

Incorporación de Tecnología Tridimensional mediante Tomografía Microcomputarizada en el Estudio de la Anatomía de Salmónidos: Una Evaluación de Utilidad

Integration of Three-Dimensional Technology through Microcomputed Tomography in the Study of Salmonid Anatomy: A Utility Evaluation

Camilo Koch¹; Renato Salvatierra¹; Carolina Smok^{1,2} & Mariana Rojas¹

KOCH, C.; SALVATIERRA, R.; SMOK, C. & ROJAS, M. Incorporación de tecnología tridimensional mediante tomografía microcomputarizada en el estudio de la anatomía de salmónidos: Una evaluación de utilidad. *Int. J. Morphol.*, 42(4):929-935, 2024.

RESUMEN: Los salmónidos, durante su desarrollo, pueden experimentar ocasionalmente deformaciones esqueléticas. Para su diagnóstico se emplean diversas metodologías, entre las que se incluyen radiografías, técnicas histológicas, diafanización con tinciones de alizarina y azul de alcian, así como el uso del microscopio electrónico de barrido (SEM), cada una con sus inherentes ventajas y desventajas. Este estudio tuvo como finalidad evaluar y comparar la eficacia de la tomografía microcomputarizada (Micro-CT) para el análisis anatómico, reconstruyendo tridimensionalmente las imágenes y contrastándolas con los resultados obtenidos mediante la técnica de diafanización. Se analizaron las aletas caudales de cinco ejemplares de salmón *Oncorhynchus kisutch*: dos sujetos a diafanización y tres procesados para análisis mediante Micro-CT utilizando el equipo BRUKER SkyScan 1272. La técnica de Micro-CT demostró superioridad en la resolución de las estructuras óseas, facilitando una exploración detallada de las variaciones morfológicas y la distribución de la densidad mineral. Este enfoque permitió identificar anomalías en la morfología y crecimiento de las últimas vértebras y lepidotriquiás dorsales, así como una densidad incrementada en lepidotriquiás dorsales malformadas. La mayor resolución proporcionada por la Micro-CT no solo potencia nuestra comprensión de la ontogenia piscícola y su adaptación a ambientes diversos, sino que además inaugura perspectivas innovadoras para el estudio de la evolución de las estrategias locomotoras y las respuestas adaptativas frente a cambios ambientales a través del tiempo.

PALABRAS CLAVE: Aleta caudal; Lepidotriquiás; Rayos óseos; Micro-CT; Microtomografía computarizada; Densidad mineral; Diagnóstico rápido; Comparación de técnicas; Innovaciones en imagenología.

INTRODUCCIÓN

El salmón, con uno de los ciclos de vida más complejos entre los vertebrados (Noble *et al.*, 2018, 2020), experimenta la eclosión de las ovas y una etapa de vida juvenil en agua dulce, seguido de las etapas de crecimiento y de maduración, las que transcurren en el océano. Una vez alcanzada la madurez sexual, el salmón regresa a su hábitat inicial de agua dulce, para reproducirse (Noble *et al.*, 2018, 2020), y posteriormente morir, como es el caso del salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*). Este salmón se distingue particularmente por la plasticidad de su tejido óseo, el cual experimenta cambios estructurales y funcionales, frecuentemente asociados con la formación de un Kype y la migración halastásica de calcio en los machos (Witten *et al.*, 2015; Rojas Rauco *et al.*, 2016).

En la industria de la salmicultura, se han llevado a cabo numerosos estudios que emplean radiografías de rayos X para evaluar aspectos morfo-anatómicos de la columna vertebral de los peces (Witten *et al.*, 2001, 2015). Además, el microscopio electrónico de barrido (SEM) ha sido generalmente utilizado para examinar el tejido óseo, debido a su capacidad para proporcionar una alta resolución espacial, gran profundidad de campo, así como un extenso campo de visión (Shah *et al.*, 2019; Liao *et al.*, 2023).

El corte histológico seriado, pese a ser un método extensamente empleado en la investigación, presenta inconvenientes tales como la pérdida eventual de tejido y en algunos casos presencia de distorsiones, las que dificultan u

¹ Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Programa de Biología Integrativa. Laboratorio de Embriología Comparada, Santiago, Chile.

² Universidad de La Frontera, Facultad de Medicina, Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Temuco, Chile.

obstaculizan la reconstrucción tridimensional de las estructuras anatómicas. El problema del grosor limitado de las secciones histológicas, así como los desafíos técnicos asociados al manejo de material calcificado han restringido de manera importante el uso de las técnicas histológicas en estos estudios (Rojas Rauco *et al.*, 2016). No obstante, en nuestro laboratorio, hemos implementado las técnicas de diafanización y tinción con azul de Alcían y Rojo de Alizarina (Hanken & Wassersug, 1981) las que nos han posibilitado estudiar el tejido óseo del viscerocráneo, columna vertebral y aletas, permitiendo realizar evaluaciones tridimensionales de las muestras mediante el uso de una lupa estereoscópica o un microscopio invertido. Sin embargo, el prolongado tiempo de aplicación y análisis que requieren dichas técnicas entra a menudo en conflicto con la necesidad de obtener diagnósticos rápidos por parte de la industria salmonera. Ante estos desafíos, la tomografía microcomputarizada (Micro-CT) emerge como una metodología vanguardista, capaz de investigar tejidos mineralizados en cortos periodos, impulsando así el diagnóstico y la investigación.

Este estudio se propone: 1) Evaluar la aplicabilidad de la tecnología Micro-CT en la identificación de la morfología ósea en la aleta caudal de *O. kisutch*; 2) Contrastar estos hallazgos con aquellos derivados de la técnica de diafanización y tinción con rojo de Alizarina; y 3) Analizar la distribución y densidad mineral en los rayos óseos o lepidotriquiás de la aleta caudal.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se centró en la evaluación anatómica y composición de minerales de cinco especímenes de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), eutanasiados conforme a protocolos éticos aprobados por el Comité Ético-Científico de la Universidad de La Frontera, ACTA N° 061-20, utilizando una solución de Benzocaína al 5 % (BZ-20®, Veterquímica) a una concentración de 800 mg/l. Dos de los especímenes fueron sometidos a diafanización seguida de tinción con Rojo de Alizarina, mientras que los restantes se procesaron para análisis mediante tomografía microcomputarizada (Micro-CT, modelo BRUKER SkyScan 1272), tras fijarse en formalina al 10 % y ser adecuadamente preparados para garantizar la ausencia de humedad.

La configuración de escaneo de Micro-CT se optimizó para equilibrar claridad, tiempo y calidad de imagen. La adquisición de datos se llevó a cabo con una rotación de 360° de la muestra. El escaneo se realizó con una configuración específica que incluyó un voltaje de fuente de 40 kV y una corriente de 215 uA, utilizando un

tamaño de píxel de la cámara de 9.0 µm con un binning de 2x2, resultando en un tamaño de píxel de imagen de 10.000004 µm. La reconstrucción de las imágenes se realizó utilizando el software NRecon, versión 1.6.9.18. Se aplicó una corrección de artefactos de anillo y se ajustó la post-alineación a 18.50, optimizando así la claridad y precisión de las imágenes reconstruidas. No se utilizó ningún filtro en el Micro-CT durante el escaneo. Este enfoque fue apoyado por el uso de Python y sus librerías especializadas: NumPy, Scikit-image, Pandas, Matplotlib, y Seaborn en procesamiento de imágenes y análisis estadístico, empleando algoritmos específicos para la estandarización de imágenes, la segmentación basada en umbral y la medición cuantitativa de áreas de interés. En Python, aplicamos el cálculo del Rango Intercuartílico (IQR) con el objetivo de detectar y excluir los valores atípicos. Para la limpieza de la imagen para mejorar la detección de áreas de mineralización, utilizamos el siguiente código y obtuvimos 105 filas de mediciones de mineralización:

```
deteccion_limpia=morphology.remove_small_objects(deteccion,
min_size=10)
deteccion_cerrada=morphology.remove_small_holes(deteccion_limpia,
area_threshold=50)
```

La técnica de Micro-CT, complementada con análisis computacional avanzado, se revela como un enfoque prometedor para la investigación biomédica y ecológica, permitiendo la visualización y cuantificación detallada de la mineralización en tejidos duros. Este método ofrece una ventana única al estudio detallado de las adaptaciones óseas y minerales en salmónidos, contribuyendo significativamente a nuestra comprensión de su biología esquelética y abriendo nuevas vías para futuras investigaciones en biología y ecología acuática.

RESULTADOS

La utilización de la tomografía microcomputarizada (Micro-CT) en este estudio permitió la visualización detallada y tridimensional de la estructura ósea de la aleta caudal de salmónidos, desde múltiples ángulos (Fig. 1). Observamos la morfología de los huesos implicados en el plegamiento del lóbulo dorsal de la aleta, relacionados específicamente con las vértebras preurales 2 y la última vértebra, denominada *Centrum* (CC). Además, identificamos una proliferación excesiva de lepidotriquiás cortas, a las que denominamos lepidotriquiás accesorias, originadas desde las espinas neurales de la vértebra preural 2 (Fig. 2A). Estas estructuras presentan deformaciones tales como dobleces, curvaturas y fracturas, patrones similares observados en los huesos hipurales H4 y H3.

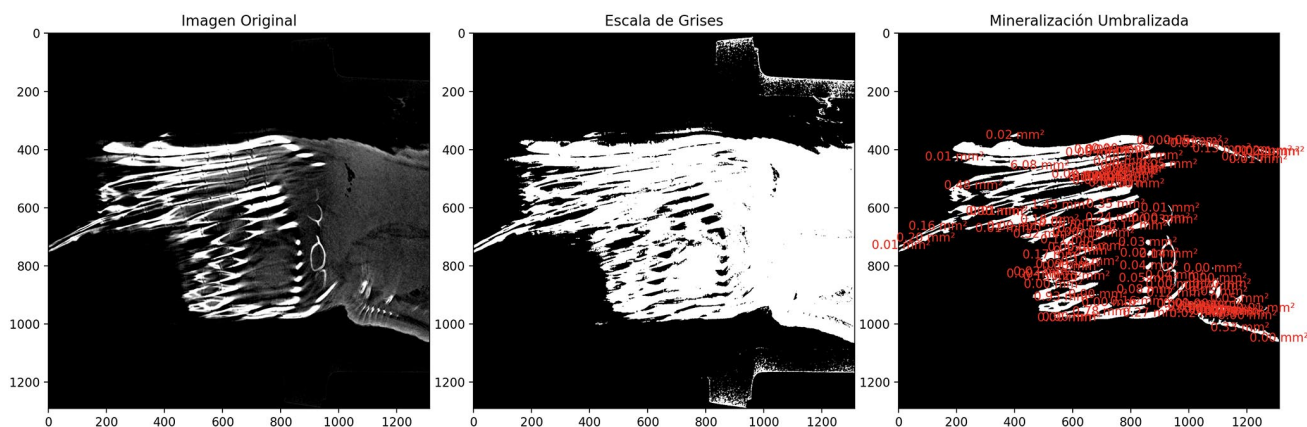


Fig. 1. **A.** Aleta caudal de Alevín de Salmón obtenida en el Micro-CT BRUKER SkyScan 1272, mostrando la estructura natural; **1B.** Imagen en Escala de Grises, resaltando los contrastes internos sin la influencia del color; **1C.** Imagen Umbralizada con Valores de Densidad Relativa separadas en dos grupos: perímetro y área, donde las áreas más claras indican mayor densidad, marcadas con anotaciones rojas para destacar las zonas de interés en la aleta caudal. El conjunto de datos analizado comprende un total de 105 elementos.

La técnica de diafanización complementada con tinción de Rojo de Alizarina (Fig. 2B) también reveló las aletas en tres dimensiones, permitiendo la observación de plegamientos de lepidotriquias, zonas interlepidotriquias,

segmentaciones y bifurcaciones. Esta técnica, aplicada al pez completo, resalta el tejido óseo mediante la afinidad del colorante por el calcio, evidenciando deformaciones y plegamientos en la aleta caudal.

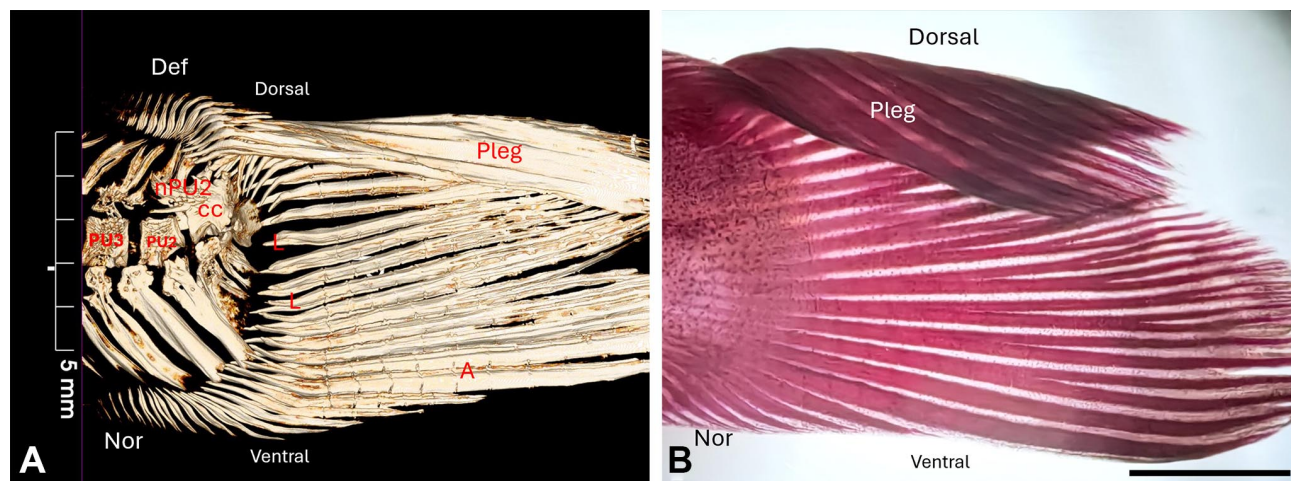


Fig. 2. Plegamiento y deformación de las lepidotriquias de la aleta caudal. **A)** Algunas de las lepidotriquias principales del lóbulo dorsal se han plegado (Pleg). Lo mismo ocurre con las lepidotriquias periféricas subyacentes que son más cortas y deformadas (Def). Lepidotriquias (L), vértebras preurales 3 (PU3), vértebras preurales 2 (PU2) y *Centrum* (CC). El arco neural de la vértebra preural (npu2) presenta un exceso de lepidotriquias que están dobladas. Se observa el lóbulo dorsal (L. dorsal) y el ventral (L. ventral). **B)** Imagen de una aleta caudal sometida al proceso de diafanización y tinción con Rojo de Alizarina (Barra de calibración: 5 mm para A y B).

Lepidotriquias y zonas interlepidotriquias. Las lepidotriquias, estructuras anatómicas rayiformes en la aleta, se destacan en la Figura 3. Estas estructuras, junto con las segmentaciones y bifurcaciones, están envueltas por un tejido óseo calcificado. La Figura 3 compara las lepidotriquias de la aleta caudal observadas mediante Micro-CT (Fig. 3A) y diafanización con tinción de Rojo de Alizarina (Fig. 3B). La diferencia clave entre estas técnicas es la capacidad del Micro-CT de revelar las zonas

de piel e interlepidotriquias, mientras que el Rojo de Alizarina resalta la abundancia de melanomacrófagos (Fig. 3B). Sin embargo, ambas técnicas ofrecen una visión clara de las lepidotriquias y sus bifurcaciones.

Morfología de las vértebras caudales, arcos neurales y hemales. La Figura 4 muestra una imagen de Micro-CT que ofrece una perspectiva lateral de la aleta caudal de un alevín con deformación dorsal. Es notable el reconocimiento de

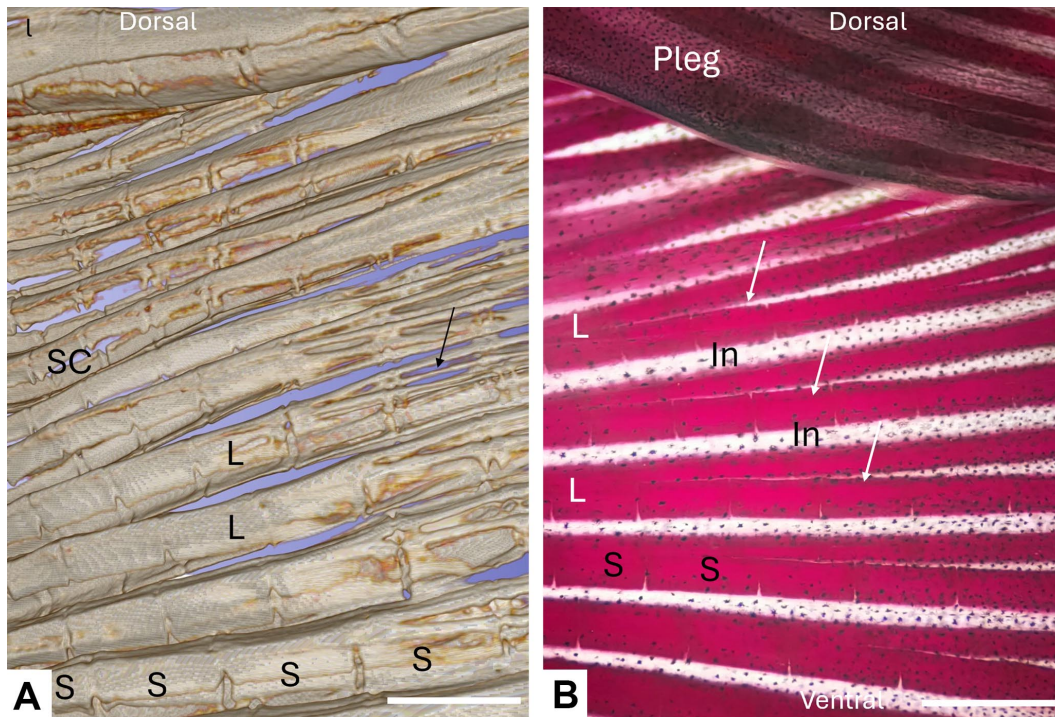


Fig. 3. Lepidotriquiias, interlepidotriquiias, segmentos y bifurcaciones de la aleta caudal. **A)** Imagen de Micro-CT. Las lepidotriquiias (L) están constituidas por segmentos (S), los que van aumentando en número a lo largo de la vida del pez, determinando el crecimiento en longitud de la aleta. Las lepidotriquiias también se bifurcan (ver flecha) generando de este modo el crecimiento a lo ancho de la aleta. En ocasiones se observan soluciones de continuidad (sc). **B)** Aleta caudal diafanizada y teñida con Rojo de Alizarina. Las lepidotriquiias poseen un revestimiento óseo calcificado (color rojo). Entre ellas se disponen las interlepidotriquiias (In), donde se observa la presencia de abundantes melanomacrófagos (ver inserto en B). Ejes dorso-ventral y antero-posterior indicados en el figurín de pez (Barra de calibración: 5 mm para A y B).

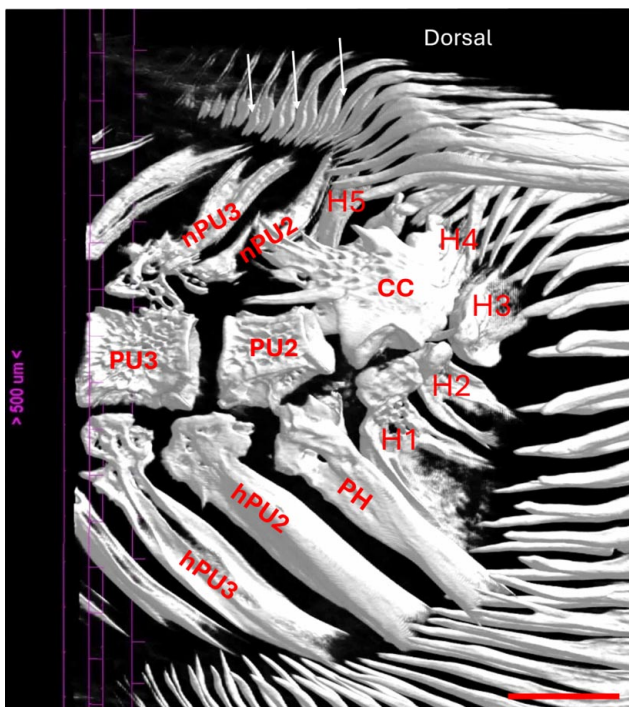


Fig. 4. Deformación de las vértebras caudales y de los arcos neurales. Imagen Micro-CT de aleta caudal de alevín ilustrando las vértebras preurales PU2, PU3 y CC. Desde la vértebra PU3 se originan los arcos hemales hPU3 y los neurales nPU3, en tanto que desde la vértebra PU2 derivan los arcos hPU2, nPU2 y PH. Desde la vértebra CC derivan H1, H2, H3, H4 y H5. Notar que los cuerpos vertebrales están constituidos por hueso esponjoso, formado por una malla de trabéculas longitudinales y transversales interconectadas. La deformación más evidente es la de CC y sus estructuras derivadas (Barra de calibración: 1 mm).

anomalías en la forma y crecimiento de las lepidotriquiás cortas, especialmente al comparar las dorsales con aquellas en la región ventral. El cuerpo vertebral *Centrum* (CC) muestra alteraciones significativas en forma y posición. Desde la vértebra preural 3 emergen los arcos hemales hPU3 y neurales nPU3, y desde la vértebra PU2, los arcos hemal hPU2 y neural nPU2, así como PH. Desde la vértebra CC se originan H1, 2, 3, 4 y 5. En este caso particular, el *Centrum* se presenta con una irregularidad notable, desviándose de la forma vertebral típica y desplazándose hacia la región dorsal. Esta vértebra y sus derivados, H5 y H4, generan numerosas lepidotriquiás principales que,

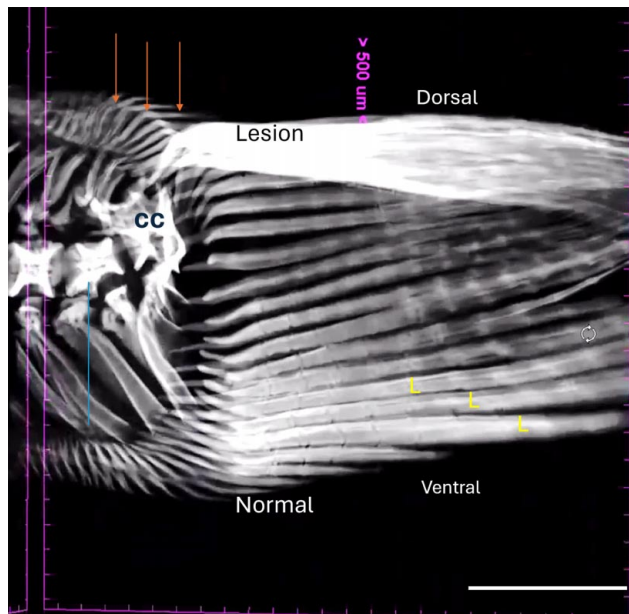


Fig. 5 Imagen Micro-CT de una vista lateral de aleta caudal. El centrum (cc) presenta una forma altamente irregular y se encuentra desplazado en dirección dorsal, generando una alteración en el orden de las lepidotriquiás. Las lepidotriquiás dorsales deformadas presentan una mayor densidad ósea (ver Tabla adjunta a la Figura) (Barra de calibración: 5 mm).

DISCUSIÓN

Utilidad de la tecnología Micro-CT en estudios anatómicos. El Micro-CT ha probado ser invaluable para identificar detalladamente estructuras óseas en alevines de salmón, especialmente en las aletas caudales, al revelar claramente deformaciones menores en las lepidotriquiás. Además, esta técnica ha permitido detectar cambios significativos en las últimas vértebras, como en la vértebra *Centrum*, e identificar fragmentos de tejido esponjoso, señalando alteraciones profundas en la estructura vertebral y los arcos neurales.

La tecnología Micro-CT permite mejorar la precisión y la claridad de las imágenes y ha sido corroborada en

además de presentar deformidades, tendencias a doblarse, fusionarse y fracturarse, muestran un incremento notable en diámetro. Asimismo, con la configuración de los valores $min_size=10$ y $area_threshold=50$, obtuvimos 43 elementos para Área Dorsal (mm^2), 43 elementos para Área Ventral (mm^2), 43 elementos para Perímetro Dorsal (mm), y 43 elementos para Perímetro Ventral (mm), los que fueron utilizados para medir densidad relativa ósea (0,422655) en las lepidotriquiás dorsales deformadas en comparación con las de la región ventral (0,125515), evidenciando variaciones significativas en la mineralización y estructura ósea (Fig. 6).

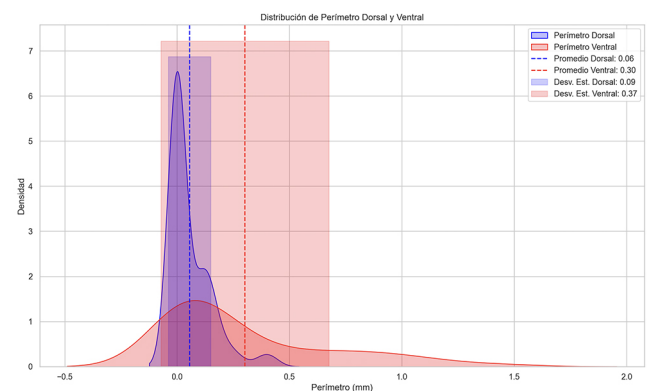


Fig. 6. Gráfico de densidad para el Perímetro Dorsal y Ventral. El gráfico sugiere que existe una diferencia en la distribución del perímetro entre las áreas dorsal y ventral. El promedio del perímetro dorsal es ligeramente menor que el del ventral, lo que podría indicar diferencias en la morfología o en la función de estas regiones. La variabilidad del perímetro, medida por la desviación estándar, es mayor en la región ventral, lo que sugiere una mayor heterogeneidad en las características de esta área. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar la variabilidad regional al evaluar la morfología del salmón, y podrían tener implicaciones significativas para el estudio de su biología y desarrollo.

trabajos previos por Liao *et al.* (2023) y Sakashita *et al.* (2019). La integración de esta técnica en el análisis morfoanatómico constituye un avance significativo para la comprensión detallada de la anatomía esquelética, la patología ósea y los procesos de mineralización en especies ícticas. Además, facilita el diagnóstico de transformaciones homeóticas en el esqueleto vertebral, provocadas por la activación inapropiada o la inactivación de genes homeobox debido a mutaciones, que resultan en el desarrollo anómalo de estructuras corporales.

El estudio de Cumplido *et al.* (2024) ilustra cómo los genes *hoxb13a* y *hoxc13a* ejercen un control específico sobre la morfología de la aleta caudal, regulando su longitud y simetría, y promoviendo la diferenciación entre los lóbulos dorsal y ventral. Este descubrimiento subraya el papel crítico

de la genética en la configuración estructural de la aleta caudal y sugiere una influencia directa sobre su densidad mineral. Tal hallazgo es un claro ejemplo de cómo el Micro-CT puede ofrecer perspectivas profundas en la intersección entre la genética, la anatomía y la biología del desarrollo de los salmónidos, abriendo nuevas perspectivas para la investigación de la evolución estructural y las adaptaciones funcionales en el reino acuático.

Comparación de Micro-CT con las técnicas de diafanización y tinción con Rojo de Alizarina. La comparativa entre la tomografía microcomputarizada y las técnicas tradicionales de diafanización seguida de tinción con Rojo de Alizarina desvela ventajas significativas de exploración estructural observacional ofrecidas por el Micro-CT, aunque a un precio económico más alto. El análisis mediante Micro-CT puede completarse en un lapso considerablemente breve, aproximadamente un día, no obstante, requiere la colaboración de especialistas en ingeniería para la reconstrucción tridimensional de las imágenes. Contrariamente, el método de diafanización y tinción, aunque económicamente más viable y capaz de evidenciar la presencia de minerales como el calcio y de células específicas en espacios interlepidotriquiás en este estudio de melanomacrófagos, demanda un período extendido para su aplicación, variando entre 5 días a varios meses dependiendo del tamaño de la muestra.

El empleo del Micro-CT para la visualización de estructuras esqueléticas en alta resolución permite una evaluación de la variabilidad estructural y la distribución de la densidad mineral de las muestras, marcando un avance en la comprensión de la adaptabilidad biológica y las estrategias evolutivas de los peces frente a cambios ambientales. Este enfoque concuerda con hallazgos de investigaciones previas, como las reportadas por Liao *et al.* (2023), que destacan la capacidad del Micro-CT para revelar con detalle variaciones óseas en función de la edad del pez. Adicionalmente, estudios comparativos sobre la morfología vertebral en teleósteos por Sakashita *et al.* (2019), así como el análisis exhaustivo de la estructura vertebral por Nordvik *et al.* (2005), reafirman la utilidad del Micro-CT en el delineamiento de la arquitectura ósea y su composición trabecular.

Nuestros hallazgos sobre las deformaciones observadas en la aleta caudal de salmónidos, atribuibles a variaciones en la morfología ósea de las vértebras caudales y huesos hipurales; subrayan la importancia del Micro-CT como herramienta avanzada de imagenología. Este método no solo facilita la identificación de alteraciones en el desarrollo óseo sino que también amplía nuestra comprensión sobre los mecanismos subyacentes a estas modificaciones,

proporcionando perspectivas valiosas sobre la influencia de factores genéticos y ambientales en la salud esquelética a lo largo del ciclo de vida de los peces.

CONCLUSIÓN

En vista de los resultados obtenidos en este estudio, es evidente que la implementación y perfeccionamiento de técnicas de tomografía microcomputarizada (Micro-CT) representan un avance en la investigación de la anatomía y patología ósea en peces, especialmente en salmónidos. Las visualizaciones detalladas y tridimensionales de estructuras óseas complejas provistas por esta tecnología, ha demostrado ser una buena herramienta para el entendimiento profundo de procesos de mineralización y deformaciones esqueléticas, ontogenia y adaptación de los salmónidos a sus ambientes naturales y de acuicultura.

Además, la aplicación de algoritmos avanzados para el análisis de datos obtenidos por Micro-CT ha permitido comparar las variaciones morfológicas y alteraciones en el tejido óseo mediante la radiodensidad presente en el tejido.

Mirando hacia el futuro, el refinamiento continuo de estas metodologías y el desarrollo de algoritmos más sofisticados permitirán avanzar en nuestro conocimiento sobre la biología ósea de los peces.

Este enfoque no solo mejora el conocimiento científico sobre los salmónidos, sino que también contribuye a prácticas sostenibles en la acuicultura y la preservación de ecosistemas acuáticos.

AGRADECIMIENTOS. Los autores desean agradecer el apoyo financiero de ANID a través del proyecto FONDEQUIP EQM 130028. Los autores agradecen a la experta María José Salas por su asistencia en el escaneo de las muestras. El Micro-CT BRUKER SkyScan 1272 utilizado en nuestro estudio pertenece a la Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

KOCH, C.; SALVATIERRA, R.; SMOK, C. & ROJAS, M. Integration of three-dimensional technology through microcomputed tomography in the study of salmonid anatomy: A utility evaluation. *Int. J. Morphol.*, 42(4):929-935, 2024.

SUMMARY: During their development, some species of salmonids may occasionally experience skeletal deformations. Several methodologies are currently being used for the diagnosis of such malformations, among which X-rays, histological techniques, diaphanization coupled either with Alizarin Red or Alcian Blue stains, as well as Scanning Electron Microscopy (SEM) can be mentioned. Each one of those methods presents inherent advantages and disadvantages. The purpose of this study was

twofold: Firstly, to evaluate and compare the effectiveness of microcomputed tomography (Micro-CT) technology for anatomical analysis, three-dimensionally reconstructing the obtained images; and secondly, to contrast those images with the results obtained through the diaphanization technique. The caudal fins of five specimens of the *Oncorhynchus kisutch* salmon were analyzed. Two specimens were subjected to diaphanization and three were processed for Micro-CT analysis, using the BRUKER SkyScan 1272 equipment. The Micro-CT technology demonstrated superiority in the resolution of bone structures, facilitating a detailed exploration of morphological variations, as well as the distribution of mineral density. This experimental approach allowed us to identify anomalies in the morphology and growth of the last vertebrae and dorsal lepidotrichiae, as well as an increased mineral density in the malformed dorsal lepidotrichiae. The higher resolution provided by Micro-CT not only enhances our understanding of the fish ontogeny and its adaptation to diverse environments, but also opens innovative perspectives for the study of the evolution of locomotor strategies and adaptive responses to environmental changes.

KEY WORDS: Caudal fin; Lepidotrichia; Bone rays; Micro-CT; Microcomputed tomography; Mineral density; Rapid diagnosis; Comparison of techniques; Innovations in imaging.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cumplido, N.; Arratia, G.; Desvignes, T.; Muñoz-Sánchez, S.; Postlethwait, J. H. & Allende, M. L. Hox genes control homocercal caudal fin development and evolution. *Sci. Adv.*, 10(3):eadj5991, 2024.
- Hanken, J. & Wassersug, R. The visible skeleton. A new double-stain technique reveals the native of the "hard" tissues. *Funct. Photogr.*, 16:22-6, 1981.
- Liao, W. N.; You, M. S.; Ulhaq, Z. S.; Li, J. P.; Jiang, Y. J.; Chen, J. K. & Tse, W. K. F. Micro-CT analysis reveals the changes in bone mineral density in zebrafish craniofacial skeleton with age. *J. Anat.*, 242(3):544-51, 2023.
- Noble, C.; Gismervik, K.; Iversen, M. H.; Kolarevic, J.; Nilsson, J.; Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.). *Welfare Indicators for Farmed Atlantic Salmon: Tools for Assessing Fish Welfare*. Tromsø, Nofima, 2018. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/225907892.pdf>
- Noble, C.; Gismervik, K.; Iversen, M. H.; Kolarevic, J.; Nilsson, J.; Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (Eds.). *Welfare Indicators for Farmed Rainbow Trout: Tools for Assessing Fish Welfare*. Tromsø, Nofima, 2020. Disponible en: <https://nofima.no/wp-content/uploads/2020/05/Welfare-Indicators-for-farmed-rainbow-trout-Noble-et-al-2020.pdf>
- Rojas Rauco, M.; Ramírez Maldonado, E. & del Sol, M. Morphological study and mineral analysis of the lower mandible of adult atlantic salmon (*Salmo salar*) from scotland with mandibular deformation. *Int. J. Morphol.*, 34(3):1097-104, 2016.
- Sakashita, M.; Sato, M. & Kondo, S. Comparative morphological examination of vertebral bodies of teleost fish using high-resolution micro-CT scans. *J. Morphol.*, 280(6):778-795, 2019.
- Shah, F. A.; Ruscsák, K. & Palmquist, A. 50 years of scanning electron microscopy of bone—a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Res.*, 7(1):1-15, 2019.

Witten, P. E. & Hall, B. K. Teleost skeletal plasticity: modulation, adaptation, and remodelling. *Copeia*, 103(4):727-39, 2015.

Witten, P. E.; Hansen, A. & Hall, B. K. Features of mono- and multinucleated bone resorbing cells of the zebrafish *Danio rerio* and their contribution to skeletal development, remodeling, and growth. *J. Morphol.*, 250(3):197-207, 2001.

Corresponding author:

Dra. Mariana Rojas
Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Programa de Biología Integrativa
Laboratorio de Embriología Comparada
Santiago
CHILE

E-mail: mrojasr@u.uchile.cl.