploid salmon. *J. Exp. Zool.* 241, 339–342. <https://doi.org/10.1002/jez.1402410309>
- Sobrino Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jiménez, L., Barrios, V., Arilla Ferreiro, E., 2014. Peptides and food intake. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 58. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00058>
- Souza-Bastos, L.R., Freire, C.A., 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289, 167–174.
- Specian, R.D., Oliver, M.G., 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am. J. Physiol.* 260, C183-93. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.2.C183>
- Spemann, H., Mangold, H., 2001. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 13–38.
- Strobl-Mazzulla, P., Nuñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Kah, O., Somoza, G., 2010. Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. *Brain. Behav. Evol.* 76, 20–31. <https://doi.org/10.1159/000316022>
- Thorgaard, G.H., Gall, G.A., 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics* 93, 961–973.
- Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E., Stier, A.R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110, 546–550.
- Tibbetts, I.R., 2005. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. *J. Fish Biol.* 50, 809–820. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01974.x>
- Tiwarly, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 2004. The biology of triploid fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* <https://doi.org/10.1007/s11160-004-8361-8>

- Tsuneki, K., 1986. A histologic survey of diencephalic circumventricular organs in teleosts with special reference to osteoglossomorphs. *Japanese J. Ichthyol.* 33, 27–38.
- Ugolev, A.M., Kuz'mina, V. V, 1994. Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 107, 187–193.
- Ulleberg, L.O., 2017. A comparison of the ontogeny of the digestive system and growth of juvenile diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a standard diet and an experimental diet containing high proportions of hydrolysed proteins. University of Tromsø.
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Valenti, R.J., 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.* 7, 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04627.x>
- Vigliano, F.A., Muñoz, L., Hernández, D., Cerutti, P., Bermúdez, R., Quiroga, M.I., 2011. An immunohistochemical study of the gut neuroendocrine system in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes). *J. Fish Biol.* 78, 901–911. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.02912.x>
- Volkoff, H., 2016. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Front. Neurosci.* 10, 540. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>
- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.001>
- von Bartheld, C.S., Meyer, D.L., Fiebig, E., Ebbesson, S.O., 1984. Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res.* 238, 475–487.
- Voogd, J., Glickstein, M., 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Cogn. Sci.* 2, 307–313.
- Vozzi, P., Sánchez, S., Permingeat, E., 2003. Indução de triploidia em *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). *Bol. do Inst. Pesca* 29, 87–94.

- Webb, K.A., 2008. Cholecystokinin and the ontogeny of digestion in the red drum (*Sciaenops ocellatus*). Mar. Sci. The University of Texas at Austin. 170p.
- Wilson, J.M., Castro, L.F.C., 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes, in: Fish Physiology. Elsevier, pp. 1–55.
- Wren, A.M., Bloom, S.R., 2007. Gut hormones and appetite control. Gastroenterology 132, 2116–2130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.048>
- Wullimann, M.F., Mueller, T., 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. J. Comp. Neurol. 475, 143–162. <https://doi.org/10.1002/cne.20183>
- Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C., Fang, L., 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. Aquaculture 302, 112–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.020>
- Yeo, C.H., Savage, G.E., 1976. Mesencephalic and diencephalic commissures and interocular transfer in the goldfish. Exp. Neurol. 53, 51–63.
- Zielinski, B., Hara, T.J., 1988. Morphological and physiological development of olfactory receptor cells in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) embryos. J. Comp. Neurol. 271, 300–311. <https://doi.org/10.1002/cne.902710210>