



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DEL SISTEMA
DIGESTIVO DE DOS ESPECIES DE ATERINÓPSIDOS,
Odontesthes bonariensis Y *Odontesthes hatcheri*, DURANTE SU
ONTOGENIA LARVARIA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

PRESENTA:

Bióloga Evangelina Cortes Ortiz

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS
UMSNH

CO-DIRECTORA
DRA. MARIA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ.
CIAD, UNIDAD MAZATLAN

Morelia, Michoacán, Enero, 2016.

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| ÍNDICE | II |
| ÍNDICE DE TABLAS | IV |
| GLOSARIO | VI |
| RESUMEN | VIII |
| ABSTRAC | IX |
| AGRADECIMIENTOS | X |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades | 1 |
| 1.2 Anatomía y fisiología del sistema digestivo de peces | 3 |
| 1.3 Ontogenia en peces | 8 |
| 1.3.1. Periodo embrionario | 8 |
| 1.3.2. Periodo larvario | 9 |
| 1.4. Desarrollo y maduración del tracto digestivo | 10 |
| 1.5. Diferencias en el sistema digestivo de peces | 13 |
| 1.6. Algunos estudios en pejerreyes | 15 |
| 1.6.1. Características de los huevos y su desarrollo | 15 |
| 1.6.2. Morfología del sistema digestivo | 18 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 3. HIPÓTESIS | 20 |

| | |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| 4. OBJETIVOS | 20 |
| 4.1. Objetivo General | 20 |
| 4.2. Objetivos particulares | 20 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 5.1. Obtención y mantenimiento de larvas | 21 |
| 5.2. Obtención de muestras | 21 |
| 5.3. Fijación | 21 |
| 5.4. Procesamiento histológico de las muestras | 22 |
| 6. RESULTADOS | 23 |
| 7. DISCUSIÓN | 41 |
| 8. CONCLUSIONES | 50 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 1. Regionalización general del sistema digestivo y órganos accesorios en peces con estómago | 14 |
| Figura 2. Tipo de configuración del tubo digestivo en peces, en función de sus hábitos alimentarios cuando son adultos | 15 |
| Figura 3. Estructura histológica general del sistema digestivo | 17 |
| Figura 4. Diagrama general del tubo digestivo de larvas de peces marinos, al momento de la primera alimentación | 22 |
| Figura 5. Ovocitos de <i>Odontesthes bonariensis</i> | 27 |
| Figura 6. Corte Longitudinal (CL) de la cabeza de <i>O. hatcheri</i> (A) y <i>O. bonariensis</i> (B). | 34 |
| Figura 7. CL de la entrada a la cavidad oral de la larva del día 0 de <i>O. hatcheri</i> (A) y <i>O. bonariensis</i> (B). | 35 |
| Figura 8. CL de la cavidad faríngea de <i>O. hatcheri</i> (A) y <i>O. bonariensis</i> (B) al día cero. | 36 |
| Figura 9. CL de una larva de <i>O. hatcheri</i> (A) y <i>O. bonariensis</i> (B) al día cero, donde se observan el esófago y las regiones del intestino, la forma y tamaño de sus vellosidades. | 37 |
| Figura 10. CL del intestino posterior de una larva de <i>O. hatcheri</i> al día cero, en el que se observan las vacuolas supranucleares absortivas vacías (flecha) (sin aún llevar a cabo pinocitosis). | 38 |
| Figura 11. CL del intestino posterior y recto de una larva de <i>O. hatcheri</i> al día 0 de eclosión. | 38 |
| Figura 12. CL del hígado de <i>O. hatcheri</i> donde se observan los hepatocitos con reserva de tipo graso, canalículos biliares y capilares. | 39 |
| Figura 13. CL de sección de larva de <i>O. hatcheri</i> en donde se observa el páncreas exocrino (ex) y endocrino (en). | |
| | 340 |
| Figura 14. CL de la región anterior del tracto digestivo de <i>O. hatcheri</i> (A) y <i>O. bonariensis</i> (B), al día 1 de post-eclosión. | 40 |

Figura 15. CL del esófago de una larva de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) al 1er día post-eclosión, caracterizado por la presencia de células caliciformes intercaladas con las células del epitelio esofágico y la transición entre esófago e intestino anterior. **42**

Figura 16. CL de larva de un día de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) en donde se observa la altura y ancho de las vellosidades del intestino medio y anterior, que además llenan casi completamente el lumen. **43**

Figura 17. CL de larva de un día post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), en donde se observa la posición del hígado respecto al intestino. **44**

Figura 18. CL Estructura anatómica de la región bucofaríngea de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) a los dos días después de la eclosión (DPE). **45**

Figura 19. CL de larva de dos días post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), donde se observa la estructura histológica del intestino posterior (ip) y del recto (r). **46**

Figura 20. CL del intestino anterior y medio del intestino de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B); y CL de intestino posterior de *O. hatcheri* (C) y *O. bonariensis* (D) a los 3 días de eclosión, en donde se observa la presencia de células de absorción de proteínas. **48**

Figura 21. CL de cabeza de larva de 4 días post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), y CL de intestino anterior y medio de *O. hatcheri* (C) y *O. bonariensis* (D). **49**

Figura 22. CL del intestino posterior al cuarto día de eclosión de *O. hatcheri*, en el que se muestra claramente la actividad pinocitaria (flechas). **50**

GLOSARIO

Borde estriado o de cepillo.- También llamado microvellosidades. Proyección de la membrana plasmática apical de los enterocitos (Leeson *et al.*, 1990).

Células caliciformes.- Son células secretoras de mocosubstancias, consideradas glándulas unicelulares. Se presentan a lo largo del tubo digestivo, excepto en el estómago, intercaladas entre las células epiteliales de la mucosa (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Eleuteroembrión.- De acuerdo a Balon (1984), fase del periodo embrionario de los peces que comienza desde el momento de la eclosión hasta que es absorbido completamente el saco vitelino y el glóbulo de aceite.

Enterocitos.- Término que reciben las células epiteliales de la mucosa intestinal. Tienen una función digestiva y de absorción de nutrientes (Stroband y Dabrowski, 1979).

Epitelio cilíndrico.- Tipo de epitelio caracterizado por una sola hilera de células que presentan una altura superior a la anchura de su base. El núcleo se encuentra alineado en la base de las células (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio cúbico.- Tipo de epitelio caracterizado por una sola hilera de células que presentan una altura similar a la anchura de su base. El núcleo es redondo y se encuentra a la mitad de la célula (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio de transición.- Tipo de epitelio que se caracteriza por la forma plana de las células, cuando está distendido, y por la forma cúbica cuando está en reposo. En mamíferos se encuentra revistiendo al sistema excretor (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio plano estratificado.- Concepto que se aplica para diferenciar al tipo de epitelio en el cual las células que lo componen son planas, con núcleos aplanados y largos. El término estratificado de refiere a la presencia de numerosas capas de células epiteliales planas (Leeson *et al.*, 1990).

Pinocitosis.- Proceso de absorción celular. Consiste en el envolvimiento de partículas, por parte de la superficie apical del enterocito, a través del borde estriado. Se asocia principalmente con la absorción de proteínas y el sistema inmunológico (Stroband y Dabrowski, 1979).

Vacuola digestiva.- Nombre que recibe un lisosoma secundario. Se forma por la acumulación de material absorbido por la célula. Presenta su propia membrana (Robertis *et al.*, 1977).

Vesícula.- Estructura celular formada como resultado del proceso de pinocitosis. Presenta parte de la membrana celular (Robertis *et al.*, 1977).

Zimógeno.- Precursor inactivo de enzimas digestivas. Se forma y acumula en los acinos pancreáticos en forma de gránulos. Los zimógenos son secretados y transportados hacia el intestino, donde ocurre su modificación activar a las enzimas (Leeson *et al.*, 1990).

RESUMEN

El éxito limitado en el cultivo de muchas especies se debe a la falta de conocimiento del desarrollo funcional del sistema digestivo, especialmente durante el cambio de la alimentación endógena a la exógena. Estos estudios permiten identificar las estructuras que se van desarrollando, establecer el estatus de su integridad estructural, la funcionalidad de los órganos y la capacidad alimenticia de las diferentes etapas larvarias. El presente trabajo describe el desarrollo ontogénico del sistema digestivo de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, del día 0 hasta el día 8 de post-eclosión junto con las estructuras asociadas. Los huevos, provenientes de reproductores de la Universidad de Japón y las larvas, fueron incubados a temperaturas óptimas. Larvas recién eclosionadas y hasta el día 8 después de la eclosión (dpe) de *las dos especies*, fueron fijadas, durante 24 horas, en solución Bouin. Posteriormente las larvas se conservaron en alcohol al 70% hasta su procesamiento histológico. Al eclosionar, las larvas presentan saco con abundante vitelo así como páncreas e hígado en función, el tracto está abierto desde la boca hasta el ano y en ambas especies está formado por la cavidad oral, faringe, esófago e intestino, no poseen estómago, ni ciegos pilóricos. Larvas de 3 a 7 dpe presentan vacuolas digestivas en intestino medio y pinocitosis en el intestino posterior. A partir del día 3 se observan claras reservas energéticas en el hígado de ambas especies y pequeños indicios de alimento en intestino, indicando el inicio de la alimentación exógena, junto con la endógena. Ambas especies eclosionan con un sistema digestivo muy desarrollado, en comparación con el de varias especies de peces marinos y de agua dulce que al momento de la eclosión presentan un sistema digestivo indiferenciado. A pesar de ello no están preparadas sino hasta el día 3 para iniciar la alimentación exógena, que coincide con la endógena por 2 a 3 días más.

Palabras clave: Agástrico, Ontogenia, Desarrollo, PAS, Histología.

ABSTRAC

Limited in many species growing success is due to the lack of knowledge of the functional development of the digestive system, especially during the change from endogenous to exogenous supply. These studies can identify the structures that develop, establish the status of their structural integrity, functionality of organs and feed capacity of different larval stages. This paper describes the ontogenetic development of the digestive system and *O. O. bonariensis* hatcheri, day 0 to day 8 post-hatch with associated structures. Eggs, players from the University of Japan and the larvae were incubated at optimal temperature. Newly hatched larvae and until day 8 after hatching (DPE) of the two species were fixed for 24 hours in Bouin solution. The larvae were preserved in alcohol 70% to histological processing. Upon hatching, the larvae have sack with abundant yolk and liver and pancreas function, the tract is open from the mouth to the anus and in both species consists of the oral cavity, pharynx, esophagus and intestine, have no stomach, or pyloric caeca. Larvae of 3 to 7 DPE digestive vacuoles present in midgut and hindgut pinocytosis. From day three clear energy reserves in the liver of both species and small intestine food signs are observed, indicating the start of exogenous feeding, along with endogenous. Both species hatch a highly developed digestive system, compared to several species of marine and freshwater fish at the time of hatching present an undifferentiated digestive system. However they are not prepared until the day 3 to start exogenous feeding, which coincides with the endogenous for 2-3 days.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, **Dra. Elva Mayra Toledo Cuevas** por haber confiado en mí, y principalmente, por su apoyo y orientación a lo largo de esta tesis. Gracias por ayudarme a conseguir todo lo que necesitaba para este trabajo. Pero sobre todo gracias por su enorme paciencia y apoyo incondicional.

A la **Dra. Cristina Chávez Sánchez** mi respeto y admiración por su gran colaboración, por haberme brindado su experiencia y conocimientos profesionales y de vida.

A las **Autoridades del CIAD** por brindarme el lugar y equipamiento para realizar esta Tesis. Al **grupo de Histología** y en especial al **M.C. Selene Abad Rosales** por todo el apoyo técnico y por su gran disposición para la realización de este trabajo.

A las **Autoridades del USAD, MVZ Adrián Sánchez Orozco**, por permitirme trabajar en sus instalaciones. Al **M.C. Manuel López Rodríguez** por todos los consejos y enseñanza y por escucharme mil gracias.

Al **Laboratorio de Histología del INIRENA**, a mis compañeras de curso y a la **Dra. Esperanza Melendez Herrera**.

Al Dr. **Carlos A. Strüssmann**. Por proporcionar los organismos para llevar a cabo este trabajo.

A mi comité revisor **Dr. Carlos Martínez Palacios, Dr. Carlos Cristian Martínez Chávez** por ayudar en mi formación académica y por su valiosa colaboración.

A la **M.C. Sibila Santos**, por ser una gran guía en el laboratorio y por brindarme su valiosa amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura por todos los momentos que compartimos juntos.

Al M.C. Juan Manuel Chavarrieta, por sus consejos y ayuda incondicional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La familia Atherinopsidae está representada por 108 especies que presentan una gran similitud morfológica pero que varían ampliamente en tamaño, hábitat y ecología (Nelson, 2006). Dentro de esta familia se encuentran los pejerreyes, pertenecientes al género *Odontesthes*, un grupo monofilético con una enorme adaptabilidad a diferentes salinidades. El género se encuentra comprendido por diecinueve especies que habitan lagos, ríos, estuarios y zonas costeras templadas y tropicales de América del Sur. El grupo ancestral de este género es habitante del medio marino (Dyer, 1993, 2006; Beheregaray y Sunnucks, 2001).

Los pejerreyes son ecológicamente relevantes como peces forrajeros y son económicamente importantes para la pesca y la acuicultura (Sampaio, 2006; Somoza *et al.*, 2008; Colautti *et al.*, 2010), lo que genera un gran interés en su biología (Bemvenuti, 2002). *Odonthestes hatcheri* y *O. bonariensis* (conocidos como pejerrey y pejerrey patagónico, respectivamente) poseen un amplio potencial de cultivo, debido a que son especies de rápido crecimiento y con carne de muy buena calidad; por consiguiente presentan una amplia demanda en las pesquerías y en los mercados de Argentina, Chile, Uruguay y Brasil (Bemvenuti, 1990; Domenico y Freyre, 2008; Mancini, 2009). De igual forma, poseen una gran importancia en la pesca deportiva. Ambas especies son exitosamente cultivadas en Japón (Strüssmann y Yasuda, 2008) y junto con los peces blancos mexicanos son las únicas cuatro especies de Atherinópsidos hasta ahora cultivadas.

A pesar de que existe un importante progreso en el cultivo de ambas especies (Berasain *et al.*, 2006; Hualde *et al.*, 2011), aún no se cuenta con una dieta balanceada apropiada para éstas (Requeni *et al.*, 2013). Tampoco existen trabajos donde se describa el desarrollo ontogénico de sus larvas y en especial de la evolución de su sistema digestivo (Lagomarsino y Conover, 1993; Strüssmann *et al.*, 1997; Agelet, *et al.*, 2003; Tsuzuki *et al.*, 2008).

De forma general, durante la etapa larvaria los peces se alimentan de las reservas vitelinas (alimentación endógena), pero a medida que ocurren los cambios en el sistema digestivo, los organismos se van preparando para la fase de alimentación exógena. El periodo de transición entre la alimentación endógena y la exógena es crítico y generalmente resulta en altas tasas de mortalidad (Moteki, 2002; Makrakis *et al.*, 2005). Entre las causas se encuentran la poca capacidad de los organismos para poder capturar el alimento, así como el obtener un alimento apropiado para el tamaño de su boca (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). Sin embargo, la principal limitante es que todas sus estructuras y órganos relacionados con la captación del alimento, la digestión de éste y su asimilación, hayan llegado a su madurez y plena funcionalidad (Yúfera y Darias, 2007). Este proceso de maduración digestiva puede verse alterado o suprimido por un destete (cambio de alimento vivo a alimento balanceado) temprano y/o por una alimentación con dietas inadecuadas (Zambonino Infante *et al.*, 2001; Cahu *et al.*, 2003).

Por tal razón es importante el conocimiento del desarrollo del sistema digestivo, a través de estudiar su anatomía e histología durante el período larvario, ya que a pesar de las similitudes microanatómicas básicas, existen diferencias importantes en las características macroscópicas y microscópicas entre las diferentes especies de peces (Khojasteh *et al.*, 2009). Conocer la histología normal del sistema digestivo en la etapa larval permite identificar las estructuras que se van desarrollando, establecer el estatus de su integridad estructural, la funcionalidad de los órganos y la capacidad alimenticia de las diferentes etapas (Reinecke *et al.*, 1997; Ticker *et al.*, 1998; Moteki *et al.*, 2002; Makrakis *et al.*, 2005; Yúfera., 2007; Zambombino *et al.*, 2008).

El desarrollo de estos cambios, hasta llegar a la madurez digestiva, puede ser monitoreado a través de estudios de bioquímica digestiva. No obstante, los cambios en los patrones de actividad de las enzimas digestivas requieren ser relacionados con los cambios anatómicos e histológicos del sistema digestivo. Esto permite entender la fisiología digestiva, determinar el momento apropiado para realizar el destete de peces en cultivo, conocer la capacidad digestiva (tipo y

actividad) de los organismos en sus diferentes estadios y desarrollar dietas balanceadas que puedan ser aprovechadas eficientemente (Watanabe y Kiron, 1994; Cahu y Zambonino Infante, 2001).

En el presente trabajo se pretende analizar el desarrollo del tracto digestivo y de las estructuras asociadas (hígado, páncreas y vesícula biliar), durante la ontogenia larvaria temprana de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*, a través de estudios histológicos. El estudio permitirá identificar el inicio de la alimentación exógena en las larvas y obtener información que contribuya al conocimiento del proceso de maduración del sistema digestivo de estos organismos agástricos y de intestino corto.

1.2. Anatomía y fisiología del sistema digestivo de peces

El sistema digestivo y sus órganos accesorios; el hígado, el páncreas y la vesícula biliar, presentan varias características en común entre los principales grupos de vertebrados (Romer y Parsons, 1981).

En los peces juveniles y adultos, el tubo digestivo muestra una gran diversidad en forma y función, dependiendo de los hábitos alimentarios. Es común que el tubo digestivo presente una serie de enrollamientos y esté estructuralmente dividido en cinco regiones bien diferenciadas; la cavidad bucal, la faringe, el esófago, el estómago y el intestino, con algunas subdivisiones en este último (Fänge y Grove, 2001; Stroband *et al.*, 2001; Romer y Parsons, 2008; Smith, 2009; Segner, 2010) (Figura 1).

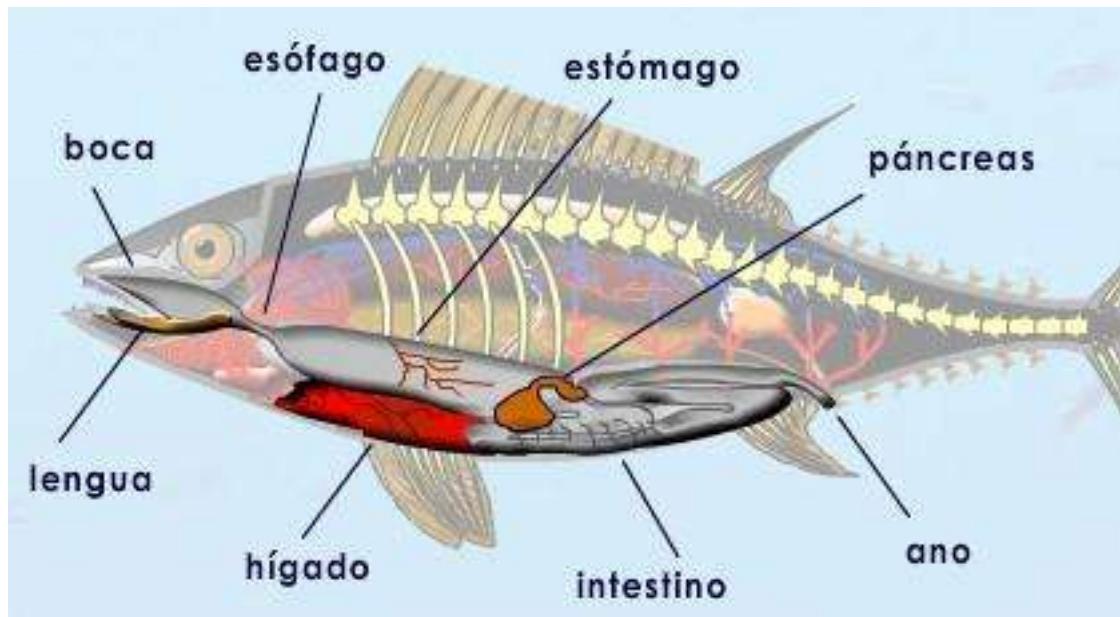


Figura 1. Regionalización general del sistema digestivo y órganos accesorios en peces con estómago.

Sin embargo, también puede no encontrarse el estómago o el intestino puede estar modificado (Figura 2); esto principalmente relacionado con el hábito alimenticio. A pesar de tal diversidad, la función primordial es la misma: asegurar la ingestión, digestión y asimilación de los nutrientes adquiridos mediante el alimento capturado.



Figura 2. Tipo de configuración del tubo digestivo en peces, en función de sus hábitos alimentarios cuando son adultos. a) Carnívoro, estómago en forma Y; b) omnívoro con preferencias carnívoras; c) omnívoro con preferencias herbívoras; d) micrófago, planctívoro (Tomado de Smith, 1989).

La cavidad bucal es la primera porción del tubo digestivo y se continúa con la faringe, que permite el paso del alimento hacia el esófago. El esófago consiste de un tubo corto, con plegamientos longitudinales, que termina en la apertura estomacal o en el intestino cuando los peces carecen de estómago. Cuenta con numerosas células caliciformes, cuyas secreciones son importantes para permitir el paso del alimento. El estómago es una porción dilatada del tubo digestivo, en donde ocurre la mezcla y la primera etapa de la digestión del alimento. El intestino es la región posterior del tubo digestivo, donde se completa la digestión de los alimentos y ocurre la absorción de los mismos. El intestino se encuentra diferenciado en tres regiones: anterior, medio y posterior. El esófago, estómago e

intestino anterior, medio y posterior presentan distintas células epiteliales, de absorción y secretoras. Este epitelio tiene pliegues, vellosidades (evaginaciones de la mucosa) y microvellosidades (pliegues de la membrana plasmática). Su función es aumentar la superficie de interacción del alimento con las secreciones digestivas, así como la superficie de absorción de los nutrientes (Caceci, 1984).

Histológicamente, en el intestino es posible distinguir un epitelio formado por una capa sencilla de células cilíndricas, intercalado con células caliciformes (secretoras de moco). Los lípidos son digeridos a ácidos grasos y monoglicéridos en el intestino y tras ser absorbidos, son resintetizados a triglicéridos en el retículo endoplásmico y depositados en grandes gotas lipídicas evidentes en los enterocitos (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). La región anterior y media constituyen el 60 al 75% de la longitud total del tubo digestivo. En la parte posterior del intestino las células absorbentes muestran vacuolas supranucleares, procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas. El último segmento (recto) representa un 5% de la longitud y dadas las características de sus enterocitos y la menor cantidad de microvellosidades, parece intervenir principalmente en procesos de recuperación de agua y de iones (Govoni *et al.*, 1986).

Dentro de las glándulas accesorias, el hígado es el productor de la bilis, indispensable para la degradación de los lípidos alimenticios. Además, este órgano es fundamental para el metabolismo de los nutrientes, con importantes funciones en el almacenamiento de lípidos, en la descomposición y la excreción de productos metabólicos y en los procesos de desintoxicación (Rust, 2002; Hoehne-Reitan y Kjørsvik, 2004). El páncreas es un órgano que presenta células especializadas en funciones endocrinas y exocrinas. El páncreas endocrino sintetiza y libera hormonas al torrente sanguíneo, tales como la insulina y el glucagón. Dichas hormonas son esenciales para la regulación del metabolismo de los carbohidratos en los organismos. El páncreas exocrino es la principal fuente de enzimas digestivas requeridas para la digestión intestinal de las macromoléculas de nutrientes (Hoehne-Reitan y Kjørsvik, 2004). Las enzimas son sintetizadas en

forma de zimógenos (forma inactiva de la enzima), que son almacenadas en gránulos visibles en el citoplasma de las células.

El sistema digestivo se encuentra conformado histológicamente de las siguientes capas básicas: túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular y túnica serosa (Figura 3). Sin embargo, puede que no todas estén presentes en las diferentes secciones del tracto digestivo.

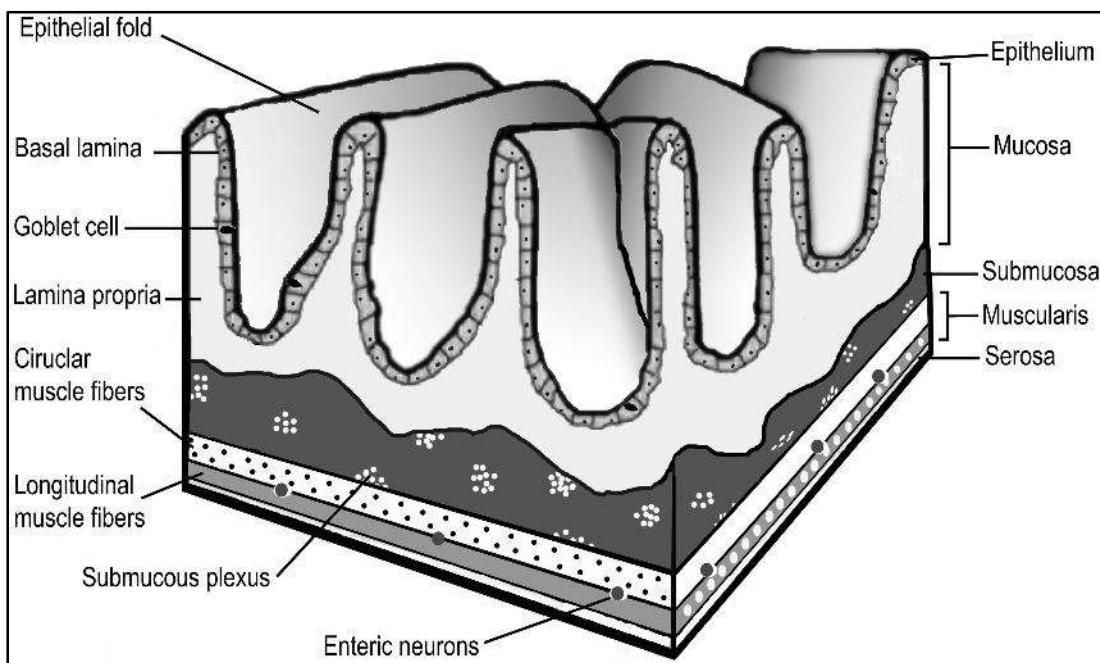


Figura 3. Estructura histológica general del sistema digestivo (Tomado de Lazo *et al.*, 2011).

En general la morfología del sistema digestivo de los peces puede ser influenciada por los hábitos alimenticios, la frecuencia de la alimentación, así como por el tamaño y forma del cuerpo (Buddington *et al.*, 1997).

Las enzimas que participan en los procesos digestivos pueden estar localizadas en el lumen intestinal o bien estar asociadas a los enterocitos, las células intestinales. En los enterocitos se encuentran enzimas digestivas citosólicas pero también aquellas asociadas a la membrana de borde de cepillo (microvellosidades). La actividad de las enzimas citosólicas se considera más

importante en las larvas que en los juveniles o adultos, ya que se cree que la digestión intracelular compensa la baja digestión extracelular y membranal en los estadios tempranos (Watanabe, 1984; Cahu *et al.*, 2003). En conjunto, todas estas enzimas juegan un papel sinérgico y complementario, hasta la digestión total de los componentes de la dieta, permitiendo así su absorción en el enterocito y posteriormente su transporte a los tejidos (Walford y Lam, 1993).

1.3 Ontogenia en peces

1.3.1. Periodo embrionario

El inicio de la ontogenia ha sido establecido desde el momento de la fertilización de los huevos (Balon, 1985). En este lapso los embriones son dependientes del suministro de nutrientes y energía de origen maternal, almacenado en las reservas vitelinas (alimentación endógena) (Balon, 1975; Kamler, 1992; 2002). El principal elemento de reserva es la vitelogenina, una proteína de origen hepático que tras su incorporación por micropinocitosis al ovocito, es hidrolizada. La utilización del vitelo en el periodo embrionario permite el desarrollo de los primeros órganos y/o sistemas que los peces necesitan para sobrevivir en el siguiente periodo de desarrollo, el periodo larval (Kamler, 2002).

En general, los huevos y eleuteroembriones (embrión libre, que comprende del momento de la eclosión hasta antes de la completa absorción del saco vitelino) de la mayoría de peces marinos de aguas tropicales y subtropicales, que son los de mayor importancia comercial y en donde más estudios se han realizado, presentan características comunes como son: diámetro pequeño del huevo, tiempos de eclosión cortos y un vitelo restringido que dura poco tiempo, por lo que la alimentación exógena tiene que realizarse antes de que el organismo esté totalmente formado. La temperatura y la salinidad, entre otros factores, influyen en el tiempo de eclosión, tamaño del saco vitelino y en el estado de desarrollo de las

larvas tras la eclosión y por tanto, de cuando inician la alimentación exógena (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004; Crichigno *et al.*, 2012).

En contraste muchas especies de agua dulce, como los cíclidos, producen huevos demersales con grandes cantidades de vitelo y presentan un desarrollo embrionario relativamente largo. Al comienzo de su alimentación exógena poseen tractos digestivos relativamente completos y funcionales, incluyendo el estómago, por lo que estas especies pueden iniciar la alimentación directamente con alimento balanceado (Kendall *et al.*, 1984).

1.3.2. Periodo larvario

Para el cultivo a escala comercial de diversas especies de peces, el periodo larvario representa un cuello de botella, porque se desconocen las características anatómicas y funcionales de las mismas y en consecuencia sus requerimientos nutricionales, tanto en calidad como en cantidad. La etapa inicial del ciclo de vida de los peces teleósteos es la más breve, pero durante ella se producen profundos cambios en la anatomía, fisiología y comportamiento. Dichas transformaciones involucran importantemente al tracto gastrointestinal (Tucker *et al.*, 1998).

En los peces existe dos tipos de ontogenia, los que presentan ontogenia directa y los de ontogenia indirecta (Balon, 1984). Los de ontogenia directa se caracterizan por carecer de un periodo larvario y, al momento de la eclosión, presentan un grado de desarrollo morfológico y funcional avanzado e incluso similar al observado durante el periodo juvenil (Kendall *et al.*, 1984). Por su parte, los peces que presentan ontogenia indirecta eclosionan como larvas. Están poco desarrollados al momento de la eclosión y durante la fase larvaria se llevan a cabo procesos complejos y altamente dinámicos de diferenciación de órganos, morfogénesis y crecimiento. En esta fase el tracto digestivo presenta cambios morfológicos importantes derivados de su genética, pero que pueden estar siendo modificados por diversos factores, tales como la temperatura y la salinidad (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004; Crichigno *et al.*, 2012). Tales cambios están

dirigidos a pasar de una alimentación endógena a una exógena; para lo cual cuentan con las reservas vitelinas como única fuente de energía y compuestos nutricionales. La gran mayoría de las larvas de especies de peces marinos se ubican dentro de esta categoría (Sala *et al.*, 2005). El desarrollo y maduración del sistema digestivo puede tomar de 7 a 60 días, dependiendo de la especie (Cousin *et al.*, 1987).

Las larvas, durante su ontogenia trófica, experimentan patrones de acuerdo a su tipo de desarrollo y al incremento en su talla (Cousin *et al.*, 1987). El tracto digestivo, en la primera alimentación de la mayoría de las especies, contiene ya las enzimas relacionadas con el aprovechamiento de los nutrientes (digestión, absorción y asimilación). No obstante, en las larvas la actividad digestiva es relativamente baja, comparada con los niveles en peces adultos (Kolkovsky, 2001).

1.4. Desarrollo y maduración del tracto digestivo.

En los peces marinos de ontogenia indirecta, que desovan huevos pelágicos, la mayoría de los sistemas y órganos se originan durante el periodo embrionario tardío o durante la etapa larval vitelina, pero su función inicia hacia el final de esta etapa. El periodo de larva vitelina dura de unos pocos días a una semana, dependiendo de la temperatura (O'Connell, 1981).

En la etapa larval, la ontogenia del sistema digestivo, así como los mecanismos de absorción de nutrientes (Lazo, 1999) presenta un patrón similar en diferentes especies, pero con ciertas variaciones, principalmente en la secuencia de aparición de las diferentes estructuras y en los tiempos en los que ocurren los distintos eventos del desarrollo (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007; Yúfera y Darias, 2007; Rønnestad y Morais, 2008) (Figura 4). Tanaka (1973) señala que el patrón de desarrollo difiere entre las especies, en la aparición y diferenciación de los órganos del sistema digestivo, debido a elementos que involucran factores tanto

ecológicos, físicos e inclusive filogenéticos.

En varias especies, al momento de la eclosión, el tracto digestivo es un tubo recto indiferenciado sin apertura exterior, que se desarrolla progresivamente durante la ontogenia larval para cumplir sus funciones digestivas, al comienzo de la alimentación exógena (Horn, 1989; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Chen *et al.*, 2006). El páncreas y el hígado están también presentes, pero son funcionales al finalizar el período larvario. Al momento de la primera alimentación se observa que ambas mandíbulas, arcos branquiales y aberturas branquiales están formadas. La mucosa de todo el tracto digestivo presenta pliegues. El intestino se encuentran diferenciado y el epitelio que lo conforma está compuesto por células cilíndricas con un borde estriado bien desarrollado. El ano está abierto. El hígado está bien desarrollado y ubicado en la región anterior del cuerpo. El páncreas presenta tejido exocrino que sintetiza gránulos de zimógeno y tejido endocrino que sintetiza hormonas. La vesícula biliar se encuentra entre el hígado y el intestino anterior. Posteriormente, en una segunda etapa, adquieren la forma digestiva del adulto, justo antes de iniciar el período juvenil, formándose los dientes mandibulares. Aparecen las papilas gustativas y se forman los dientes faríngeos. El tubo digestivo se enrolla y aparecen células caliciformes en el intestino. Durante el desarrollo de las larvas de los peces marinos, que no presentan una remodelación dramática (metamorfosis), se llevan a cabo cambios estructurales y funcionales en el epitelio del tracto gastrointestinal, hasta alcanzar la maduración del sistema digestivo y con esto una digestión eficiente (Zambonino *et al.*, 2008). Se forma el hepatopáncreas, en aquellas especies que lo presentan (Gawlicka *et al.*, 1995). En el caso de especies gástricas, el estómago cambia de forma y aparecen las glándulas gástricas. Los ciegos pilóricos comienzan a formarse.

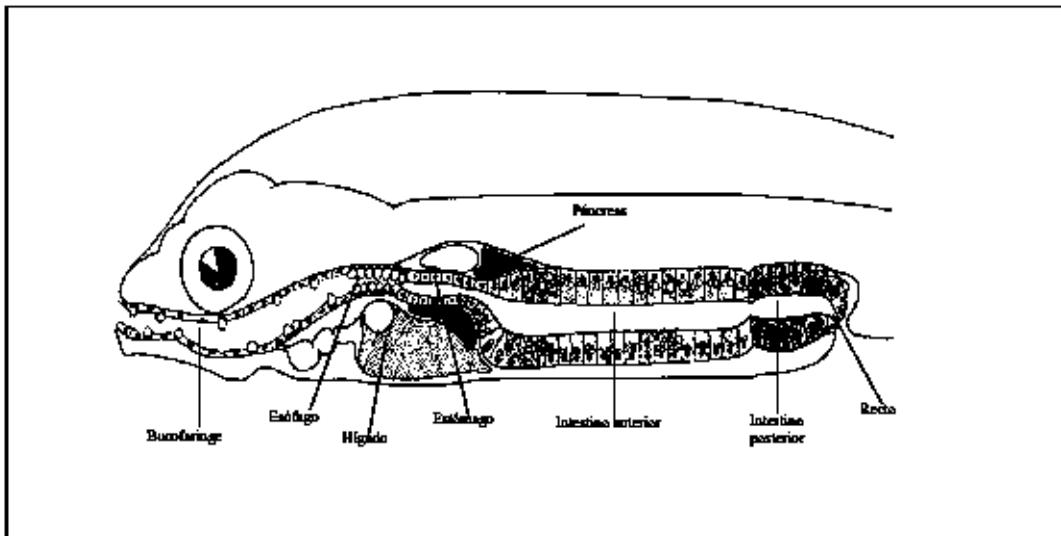


Figura 4. Diagrama general del tubo digestivo de larvas de peces marinos, al momento de la primera alimentación (Tomado de Tanaka, 1973).

En cerca de 20 especies, tanto dulceacuícolas como marinas, se ha encontrado absorción de proteínas en el intestino, caracterizada por la presencia de vesículas en el área apical de los enterocitos del intestino posterior; mientras que la absorción de lípidos es evidenciada por la presencia de vacuolas en la región supranuclear de los enterocitos del intestino anterior y medio (Watanabe, 1996).

El proceso de maduración del sistema digestivo ocurre varias semanas después de la eclosión en las larvas de peces marinos y corresponde al cambio en el tipo de digestión larval a la forma adulta (Zambonino Infante y Cahu, 2001). En la mayoría de los estudios realizados se ha observado un incremento progresivo en la actividad de las enzimas digestivas con la edad, aunque en muchos casos existen descensos bruscos, posiblemente relacionados a los cambios morfológicos requeridos para la maduración del sistema digestivo y al cambio en el tipo de alimentación (Cahu y Zambonino Infante, 1994).

No obstante, todo este proceso de desarrollo del sistema digestivo puede verse alterado. Esto debido tanto a una alimentación inadecuada como al impacto de

factores ambientales durante el desarrollo, que pueden tener consecuencias a largo plazo sobre la capacidad digestiva del organismo. Varios estudios reportan retraso en el crecimiento y en el desarrollo del sistema digestivo en las larvas de peces que fueron alimentadas con dietas balanceadas a edades tempranas, antes de la maduración digestiva (Zambonino *et al.*, 2008; Guerreiro *et al.*, 2010). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios, la capacidad digestiva se evaluó mediante la cuantificación de las actividades de las enzimas digestivas y/o su expresión genética, pero no hay información disponible sobre el efecto en la ultra-estructura del tracto gastrointestinal.

De acuerdo a estas consideraciones, se ha tomado la determinación de tener en cuenta las características digestivas de las larvas de peces para la formulación de dietas compuestas, con el fin de promover el crecimiento óptimo de las larvas y facilitar la transición a una digestión eficiente (Zambonino *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 2003). El conocimiento de la ontogenia del tracto gastrointestinal se ha logrado por la asociación de diferentes enfoques analíticos, desde la histología clásica hasta los enfoques moleculares, incluyendo inmuno-histoquímica y la bioquímica digestiva. Estos estudios han demostrado que las larvas de peces marinos constituyen un modelo animal muy interesante para estudiar las interacciones entre nutrientes (nutrición exógena) y los procesos de desarrollo.

1.5. Diferencias en el sistema digestivo de peces.

Para efectos prácticos, Dabrowski (1982) clasificó en tres categorías a los peces, considerando los principales eventos que tienen lugar durante el desarrollo de su sistema digestivo.

En un primer grupo, consideró a los salmonídos y algunos cíclidos, los que al inicio de la alimentación exógena presentan ya un estómago bien desarrollado y además funcional. Un desarrollo de este tipo determina que se puede iniciar la alimentación de estas especies directamente con dietas balanceadas.

En el segundo grupo se engloban la mayoría de los peces marinos, en los que el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo en algunas especies hasta cierto desfase entre su aparición y funcionalidad (Lauff y Hoffer, 1984).

En el tercer grupo se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida (agástricos). En este grupo se encuentran peces teleósteos de diferentes linajes, incluyendo algunas familias, como los Ciprinidae, Labridae y Gobiidae (Barton, 2007).

Los peces agástricos se definen de forma general por la ausencia de un estómago y no por la forma o función del sistema digestivo. Sin embargo esta pérdida no parece imponer restricciones dietéticas, lo que resulta en peces con una morfología similar pero con adaptaciones anatómicas y funcionales en su sistema digestivo que los capacita para digerir los diferentes tipos de alimento (Horn *et al.*, 2006; Alemán, 2011). Algunos peces agástricos herbívoros han sido descritos con un sistema de dientes faríngeos robustos, con los que realizan un proceso mecánico de digestión de los alimentos, compensando así la ausencia de estómago. Algunos de estos tienen un paso intestinal acelerado, a través de un intestino corto pero grueso (digestión tipo III) (Horn y Messer 1992). Otros peces agástricos herbívoros tienen tiempos de retención de alimento largos y aunque la digestión mecánica con sus dientes faríngeos no es tan eficiente, si hay una importante contribución de la fermentación microbiana para digerir una dieta rica en algas (Clements 1991; Montfort *et al.*, 2002; Skea *et al.*, 2005). Comparativamente existen pocos trabajos acerca de la fisiología digestiva de carnívoros agástricos. Aleman (2009) comparó varias especies de peces agástricos (Ciprinidae), encontrando diferencias significativas en los niveles de actividad de las enzimas digestivas y en los patrones de localización de éstas, entre una especie carnívora y cuatro herbívoras estrechamente relacionadas.

En un estudio de tres especies de atherinópsidos con diferentes hábitos alimenticios, encontraron diferencias significativas en el área de la superficie del intestino, tamaño de las microvellosidades y en el nivel y tipo de las actividades enzimáticas digestivas, sugiriendo que aún dentro de los peces agástricos y de intestino corto (al parecer características de la familia), los peces de hábitos herbívoros y carnívoros digieren de manera diferente sus respectivas dietas (Horn *et al.*, 2006).

Aunque a la fecha son limitados los estudios sobre el desarrollo del sistema digestivo de atherinópsidos (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Herrera-Vargas *et al.*, 2011; Chávez-Sánchez, inédito), al parecer estos organismos agástricos tienen un desarrollo de ontogenia indirecta. Es decir, su sistema digestivo completa su desarrollo y maduración durante la etapa larvaria, a semejanza de muchos peces marinos, posiblemente manteniendo esta característica de sus ancestros.

1.6. Algunos estudios en pejerreyes

1.6.1. Características de los huevos y su desarrollo.

El huevo de un pez puede ser considerado como un sistema semicerrado. Despues de la fertilización, las membranas del huevo se endurecen y se vuelven relativamente impermeables, pero todavía permiten el intercambio gaseoso. Como consecuencia, los embriones dependen de las reservas endógenas para obtener la energía destinada al desarrollo y crecimiento (Heming *et al.*, 1988). La fuente endógena de alimentación está constituida por el vitelo y el (los) glóbulo(s) de aceite. La composición nutricional de ambos es especie-específica y varía en función de la edad de la madre, el peso y la alimentación de ésta (Kamler *et al.*, 1976).

La tasa de absorción y la eficiencia de utilización del vitelo son determinantes en el desarrollo inicial, crecimiento y supervivencia de las larvas de peces. Sin embargo, tanto la tasa de absorción como la eficiencia son afectadas por diversos factores, tales como la temperatura, la luz, la concentración de oxígeno y la salinidad (Heming y Buddington, 1988; Crichigno *et al.*, 2012). Entre estos, la temperatura es uno de los factores ambientales con mayor influencia. Se ha reportado que existen intervalos óptimos de temperatura, en los cuales el desarrollo se efectúa de manera normal y con un nivel similar de eficiencia en la utilización del vitelo (Kamler *et al.*, 1998). En muchas especies de peces ha sido reportada una estrecha relación entre la temperatura de incubación y el desarrollo de los organismos (Pepin, 1991; Martell *et al.*, 2005., López *et al.*, 2010); aunque de manera general la tasa de desarrollo ontogénico es lenta a temperaturas bajas y se incrementa con el aumento de temperatura (Kamler *et al.*, 2002). En el pejerrey *Odontesthes bonariensis*, la temperatura del agua de cultivo no sólo afecta al desarrollo y la tasa de crecimiento de los organismos, sino también dirige el proceso de diferenciación sexual (Strüssmann y Patiño, 1995; Ito *et al.*, 2005). Por esta razón, el desarrollo de las larvas de pejerrey a diferentes temperaturas difiere cronológicamente (Minoprio, 1944; Muñiz Saavedra y Piacentino, 1991).

Por otra parte, dentro de los factores bióticos, uno de los más relevantes es el tamaño del huevo (Kamler *et al.*, 2002), el que depende de la nutrición de los reproductores, de su edad y talla y del estrés al que estén sometidos (Jobling, 1998; Morehead *et al.*, 2001). La mayoría de los peces marinos de ontogenia indirecta presentan huevos pequeños, en un intervalo de 600 a 2,000 μm de diámetro (Kiewek *et al.*, 2004)

Los ovocitos de los Atherinópsidos presentan la característica de poseer una cápsula externa (corión) totalmente transparente y recubierta por filamentos, que les permiten fijarse a un sustrato, como a la vegetación acuática (Minoprio 1944 y Chalde *et al.*, 2008). Los ovocitos recién liberados de *O. bonariensis* son de color amarillo verdoso, con un diámetro promedio de 1,68 mm, y en los cuales el vitelo

ocupa la mayor parte del volumen. En ese momento el vitelo presenta una serie de gotitas de aceite, con tamaños que van desde 30 hasta 250 micras y con 3-10 filamentos adherentes (Sensu Kunz, 2004) (Figura 5).



Figura 5. Ovocitos de *Odontesthes bonariensis* (Tomado de Chalde *et al.*, 2011).

Conte *et al.* (2009) encuentran una amplia distribución latitudinal del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) y ligeras diferencias en el tiempo de aparición de las estructuras embrionarias, pigmentación del huevo y el número de filamentos adherentes en estos, en relación a la temperatura y la ubicación de los organismos.

Las larvas de los pejerreyes eclosionan con una pequeña reserva de vitelo, que a una temperatura de cultivo de 20°C dura entre 3 y 5 días, pero tanto la cantidad de vitelo como el periodo en el que éste es consumido están en función de las temperaturas de incubación de los huevos y del cultivo de las larvas (Strüssmann y Takashima, 1989). Una vez reabsorbido el vitelo, la no suministración del alimento adecuado provoca mortalidades totales en el lapso de pocas horas (Ringuelet *et al.*, 1967).

1.6.2. Morfología del sistema digestivo.

Los antecedentes referidos al estudio del tracto digestivo de los pejerreyes son escasos y solo incluyen, para *O. bonariensis*, estudios sobre las características del tracto gastrointestinal y la longitud del intestino en juveniles (Ringuelet, 1942), así como las características de la cavidad bucofaríngea (Ringuelet *et al.*, 1980). La boca se encuentra constituida por premaxilares protráctiles, capaces de expandirse formando un embudo de gran superficie. El premaxilar posee dientes cónicos, dirigidos hacia atrás y dispuestos en hileras. La cavidad faríngea posee cinco pares de aberturas branquiales y los arcos branquiales presentan branquiespinas o branquictenias bien desarrolladas, con dentículos que conforman un rastillo branquial filtrante. Luego de la faringe se presenta un corto esófago, el cual se conecta directamente con el intestino. No tiene estómago, ni ciegos pilóricos. Todas estas características sugieren una alimentación basada en la ingestión de pequeñas partículas en suspensión (Ringuelet *et al.*, 1980).

Agelet *et al.* (2003) describen los diferentes tipos celulares que componen el sistema digestivo de juveniles del pejerrey *Odontesthes bonariensis*. La boca está formada por un armazón músculo-cartilaginoso. La cavidad bucal se encuentra revestida por un epitelio plano estratificado, con células caliciformes y corpúsculos gustativos. El premaxilar presenta pequeños dientes cónicos revestidos por el epitelio bucal. El esófago es un conducto corto músculo-membranoso. El esófago desemboca directamente en el intestino, no pudiéndose observar la presencia de un estómago. El tubo digestivo presenta tres túnicas; mucosa, muscular y serosa. Histológicamente, la mucosa intestinal presenta vellosidades y microvellosidades. Presenta un intestino corto dividido en tres regiones: anterior, de transición y posterior, de acuerdo a las características histológicas de la mucosa intestinal. En la región anterior las vellosidades son altas y están en gran número, ocupando casi por completo la luz intestinal. En el segundo tramo, la mucosa presenta vellosidades más delgadas. En la parte

posterior no se observaron vellosidades. La mucosa está formada por células columnares, con borde estriado de cepillo (microvellosidades), intercaladas con células caliciformes.

2. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la anatomía y fisiología digestiva de un organismo es importante para el desarrollo de nuevas tecnologías para el cultivo de una especie, ya que permite, entre varios aspectos, delimitar la temporalidad del período larval, en función del estado de desarrollo del sistema digestivo y entender los requerimientos alimenticios de la especie. Como consecuencia, puede ser factible establecer un calendario de alimentación basado en el conocimiento de la digestión eficiente del organismo, con lo que podría ser posible disminuir las elevadas tasas de mortalidad reportadas durante el periodo larval. Finalmente contribuyen a entender el modelo de maduración digestiva de las especies de interés.

Todo este conocimiento resulta crucial para especies como los atherinópsidos, ya que actualmente se presentan altas mortalidades en este período, dado que las características de su sistema digestivo parecen limitar el tipo de alimento balanceado que pueden aprovechar, sin afectar su desempeño. Aunque este trabajo describe el desarrollo del sistema digestivo de dos especies de atherinópsidos no nativos de nuestro país, sus similitudes con los atherinópsidos mexicanos, los peces blancos, permitirán aplicar y contrastar el conocimiento generado.

3. HIPÓTESIS

El desarrollo del sistema digestivo en los peces de ontogenia indirecta, que se caracteriza por tener 5 fases (embrionario, larvario, juvenil, adulto y senectud) y que presentan la mayoría de los peces marinos, se lleva a cabo durante el estadio larvario, a través de una serie de cambios histológicos y anatómicos que permiten la maduración de dicho sistema. Los pejerreyes, por su origen marino, presentarán una secuencia de cambios similar durante su desarrollo larvario, aunque con distinta temporalidad, por estar ya adaptados a un hábitat de agua dulce y por ser organismos agástricos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Realizar el estudio anatómico e histológico del sistema digestivo de dos especies de Atherinópsidos, *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes hatcheri*, durante su ontogenia larvaria temprana.

4.2. Objetivos particulares

Caracterizar por microscopia óptica el desarrollo del sistema digestivo de los pejerreyes *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*, durante la primer semana después de la eclosión.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención y mantenimiento de larvas.

El material biológico utilizado en este trabajo de investigación fue obtenido de la Universidad de Ciencias Marinas y Tecnología de Tokio. Los ovocitos fertilizados y las larvas fueron incubadas a la temperatura óptima para cada una de las especies, en un sistema de flujo continuo, a una salinidad de entre 0.3 a 0.5%.

La temperatura de incubación de los huevos de *Odontesthes bonariensis* fue de 21 °C; mientras que la del cultivo larvario fue de 23 °C. Para el caso de *Odontesthes hatcheri*, las temperaturas fueron de 19 y 21°C, para la incubación de huevos y cultivo larvario, respectivamente (Strüssmann *et al.* 1996; 1997; Ito *et al.*, 2005).

Las larvas fueron alimentadas, desde su eclosión y hasta el final del tiempo de cultivo, 7 días post-eclosión (DPE), con nauplios de *Artemia franciscana*, *ad libitum*, dos veces al día; a las 10 y a las 17 hr.

5.2. Obtención de muestras.

Para cada una de las dos especies de pejerrey, 32 organismos fueron muestreados diariamente, desde el día de la eclosión hasta el día 8 DPE en la mañana, antes de la primer alimentación.

5.3. Fijación.

Las larvas fueron anestesiadas en hielo. Posteriormente los organismos fueron fijados completos mediante la adición de 5 a 10 volúmenes de Solución de Bouin (mezcla de formaldehido, ácido acético y ácido pícrico, HT10132-SIGMA), por 24 horas a 4°C. Posteriormente los organismos fueron lavados tres veces en etanol al 70%, solución en la que se mantuvieron hasta el momento de su procesamiento.

5.4. Procesamiento histológico de las muestras

Los organismos fijados fueron colocados en moldes Tissue-Tek Uni-cassette # 4170, para ser introducidos en el procesador de tejidos Sakura (Modelo 4640-B). El proceso de deshidratación y aclaramiento se llevó a cabo en un tiempo de 19 horas; iniciando con soluciones de etanol a diferentes concentraciones (70%, 80%, 96%, 100%) y finalizando con el tratamiento en xilol. Posteriormente las muestras fueron embebidas en parafina en el embebedor de tejidos Leica (modelo Histoembedder).

Cortes histológicos longitudinales, de 5 μm de espesor, fueron realizados en las larvas, utilizando un microtomo de rotación. Los cortes fueron teñidos con la técnica Hematoxilina-Eosina-Floxina (H,E&F), la cual permite observar los rasgos generales de los tejidos. Posteriormente, las preparaciones histológicas fueron montadas con resina sintética.

Para realizar la descripción del desarrollo del sistema digestivo, se analizaron entre 6 y 9 larvas de cada edad, para cada una de las especies. La caracterización cualitativa de los distintos órganos del sistema digestivo de las larvas se realizó con la ayuda de un microscopio óptico Karl Zeiss Axioscop 20, con los objetivos de 10, 40 y 60X. La fotografías fueron tomadas con una cámara Q Imaging RoHS.

6. RESULTADOS

En el plano morfológico general, las larvas de las dos especies eclosionan rectas, presentan ojos pigmentados y desarrollados, aspecto importante para la captura de alimento cuando éstas pasen a la fase de destete.

Al igual que la mayoría de los peces óseos, la organización histológica del tracto digestivo de estas dos especies es similar y dependiendo de la región que se analiza, puede estar formado por cuatro capas concéntricas (conocidas también como túnicas): 1) la túnica mucosa, es la capa que da hacia la luz del tubo digestivo, constituida por el epitelio. Ésta es soportada por tejido conectivo laxo, conocido como lámina propia; 2) la túnica submucosa que es tejido conectivo, vasos y nervios; 3) la túnica muscularis (formada por una primer capa de tejido muscular circular y otra de músculo longitudinal, y finalmente 4) la túnica o capa serosa.

Día 0 (día de la eclosión)

En cuanto a las características anatómicas del canal alimentario al día cero, el tracto digestivo en ambas especies está formado por la cavidad oral, la faringe, esófago e intestino; no poseen estómago, ni ciegos pilóricos. El intestino es corto, característico de las especies de Atherinópsidos, y a la eclosión histológicamente está dividido en tres secciones: anterior, medio y posterior. Sin embargo se forma la primer asa o vuelta dentro de la cavidad y dependiendo de la posición, se llegan a observar cuatro porciones de intestino: anterior, medio anterior, medio posterior y posterior. En esta etapa se observan los órganos accesorios como hígado y páncreas. En las dos especies se observa la apertura del sistema digestivo, de la boca al ano.

El saco vitelino, en ambas especies, es abundante y está compuesto por el vitelo altamente acidófilo y el glóbulo de aceite, que se observa solamente como un espacio vacío en la parte interna del saco vitelino debido a que el contenido se pierde durante el procesamiento de las muestras. El saco vitelino está rodeado por

la capa sincial, que permite la reabsorción de las reservas para el desarrollo de la etapa larval. En este periodo las larvas se alimentan de las reservas del saco vitelino (Figuras 6 A y B).

En la **cavidad bucal**, los labios están revestidos por epitelio plano pseudoestratificado, que continúa en dos válvulas orales, la mandibular y la maxilar, constituidas por dos pliegues de epitelio, de una o dos células. Éstas controlan la entrada de agua y alimento al canal alimentario. El epitelio de la boca, que es continuación de los labios, y las válvulas, es plano y en esta etapa no se observan aún estructuras asociadas, tales como dientes, papilas gustativas o células caliciformes (Figuras 7 A y B).

La faringe de las dos especies se encuentra revestida de un epitelio plano simple, seguido de una capa de células de tejido conectivo laxo areolar y una capa de músculo circular. Se distinguen algunos cartílagos mandibulares y branquiales en desarrollo.

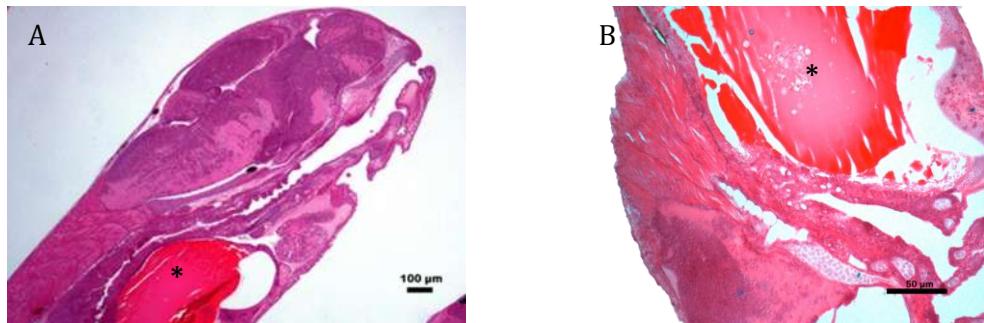


Figura 6. Corte Longitudinal (CL) de la cabeza de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B). La cavidad oral está abierta, formada por epitelio pseudoestratificado, músculo y cartílago, sin células caliciformes. Se observa la reserva del saco vitelino (*). H&E. Barra 100 y 50 μ m.

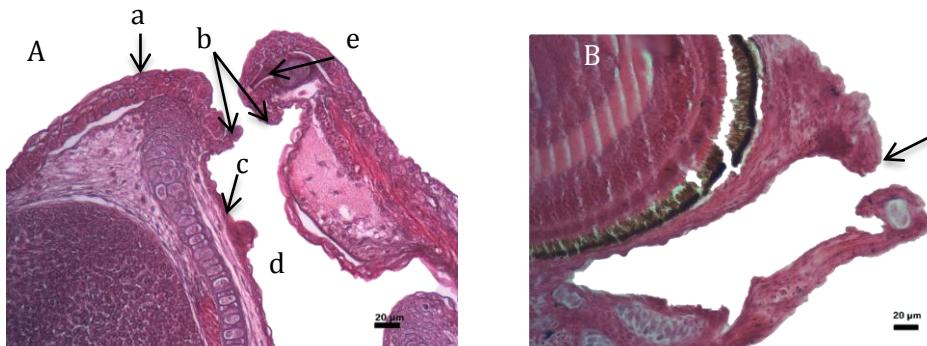


Figura 7. CL de la entrada a la **cavidad oral** de la larva del día 0 de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), en donde se observa epitelio pseudoestratificado antes de entrar a la boca (a), que continúa en dos válvulas orales, una maxilar y otra mandibular (b) para posteriormente convertirse en una sola capa de epitelio plano simple en la cavidad bucofaríngea (c); el epitelio se encuentra soportado por tejido conectivo y soportado por cartílago (d); se observa un diente embebido en la premaxila (e). H&E. Barra 20 μ m.

El esófago comunica a la cavidad bucofaríngea con el intestino anterior y en ambas especies se encuentra abierto. Histológicamente a esta edad es corto y estrecho. Presenta mucosa, submucosa, muscular y serosa. La mucosa formada por un epitelio cúbico pseudoestratificado, células caliciformes en toda su longitud, y la submucosa, por tejido conectivo laxo, con presencia de fibras nerviosas y vasos sanguíneos. La capa muscular está constituida por músculos estriados circulares y longitudinales, ubicados externa e internamente, respectivamente. La capa serosa se observa como una capa de tejido escamoso (Figura 8). No se presentan grandes dobleces del esófago en las larvas de esta edad. La transición de esófago a intestino se pone de manifiesto por la completa desaparición de las células caliciformes y la sustitución del epitelio esofágico pseudoestratificado por un epitelio cilíndrico simple con núcleos basales, conocido como epitelio columnar, que caracteriza la región anterior del intestino (Figura 8A y B).

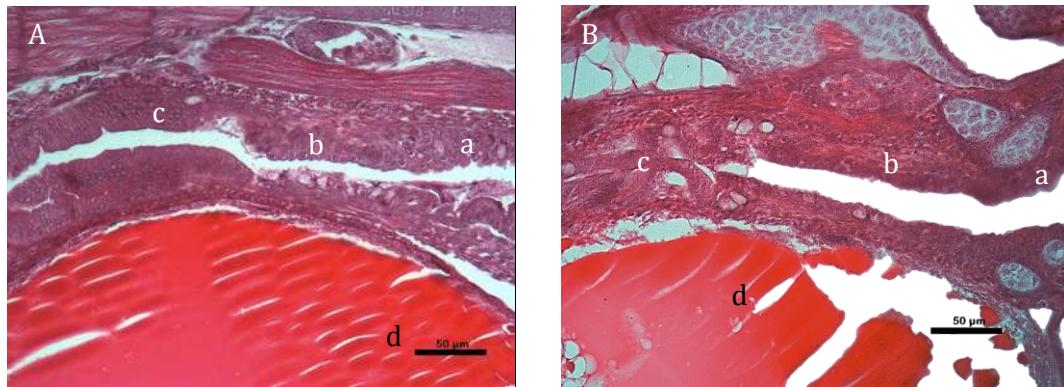


Figura 8. CL de la cavidad faríngea de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) al día cero. a) Faringe con epitelio cúbico-cilíndrico pseudoestratificado, sin células caliciformes ni papillas gustativas; b) esófago con epitelio cúbico pseudoestratificado, y células caliciformes; c) inicio del intestino con epitelio columnar simple; d) saco vitelino. H&E. Barra 50 μ m.

El intestino, al momento de la eclosión, se observa en posición dorsal al saco vitelino y diferenciado en 3 regiones; anterior, media y posterior. **El intestino anterior** comienza inmediatamente después del esófago y se encuentra localizado dorsalmente al hígado. En ambas especies el intestino da una vuelta para formar la primer asa, que pasa por la parte posterior del hígado y que da lugar al **intestino medio anterior**. Éste se continua con la tercera sección, **intestino medio posterior**, que se acomoda por debajo de la vejiga natatoria, de donde continua la cuarta sección, el **intestino posterior**. Histológicamente se conserva la misma estructura del **intestino anterior y medio** en ambas especies. La mucosa intestinal se encuentra revestida por un epitelio simple formado por células columnares (conocidas como enterocitos) con citoplasma acidófilo y núcleos basófilos alineados y adyacentes a la membrana basal. Este epitelio da hacia la luz del tubo digestivo y claramente se distingue un borde estriado de microvellosidades, seguido de lámina propia, la cual está formada por tejido conectivo laxo vascularizado. No existe submucosa por lo que enseguida se encuentra la túnica muscularis, que en la parte más externa consiste de una capa

de músculo liso o estriado, distribuida de manera circular (interior) y longitudinal (exterior). Finalmente se encuentra la túnica serosa, constituida por células mesoteliales y tejido conectivo laxo, con presencia de vasos sanguíneos. En ninguna de estas secciones se observa la presencia de células caliciformes. Las vellosidades se observan altas y en gran número, ocupando casi por completo la luz intestinal. No se observa alimento en ninguna de las especies (Figura 9A y B).

El intestino posterior es histológicamente similar al anterior y medio, distinguiéndose en que las vellosidades se encuentran en menor número y son más cortas y anchas. Los enterocitos de esta sección presentan vacuolas supranucleares absortivas (donde se lleva a cabo la pinocitosis), vacías, dado que los hallazgos sugieren que las larvas aún no inician su alimentación exógena (Figura 10). El intestino posterior termina morfológicamente en la **zona rectal**, la que posee un epitelio cuboidal simple y sin vellosidades. El recto es corto y rectilíneo. En ambas especies el orificio rectal ya está abierto, listo para cuando se inicie la alimentación exógena (Figura 11).

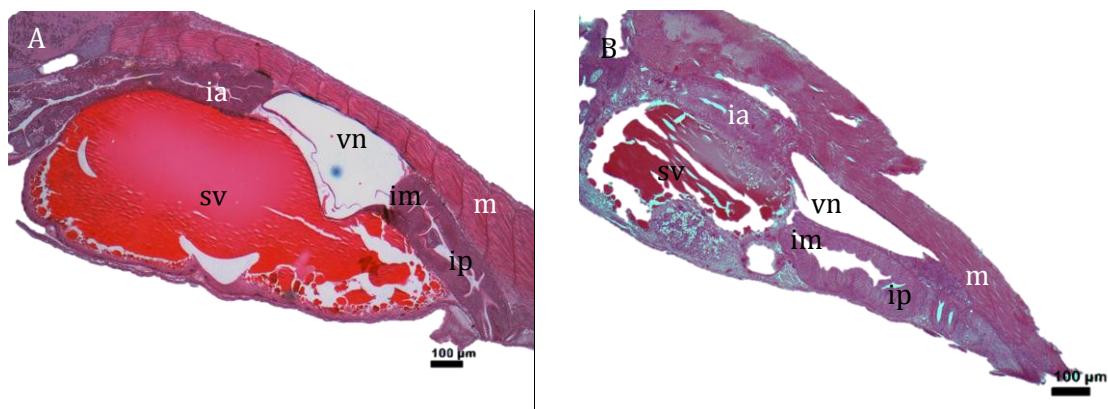


Figura 9. CL de una larva de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) al día cero, donde se observan el esófago y las regiones del intestino, la forma y tamaño de sus vellosidades. m-músculo; vn-Vejiga natatoria; ia-Intestino anterior; im-Intestino medio; ip-Intestino posterior; sv-Saco vitelino. H&E. 20X. Barra 100 μ m.

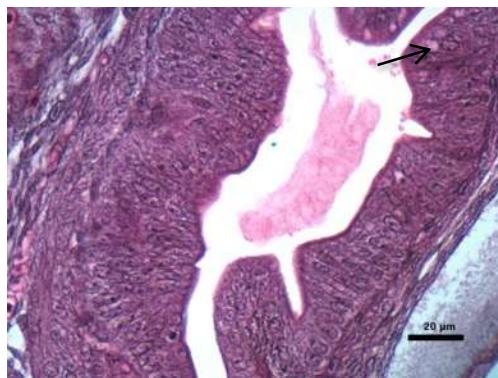


Figura 10. CL del intestino posterior de una larva de *O. hatcheri* al día cero, en el que se observan las vacuolas supranucleares absortivas vacías (flecha) (sin aún llevar a cabo pinocitosis). H&E. Barra 20 μ m.

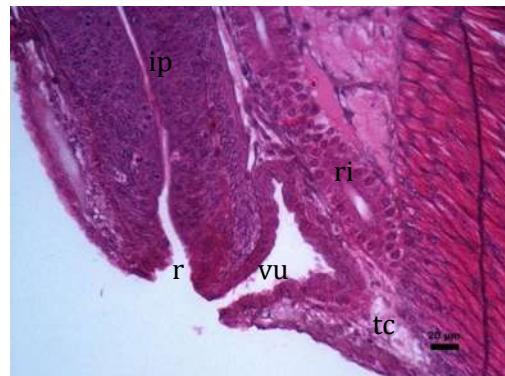


Figura 11. CL del intestino posterior y recto de una larva de *O. hatcheri* al día 0 de eclosión. ip-Intestino posterior; r-recto; vu-vejiga urinaria; tc-Tejido conectivo; ri-riñón. H&E. Barra 20 μ m.

Las glándulas accesorias del sistema digestivo son el hígado, páncreas y vesícula biliar. **El hígado** es uno de los primeros órganos en desarrollarse, al estar involucrado en la reabsorción de las reservas vitelinas. En las larvas recién eclosionadas de ambas especies de pejerrey, el hígado se observa bien diferenciado y distribuido lateralmente en la región anterodorsal de la cavidad celómica. Microscópicamente se observan hepatocitos, sinusoides hepáticos y canalículos biliares. El órgano está compuesto por un paquete de células esféricas basofílicas, con un prominente núcleo central basófilo, un claro nucléolo y un

citoplasma ligeramente eosinófilo. La posición del núcleo puede variar dependiendo de la cantidad de reservas acumuladas. Se observan los conductos hepáticos (canales biliares y pancreáticos) y algunos vasos capilares (Figura 12).

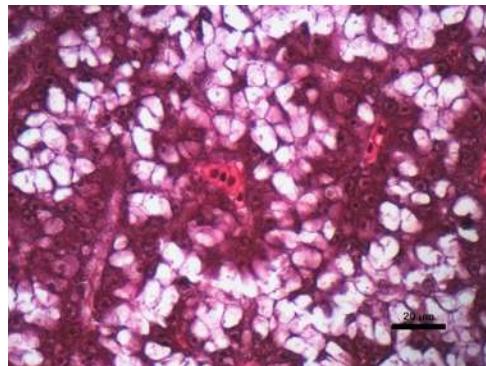


Figura 12. CL del hígado de *O. hatcheri* donde se observan los hepatocitos con reserva de tipo graso, canalículos biliares y capilares. H&E. Barra 20 μ m.

El **páncreas exocrino** (el tejido que se encarga de la síntesis de enzimas digestivas) y **endócrino** (el encargado de la síntesis de hormonas, como la insulina y el glucagón), se presentan en el día 0 como un pequeño grupo de células compactadas a un lado del hígado, en posición dorsal al intestino anterior y a lo largo del intestino. El páncreas exocrino se encuentra en pequeñas áreas soportadas por el peritoneo, en las que se distinguen pocos gránulos de zimógeno (precursores de enzimas digestivas). El ducto pancreático está compuesto por epitelio cúbico simple. Las células del páncreas exocrino no se observan formando los característicos acinos (en forma de racimo), en esta etapa del desarrollo larvario, si no en una masa compacta de células acinares. Se observa claramente el páncreas endócrino (Figura 13).

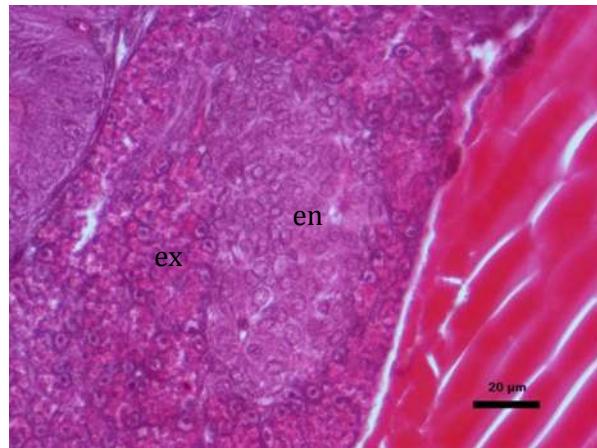


Figura 13. CL de sección de larva de *O. hatcheri* en donde se observa el páncreas exocrino (ex) y endócrino (en). H&E. Barra 20 μ m.

DIA 1

La reabsorción del vitelo y en consecuencia la reducción del saco vitelino en ambas especies es diferente ya que aparentemente *O. bonariensis* casi consume al día 1 todo el vitelo, comparado con *O. hatcheri* (Figura 14 A y B). Morfológicamente, la **cavidad oral y faringe** de las dos especies se observa sin cambios con respecto a la larva 0; sigue sin presentar dientes, papilas gustativas o más células caliciformes. La diferencia solamente es que el tamaño de las estructuras bucales, como mandíbulas, cartílago, músculo y elementos branquiales, que estaban presentes en el estadio anterior, va en aumento.

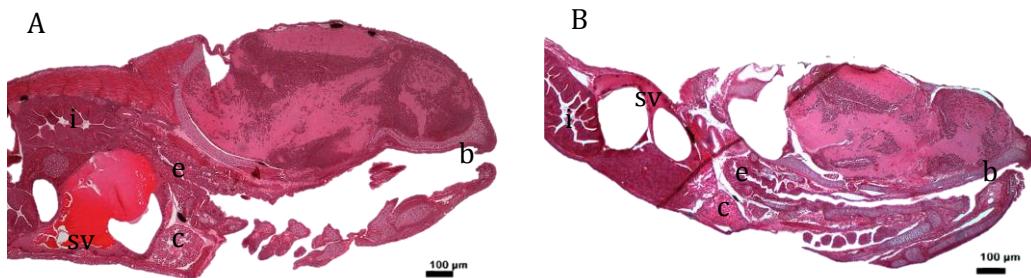


Figura 14. CL de la región anterior del tracto digestivo de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), al día 1 de post-eclosión. b-boca, e-esófago, i-intestino, c-corazón, H&E. 10X. Barra 50 µm.

El esófago de las dos especies se observa claramente diferenciado. Las células de la mucosa de este órgano comienzan un progresivo desarrollo, alargándose, pero manteniéndose como un epitelio pseudoestratificado. Intercaladas se encuentran células caliciformes, encargadas de mantener húmedo al epitelio que recubre el tracto digestivo. La transición entre el esófago y el intestino es todavía más clara que en la larva 0, ya que se observan algunos dobleces (Figura 15 A y B).

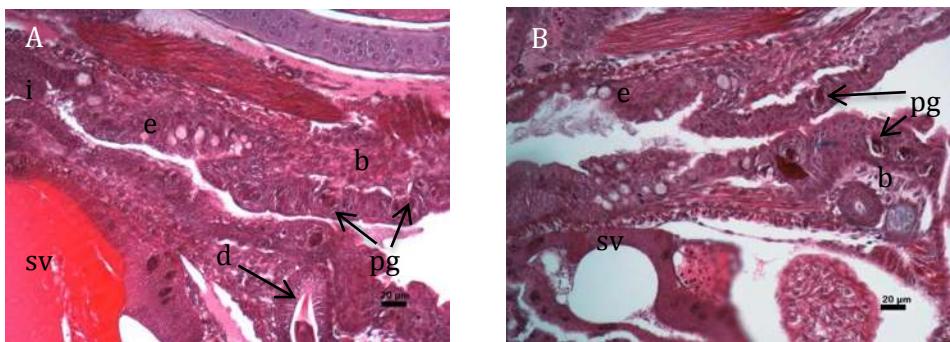


Figura 15. CL del esófago de una larva de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) al 1er día post-eclosión, caracterizado por la presencia de células caliciformes intercaladas con las células del epitelio esofágico y la transición entre esófago e intestino anterior. e-esófago; i-intestino; sv-saco vitelino; d-diente; pg-papilas gustativas. H&E. Barra 20 μ m.

Los primeros días de vida se caracterizan por un progresivo desarrollo morfológico de las estructuras del sistema digestivo. El desarrollo de las tres secciones del **intestino** continúa en ambas especies. La mucosa de todo el intestino presenta vellosidades en desarrollo, así como microvellosidades en los enterocitos; pliegues que en conjunto aumentan la superficie de digestión y absorción de los nutrientes. En este día todavía no se observa alimento en el lumen del intestino (Figura 16 A y B).

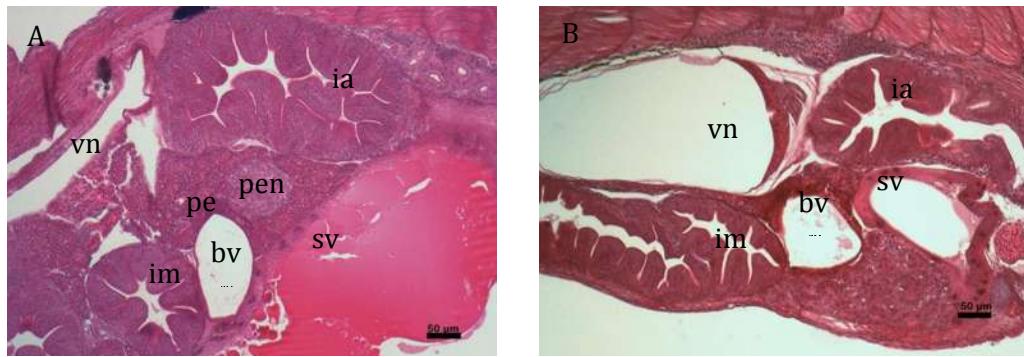


Figura 16. CL de larva de un día de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) en donde se observa la altura y ancho de las vellosidades del intestino medio y anterior, que además llenan casi completamente el lumen. ia-intestino anterior; im-intestino medio; vn-vejiga natatoria; pe-páncreas exocrino; pen-páncreas endócrino; bv-vesícula biliar. H&E. Barra 50 μ m.

El hígado aumentó de tamaño y se observa como un órgano alargado y compacto, mientras que el páncreas exocrino continúa con el aumento en el número y tamaño de las células acinares, a un lado del hígado y a lo largo del intestino, soportado por el peritoneo. No obstante, aún no está conformado en los característicos acinos de células piramidales pero se observa mayor cantidad de gránulos de zimógeno (Figura 17 a y b). El **páncreas endócrino** (Isleta de Langerhans) se observa claramente incluido en el páncreas exocrino.

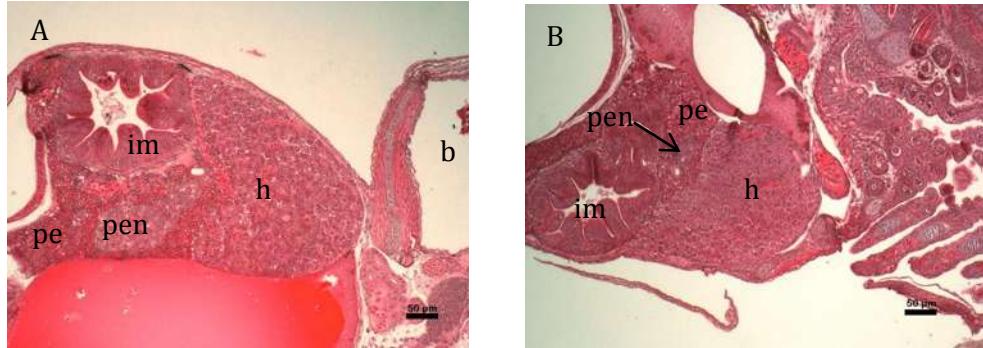


Figura 17. CL de larva de un día post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), en donde se observa la posición del hígado respecto al intestino. h-hígado; im-Intestino medio; pe-páncreas exocrino; pen-páncreas endocrino. H&E. Barra 50 μm .

DIA 2

En este día todavía el saco vitelino de las dos especies se observa con reservas, aunque más reducidas en *O. bonariensis* (Figura 18 A y B). En la **cavidad bucal** de ambas especies todavía no se presentan dientes externos, ni papilas gustativas aunque en *O. hatcheri* ya se observan algunas células caliciformes. En la **cavidad faríngea** de las dos especies ya se observan papilas gustativas y dientes, aunque aún embebidos (Figura 18 C y D).

La longitud del **esófago** se ha incrementado. La túnica submucosa permanece con pocas fibras y la túnica muscular es evidente, en donde se distinguen algunas fibras de músculo liso y estriado (Figura 18 C y D).

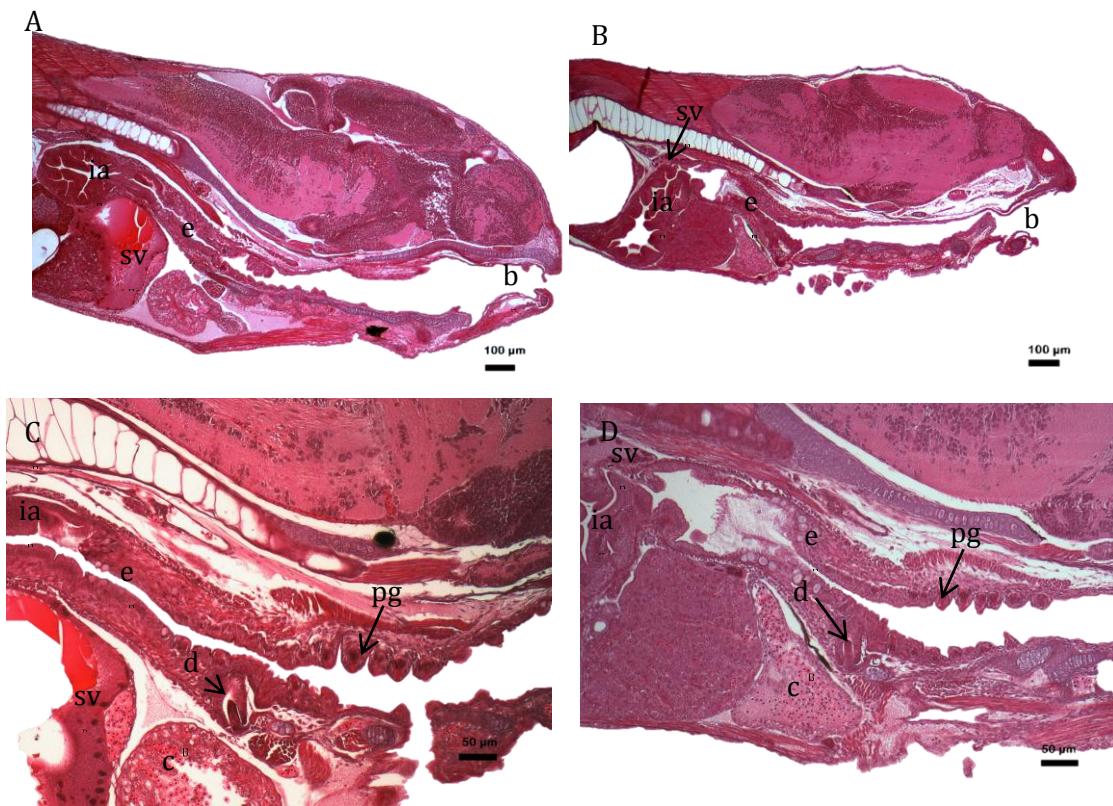


Figura 18. CL Estructura anatómica de la región bucofaríngea de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B) a los dos días después de la eclosión (DPE). Se observa el epitelio esofágico, con la presencia de células caliciformes y la transición de esófago al intestino anterior. H&E. 10X. Barra 100 μ m. Acercamiento de faringe y esófago de *O. hatcheri* (C) y *O. bonariensis* (D). b-boca, e-esófago, sv-saco vitelino, ia-intestino anterior, pg-papila gustativa, c-corazón, d-diente. H&E. Barra 50 μ m.

Al día 2 de post-eclosión continúa el proceso de diferenciación y alargamiento del **tubo digestivo** en ambas especies. En la mucosa intestinal se observa el aumento en el número y tamaño de las vellosidades; los cambios son mas pronunciados en la región anterior y media. En el intestino posterior las vellosidades son mas cortas y anchas (Figura 19A y B).

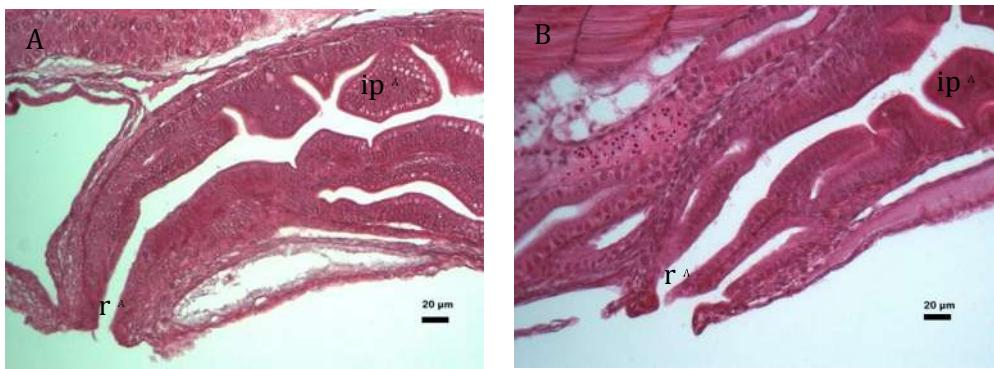


Figura 19. CL de larva de dos días post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), donde se observa la estructura histológica del intestino posterior (ip) y del recto (r). H&E. Barra 20 μ m.

El cambio en la estructura del **hígado** es mínimo, pues solo se presenta aumento en el tamaño del órgano. En el **páncreas exocrino** también se observa aumento en los gránulos de zimógeno y mayor número de células acinares a lo largo del peritoneo. En una sección del páncreas exocrino peritoneal se observa un islote de Langerhans.

DIA 3

En esta etapa del desarrollo larvario, el saco vitelino esta casi reabsorbido en ambas especies.

En la **cavidad bucal y faringea** de ambas especies han ocurrido algunos cambios. En *O. hatcheri* se presentan algunas células caliciformes. También se observa un aumento en el número de capas celulares de las túnicas que la recubren; tanto epiteliales en la mucosa, de tejido conectivo en la submucosa y de fibras musculares en la muscular. En *O. bonariensis* no se observan células caliciformes en la cavidad bucofaríngea pero aparecen varios brotes de papilas

gustativas.

La zona de transición del **esófago** a intestino no muestra modificaciones evidentes, respecto del día anterior, y aún no se detectan células caliciformes.

El **tracto intestinal** de *O. bonariensis* y *O. hatcheri* paulatinamente se va diferenciando, encontrándose diferencias en la altura y forma de las vellosidades en las distintas secciones. El intestino anterior y medio presenta vellosidades mas delgadas y con mayor altura, mientras que las del intestino posterior son mas anchas y de menor altura (Figura 20 A y B). No obstante, aparecen dos de los cambios mas relevantes encontrados. El primero, el hallazgo de abundantes residuos de alimento en el lumen del intestino, poniendo de manifiesto el inicio de la alimentación exógena. El segundo, la presencia de vacuolas de absorción de lípidos en los enterocitos, indicio de haber contenido lípidos que fueron solubilizados en el proceso de deshidratación de los tejidos. Las vacuolas de la sección anterior son más abundantes que las de la región media del intestino (Figura 20 C y D). Los enterocitos del intestino posterior muestran indicios de pinocitosis, en las dos especies.

Una vez iniciada la alimentación exógena (día 3 DPE), los hepatocitos aumentan en tamaño y número, y se observa un mayor grado de acumulación de reservas (probablemente lípidos). También se observa un aumento en el tejido exocrino del páncreas, así como en la cantidad de gránulos de zimógeno. En la parte endocrina se observan varios islotes de Langerhans.

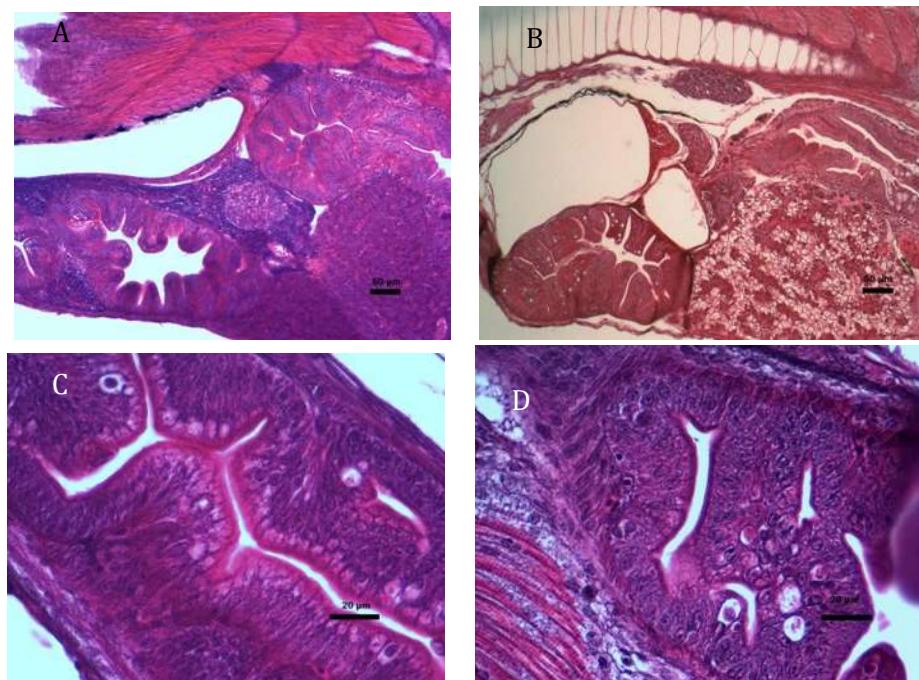


Figura 20. CL del intestino anterior y medio del intestino de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B); y CL de intestino posterior de *O. hatcheri* (C) y *O. bonariensis* (D) a los 3 días de eclosión, en donde se observa la presencia de células de absorción de proteínas H&E. Barra 50 y 20 μ m.

DIA 4

En *O. hatcheri* todavía se observa un pequeño remanente de saco vitelino, ya sin reservas. En la cavidad bucal de esta misma especie se observa la presencia de células caliciformes (células mucosas) y numerosas papilas gustativas en faringe, mientras que en *O. bonariensis* todavía no se presentan en la cavidad bucal las células de caliciformes pero si numerosas papilas gustativas en faringe (Figura 21

A y B). También se observaron cambios importantes en el esófago, que se alarga y expande con pliegues (criptas) hacia el lumen, la mucosa muestra en su epitelio estratificado una mayor cantidad de células mucosas.

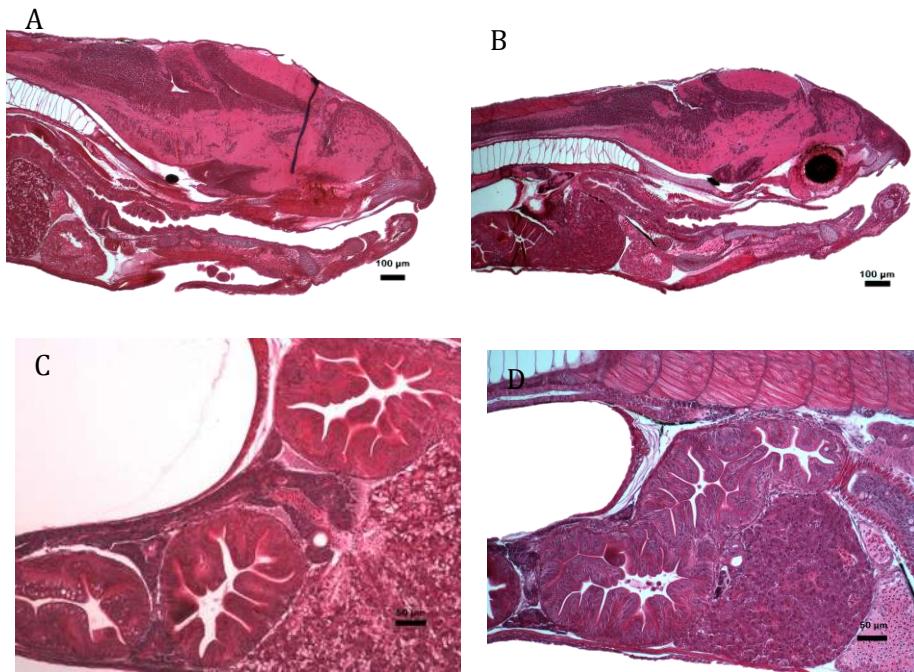


Figura 21. CL de cabeza de larva de 4 días post-eclosión de *O. hatcheri* (A) y *O. bonariensis* (B), y CL de intestino anterior y medio de *O. hatcheri* (C) y *O. bonariensis* (D). H&E. Barra 100 y 50 µm.

Se observa con mayor claridad la alimentación exógena, ya que hay residuos importantes de alimento en el lumen del intestino. El almacenamiento de reservas en los hepatocitos aumenta progresivamente, por lo que el nivel de vacuolización de su citoplasma, después del inicio de la alimentación exógena, se incrementa.

El páncreas endocrino se ve íntimamente relacionado con el páncreas exocrino; generalmente rodeándolo este último. No se presenta ningún cambio estructural en los dos tipos de tejido pancreático, excepto el aumento de tamaño.

En ambas especies se siguen observando las vacuolas digestivas en el intestino anterior y medio y un aumento de las células caliciformes. Sin embargo, las vacuolas pinocíticas (eosinófilas supranucleares) observadas en el intestino posterior de *O. hatcheri* presentan una actividad pinocitaria importante (Figura 21 C y D y Figura 22), contrario a lo observado en *O. bonariensis*, que presenta una menor actividad pinocítica.



Figura 22. CL del intestino posterior al cuarto día de eclosión de *O. hatcheri*, en el que se muestra claramente la actividad pinocitaria (flechas). H&E. Barra 20 μ m.

DIAS 5, 6 y 7

En este periodo ya no se observa variación en las estructuras que conforman el sistema digestivo; solo se observa un aumento en el número y tamaño de las células. En el intestino se continúan observando restos de alimento. Los elementos que conforman el aparato bucal y la cavidad faríngea muestran un mayor desarrollo. Hay aumento en las reservas del hígado y la presencia de pequeñas secciones de páncreas en el hígado, conformándose con ello el hepatopáncreas de estas especies. En esta etapa persisten las vacuolas digestivas en el intestino medio y la actividad pinocitaria en intestino posterior de *O. hatcheri* y en *O. bonariensis*.

7. DISCUSIÓN

Existe poca información sobre el desarrollo morfológico del sistema digestivo en larvas de peces agástricos (Meza *et al.* 2002) y de la existente, la mayoría deriva en estudios de bioquímica digestiva (Zambonino y Cahu, 2001). El patrón de desarrollo del sistema digestivo de larvas de *O. hatcheri* y *O. bonariensis* resultó similar al reportado en otras especies de peces en general; sin embargo varía el tiempo en el cual ocurren los diferentes eventos y la duración de las distintas etapas de desarrollo. Estas diferencias pueden reflejar la influencia de factores ambientales y nutricionales, tales como la temperatura y la disponibilidad de alimento, que en conjunto, influyen en el desarrollo larval (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007). Según Liem (1991), la aparición de transformaciones morfológicas responde a relojes internos de desarrollo y a adaptaciones funcionales que surgen como respuesta al ambiente externo. La temperatura determina el metabolismo larval, las tasas de crecimiento y el desarrollo de los órganos, así como también la relación entre el estadio de desarrollo y la talla de los ejemplares (Strüssmann y Patiño, 1995; Ito *et al.*, 2005).

Diversos estudios han determinado que los factores ambientales, entre ellos la temperatura, influencian el desarrollo larval de manera significativa (Strüssmann y Takashima, 1989; Lee *et al.*, 2011). En el caso de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, a pesar de que cada especie fue cultivada a una distinta temperatura (huevos de *O. bonariensis* se incubaron a una temperatura de 21 °C y las larvas fueron cultivadas a 23 °C; mientras que las temperaturas respectivas para *O. hatcheri* fueron de 19 °C y 21°C), al ser la óptima para cada una de ellas, el desarrollo se vio favorecido. Esto se reflejó en que tanto la secuencia de los cambios como la temporalidad fueron muy similares entre ambas especies.

Un aspecto importante a recalcar es que a pesar de que las especies de la familia Atherinopsidae son de origen marino, al contrario de muchas de las especies de este ambiente, que nacen con un sistema digestivo muy rudimentario, sin boca y con un tracto digestivo como un tubo anatómicamente indiferenciado (Yúfera *et al.*, 2007), *O. bonariensis* y *O. hatcheri* nacen con un sistema digestivo muy avanzado,

abierto de boca a ano, con un hígado, páncreas y vesícula biliar presentes y funcionales. Adicionalmente, el saco vitelino que presentan les dará los nutrientes necesarios para acabar de llevar a cabo su desarrollo y prepararlos en 3 a 4 días para la alimentación exógena. Estos hallazgos contribuyen al entendimiento del desarrollo ontogénico, tanto microanatómico como funcional, del sistema digestivo. El estudio de los factores que influyen en el desarrollo del sistema digestivo, aunado a estudios sobre la fisiología digestiva de la especie de interés, de sus estrategias de alimentación y del potencial de crecimiento de sus larvas, contribuirán al entendimiento de su alimentación y nutrición, con lo que será posible mejorar su supervivencia y abrir la posibilidad de desarrollar tecnologías de cultivo para peces con potencial acuícola (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004).

La caracterización de la organogénesis del sistema digestivo así como de la ontogenia enzimática son pasos fundamentales hacia una mayor comprensión de la fisiología nutricional de las larvas de peces (Segner, 1996). Gracias a la integración de estos estudios ha sido posible que se pueda establecer que tanto el sistema digestivo como la actividad enzimática de las larvas de peces están lo suficientemente desarrollados al momento de la primera alimentación para digerir el alimento (Segner *et al.*, 1993). Este es el caso de las dos especies que nos ocupan en el presente estudio. Aunque el tracto digestivo y las glándulas accesorias están presentes desde la eclosión, estos necesitan todavía continuar su desarrollo, por lo que los días subsiguientes se distinguen porque ocurre la diferenciación estructural del sistema digestivo y el crecimiento en tamaño y número de células de los órganos accesorios, la aparición de papilas gustativas, células caliciformes y dientes. Por ello, a pesar de que desde la eclosión ya se encuentra abierto todo el tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, no es hasta el 3er día de post-eclosión que por primera vez se encuentran residuos de alimento, a pesar de que a los organismos se les proporcionó alimento desde recién eclosionados. Esto sugiere que hasta ese momento los organismos completan la mínima funcionalidad de su sistema digestivo para la alimentación exógena. Estudios de bioquímica digestiva en estas especies reportan que las principales actividades digestivas están presentes desde los 7 DPE (Toledo-

Cuevas *et al.*, 2011; Herrera-Vargas, 2011) y estudios histológicos aún inéditos (Chávez-Sánchez *et al.*) también reportan un sistema digestivo totalmente formado a esta edad. En peces blancos, también pertenecientes a la familia de los atherinópsidos, agástricos y de intestino corto (Ross *et al.*, 2006), se han detectado actividades digestivas desde la eclosión (Hernández-González, 2014), pero la secuencia de desarrollo del sistema digestivo aún no ha sido estudiada. En peces gástricos, durante el proceso de transformación a juveniles, el sistema digestivo madura hasta la aparición y funcionalidad del estómago (secreción de pepsina y ácido clorhídrico) y ciegos pilóricos (en aquellas especies que los poseen) (Kapoor *et al.*, 1975), en una secuencia conservada pero con distinta temporalidad, dependiendo de la especie (Kapoor *et al.*, 1975; Zambonino *et al.*, 2008; Lazo *et al.*, 2011). Posteriormente, el desarrollo del tracto digestivo y sus órganos accesorios es igualmente en aumento de tamaño y número de células (Alarcón- López *et al.*, 2002). El desarrollo del canal alimentario se caracteriza por cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos que están sincronizados con procesos genéticos y medio ambientales (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004), preparándolo para la alimentación exógena.

Los peces agástricos compensan la carencia de estómago de varias formas. Una es a través de una elevada actividad enzimática citosólica y pancreática hasta la edad adulta (Walford y Lam, 1993; Moyano *et al.*, 1996). Tal es el caso de los peces blancos y los pejerreyes (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Herrera-Vargas, 2011; Hernández-González, 2014). Estas características son apropiadas para los hábitos alimenticios de las especies, que son zooplantófagas, porque la proteína animal es más digestible (Moyle y Cech, 2000).

En la mayoría de las especies de ontogenia indirecta y escaso vitelo, el inicio de la alimentación exógena se realiza sin tener un desarrollo importante del sistema digestivo y posiblemente ineficiente como para digerir dietas complejas, observándose altas mortalidades en larvas de muchas especies (Boiani *et al.*, 2003; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). De manera diferente, las larvas de peces de ontogenia directa nacen con los órganos del tracto digestivo altamente

diferenciados (Green y McCormick, 2001), teniendo al inicio de la alimentación exógena un sistema digestivo funcional. Los hallazgos de este trabajo, sobre la ontogenia del sistema digestivo de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, junto con los estudios de maduración digestiva (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Herrera-Vargas, 2011), sugieren que el desarrollo de estas especies es similar al de peces de ontogenia indirecta, pero con buena cantidad de reservas en su saco vitelino y como ya se mencionó, un sistema digestivo muy avanzado en su desarrollo. Esto podría explicarse como una más de las adaptaciones de estas especies de ancestros marinos al ambiente dulceacuícola, que adquieren algunas características de peces de agua dulce sin perder totalmente características de peces marinos (Strüssmann *et al.*, 1997). Por ejemplo, su gran adaptabilidad a distintas salinidades y su capacidad de sintetizar ácidos grasos altamente insaturados, incluso en cultivos en agua salobre (Fonseca *et al.*, 2012). Los hallazgos de este trabajo sugieren que tal vez, en su proceso evolutivo, al pasar de un ambiente marino al dulceacuícola, conservan su desarrollo de ontogenia indirecta pero “adquieren” una gran cantidad de vitelo y un mayor desarrollo del sistema digestivo. Fenómenos de plasticidad han sido observados en el pejerrey patagónico, debidos a la temperatura y a la alimentación, pero se sabe que están expuestos a diversos cambios ambientales y tróficos durante su ciclo de vida en condiciones naturales (Crichigno *et al.*, 2012).

En las larvas recién eclosionadas se diferenciaron cuatro zonas histológicamente distintas: cavidad oral, faringe, esófago e intestino. La variación histológica del sistema digestivo se debe a las funciones específicas de cada región u órgano, según el proceso digestivo que realiza (Tanaka, 1973 y Segner, 1996).

De acuerdo a la definición de Rivera *et al.* (2009), sobre el aspecto de los sacos vitelinos, las larvas recién eclosionadas de *O. hatcheri* presentaron un saco vitelino homogéneo ovoide; mientras que las de *O. bonariensis* presentaron un saco vitelino heterogéneo de menor tamaño. En el presente estudio, la absorción completa de las reservas endógenas se observó en *O. bonariensis* al día 2 DPE, mientras que para *O. hatcheri* ocurrió hasta el día 4º PE. Lo anterior está

relacionado con el tamaño de la larva y del saco vitelino. Aunque en el presente estudio no se hicieron mediciones en fresco del tamaño de las larvas, histológicamente se observó que las larvas de *O. bonariensis* son más pequeñas y con un saco vitelino más pequeño que las de *O. hatcheri*. La menor cantidad de reservas del saco de *O. bonariensis* hace suponer que estas larvas deben ser alimentadas rápidamente, muy cerca de su eclosión, lo que en la práctica se hace. Estudios indican que en peces la eclosión es disparada por cambios del medio ambiente durante el período embrionario; por lo tanto individuos hermanos pueden eclosionar en diferentes estado de desarrollo (Yamagami, 1988). Por otro lado, Crichigno *et al.* (2012), en su trabajo para conocer la variación morfológica temprana y la plasticidad fenotípica de *O. hatcheri*, mencionan que los cambios morfológicos se deben a la curvatura del cuerpo del pez sobre el saco vitelino y observaron que los peces que eclosionaron temprano, tenían sacos vitelinos más grandes que los individuos que eclosionaron más tarde. Al analizar los datos sugieren que los que se cultivaron a más altas temperaturas estaban más doblados sobre el saco vitelino y que esto es consistente con el consumo del vitelo observado en el trabajo con *Anarchias minor*, realizado por Sund y Falk-Petersen (2005). En el presente estudio se utilizaron las temperaturas de incubación y de cultivo que son adecuadas para cada especie, por lo que es posible que las diferencias en el tamaño de las larvas y en el de su saco vitelino sean específicas de las especies, a dichas temperaturas (Strüssmann y Takashima, 1989; Strüssmann *et al.*, 1996).

Para el día 3 PE se observó la presencia de alimento en las larvas, lo cual indica que se requieren de dos días para alcanzar la diferenciación morfológica mínima necesaria que les permita iniciar con la obtención y absorción de alimento exógeno. Esto significa que durante los primeros días después de la eclosión, ocurren cambios significativos en la estructura del tubo digestivo, que sentarán las bases para el pleno funcionamiento de la fisiología digestiva de las larvas (Stroband y Dabrowski, 1979; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004). Esta característica lleva a la conclusión de que las larvas de las dos especies son precoces

(madurados de antemano), lo que significa que después de consumir el vitelo, no necesitan cuidado parental y se pueden alimentar solas.

En ambas especies, la boca y la faringe tienen una posición subventral y están abiertas desde la eclosión; sin embargo todavía no presentan papilas gustativas, células caliciformes ni dientes, los cuales se van presentando a partir del día 2. Yúfera *et al.* (2007) mencionan que los peces marinos, con sistema digestivo rudimentario, presentan a la eclosión una cavidad bucal sin dientes, un esófago sin epitelio escamoso estratificado y que el intestino presenta un epitelio columnar monoestratificado. Recalca que resulta interesante descartar el aumento alométrico positivo de los órganos relacionados con la presa en los primeros días de alimentación.

El esófago presentó, en ambas especies, células globosas caliciformes. Estas células juegan un importante papel en la lubricación y protección contra el ataque de microorganismos (Zimmer *et al.*, 1992; Gisbert *et al.*, 2004). En el epitelio del esófago de otras especies se observaron células caliciformes conteniendo mucinas neutras, ácidas y mixtas (Sarasquete *et al.*, 1995; Ostaszewska, 2005; Yang *et al.*, 2010). En el presente trabajo no se realizó un análisis de las secreciones de las células caliciformes del esófago. Sin embargo, como mencionan Peña *et al.* (2003), en los estudios realizados en otras especies agástricas, las secreciones de células caliciformes del esófago sugieren un papel importante en la digestión agástrica. La aparición de esas células secretoras varía en las diferentes especies. En muchos peces marinos están ausentes a la eclosión, desarrollándose varios días después de la misma (Yúfera *et al.*, 2007)

En las larvas de *O. hatcheri* y *O. bonariensis*, dentro del período estudiado, se observó un incremento gradual en la longitud de los pliegues intestinales hasta el 7 DPE, y desde el día cero la presencia del borde de cepillo o microvellosidades en el intestino anterior, medio y posterior. Aunque éstas no son observadas claramente con el microscopio óptico, histológicamente su presencia se observa porque el borde de las vellosidades es más brillante e intensamente eosinófilo. Grosell (1999) describe las microvellosidades como estructuras apicales de las

células epiteliales entéricas que confieren más del 90% de la actividad de absorción, donde confluyen múltiples enzimas digestivas. Además menciona que estas estructuras pueden variar en altura y densidad según la especie y las condiciones nutricionales. La presencia de estas estructuras denota, una vez más, el avance en el desarrollo del sistema digestivo de la larva cero, aunque éste aún no sea totalmente funcional como para que las larvas comiencen su alimentación exógena.

Al inicio de la alimentación exógena las larvas de muchas especies son capaces de absorber lípidos por el epitelio intestinal. El intestino anterior y medio, implicado en la absorción de lípidos, se caracteriza por la presencia de inclusiones lipídicas en los enterocitos, considerado como lugar de almacenamiento temporal (Elbal *et al.*, 2004; Kowalska *et al.*, 2006). En ambas especies de pejerrey es evidente la presencia de vacuolas digestivas, con indicios de la presencia de gotas de grasa en los enterocitos y los residuos de alimento en el lumen del intestino, a partir del día 3 PE, lo que indica el inicio de la alimentación exógena. Vacuolas con lípidos han sido observados en otros peces antes de iniciar la alimentación exógena y se considera material almacén derivado del vitelo (Calzada *et al.*, 1998; García Hernández *et al.*, 2001). En este caso pueden provenir tanto del alimento endógeno, porque aún no han agotado las reservas vitelinas, y del alimento exógeno que comienzan a ingerir.

Durante la transición de la alimentación endógena a exógena, el intestino posterior tiene un papel nutricional básico, asegurando la absorción de proteínas en forma macromolecular, pero también está implicado en la asimilación de moléculas simples. En las dos especies estudiadas los enterocitos del intestino posterior muestran vacuolas supranucleares acidófilas, que ocupan la mayoría del espacio citoplasmático, lo que sugiere la absorción de proteínas por pinocitosis (Gisbert *et al.*, 2004; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). En ambas especies se detectaron vacuolas pinocíticas activas a partir del día 3 PE, y aunque en *O. hatcheri* la actividad es notoriamente más importante que en *O. bonariensis*, para ambas especies persiste hasta el 7º DPE. La captación de macromoléculas por

pinocitosis y su posterior digestión intracelular (por peptidasas citosólicas; Cahu y Zambonino-Infante, 2001) en el intestino posterior fue propuesta como el principal mecanismo de absorción de proteínas en ausencia de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986). La acumulación de estas vacuolas en el intestino posterior se ha observado en salmón del Atlántico (Urán *et al.*, 2008; Sahalman 2015), carpa (Noaillac-Depeyre 1973), Tilapia (Gargiulo, *et al* 1998). En atherinópsidos, la adquisición de proteínas por esta vía ha sido evidenciada por microscopía confocal (Teñorio-Patiño, inédito). Adicionalmente, en el pez blanco de Pátzcuaro y en las dos especies de pejerrey del presente trabajo, en condiciones de cultivo, se ha detectado una muy alta actividad de leucin alanin peptidasa (peptidasa citosólica), durante prácticamente toda su historia de vida, desde larvas hasta juveniles y en adultos (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Herrera-Vargas *et al.*, 2011; Hernández-González, 2014).

Las glándulas accesorias del sistema digestivo son el hígado, páncreas y vesícula biliar. Se ha reportado en muchos trabajos su papel en la digestión y almacén de metabolitos, detoxificación de compuestos dañinos, síntesis de proteínas y lipoproteínas, secreciones exocrinas y endocrinas, así como el almacén de sales biliares (Ikpegbu *et al.*, 2012). El hígado es uno de los primeros órganos en desarrollarse, al estar involucrado en la reabsorción vitelina. Al momento de la eclosión en *O. bonariensis* y *O. hatcheri* este órgano se observa diferenciado, distribuido lateralmente en la región anterodorsal de la cavidad celómica. Microscópicamente se observan hepatocitos, sinusoides hepáticos y canalículos biliares. Los hepatocitos no están arreglados en lóbulos como en otros vertebrados, sino de manera difusa. De acuerdo a Ikpegbu *et al.* (2012), este arreglo puede ayudar en las funciones especiales de detoxificación y almacén de metabolitos, pero también lo hace más propenso a daños tóxicos.

El tejido pancreático estuvo presente a la eclosión, en las especies estudiadas. Tal como se ha reportado en el bacalao (Morrison, 1993), la brema marina (Beccarai *et al.*, 1991), el salmón (Takahashi *et al.*, 1978), la cabrilla arenera (Pena *et al* (2003) y el salmón del Atlántico (Sahlmann *et al.*, 2015). El páncreas es

responsable de la síntesis de los precursores de las principales enzimas digestivas tales como las proteasas, amilasas, lipasas etc. De acuerdo a Okan Kamaci *et al.* (2010), la expresión de los genes de las enzimas pancreáticas debe ocurrir antes de la alimentación exógena, junto con el desarrollo de los gránulos de zimógeno, en preparación para la producción de enzimas.

La vesícula biliar también se observó en larvas recién eclosionadas de las dos especies de pejerrey. La presencia de este órgano sugiere la necesidad de regular la emulsión de los lípidos y facilitar la absorción por medio de los enterocitos del intestino (Anderson *et al.*, 2011), posiblemente los derivados del saco vitelino .

8. CONCLUSIONES

- a) Los pejerreyes *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* eclosionan con un sistema digestivo muy desarrollado. El tracto digestivo se encuentra totalmente abierto, desde la cavidad oral hasta el poro anal, y está conformado por la cavidad oral, la faringe, el esófago y el intestino; éste último divido en las secciones, anterior, media (media-anterior y media-posterior) y posterior.
- b) Las glándulas accesorias también se encuentran presentes; el páncreas y el hígado parecen estar ya funcionales y es notoria la vesícula biliar.
- c) Las larvas aún presentan saco vitelino (más abundante en *O. hatcheri* que en *O. bonariensis*), cuyas reservas energéticas y nutricionales (alimentación endógena) les permitirán continuar con su desarrollo, hasta el momento en el que comiencen a alimentarse exógenamente.
- d) En ambas especies se detectaron vacuolas lipídicas en intestino medio, pinocíticas activas en el intestino posterior y restos de alimento a partir del día 3 PE, indicando el inicio de la alimentación exógena.
- e) Los hallazgos claramente evidencian que todos los órganos del sistema digestivo terminan de diferenciarse durante el estadio larvario temprano, en la primer semana después de la eclosión, adquiriendo: dientes en las cavidades orales y faríngeas, papilas gustativas, células caliciformes, mayor área de digestión y absorción en el tracto a través vellosidades y microvellosidades, desarrollo de los tejidos endócrinos y exocrinos del páncreas (estos últimos posiblemente con mayor producción de zimógenos y hormonas) y del hígado.
- f) Los hallazgos sugieren que estos atherinópsidos parecen mantener el desarrollo del sistema digestivo de sus ancestros marinos y por tanto no eclosionan con un sistema digestivo totalmente funcional, como muchas especies de agua dulce, de ontogenia directa. No obstante, el sistema digestivo de los pejerreyes presenta un mayor desarrollo a la eclosión y por lo tanto el tiempo para alcanzar su completa diferenciación y funcionalidad es corto.
- g) Se recomienda realizar estudios enzimáticos para determinar si a pesar de contar con sistema un digestivo abierto, órganos y glándulas endócrinas y exocrinas accesorias, todavía les falta madurez para elaborar las enzimas digestivas necesarias, por lo que es hasta el día 3 PE en el que están listas para la alimentación exógena.

9. BIBLIOGRAFIA.

Alarcón-López, F.J. y M.I. Martínez-Díaz. 1998. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. *Aquatic* 5: 1-7.

Ash, R. 1985. Protein digestion and absorption. 69-93 pp. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press. Great Britain. Balon, E.K. 1975. Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Board. Can.* 32: 1663-1670.

Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 178-185.

Balon, E.K. 1986. Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life- history model. 11-24 pp. En: A.C. Simestad y G.M. Cailliet (eds.) *Contemporary studies of fish feeding: the proceedings of GUTSHOP 84*. California, U.S.A.

Basch, P.F. 1986. An alginate matrix double-embedding method for paraffin sectioning of minute specimens. *Stain Technol.* 61: 235-238.

Beheregaray LB, Levy JA (2000). Population genetics of the silverside *Odontesthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. *Copeia*: 441-447. [[Links](#)]

Beheregaray LB, Sunnucks P (2001). Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Mol. Ecol.* 10: 2849- 2866. [[Links](#)]

Beheregaray LB, Sunnucks P, Briscoe DA (2002). A rapid radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc. R. Soc. Lond.* 269: 65-73. [[Links](#)]

Bemvenuti MA (1995). *Odontesthes mirinensis*, sp.n. um novo peixe-rei (Pisces, Atherinidae, Atherinopsinae) para o extremo sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 12: 881-903. [[Links](#)]

Bemvenuti MA (2004). Los pejerreyes *Odontesthes* del sur de Brasil. In: *Jornadas del Pejerrey: aspectos básicos y Acuicultura*. Chascomús, Argentina, pp. 10-11.

Bengtson, D.A. (1993). A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 199-210.

Bisbal, G.A. y D.A. Bengtson. (1995). Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* 47: 277-291.

Blaxter, J.H.S. (1969). Development: eggs and larvae. 177-252 pp. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.) *Fish Physiology*. Vol. III. Academic Press. U.S.A.

Blaxter, J.H.S. (1988). Pattern and variety in development. pp 1-58. En: W.S. Hoar y D.J. Randall (eds.). *Fish Physiology*. Vol IX A. Academic Press. U.S.A.

- Boulhic, M. y J. Gabaudan. (1992). Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 102 : 373-396.
- Buddington, R.K., Doroshov, S.I. (1986). Structural and functional relations of the white sturgeon alimentary canal (*Acipenser transmontanus*). *J. Morphol.* 190: 201-213.
- Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. (1994). Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 109(2):213-222.
- Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. (1995). Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiological and Biochemical* 14:209-214.
- Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. (1997). Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International* 5:151-160.
- Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200:161-180.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Barbosa, V. (2003). Effect of dietary phospholipid level and phospholipid/neutral lipid ratio on development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed compound diet. *British Journal of Nutrition* 90(1):21-28.
- Cahu, C., Rønnestad, I., Grangier, V., Zambonino-Infante, J.L (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein, involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295-308.
- Calzada, B.A. (1996). Desarrollo postembrionario del intestino y órganos asociados de la dorada, *Sparus aurata* L., en cultivo. Estudio histológico y ultraestructural. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España. 258 pp.
- Calzada, A., Medina, A., González de Canales, M.L. (1998). Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J. Fish Biol* 53: 340-365.
- Cara, T.J.B., Moyano, J.F, Fernández, D.C, Yúfera, M. (2002). Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 110-121.
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas S, Fernández-Díaz C, Yúfera M (2003). Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol* 63: 48-58.
- Clements, D. K. y Choat, J. H. (1993). Influence of season, ontogeny and tide on the diet of the temperate marine herbivorous fish *Odax pullus* (Odacidae). *Mar. Biol.* 117: 213-220.
- Cowey, C.B. y Sargent, J.R. (1979). Nutrition. 1-69 pp. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.). *Fish Physiology*. Vol. VIII. Academic Press.
- Dabrowski, K. (1984). The feeding of fish larvae: present “state of the art” and perspectives.

Reprod. Nutr. Dévelop. 24: 807-833.

Dabrowski, K. (1986). Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. Comp. Biochem. Physiol. 85 A: 639-655.

Dabrowski, K. (1991). Dietary requirements for freshwater fish larvae in search of a common thread. pp. 9-10 En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) Larvi'91- Fish & crustacean larviculture symposium. European aquaculture Society, Special Publication No. 15, Gent, Belgium.

Dabrowski, K., Murai T., Becker, K. (1986). Physiological and nutritional aspects of intensive feeding of carp. 55-70. En: R. Billard y J. Marcel (eds.). Aquaculture of Cyprinids. U.S.A.

Dabrowski, K., H. Segner, R. Dallinger, S. Hinterleitner, C. Sturmbauer., Wieser. W. (1989). Rearing of cyprinid fish larvae: the vitamin C-minerals interrelationship and nutrition-related histology of the liver and intestine of roach (*Rutilus rutilus* L.). J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 62: 188-202.

Darias, M.J., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez G., Yúfera, M. (2007). Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. Histology and Histopathology 22:753-768.

Darias, M.J.; Mazurais, D.; Koumoundouros, G.; Glynatsi, N.; Christodouloupolou, S.; Huelvan, C.; Desbruyeres, E.; Le Gall, M.M.; Quazuguel P.; Cahu, C.L.; Zambonino-Infante, J.L. (2010). Dietary vitamin D₃ affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). Aquaculture 298, 300-307.

Davenport, H.A. (1960). Histological and histochemical techniques. W. B. Saunders Company. U.S.A. 401pp.

De Buen, F. (1953). Los pejerreyes (familia Atherinidae) en la fauna Uruguaya, con descripción de nuevas especies. Bol. Inst. Oceanogr. Univ São Paulo 4(1-2): 3-80. [[Links](#)]

Deplano, M., Diaz, J.P., Connes, R., Kentouri-Divanach, M., Cavalier, F. (1991). Appearance of lipid-absorption capacities of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. Marine Biology 108(3):361-371.

Dyer, B.S. (1993). A phylogenetic study of atheriniform fishes with a systematic revision of the South American silversides (Atherinomorpha, Atherinopsinae, Sorgentinini). Ph.D. Thesis, University of Michigan, Ann Arbor. 596 p. [[Links](#)]

Dyer, B.S. (1997). Phylogenetic revision of Atherinopsinae (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae), with comments on the systematics of the South American freshwater fish genus *Basilichthys* Girard. Misc Publ, Mus Zool, Univ Michigan 185: 1-64. [[Links](#)]

Dyer, B.S. (1998). Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical silverside family Atherinopsidae (Teleostei, Atheriniformes). In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZM Lucena, CAS Lucena, Eds. Edipucrs, pp.519-536. [[Links](#)]

Dyer, B.S. Chernoff B. (1996). Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). Zool J Linnean Soc, Lond 117: 1-69 [[Links](#)]

Dyer, B.S. Gosztonyi AE (1999). Phylogenetic revision of the South American subgenus *Austromenidia* Hubbs, 1918 (Teleostei, Atherinopsidae, *Odontesthes*) and a study of meristic variation. Rev. Biol. Mar. Oceanog. 34(2): 211-232.

Dyer, B.S (2000). Revisión sistemática de los pejerreyes de Chile (Teleostei, Atheriniformes). Estud. Oceanol. 19: 99-127. [[Links](#)]

Dyer, B.S (2003a). Family Atherinidae (Silversides). In: Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris (Orgs.) Edipucrs, RS, Brazil, pp. 513-514. [[Links](#)]

Dyer, B.S. (2003b). Family Atherinopsidae (Neotropical Silversides). In: Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. RE Reis, SO Kullander, CJ Ferraris (Org.) Edipucrs, RS, Brazil, pp. 515-525. [[Links](#)]

Dyer, B.S. (2006) Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). Biocell 30:69-88.

Gawlicka, A., Teh, S.J., Hung, S.S., Hilton, D.E., de la Noüe, J. (1995). Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. Fish Physiology and Biochemistry 14(5):357-371.

Gisbert, E., y Doroshov, S.I. (2003). Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). Aquatic Living Resources 16(2):77-89.

Gisbert, E., Rodríguez, A., Castelló-Orvay, F., Williot, P. (1998). A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. Aquaculture 167(3-4):195-209.

Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P., Castelló-Orvay, F. (1999). Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. Journal of Fish Biology 55(3):596-616.

Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E. (2004a). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture 232(1-4):455-470.

Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E. (2004b). Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. J. Fish Biology 64(1):116-132.

Govoni, J.J., G.W. Boehlert, Y. Watanabe. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fish. 16: 59-77.

Holt, G.J. (1993). Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. J. World Aquacult. Soc. 24 : 225-230.

Horn, H. K. (1989). Biology of marine herbivorous fishes. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.

27: 167 – 272.

- Horn, M.H, Gawlicka A.K, German, D.P, Logothetis, E.A., Cavanagh, J.W, Boyle, K.S. (2006). Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology* 149: 1237–1245.
- Iwai, T. (1967). The comparative study of the digestive tracts of teleost larvae-I. Fine structure of the gut epithelium in larvae of Ayu. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33: 489-496.
- Iwai, T. y M. Tanaka. (1968). The comparative study of the digestive tract of teleost larvae. III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 34: 44-48.
- Kjørsvik, E., T. van der Meer, H. Kryvi, J. Arnfinnso., P. G. Kvænseth. (1991). Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *J. Fish Biol.* 38: 1-15.
- Kjørsvik, E., A.L. Reiersen. (1992). Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) an indication of the timing of functionality. *J. Fish Biol.* 41: 1-19.
- Lazo, J.P. (1999). Development of the digestive system in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. Tesis Doctoral. The University of Texas at Austin. U.S.A. 212 pp.
- Leger, C. (1985). Digestion, absorption and transport of lipids. pp 299-331. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press. Great Britain.
- Mai, K., Yu, H., Ma, H., Duan, Q., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. (2005). A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology.* 67(4):1094-1106.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc. 3a ed. U. S. A. 600 pp.
- Reinecke, M., C. Müller., H. Segner. (1997). An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibres of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* (Teleostei). *Anat. Embryol.* 195 : 87-102.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis. M.T (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup, 1858. *Aquaculture* 179: 465-473.
- Rønnestad, I., Thørsen A., Finn, R.N. (1999). Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177: 201-216.
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernández-Cruz, C.M., Fernández, A., Fernández-Palacios, H. (1999). Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture* 179: 499-512.
- Rösch, R., Segner, H. (1990). Development of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. I. Growth, food digestion and fat absorption. *Aquaculture* 91: 101-115.

Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. (1997). Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155: 183-191.

Sale, F.P. (1991). The ecology of fishes on coral reefs. Academic Press, Inc. U.S.A. 754 pp.

Sarasquete, M.C., Polo, A., González de Canales, M.L. (1993). A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *Histochem. J.* 25: 430-437.

Sarasquete, M.C., Polo, A., Yúfera, M. (1995). Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130: 79-92.

Sarasquete, M.C., Polo, A., Pascual, E., Yúfera, M. (1993). Histochemistry of proteins, lipids and carbohydrates in the yolk of oocytes, eggs and larvae of seabream (*Sparus aurata*). 309-314 pp. En: B.T. Walther, y H.J. Fyhn (eds.). Physiological and biochemical aspects of fish development. Univ. of Bergen, Norway.

Sarasquete, M.C., González de Canales, M.L., Arellano, J.M., Muñoz-Cueto, J.A., Ribeiro L., Dinis, M.T. (1996). Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of the larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Histol. Histopathol.* 11: 881-888.

Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R. (1989). The lipids. 153-218 pp. En: J.E. Halver (ed.) Fish nutrition. Academic Press. U.S.A.

Segner, H. (1996). Nutritional physiology in fish larvae. 1-24 pp. En: J. Verreth (ed.). 6th. Int. Course of fish larvae nutrition (ERASMUS). May 6-14.

Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., von Poeppinghausen, K.J. (1989). Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* 35: 249-263.

Segner, H., Rösch, R., Verreth, J., Witt, U. (1993). Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.* 24 : 121-134.

Segner, H. y R. Rösch. (1998). Ontogeny of digestive and metabolic functions in *Coregonus lavaretus*. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 50 : 1-14.

Smith, L.S. (1989). Digestive functions in teleost fishes. 331-422 pp. En: J.E. Halver (ed.) Fish Nutrition. Academic Press. U. S. A.

Stroband, H.W.J., Dabrowski, K.R. (1979). Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. 355-376 pp. En: M. Fontaine (ed.) La nutrition des poissons. CNERNA. París.

Strüssmann, C.A, Choon,N.B, Takashima, F., Oshiro, T. (1993). Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *The Progressive Fish-Culturist* 55: 83-89. [[Links](#)]

Strüssmann, C.A, Patiño, R. (1995). Temperature manipulation of sex differentiation in fish. In: Proceedings of the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.

FW Goetz, P Thomas, Eds. FishSymp '95, Austin, Texas, pp. 153- 157. [[Links](#)]

Strüssmann, C.A, Calsina Cota, J.C, Phonlor, J.C, Higuchi, G., Takashima, F. (1996a). Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. Environ Biol Fishes 47: 143-154. [[Links](#)]

Strüssmann, C.A., Moriyama, S., Hanke, E.F., Calsina Cota, J.C., Takashima, F. (1996b). Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. J Fish Biol 48: 643-651. [[Links](#)]

Strüssmann, C.A, Takashima, F., Toda, K. (1996c). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture 139: 31-45. [[Links](#)]

Strüssmann, C.A., Akaba, T., Ijima, K., Yamaguchi, K., Yoshizaki, G., Takashima, F. (1997a). Spontaneous hybridization in the laboratory and genetic markers for the identification of hybrids between two atherinid species, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes) and *Patagonina hatcheri* Eigenmann. Aquaculture Res 28: 291-300. [[Links](#)]

Strüssmann, C,A, Saito, T., Usui, M., Yamada, H., Takashima, F. (1997b). Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. J Exp Zool 278: 167-177. [[Links](#)]

Tanaka, M. (1969). Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-I. Development of the digestive system during prelarval stage. Jap. J. Ichthyol. 16: 1-9.

Tanaka, M. (1971). Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-III. Development of the digestive system during postlarval stage. Jap. J. Ichthyol. 18: 164-174.

Tanaka, M. (1972a). Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-IV. Changes in the epithelium related to fat absorption in the anteromedian part of the intestine after feeding. Jap. J. Ichthyol. 19: 15-25.

Tanaka, M. (1972b). Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-V. Epithelial changes in the posterior-gut and protein ingestion. Jap. J. Ichthyol. 19: 172-180.

Tanaka, M., Kawai, S., Yamamoto, S. (1972). On the development of the digestive system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juveniles stage in ayu. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38: 1143-1152.

Tanaka, M. (1973). Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. Ph. D. Thesis. Kyoto University. Japan. 136 pp.

Tucker, J.W., Jr. (1998). Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. U.S.A. 750 pp.

Watanabe, T. (1988). Nutrition and growth. 154-197 pp. En: J.C. Shepherd y R.N. Bromage (eds.) Intensive fish farming. BSP Professional Books. Gran Bretaña.

Watanabe, T., Kiron, V. (1994). Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124: 223-251.

Yúfera M., Darias, M.J. (2007). The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 130: 477–487.