

EUGENOL Y MS-222 COMO ANESTÉSICOS UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN
DE REPRODUCTORES DE CAPAZ (*Pimelodus grosskopfii*) Y SUS EFECTOS
SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS ASOCIADOS AL ESTRÉS EN PECES.

EFRAÍN VARÓN SUAREZ

SANDRA LILIANA MORCILLO ORTIZ

CORPORACION UNIVERSITARIA DEL HUILA- CORHUILA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y CIENCIAS AFINES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

NEIVA

2017

EUGENOL Y MS-222 COMO ANESTÉSICOS UTILIZADOS EN LA MANIPULACIÓN
DE REPRODUCTORES DE CAPAZ (*Pimelodus grosskopfii*) Y SUS EFECTOS SOBRE
PARÁMETROS SANGUÍNEOS ASOCIADOS AL ESTRÉS EN PECES.

EFRAÍN VARÓN SUAREZ

SANDRA LILIANA MORCILLO ORTIZ

Informe final del trabajo escrito para optar al título de Profesional en Medicina Veterinaria
y Zootecnia

Orientadora

BEATRIZ ELENA ZAPATA BERRUECOS. Zooot, Esp, cMSc.

CORPORACION UNIVERSITARIA DEL HUILA- CORHUILA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y CIENCIAS AFINES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECHNIA

NEIVA

2017

ACEPTACIÓN

JURADO

JURADO

JURADO

DEDICATORIA

Al terminar nuestra carrera universitaria dedicamos nuestros esfuerzos, empeño y luchas durante toda la formación profesional a:

Nuestros padres; Sosimo Morcillo Bolaños, Adelia Cruz Ortiz, Rubiela Suarez Adamez, Efrain Varon Sierra, que incondicionalmente fueron un apoyo durante todo este proceso formativo. gracias por darnos fuerza, fortaleza para superar cada uno de los obstáculos y adversidades encontradas en el camino, por brindarnos ese cariño y amor incondicional, por la paciencia y comprensión.

Y demás familiares, especialmente a Mi tía, Carlota María Suarez por ese apoyo moral y económico durante mi formación profesional, por sus consejos y demás palabras de ánimo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Por ayudarnos a afrontar el día a día en nuestras vidas y permitir culminar esta etapa tan importante y crucial.

A nuestra tutora Beatriz Elena Zapata Berruecos, Zooot, Esp, cMSc. Por su excelente direccionamiento, entrega, exposición de conocimientos y por su ayuda desinteresada en el desarrollo de este proyecto.

A la Corporación Universitaria del Huila “CORHUILA” en su carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia, a todos los docentes de tan alto nivel con los que contamos a través de todo nuestro proceso formativo por cada una de sus enseñanzas y experiencias compartidas, en especial al profesor Eduardo Castillo Losada, Médico Veterinario y Zootecnista, encargado del área de Piscicultura de la Universidad CORHUILA.

A la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos, de la Universidad Surcolombiana y al Convenio de Cooperación Ciencia y Tecnología 707 de 2015 EMGESA-USCO, por disponer de sus instalaciones y recursos para la evaluación de la fase experimental de este proyecto.

De igual manera, queremos mostrar agradecimiento aquellas personas que de una u otra manera se han considerado partícipes en este trabajo, por su amistad y entrega desinteresada para el desarrollo de esta tesis.

¡Muchas gracias a todos...!

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	11
OBJETIVOS	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 1	14
USO DE ANESTÉSICOS EN ACUICULTURA Y SUS EFECTOS SOBRE EL ESTRÉS EN PECES.....	14
Generalidades de los silúridos	14
Generalidades de la especie	14
Capaz (<i>P.grosskopfii</i>)	14
Características morfológicas.....	15
Reproducción y ciclo de vida.....	15
Importancia comercial	15
Generadores de estrés y respuestas fisiológicas en peces	16
Principales generadores de estrés.....	16
Estrés social.....	17
Estrés nutricional.....	17
Estrés traumático.....	18
Fisiología del estrés.....	18
Efectos del estrés en la reproducción.	20
Efectos de estrés sobre las gonadotropinas.	21
Uso de anestésicos en acuicultura.....	22

Principales Anestésicos usados en acuicultura.....	23
Composición general de la sangre	25
Parámetros hematológicos asociados al estrés.....	25
Alteración en los parámetros sanguíneos (Hematocrito, Hemoglobina y Glucosa) asociados al estrés.	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2	39
EVALUACIÓN DE DOS SUSTANCIAS ANESTÉSICAS EN REPRODUCTORES DE CAPAZ (<i>Pimelodus grosskopfii</i>).	39
RESUMEN	39
INTRODUCCIÓN.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Localización.....	41
Pesca, selección y adaptación de los peces.....	41
Parámetros de calidad de agua.....	41
Preparación de anestésicos.....	42
Metasulfato de tricaina (MS-222).	42
Aceite de clavo (Eugenol).	42
Pruebas con etanol.	42
Definición de los planos de anestesia	43
Unidades experimentales.	44
Determinación de tiempos de inducción y recuperación.	44
Análisis de datos	45
RESULTADOS	46
Definición de los planos de anestesia en inducción y recuperación.....	46
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
CAPÍTULO 3	65

EFFECTO DE DOS SUSTANCIAS ANESTÉSICAS SOBRE PARAMETROS SANGUÍNEOS ASOCIADOS AL ESTRÉS EN CAPAZ (<i>Pimelodus grosskopfii</i>)	65
RESUMEN	65
INTRODUCCIÓN	66
MATERIALES Y MÉTODOS	68
Pesca, selección y adaptación de los peces.	68
Química sanguínea.....	68
Animales sometidos a estrés sin uso de anestesia.....	68
Animales sometidos a estrés con anestesia.	69
Determinación de parámetros sanguíneos.	69
-Microhematocrito.....	69
-Hemoglobina.....	70
-Glucosa	70
Análisis de datos	71
RESULTADOS	72
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	83
ANEXOS REGISTRO FOTOGRÁFICO	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiempos de inducción a la anestesia en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos se reportan para los planos I, II y III de anestesia.	48
Figura 2. Tiempos de recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (<i>Pimelodus grosskopfii</i>), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos de recuperación se reportan para los planos I, II, III, IV, V.	50
Figura 3. Tiempos de inducción y recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos se reportan para el plano III de inducción y plano 5 de recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales ($P<0.05$).....	51
Figura 4. Tiempos de inducción a la anestesia en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos se reportan para los planos I, II y III de anestesia.	53
Figura 5. Tiempos de recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos de recuperación se reportan para los planos I, II, III, IV, V.	54
Figura 6. Tiempos de inducción y recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (<i>Pimelodus grosskopfii</i>), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos se reportan para el plano III de inducción y plano V de recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales ($P<0.05$).	55
Figura 7. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando como anestésico eugenol. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).	73
Figura 8. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), sin utilizar eugenol. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).	74
Figura 9. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), utilizando como anestésico MS-222. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).	75
Figura 10. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), sin utilizar MS-222. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).	76
Figura 11. Relación entre el peso de los reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>), y las diferentes variables evaluadas.....	78

TABLA DE TABLA

Tabla 1. Planos de anestesia en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>).....	43
Tabla 2. Planos de recuperación en reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>).....	44
Tabla 3. Tratamientos experimentales para determinación de tiempos de inducción y recuperación de reproductores de capaz (<i>P. grosskopfii</i>) utilizando eugenol y MS-222 como anestésicos.....	45
Tabla 4. Tiempos de inducción y recuperación para capaz (<i>P. grosskopfii</i>) anestesiados con Eugenol, evaluando 5 concentraciones anestésicas. Los datos se presentan como la media± desviación estándar. n: número de animales tratados. Letras diferentes entre columnas significan diferencias significativas ($P<0.05$) entre las dosis evaluadas.	47
Tabla 5. Tiempos de inducción y recuperación para capaz (<i>P. grosskopfii</i>) anestesiados con MS-222, evaluando 5 concentraciones anestésicas. Los datos se presentan como la media± desviación estándar. n: número de animales tratados. Letras diferentes entre columnas significan diferencias significativas ($P<0.05$) entre las diferentes dosis evaluadas.	52
Tabla 6. Variables evaluadas (hematocrito, hemoglobina y glucosa) en diferentes tiempos de muestreo para reproductores de capaz sometidos a estrés utilizando eugenol o MS-222 y sin la utilización de anestésico. T1= Animales estresados sin Anestesia (Eugenol); T2= Animales estresados con Anestesia (Eugenol); T3= Animales estresados sin Anestesia (MS-222) y T4= Animales estresados con Anestesia (MS-222).....	77

INTRODUCCIÓN GENERAL

En la piscicultura, existen actividades que provocan un alto nivel de estrés en los peces, entre estos: la pesca, empaque, transporte y actividades de reproducción en cautiverio (Chrousos y Gold, 1992). El estrés es una respuesta normal del organismo, el cual se encarga de re direccionar aspectos metabólicos y celulares frente a situaciones adversas (Flores, 2002). Cambios en el medio ambiente generan situaciones de alarma en los peces, esto es reconocido por el Sistema Nervioso Central (SNC), es aquí donde el organismo intenta adaptarse a dicha situación, pero cuando las condiciones son persistentes el organismo no es capaz de compensar, y se genera una condición patológica (Flores, 2002), la que a su vez genera afectaciones graves, tales como problemas de crecimiento, reproducción y en ocasiones hasta la muerte (McCormick *et al.*, 1998).

Es por esto que se utilizan productos anestésicos que tienen como fin evitar episodios de estrés que afecten el bienestar animal. La anestesia es un acto médico utilizado para bloquear la sensibilidad táctil y dolorosa (Keene *et al.*, 1998). Los anestésicos ideales son los que actúan rápidamente, a dosis bajas y con periodos cortos de recuperación (Ross y Ross, 1999, Coyle *et al.*, 2004). La aplicación y dosis óptima del anestésico está asociada a la especie, el medio en el que se encuentra calidad del agua, tamaño, densidad y etapa fisiológica del pez (Mylonas *et al.*, 2005).

El metanosulfato de tricaina (MS-222), es un derivado de la benzocaína, aprobado por la FDA (Food and Drug administration, EE.UU) (Córdova y Braun, 2007), sin embargo se reportan respuestas indeseadas en el sistema inmunitario de los peces (Vázquez *et al.*, 2013). Entre tanto el Eugenol, otro de los anestésicos más usados en la acuicultura (Keene

et al., 1998; Woody et al., 2002), es una sustancia de origen natural obtenida de hojas, flores y tallos de árboles de clavo *Eugenia caryophyllata* y *Eugenia aromatica* (Soto, 1995), éste posee como compuesto activo (4 ali-metoxifenol), el cual es categorizado por la FDA como seguro (Vázquez et al., 2013). Es un compuesto que a bajas concentraciones se obtiene una buena sedación y anestesia, además es de bajo costo, fácil adquisición, amigable con los peces y el medio ambiente, además de ser seguro para el personal que lo manipula (Cunha y Rosa, 2006).

El término ictiohematología, se define como una disciplina encargada de estudiar la sangre; sin embargo, en términos más precisos, estudia y analiza todos los componentes sanguíneos de manera morfológica, química y funcional. como también los órganos hematopoyéticos, y cualquier patología y enfermedad que se relacione con las células y sus órganos productores (Valenzuela et al., 2003). La hematología se considera una herramienta importante para el diagnóstico de cualquier alteración o patología en la ciencia veterinaria, pero lamentablemente en el campo de la acuicultura es aún muy poco usada, específicamente en Latinoamérica, esto consecuencia del poco conocimiento que se tiene de los parámetros fisiológicos normales de diferentes especies de importancia comercial (Kinkelin et al., 1985). Diversos factores fisiológicos como la edad, género, nutrición y ciclo reproductivo han sido tenidos en cuenta como generadores de cambios en los distintos parámetros sanguíneos de los peces (Groff y Zinkl, 1999), por lo anterior se ha limitado el uso de la hematología como una herramienta de suma importancia para el mantenimiento adecuado de la salud de los peces, es así, como se requiere realizar diversos estudios en gran variedad de especies, teniendo en cuenta los factores anteriormente mencionados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar protocolos de anestesia e indicadores de estrés sanguíneo en capaz (*Pimelodus grosskopfii*), utilizando metasulfato de tricaina (MS-222) y aceite de clavo (Eugenol).

Objetivos específicos

- Identificar estadios de anestesia en reproductores de capaz (*Pimelodus grosskopfii*).
- Cuantificar tiempos de inducción y periodos de recuperación en reproductores de capaz (*Pimelodus grosskopfii*), utilizando MS-222 y Eugenol.
- Determinar indicadores de estrés sanguíneo (hematocrito, hemoglobina y glucosa) y su alteración post anestesia.
- Establecer un protocolo de anestesia indicado para el capaz (*Pimelodus grosskopfii*).

REVISIÓN DE LITERATURA

CAPÍTULO 1

USO DE ANESTÉSICOS EN ACUICULTURA Y SUS EFECTOS SOBRE EL ESTRÉS EN PECES

Generalidades de los silúridos

Los siluriformes son un orden de peces de gran jerarquía neotropical, poseen una distribución muy amplia, también una gran variedad de formas; después de los carácidos es el grupo con mayor número de especies de agua dulce de América (Galvis et al., 1997).

Conocidos como peces gato o bagres, presentan como característica principal una gran variedad de barbillas en torno a su boca, aberturas nasales o mentón, poseen un aparato de weber (estructura anatómica que une la vejiga natatoria con el sistema auditivo), la gran mayoría representantes de este orden son de agua dulce, además presentan piel desnuda, tienen una serie de espinas pequeñas en el área opercular y algunos presentan en su aleta dorsal y pectoral una poderosa espina con bordes aserrados (Ruiz, 2013).

Generalidades de la especie

Capaz (*P.grosskopfii*)

Conocido como barbudo, el capaz (*Pimelodus grosskopfii*), es un silúrido caracterizado por poseer hábitos alimenticios omnívoros (Cala, 1996), con favoritismo por macroinvertebrados, insectos y peces (Villa, 1999). Se encuentra en las cuencas del río Magdalena, Cauca, San Jorge, Sinú, Cesar, Atrato, Baudó y Catatumbo (Dahl, 1971; Mojica et al., 2002).

Características morfológicas

Se identifica por ser un pez de mediano tamaño, color gris predominante en su cuerpo con matices dorados, su dorso es oscuro con presencia de puntos negros. Posee un puente óseo que se origina desde el cráneo hasta la aleta dorsal, la hipófisis postcleitral es triangular y aplanada, los primeros radios de las aletas pectorales y dorsal están dotados de espinas fuertes, su aleta adiposa es larga (Villa, 1999) según Miles (1971), cabe cuatro veces o menos en la longitud esquelética (3,5 - 4 veces). La distancia entre las comisuras de la boca es mayor que la longitud del rostro (Maldonado et al., 2005).

Reproducción y ciclo de vida

Esta especie presenta migraciones, aunque parecen no estar relacionadas únicamente con periodos de desove. Villaneda, (1977) considera que estos desoves se realizan en la parte alta de la cuenca del río Magdalena y señala que la etapa de madurez sexual se presenta en una talla mínima de 25 cm. En el embalse de Betania se registra que la especie desova entre marzo y octubre, además se observa dimorfismo sexual, ya que las hembras son de mayor talla que los machos (aproximadamente 11 cm) (Cala et al., 1996).

Importancia comercial

El capaz (*P. grosskopfii*), es parte de las 30 especies de peces dulceacuícolas de interés pesquero en el país, considerándose una de las más influyentes en la explotación en pesquerías del río Magdalena (Incoder, 2006). En el embalse de Betania es la especie de mayor valor comercial; por otra parte en el país existe gran interés por las especies de orden siluriforme, debido a la buena aceptación comercial de su carne, alto valor comercial, entre otras. Esta especie está declarada en peligro de extinción debido a la disminución de sus

capturas y tallas en la cuenca, resultado del deterioro ambiental y sobrepesca (Mojica et al., 2002).

Generadores de estrés y respuestas fisiológicas en peces

Según su duración e intensidad el estrés se podría clasificar como agudo y crónico. El estrés agudo es producido por perturbaciones de duración muy corta, un ejemplo de este son los cambios en los factores ambientales; y el estrés crónico, es el efecto de exposiciones duraderas o constantes a bajos niveles de agentes generadores de estrés (Ocampo y Camberos, 1999).

Tanto en condiciones artificiales como en la naturaleza, permanentemente los peces están sometidos y expuestos a una gran variedad de agentes estresantes. Específicamente en la acuicultura, donde se quiere reproducir artificialmente las condiciones que normalmente se generan en su ambiente natural, aquellos cambios fisiológicos que se presentan en respuesta a condiciones adversas, generan un desequilibrio en el organismo, el cual genera una situación de estrés, por tanto como consecuencia final ocasionan en el animal bajo rendimiento, además de tener efecto sobre la respuesta productiva y reproductiva. Es así que el estrés se considera como uno de los problemas más importantes que perturban al sector piscícola, esto debido a que en la acuicultura intensiva son muchos los factores o procedimientos que lo ocasionan, entre los cuales se encuentra comúnmente la selección, manipulación, vacunación y transporte (Strange et al., 1977).

Principales generadores de estrés

Cuando se habla de animales en cultivo, es adecuado definir la amplia relación de agentes causantes de estrés que son inherentes a la propia biología y medio ambiente del animal,

como también cabe recalcar las condiciones del cultivo, tanto en aspectos físicos y químicos del agua, así como las relaciones sociales, densidad, presencia de contaminantes, manipulación, manejo en cultivo y alimentación (Sánchez y Gómez, 2001). Bajo condiciones de cultivo, los peces se estresan fácilmente, existiendo diferentes condiciones que pueden llegar a generar estrés, causando inmunosupresión, lesiones físicas e incluso muerte (Brown, 2000).

Estrés social.

La jerarquía que ejercen los peces en una población, así como el tamaño de la misma son la primordial causa de competencia entre sí, también se compite por espacio y alimento, lo cual consecuentemente conlleva a una situación de estrés y este se puede categorizar en: estrés de tipo nutricional, traumático o físico, situaciones consideradas como estrés social. Sin embargo, las diferencias que existen entre sí, dependerán del generador, que puede ser llamado “manipulación humana”, además de otros, que no se encuentran relacionado con la cantidad ni la calidad de la población ícticas (Auro y Ocampo, 1999)

Estrés nutricional.

Se considera el alimento como gran generador de estrés, debido a la gran accesibilidad en calidad y cantidad que se puede llegar a ofrecer, esto consecuente de la no realización de un ajuste adecuado en la dieta para la especie que se tiene; factores como la mala administración de los espacios o tamaño de la especie, que no encajan entre sí, en este sentido tiene gran importancia aspectos como la digestibilidad, contenido de vitaminas, minerales, calidad de lípidos y proteínas, así como también la presencia de factores anti nutricionales. Un estado de salud adecuado es fundamental para generar un rendimiento

mayor, de manera directa influye tanto la ingesta como el aprovechamiento nutritivo del alimento, esto debido a que los peces en un mal estado de salud serán más susceptibles a la aparición de enfermedades. La aparición de una patología se encuentra relacionada de manera directa con el ambiente, el patógeno y el estado fisiológico del pez (Arturo, 2012).

Estrés traumático.

En los organismos acuáticos son muchas las referencias frente a lesiones de tipo traumático, en las que se destaca el canibalismo y la afección por elementos físicos peligrosos existentes dentro del estanque. Estas lesiones son visibles fácilmente, muchas de estas son la entrada para la proliferación de infecciones de tipo micótico, bacteriano y viral. Las cuales son causantes de grandes pérdidas en la economía acuícola (Lewis y Berry, 1988).

Fisiología del estrés

Una vez que la homeostasis se ve alterada, debido a la recepción de estímulos estresantes, inmediatamente el organismo reacciona con una serie de eventos los cuales son llamados mecanismo de adaptación, que tienen como acción inicial mantener un equilibrio interno. Estos eventos son llevados de manera secuencial y están regulados gracias a la acción del sistema nervioso central (SCN) y el sistema endocrino (Schreck et al., 2001).

La activación conjunta de estos sistemas, liberan las hormonas del estrés (cortisol y catecolaminas), que intervendrán para disminuir los efectos del mismo. Es así como estas respuestas al estrés han sido catalogadas como primarias, secundarias y terciarias. (Wedemeyer et al., 1990)

Una percepción de un estímulo estresante genera activación del sistema neuroendocrino, que inmediatamente se encarga de liberar catecolaminas y cortisol, donde posteriormente

vian a través de la circulación sanguínea (Barton, 2002). A este tipo de acción se le denomina respuesta primaria, aunque dentro de esta acción generada, existe una fase de actuación inmediata, esto gracias a la activación del eje del sistema nervioso simpático-células cromafines y liberación de catecolaminas (Schreck et al., 2001).

En cuanto a las respuestas secundarias, son las secuencias inmediatas a la liberación de catecolaminas y cortisol, alteraciones que se ven reflejadas por la inducción de estas hormonas en los diferentes órganos del pez. Los cambios generados por estas hormonas se concluyen en dos aspectos primordiales: 1). Cambios en el sistema de osmorregulación, circulatorio y respiratorio, y 2). Movilización en los sustratos energéticos. Además de estas variaciones, se generan cambios en la secreción hormonas hipofisarias y tiroideas, como también en la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión cerebral, como el dopaminérgico y serotoninérgico (Barton, 2002).

Las respuestas terciarias se dan como una consecuencia de conservar continuamente los cambios que se llevan a cabo en el transcurso de los efectos secundarios, cuando estos agentes estresores se mantienen de forma repetitiva o constante, situaciones que se ven reflejadas en los cultivos intensivos, esto conlleva a una perturbación constante de la homeostasis, generando disminución en los parámetros productivos afectando su reproducción y de manera directa el sistema inmunitario, con probabilidades de llegar a causar la muerte. Por consiguiente, esta última respuesta se ve manifestada a nivel de la población como a nivel individual (Barton, 2002).

En conclusión no se puede hablar de respuestas uniformes y entrelazadas por los diferentes tipos de estrés, esto dado a que dependiendo del estrés al que el animal es sometido, este puede llegar a generar diferentes tipos de respuestas fisiológicas, cabe tener en cuenta la importancia que tiene el SNC al momento de la generación de algún tipo de estrés, ya que

este puede actuar de una u otra manera, esto teniendo en cuenta los tipos de condición ambiental , estado reproductivo o estado del desarrollo por el cual está pasando el animal (Flores, 2002).

Efectos del estrés en la reproducción.

El ciclo reproductivo de los peces está dado por el balance hormonal, bajo el control del eje cerebro-hipófisis-gónadas, para el funcionamiento adecuado de la reproducción y puede ser alterado por el estrés, esto dependiendo de la especie, maduración de las gónadas y tolerancia (Schreck et al., 2001). Aún no está claro en donde se ejerce el efecto supresor en la reproducción, manifestándose por la disminución en los procesos de desove (Hontela, 1997), baja calidad de progenie y disminución de la población (Schreck et al., 2001). En hembras se ha observado retardo de maduración ovocitaria, vitelogénesis incompleta, inhibición de la ovulación y atresia folicular acelerada y en machos retardo en el desarrollo espermático, inhibición de la espermiación y de baja densidad espermática (Goos y Consten, 2002).

En la acuicultura industrial intensiva, aquellos organismos que pasan gran tiempo en confinamiento son los reproductores; de esta manera, los estudios en el efecto del estrés por cautiverio se basan principalmente en la medición de los parámetros reproductivos, en los que se destacan: viabilidad y número de huevos, crías y alevines, como también calidad de la progenie, dichos parámetros mencionados generan el punto clave para la metodología en la reproducción de estas especies (Weber, 2009).

Efectos de estrés sobre las gonadotropinas.

El hipotálamo segrega GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y esta, estimula a la hipófisis para la liberación de las hormonas como la FSH (folículo estimulante) LH (hormona luteinizante), la FSH viaja a través de la sangre hacia los ovarios para el crecimiento ovocitario y altos niveles plasmáticos de 17β -estradiol y se encarga de inducir la síntesis hepática de vitelogenina. Al terminarse esta etapa, los ovocitos entran a la etapa final de maduración, anterior a la ovulación y puesta. Es controlada por la LH (hormona luteinizante) que actúa sobre las células de la teca para la síntesis de la 17α -hidroxiprogesterona y en las células de la granulosa en peces se convierte en el esteroide $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ -DP) que actúa sobre la membrana de los ovocitos como factor promotor de la maduración (MPF) (Weber, 2009) y luego la ruptura de la vesícula germinal (maduración ovocitaria) (Nagahama, 1987). Las GTH actúan en los testículos, en las células de Leydig y Sertoli donde se da la esteroidogénesis y la espermatogénesis (Schulz et al., 2001), la FSH con el control de la espermatogénesis y síntesis de andrógenos (11-cetotestosterona y testosterona) por las células de Sertoli y la LH en las células Leydig para la maduración de la esperma debido a la síntesis de $17\alpha,20\beta$ -DP a partir de la 11-cetotestosterona (11-KT) en el (Schulz et al., 2001; Schulz y Miura, 2002).

La vitelogénesis está asociada al crecimiento de los ovocitos dada por la entrada de la vitelogenina procedente del hígado y sintetizada por el 17β -estradiol (Wendelaar, 1997), una disminución de la hormona puede alterar el tamaño del ovocito (Tyler et al., 1996). En algunos estudios se presenta disminución de vitelogenina, caída de la vitelogenina pero no del estradiol (Pottinger et al., 1991; Roy et al., 1990). El estrés también puede disminuir la

cantidad de esperma en machos (Pankhurst y Van, 1997; Schreck et al., 2001), baja calidad de larvas y tasa de supervivencia por lo tanto se vería afectada la producción de juveniles viables (Morgan et al., 1999).

Uso de anestésicos en acuicultura

El uso de la anestesia, es de suma importancia tanto en la acuicultura como en la investigación pesquera, en gran medida se facilitan muchos procedimientos de rutina, tales como: inducción del desove, inseminación artificial, muestreos de rutina como la obtención de peso y longitud corporal, también para la realización de procedimientos quirúrgicos y biopsias (Ross y Ross 2008), incluyendo su uso también para programas de mejoramiento genético y técnicas de reproducción (McGovern et al., 2003).

Con la intención de reducir en gran cantidad el daño generado a los peces, es habitual el uso de anestésicos para mayor facilidad al momento de su manejo. Factores como el desconocimiento de las concentraciones y tiempos de inducción en las diferentes especies limitan el uso de estos productos anestésicos. Para optar por un buen anestésico se debe tener en cuenta la viabilidad económica que este genere (Pérez et al., 2010)

La mayoría de los métodos de inducción de anestesia química en peces suponen la inmersión en una solución del producto, esta inmersión debe llevarse a cabo en tanques de inducción, por lo cual estos contenedores deben prepararse con anterioridad con los respectivos parámetros físico-químicos que requiera el pez (temperatura, dureza, salinidad y pH). La hipoxia es un problema característico cuando inducimos anestesia por inmersión, es por esto la importancia de contar con respectivos aireadores en los tanques donde se realicen los procesos de inducción (Gonzales, 2010).

La seguridad y eficacia de los anestésicos varía según la especie, tamaño y factores ambientales (Gilderhus y marcado, 1987). Como consideración para la elección de un buen anestésico no solo se debe tener en cuenta su bajo costo, disponibilidad, facilidad de uso y alta margen de seguridad para quien los usa (Pirhonen y Schreck, 2003), sino también de su eficacia. En acuicultura la efectividad de un anestésico viene dada en la capacidad de inmovilizar un pez, pudiéndose llevar a cabo su respectiva manipulación para así poder llevar con normalidad los trabajos que se realizan en dicho cultivo (Burka et al., 1997). En la actualidad se encuentran gran variedad de anestésicos usados acuicultura, los de uso habitual son el MS-222, aceite de clavo, 2-fenoxietanol, metomidato, benzocaína, quinaldina y clorobutanol.

Principales Anestésicos usados en acuicultura.

El MS-222 (3-aminobenzoico etil éster metanosulfonato), cuyo nombre genérico es la tricaina, es un anestésico que actúa de manera general, el cual es absorbido y metabolizado a través de las branquias (Burka et al., 1997). Su excreción se realiza vía urinaria y su periodo de retiro es de 24 horas (Ross y Ross, 1999). Actúa como depresor del SNC y se ha descrito que su mecanismo de acción tiene afinidad por el bloqueo de la transmisión nerviosa (Burka et al., 1997). Hinostroza et al., (2013), realizó un estudio en juveniles de paiches (*Arapaima gigas*) con concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/L, la concentración optima fue la más alta (100 mg/L), mientras que el estudio en juveniles de chitas (*Anisotremus scapularis*) evaluaron dosis de 15, 20 y 25 mg/L para determinar la indicada para procedimientos de transporte, en este estudio la dosis más baja (15 mg/L) fue la que presentó los mejores resultados para este tipo de manipulaciones (Rosado et al., 2016). Por otra parte dosis de 70-80 mg/L fueron efectivas para producir un estado de anestesia

profunda en juveniles de *S. aurata* (dorada), evaluando concentraciones de 10 en 10 hasta 100 mg/L (Santo et al., 2016).

El eugenol, [2-metoxi-4-(2-(2-profenil)-fenol)] es el principio activo del aceite de clavo; el cual es obtenido de los tallos, las hojas y las flores de los árboles de clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunberg y *Eugenia aromatica* Baill) (Soto, 1995). Diversas investigaciones en diferentes trabajos, confirman su efectividad en diferentes especies de peces (Hajek et al., 2006). Su mecanismo de acción aun es tarea de investigación, aunque se relaciona cierta actividad del eugenol por los receptores NMDA (Receptores celulares encargados de las sinapsis neuronales) Y GABA (Ácido Aminobutírico, principal neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central) (Yang et al., 2003). Suarez et al. (2014), evaluaron concentraciones de 30, 50, 60 y 70 mg/L en híbridos de *Pseudoplatystoma metaense* x *Leiarius marmoratus*, donde concentraciones de 50 mg/L indujeron una anestesia deseada. Por otro lado, en juveniles de pintado la evaluación de concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/L, considerándose concentraciones optimas de 50 mg/L (Vidal et al., 2006).

El 2-Fenoxietanol es un agente anestésico que se usa ampliamente en el campo de la investigación y en el cultivo de peces (Hseu et al., 1998). Presenta como principio activo el etilenglicol monofenil éter (Velisek et al., 2007). Este agente interviene en los peces como anestésico general (Burka et al., 1997), aunque su mecanismo de acción no está bien definido. Se cree que tenga relación alguna con su acción sobre las membranas de las células neuronales. Estudios en lenguado (*Solea senegalensis*) realizados por Weber et al., (2009), evalúan la eficacia del 2-Fenoxietanol para la atenuación de estrés en manipulaciones de rutina, donde se muestran dosis optimas de 500 –600 mg/L. Mello et al.

(2012) estudiaron la eficacia de este agente anestésico en concentraciones de 0.45, 0.60, 0.75, 0.90 y 1.05 mL/ L, en tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) indicando una gran efectividad a dosis de 0.90 mL/L.

Composición general de la sangre

Este fluido sanguíneo está compuesto por plasma, el cual representa la parte líquida y las células la parte sólida. Estos en conjunto ocupan un volumen que oscila entre 2-4% del peso corporal del pez, con diferencia de otros vertebrados que poseen un volumen entre 5-8% (Brown, 1993). En los peces el plasma, muestra semejantes características a las encontradas en mamíferos, a excepción de la proteica, que es menor, en cuanto a funciones inmunológicas y otras funciones se encuentran muy similares (Ellis et al., 1981).

En cuanto a los elementos celulares se puede dividir en tres grupos: los encargados de la oxigenación a los distintos tejidos encontramos los hematíes, aquellos encargados de la coagulación (trombocitos) y los leucocitos responsables del sistema inmune (Ellis et al., 1981).

Parámetros hematológicos asociados al estrés

El estrés es una situación en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (estado de homeóstasis) es transformado como resultado de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco al animal, nombrado como agente estresante. El organismo reacciona con situaciones y comportamientos fisiológicos, con el fin de compensar y poder adaptarse a la nueva situación adversa presentada. Reacciones tales como la síntesis y liberación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, cortisol, ACTH, CO₂, hormona melanotropa) y hormonas esteroideas, son liberadas en la sangre, aumentando constantes fisiológicas en las cuales se destacan; frecuencia cardíaca, respiratoria, existiendo alteración en el transporte

de O₂, movilización de sustratos energéticos, estos son habituales en sistemas de cultivo intensivo. En los tipos de hipóxico se aumentan los valores eritrocitarios, también se observa una disminución en el tamaño de algunas células sanguíneas, disminuye el contenido de hemoglobina en la sangre, y se aumenta el número de los policromatocitos (Conroy, 2004).

Cuando existe estrés por nitritos, no hay transporte adecuado del oxígeno, los peces muestran signos de hipoxia, y aunque haya bastante oxígeno en el ambiente hay un incremento de los centros melanomacrófagos. En estrés por amonio hay alteraciones en los procesos de osmoregulación, también disminución del transporte de oxígeno en la sangre, cambios significativos en los elementos eritrocitarios circulantes y un notorio bajón en el porcentaje de los hepatocitos (Conroy, 2004).

Alteración en los parámetros sanguíneos (Hematocrito, Hemoglobina y Glucosa) asociados al estrés.

Diferentes estudios en hematología han demostrado que modificaciones en las condiciones ambientales en las que se encuentran los peces, tales como, oxígeno, pH, temperatura, generan alteraciones fisiológicas en los niveles de algunos parámetros sanguíneos (Valenzuela et al., 2002), También, factores adicionales como la edad, la especie, el estado nutricional, fotoperiodo y las diferentes metodologías usadas para la determinación de dichos parámetros (Pedro et al., 2004).

Dado que el estrés genera un proceso demandante de energía, el animal debe movilizar cantidad de sustratos energéticos para hacer cara al estrés metabólico, incrementado los niveles de glucosa en la sangre, esto con el fin de proveer la energía adecuada a cerebro,

branquias y músculos, mediante los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis (Arends et al., 1999).

Eje Hipotálamo-Simpático-Células Cromafines.

Las catecolaminas son liberadas al torrente sanguíneo, casi inmediato, como respuesta al estrés agudo. Son sintetizadas, almacenadas y liberadas desde las células cromafines (Reid *et al.*, 1998), situadas en la zona cefálica de los riñones (Perry et al., 1991), dada por el sistema nervioso simpático por las fibras colinérgicas preganglionares (Weber, 2009), liberando el neurotransmisor acetilcolina que ejerce acción sobre los receptores colinérgicos situados en las células cromafines y por lo tanto la liberación de las catecolaminas (Perry et al., 1991). Provocan efecto hiperglucémico a corto plazo debido a las demandas de energía provocadas por el estrés (Weber, 2009), también ejercen acción sobre los receptores β -adrenérgicos y α -adrenérgicos (Wendelaar, 1997), aumentando la movilización de la glucosa desde las reservas hepáticas a través de la glucógenolisis y gluconeogénesis (Iwama et al., 2004).

Las catecolaminas aumentan el pH de los eritrocitos y acidifican el plasma, aumentando la afinidad de O₂ por la hemoglobina (Soivo y Nikinmaa, 1981); alteran el hematocrito por la contracción de la musculatura lisa y fibras elásticas de la capsula del bazo, donde se encuentra el reservorio eritrocitario, incrementando su número y tamaño celular con mayor concentración de hemoglobina al igual que disminuye la resistencia del eritrocito al flujo sanguíneo (Wenderlaar, 1997).

Eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HHI).

La hiperglucemia a largo plazo es dada por el cortisol (Wenderlaar, 1997), el hipotálamo recibe la información de estrés por las vías aferentes del cuerpo, liberando la corticotrofina

CRH que junto con arginina vasotocina (AVT), la isotocina (IT), las angiotensinas I y II, las urotensinas y el neuropeptido Y (NPY) (Gilchriest et al., 2000) estimulan a la hipófisis para la liberación de la adrenocorticotrofina ACTH, viaja por el torrente sanguíneo a las células interrenales (Mommsen et al., 1999) en la zona cefálica de los riñones (Reid et al., 1996), para la liberación de los corticosteroides en especial el cortisol (Guerriero y Ciarcia, 2006).

Aproximadamente el 30 – 55% del cortisol está unido a glucoproteínas α -globulina reversiblemente, la porción que se encuentra libre es la activa (Weber, 2009). Esta unión protege su inactivación en el hígado (Mommsen et al., 1999) actuando de manera hiperglicémica, inhibe la síntesis y estimula el catabolismo de las proteínas a la conversión de glucosa por medio de la glucogénesis (Weber, 2009). También incrementa la gluconeogénica hepática activando las enzimas como la glucosa 6-fosfatasa, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la fructosa 1,6 bisfosfatasa (Weber, 2009). Aunque no en todos los casos produce hiperglucemia por no producir efectos sobre la glucosa plasmática y glucógeno hepático (Boeck et al., 2001).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arends, R., Mancera, J., Muñoz, J. y Wendelaar, S. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* 163: 149-157.
- Arturo, C. (2012). El Estrés en Peces de Granja. *Revista Investigación Pecuaria*. (1) 47-51.
- Auró, A. y Ocampo, L. (1999). Diagnóstico del Estrés en Peces. *Vet Mex*. (30) 337-344.
- Barton, B. (2002). Stress in Fishes: A diversity of responses with particular referente to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517-525.
- Boeck, G., Alsop, D. y Wood, C. (2001). Cortisol effects on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion, and whole-body composition in juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74, 858- 868.
- Brown, L. (1993). Acuicultura para veterinarios. Abbott Laboratoties, North Chicago, USA. 460pp.
- Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios Producción y clínica de peces. Nort Chicago, USA. *Acribia*, S. A. Zaragoza. España.
- Burka, J., Hammell, K., Horsberg, T., Johnson, G., Rainnie, D. y Speare, D. (1997). Drugs in salmonid aquaculture - A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20, 333-349.
- Cala, P., Pérez, C. y Rodríguez, I. (1996). Aspectos Bioecológicos de la población de capaz, *Pimelodus grosskopfii*, (Pisces: Pimelodae) en el embalse de Betania y parte

- alta del río Magdalena. *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas*, Colombia. 20(77) 319-330.
- Chrousos, G., y Gold, P. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267(9), 1244-1252.
- Conroy, G. (2004). Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América Latina. *Panorama Acuicola Magazine*, 6 (9), 20-25.
- Cordova, M., y Braun, C. (2007). The use of anesthesia during evoked potential audiometry in goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Res*, 1153: 78-83.
- Coyle, S., Durborow, R., y Tidwell, J. (2004). Anesthetics in aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, N. ° 3900. Texas, USA, 6.
- Cunha, F., y Rosa, I. (2006). Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *J Fish Biol*, 69: 1504- 1512.
- Dahl, G. (1971). Los peces del norte de Colombia. Bogotá (Colombia): Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables, (Inderena), Talleres Litografia Arco. p. 391.
- De Pedro, N., Guijarro, A., López, M., Martínez, R., Bedate, A y Delgado, M. (2004). Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (*Tinca tinca*): ritmos diarios y estacionales. *Comunicación Científica CIVA*, 173-190. Disponible en línea: www.revistaaquatic.com/
- Ellis, A. (1981). Inmunológica de teleósteos. Patología de los peces. Editado por Roberts, R. Edición mundial-prensa, versión Española. Capítulo IV. 103-117.

- Flores, Q. (2002). Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. (Artículo de revisión). Universidad Nacional del Nordeste. *Rev.ictiol*, 10 (1/2) ,57-78.
- Galvis, G., Mojica, I. y Camargo, M. (1997). Peces del catatumbo. COPETROL: OXY: SHELL-Asociación Cravo Norte. D'Vinni Edi. Ltda., Santa Fe de Bogotá. 118.
- Gilchriest, B., Tipping, D., Hake, L., Levy, A. y Baker, B. (2000). The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Neuroendocrinology*, 12: 795-801.
- Gilderhus, P. y Marking, L. (1987). Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North Am. J. Fish. Manage.*, 7: 288-292.
- Gonzales, J. (2010) Farmacología, terapéutica y anestesia de peces. *mem.conf.interna med.aprovech.fauna sil.exot.conv.* 6:1.
- Goos, H. y Consten, D. (2002). Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197: 105-116.
- Groff, J. y Zinkl, J. (1999). Hematology and clinical chemistry of Cyprinid fish. Common carp and goldfish. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract*, 2(3), 741–746.
- Guerriero, G. y Ciarcia, G. (2006). Stress biomarkers and reproduction in fish. En: *Fish endocrinology*. Editado por Reinecke, M., Zaccone, G. y Kapoor, B. Science Publisher, USA, p. 665-692.
- Hajek, G., Kyszejko, B. y Dziaman, R. (2006). The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 36(2), 93-97.
- Hinostroza, E. y Serrano, E. (2013). Efecto anestésico del Metasulfonato de Tricaína en Paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. *Rev Inv Vet Perú* 2013; 24(4): 451-458.

- Hontela, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Reviews in Toxicology* 1, 1-46.
- Hseu, J., Yeh, S., Chu, T y Ting, Y. (1998). Comparison of efficacy of five anesthetic goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*, 9: 35-41.
- Incoder (2006) Pesca y Acuicultura Colombia.
- Iwama, G., Afonso, L. y Vijayan, M. (2004). Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare. Campbell River, B. C. Canada, p. 1-9.
- Keene, J., Noakes, D., Moccia, R., y Soto, C. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Res*, 29: 89-101.
- Kinkelin, P., Michel, C. y Ghittino, P. (1985). Tratado de las enfermedades de los peces. *Acribia*, Zaragoza. 353.
- Kreinberg, H. (2000). Stress and anesthesia. En: The laboratory fish. Editado por Ostrander, G. Academic Press, New York, 503-511.
- Lewis, R. y Berry, K. (1988). Brain lesions in a Pacific White- Sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Wildl Dis*, 24,577-581.
- Maldonado, J., Ortega, A., Usma, J., Galvis, G., Villa, F., Vasquez, L., Prada, S y Ardila, C. (2005). Peces de los Andes de Colombia., Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 1 ed. Bogotá D.C. Colombia, 346.
- Marking, L. y Meyer, F (1985). Are better anaesthetics needed in fisheries? *Fish*. 10: 2-5.
- McCormik, S., Shrimpton, J., Carey, J., O'Dea, M., Sloan, K., Moryama, S., y Bjornsson, B. (1998). Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and

- alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 168: 221-235.
- McGovern, K., Tamaru, C., Takeshita, G. y Yamamoto, M. (2003). Procedural guide for the artificial insemination of the lyretail swordtail, *Xiphophorus helleri*. Center for Tropical and Subtropical *Aquaculture*, 149.
- Mello, R., Santos, L., Okamura, D., Guedes, F., Perez, P., Correa, F. y Vieira, P. (2012) Avaliação de 2-fenoxietanol e mentol como agentes anestésicos em tilapias. *Bol. Inst. Pesca*, Sao Paulo, 38(1), 53 – 59.
- Miles, C. (1971). Los Peces del río Magdalena. 2 ed. Ibagué, Universidad del Tolima. Centro audiovisual. UT ediciones. Ibagué, Colombia. 214.
- Mojica, J., Castellanos, C., Usma, J. y Álvarez, R. (2002) Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de Colombia. Ministerio del Medio Ambiente. Editorial Panamericana, Bogotá.
- Mommsen, T., Vijayan, M. y Moon, T. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- Morgan, M., Wilson, C. y Crim, L. (1999). The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. *Journal of Fish Biology*, 54, 477-488.
- Mylonas, C., Cardinaletti, T., Sigelaki, I. y Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2- phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246, 467-481.

- Nagahama, Y. (1987). Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 4: 209-222.
- Ocampo, A., y Camberos, L. (1999). Diagnóstico del estrés en peces. *Veterinaria México*, 30, 337-344.
- Pankhurst, N. y Van, G. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Editado por Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J y Schreck, C. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 73-93.
- Pérez, P., Santos, I., Eloy, A., Vieira, P. y Solis, L. (2010). Aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *An. Vet. (Murcia)* 26, 69-76.
- Perry, S., Fritsche, R., Kinkead, R. y Nilsson, S. (1991). Control of catecholamine release in vivo and in situ in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hipóxia. *Journal of Experimental Biology*, 155, 549-566.
- Pirhonen, J. y Schreck, C. (2003). Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO² on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2003; 220: 507-514.
- Pottinger, T., Campbell, P. y Sumpter, J. (1991). Stress induced disruption of the salmonid liver gonad axis. En: *Reproductive Physiology of fish*. Editado por Scott, A., Sumpter, J., Kime, D. y Rolfe, M. FishSimp 91, Sheffield, 114-116.
- Reid, S., Bernier, N. y Perry, S. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 120: 1-27.

- Rosado, M., Dionicio, J. y Aguirre, A. (2016). Evaluación de Diferentes Concentraciones de Tricaína (MS-222) en el Transporte de Chitas (*Anisotremus scapularis*) Juveniles. *Rev Inv Vet Perú*, 27(4), 687-697.
- Ross, L. y Ross, B. (2008). Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford: *Blackwell Science*, 236p.
- Ross, L. y Ross, B. (1999). Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Blackwell Science*, Oxford, 159.
- Roy, R., Ruby, S. y Idler, D. (1990). Plasma vitellogenin levels in pre spawning rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acid exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19, 803-806.
- Sánchez, M., y Gómez, E. (2001). Efecto del estrés en los peces. En: Universidad Internacional del Mar: Acuicultura II. Editado por S. Zamora y F. J. Martínez. Universidad de Murcia, 57-69.
- Santo, T., Fernández, M., Jerez, I. y Mancera, J. (2016). Empleo del anestésico MS-222 en dorada (*Sparus aurata*) como relajante en condiciones de estrés por transporte. Dpto. Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Av. República Saharaui s/n, 11510 Puerto Real (Cádiz), España.
- Schreck, C., Contreras, W. y Fitzpatrick, M. (2001). Effects of stress on fish reproduction gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24.
- Schulz, R., Vischer, H., Cavaco, J., Santos, E., Tyler, C., Goos, H. y Bogerd, J. (2001). Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129, 407-417.

- Schulz, R., y Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
- Soivo, A. y Nikinmaa, M. (1981). The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. In: *Stress and Fish*, Pickering ed. 49-75.
- Soto, C. (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136, 149-152.
- Strange, R., Schreck, C. y Golden, J. (1977). Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 213-218.
- Stteger, T., Grizzle, J., Weathers, K. y Newman, M. (1994). Bacterial diseases and mortality of angler caught Largemouth Bass releases after tournaments on Walter F. George Reservoir, Alabama -Georgia. *North Am J Fisheries*, 14,435-441.
- Suarez, R., Bernal, G., Velasco, J., Pinzon, M., Eslava, P. y Baldisserotto, B. (2014). Eugenol como anestésico para el manejo de juveniles del híbrido *Pseudoplatystoma metaense* por *Leiarius marmoratus*. *Orinoquia*, 18. 256-259.
- Tyler, C. y Sumpter, P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fisher* 6, 287-318.
- Valenzuela, A., Alveal, K. y Tarifeño, E. (2002). Respuestas hematológicas de truchas (*oncorhynchus mykiss walbaum* 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja. *Gayana*, 66(2), 255-261.
- Valenzuela, A., Oyarzún, C. y Silva, V. (2003). Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): serie blanca. *Gayana*, 67(1), 130 – 137.

- Vazquez, G., Castrob, T., Hernándezb, A., Castrob, J. (2013). Comparison of anaesthetic effect of clove oil, saline solution and colloidal solution in juvenile *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). Arch. med. vet. 45(1), 59-66.
- Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z. y Novotny, L. (2007). Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L). Veterinarni Medicina, 52:103-110.
- Vidal, L., Albinati, R., Albinati, A. y Macedo, G. (2006). Utilização do Eugenol como Anestésico para o Manejo de Juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá, 28,3.
- Villa, F. (1999). Estudio biológico pesquero de la represa de Prado, para la determinación de especies promisorias en acuicultura. Presentado a Universidad del Tolima, CORTOLIMA; INPA; Gobernación del Tolima y Comité departamental de cafeteros del Tolima. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia. 105.
- Villaneda, J. (1977). Algunos aspectos biológicos del capaz *Pimelodus grosskopffi* (Steindahcner 1879). (Tesis de grado), Facultad de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano. Santafé de Bogotá, Colombia. 43
- Weber, R. (2009) Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado (*Solea senegalensis*) (Tesis Doctoral). Universidad Santiago de Compostela, España.

- Wedemeyer, G., Barton, B. y MacLeay, D. (1990). Stress and acclimation. En: Methods for Fish Biology. Editado por Schreck, C y Moyle, P. American Fisheries Society, USA 451-489.
- Wendelaar, S. (1997). The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625
- White, S., Nguyen, T. y Fernald, R. (2002). Social regulation of gonadotropinreleasing hormone. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2567-2581.
- Woody, C., Nelson, J., y Ramstad, K. (2002). Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J Fish Biol*, 60: 340-347.
- Yang, B., Piao, Z., Kim, Y., Lee, C., Lee, J. y Park, K. (2003). Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res*, 82, 781-785.

RESULTADOS

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE DOS SUSTANCIAS ANESTÉSICAS EN REPRODUCTORES DE CAPAZ (*Pimelodus grosskopfii*).

RESUMEN

Este trabajo se realizó con el fin de evaluar y analizar dos sustancias anestésicas: MS-222 y eugenol en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), determinando concentraciones óptimas para cada una de los dos anestésicos antes mencionados. Antes de realizar los procesos de anestesia se procede a tomar parámetros fisicoquímicos del agua a utilizar en el experimento, reportando los siguientes datos: pH: 7.5 temperatura: 27.8°C, oxígeno disuelto: 7.57mg/L. Se utilizaron 15 peces para la respectiva evaluación de cada anestésico, donde por cada concentración del anestésico a evaluar se utilizaron 3 réplicas. En el caso del eugenol las concentraciones evaluadas fueron (30, 40, 50, 60,70 mg/L) y MS-222 (60, 70, 80, 90,100 mg/L). Para el proceso de anestesia (inducción) y recuperación se utilizaron acuarios en acrílico, con capacidad de 40 L cada uno, para el proceso de anestesia y recuperación. El volumen usado fue de 20 L, con aireación constante. Para la determinación de la dosis óptima de anestésico se tuvo en cuenta el plano III de anestesia, que consta de la pérdida total del equilibrio, fin de la locomoción y el plano V de recuperación con recuperación total del reflejo de huida. Los resultados mostraron que la concentración de 40

mg/L de eugenol y 80 mg/L de MS-222, fueron las que presentaron los mejores tiempos de inducción y recuperación.

Palabras clave: anestesia, capaz, dosis anestésica, eugenol, MS-222.

INTRODUCCIÓN

El uso de anestésicos en peces ha adquirido gran relevancia, debido a la gran función que pueden llegar a ejercer en las buenas prácticas de manejo acuícolas, es así, como dicha utilización de sustancias anestésicas pueden generar una disminución significativamente en los niveles de estrés a los que estas especies son sometidas a diario (Marín et al., 2012). Dichos procedimientos rutinarios pueden proporcionar daños en grandes magnitudes, en donde en casos drásticos se generan mortalidad de peces (Pérez et al., 2010), especialmente en las explotaciones piscícolas dedicadas a la producción (Marín et al., 2012).

El eugenol catalogado como uno de los anestésicos no convencionales usados en la acuicultura, ha sido probado en gran variedad de especies tanto de agua salada como dulce, ha demostrado alta efectividad y gran margen de seguridad (Pirhonen y Schreck, 2003). El Eugenol se obtiene de tallos, hojas y brotes de árboles de lavo de las especies (*Eugenia caryophyllata* y *Eugenia aromática*) (Soto, 1995). Por otro lado la triclaína metanosulfonato (MS-222) es un anestésico empleado en el sector acuícola, y está aceptado para su uso en instalaciones de producción en la UE y los EEUU. Actualmente el empleo de MS-222 como anestésico en acuicultura ha sido evaluado en gran variedad de peces (Kreinberg, 2000). En la actualidad, el único anestésico aprobado por Food and Drug Administration (FDA) y Environmental Protection Agency (EPA) es el MS-222 para ser

manipulado y utilizado en peces que posteriormente serán para consumo humano (Velasco et al., 2008). Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar dos sustancias anestésicas (Eugenol y MS-222), con el fin de determinar la concentración optima y adecuada para el manejo de reproductores de capaz (*P. grosskopfii*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización.

El experimento se realizó en la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos (ESRH); esta se encuentra ubicada en el predio “La Granja Experimental”, propiedad de la Universidad Surcolombiana, vereda San Miguel Palermo-Huila y situada a 461 m.s.n.m. en el distrito de riego El Juncal, a siete (7) Km de la Ciudad de Neiva. La zona presenta una temperatura ambiental promedio de 28.6°C.

Pesca, selección y adaptación de los peces.

Un día antes de las pruebas, se pescaron los reproductores con chinchorro y se transportaron en un contenedor con capacidad de 60 L; el transporte del estanque al laboratorio duró aproximadamente 5 minutos. Se mantuvieron en tanques de 500 L, con recambio y aireación constante. Al terminar las pruebas los peces se dejaron en tanques de 500 L durante 24 horas en observación y tratamiento con sal (1g/L).

Parámetros de calidad de agua.

Los parámetros de calidad de agua como oxígeno disuelto (OD), temperatura y pH fueron monitoreados en los días donde se realizó los experimentos, con la ayuda de un equipo multiparamétrico HACH.

Preparación de anestésicos.

Con el fin de crear un efecto tampón en el agua utilizada para realizar las pruebas anestésicas, se adiciono bicarbonato de sodio (NaHCO_3) en una dosis de 1 mg de bicarbonato por 1 mg de MS-222 (Scott *et al.*, 2009). Lo anterior debido a que el MS-222 acidifica el agua y bajo niveles de pH (ácidos) esta sustancia disminuye su efecto anestésico (Alpharma, 2001). Esto permitirá obtener valores coherentes, tiempos de inducción cortos, anestesia duradera y periodos de recuperación más cortos (Ohr, 1976; Smit y Hattingh, 1979).

Metasulfato de tricaina (MS-222).

Se pesaron las dosis de MS-222, por separado en una balanza analítica y se diluyo en 6 ml de agua destilada según lo reportado por Zahl et al. (2009); posteriormente se adiciono al agua del acuario.

Aceite de clavo (Eugenol).

Se preparó el stock de Eugenol utilizando etanol en relación 1:9, respectivamente, con el fin de que el aceite de clavo se diluyera. Esta preparación se realizó en probetas de 10 ml y se almaceno en un recipiente de vidrio oscuro; cada dosis se diluyó en 6 ml de agua destilada y luego se mezcló homogéneamente en los acuarios experimentales.

Pruebas con etanol.

Para determinar si el etanol utilizado para diluir el Eugenol tiene un efecto anestésico en los ejemplares experimentales, se tomaron 3 reproductores de capaz, los cuales fueron evaluados de manera individual; se usó la concentración de Etanol más alta utilizada para

diluir el Eugenol en capaz (10.8 ml). Para ello el etanol se diluyo en un acuario, se sumergió el pez y se observó durante 10 minutos.

Definición de los planos de anestesia

Se identificaron los diferentes planos de anestesia en silúridos debido a que por su conformación morfológica pueden presentar diferentes comportamientos. En 3 reproductores de capaz (*P. grosskopfii*). Se observó de manera individual (minuto a minuto) durante el periodo de inducción y recuperación, utilizando como sustancia anestésica el MS-222 a dosis de 95 mg/L. Tomando como referencia los planos de anestesia propuestos por Suarez et al.(2014) y de recuperación propuestos por Millán et al. (2012) modificada, como se observa en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Planos de anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*).

Planos	Descripción
I	Sedación leve: disminución de la reacción a estímulos externos.
II	Sedación profunda: pérdida parcial del equilibrio y nada errático.
III	Anestesia leve: pérdida total del equilibrio, fin de la locomoción.

Tabla 2. Planos de recuperación en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*).

Planos	Descripción
I	Recuperación del movimiento opercular
II	Recuperación del movimiento de aletas
III	Recuperación total del eje de nado
IV	Recuperación del reflejo de huida
V	Recuperación de la reacción a estímulos externos

Unidades experimentales.

Tanto para el tratamiento como para la recuperación de los peces, los acuarios se llenaron con una capacidad de 30 litros. Para cada replica se realizó recambio de agua de ambos acuarios.

Determinación de tiempos de inducción y recuperación.

Una vez identificados los estadios de anestesia se determinaron los tiempos de inducción y recuperación para diferentes concentraciones de anestésico (tabla 3). Para este fin se utilizaron 3 individuos por tratamiento experimental, 15 peces por anestésico a evaluar. Es importante aclarar que los peces fueron evaluados de manera individual. Para la determinación de los tiempos de inducción y recuperación se utilizó un cronometro marca Cassio ®.

Se consideró el plano 3 de anestesia, cuando hay pérdida total del equilibrio y sin reacción a estímulos externos, como anestesia para manipulación invasiva. Si el pez no logro plano

III de anestesia en un lapso de 3 minutos, este solo será observado hasta el minuto 10. Teniendo en cuenta que un anestésico eficiente es aquel que induce en menos de 3 minutos y recupera en menos de 5 minutos (Coyle et al., 2004).

Tabla 3. Tratamientos experimentales para determinación de tiempos de inducción y recuperación de reproductores de capaz (*P. grosskopfii*) utilizando eugenol y MS-222 como anestésicos.

Anestésicos	
MS-222 (mg/L)	Eugenol (mg/L)
60	20
70	30
80	40
90	50
100	60

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva, estimando la media, desvío estándar de las diferentes variables evaluadas. Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza ($P < 0.05$). En el caso que existieran diferencias significativas entre los tratamientos (dosis entre anestésicos) estas fueron determinadas mediante una prueba de Tukey (< 0.05). Para los análisis se utilizará el análisis estadístico SPSS.

RESULTADOS

Los parámetros de calidad de agua reportados durante el desarrollo de la investigación evaluando eugenol fueron: pH 7.5, temperatura promedio de 27.8°C y oxígeno disuelto de 7.57mg/L y para el desarrollo del experimento con MS-222 fueron: pH 7.9, temperatura promedio fue de 28.7°C y oxígeno disuelto de 7.34 mg/L.

Se realizaron ensayos individuales con etanol, con el fin de descartar algún efecto de sedación o anestesia, es así como se ratifica que el etanol no posee algún efecto anestésico en ninguno de los animales utilizados en esta fase experimental.

La investigación se llevó a cabo en animales aparentemente sanos, no se observó mortalidad durante y después del procedimiento de anestesia para ninguno de los anestésicos evaluados. Hubo un periodo de monitoreo de 24 horas antes de los experimentos y después de la anestesia, en donde no mostraron alteraciones de ningún tipo.

Definición de los planos de anestesia en inducción y recuperación.

La definición de los diferentes estadios de anestesia en capaz tanto en inducción como en recuperación se muestran en las (tablas 1 y 2) tomada de Suarez et al (2014), donde el plano III de inducción se determina con la pérdida total del equilibrio y fin de la locomoción, los peces toman posición dorsal (aleta dorsal) sobre el acuario o lateral. En los planos de recuperación reportado por Millán et al., (2012) en peces escalares (*Pterophyllum scalare*), modificado: agregando el plano V de recuperación como la recuperación a la reacción de estímulos externos.

Para la determinación de la dosis ideal para cada uno de los anestésicos evaluados (Eugenol y MS-222) en reproductores de capaz, se evaluaron los tiempos de inducción en plano III, y de recuperación en plano V de anestesia.

Se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) en los tiempos de inducción y recuperación entre las dosis evaluadas con Eugenol (tabla 4).

Tabla 4. Tiempos de inducción y recuperación para capaz (*P. grosskopfii*) anestesiados con Eugenol, evaluando 5 concentraciones anestésicas. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar. n: número de animales tratados. Letras diferentes entre columnas significan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las dosis evaluadas.

Tiempo (min)					
	Concentración	n	Peso (g)	Inducción	Recuperación
	(mg/L)				
Eugenol	20	3	102.4 $\pm$ 15.84	10.00 ^a	2,92 $\pm$ 0.34 ^a
	30	3	110.83 $\pm$ 16.64	6.49 $\pm$ 0.94 ^b	4,09 $\pm$ 0.64 ^{ab}
	40	3	95.06 $\pm$ 13.72	5.05 $\pm$ 0.46 ^{bc}	6,56 $\pm$ 1.16 ^{ab}
	50	3	108.56 $\pm$ 25.44	3.08 $\pm$ 0.45 ^c	6,02 $\pm$ 1.73 ^{ab}
	60	3	109.23 $\pm$ 14.27	4.19 $\pm$ 0.79 ^c	7,77 $\pm$ 1.92 ^b

En la figura 1 se observó que para el plano I de anestesia, en todos los tratamientos se obtienen tiempos similares; en el plano II, el tratamiento 1 (20mg/L) presenta un periodo más largo de inducción comparado con los demás, para el plano III se observa que en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 (20, 30 ,40 y 50 mg/L) son dependientes de la concentración

($P < 0.05$), donde a mayor concentración de Eugenol, menor es el tiempo de inducción, el tratamiento 5 aunque es la concentración más alta tiene mayor tiempo de inducción de (4.19 min) en comparación con el tratamiento 4 (3.08 min). Con el tratamiento 1 (20mg/L) no se alcanzó plano III de anestesia a pesar de haber realizado la observación por un periodo de 10 minutos. En los tratamientos 3, 4 y 5 (40, 50 y 60 mg/L) se observaron los menores tiempos de inducción, sin mostrar diferencias significativas ($P > 0.05$) con tiempos de inducción de 5.05, 4.19 y 3.07 min, respectivamente. Por lo tanto, se considera el tratamiento 3 de (40 mg/), como concentración ideal debido a que se encuentra en el grupo de menor tiempo de inducción utilizando la menor cantidad de anestésico.

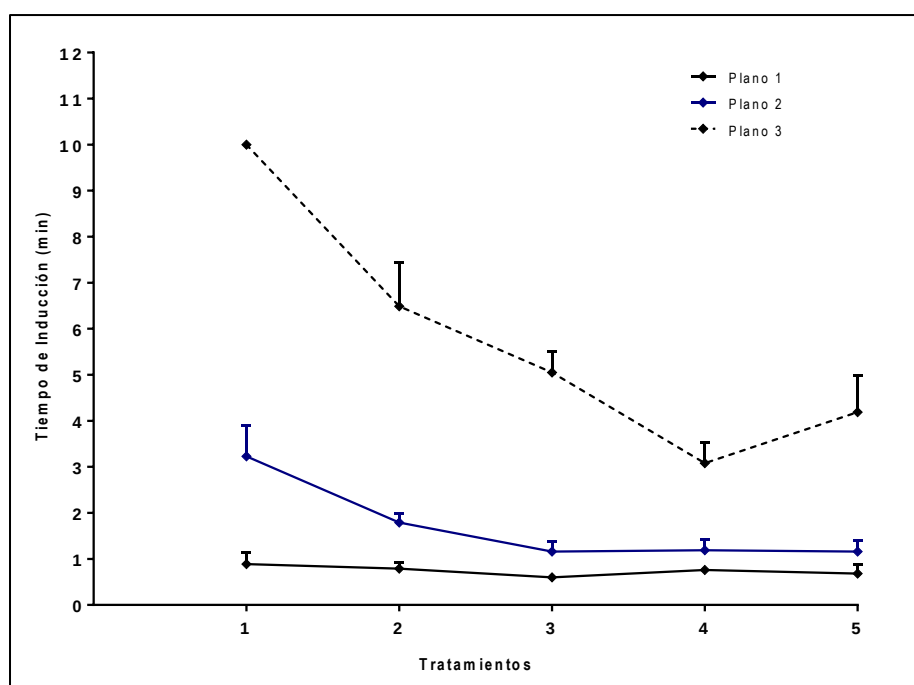


Figura 1. Tiempos de inducción a la anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos se reportan para los planos I, II y III de anestesia.

Para los planos de recuperación utilizando Eugenol como anestésico, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales para el plano V ($P < 0.05$). En todos los tratamientos los peces se recuperaron antes de 10 minutos. En la figura 2 se muestra que para el plano I de recuperación no importa la concentración del tratamiento debido a que se recuperan casi al mismo tiempo, para los planos II, III, IV y V dependen de la concentración, a mayor concentración mayor es el tiempo de recuperación. Para los tratamientos 2, 3 y 4 (30, 40 y 50 mg/L respectivamente) no se observa diferencia significativa ($P > 0.05$) con tiempos de 4.09, 6.01 y 6.56 min respectivamente. Para el tratamiento 1 (20 mg/L) se observa el menor tiempo de recuperación ($P < 0.05$) con un periodo de 2.92 min, y el tratamiento 5 de 7.77 min con el mayor tiempo de recuperación ($P < 0.05$). Cuando se comparan los tiempos de recuperación en el plano V teniendo en cuenta el tiempo de inducción en el plano III, los resultados mostraron que el tratamiento 3 (40 mg/L) mostró los menores tiempos de inducción y recuperación con valores de 5.05 y 6.56 min respectivamente, como se muestra en la figura 3.

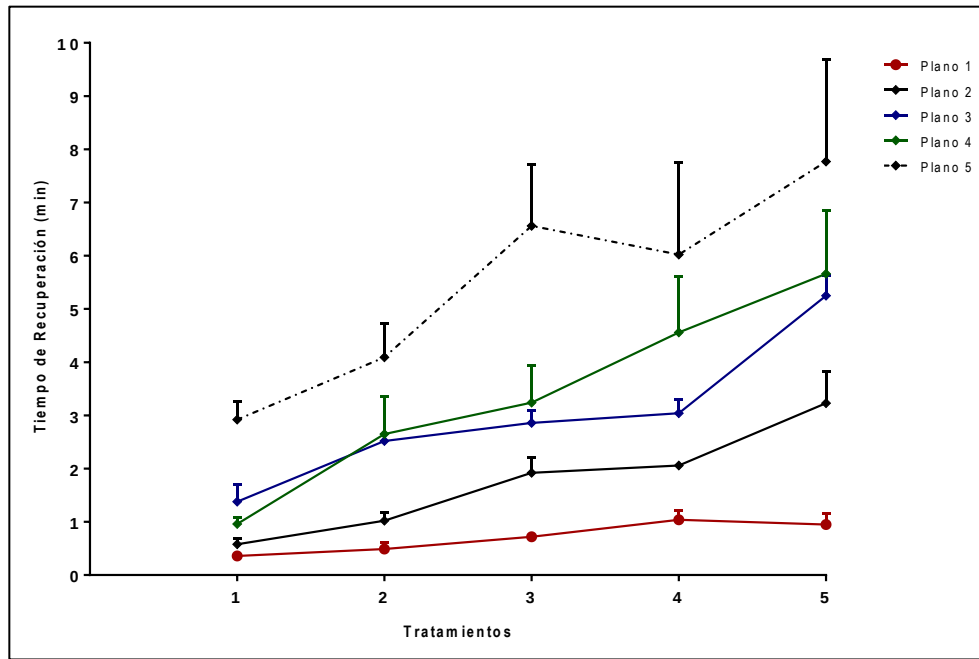


Figura 2. Tiempos de recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (*Pimelodus grosskopfii*), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos de recuperación se reportan para los planos I, II, III, IV, V.

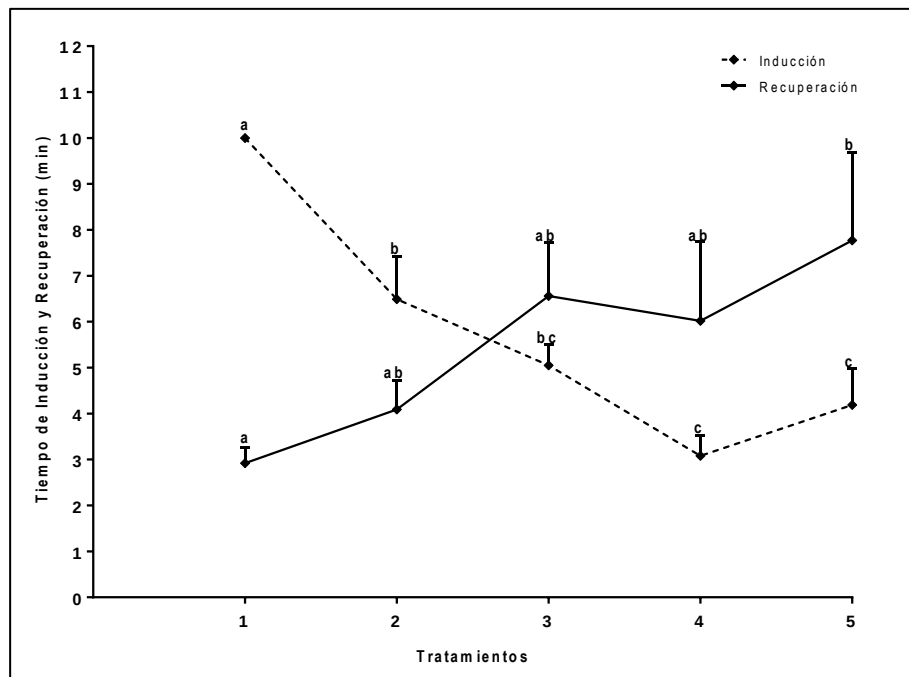


Figura 3. Tiempos de inducción y recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando Eugenol como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:20, T2:30, T3:40, T4:50 y T5:60 mg/L. Los tiempos se reportan para el plano III de inducción y plano 5 de recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales ($P<0.05$).

En la tabla 5 se observan los tiempos de inducción para plano III y recuperación para plano V en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), anestesiados con MS-222.

En la figura 4, se observan los tiempos de inducción utilizando MS-222 como anestésico. Para los planos I y II de anestesia en todos los tratamientos los tiempos de inducción son similares, no dependientes de la concentración del anestésico. En el plano III de anestesia para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 (60, 70, 80 y 90 mg/L, respectivamente) dependen de la concentración del anestésico observándose diferencia significativa entre tratamientos ($P<0.05$), a mayor concentración menor es el tiempo de inducción. El tratamiento 1 no alcanzo plano III de anestesia (observándose hasta el minuto 10). El tratamiento 2 alcanzó plano III de anestesia a los 5.94min, siendo el de mayor tiempo de inducción ($P<0.05$) y, no cumpliendo con los requerimientos de un anestésico ideal. Para los tratamientos 3, 4 y 5 se observaron los menores tiempos de inducción con 3.43, 2.75 y 3.45 min respectivamente, sin observarse diferencias significativas ($P<0.05$) entre ellos. Por lo tanto, se considera el tratamiento 3 de 80 mg/L, como concentración ideal debido a que se encuentra en el grupo de menor tiempo de inducción utilizando la menor concentración de anestésico.

Tabla 5. Tiempos de inducción y recuperación para capaz (*P. grosskopfii*) anestesiados con MS-222, evaluando 5 concentraciones anestésicas. Los datos se presentan como la media± desviación estándar. n: número de animales tratados. Letras diferentes entre columnas significan diferencias significativas (P<0.05) entre las diferentes dosis evaluadas.

		Tiempo (min)			
	Concentración	n	Peso (g)	Inducción	Recuperación
	(mg/L)				
MS-222	60	3	146.73±12,65	10.00 ^a	0.9±0.72 ^a
	70	3	138.93±14.02	5.93±0.86 ^b	2.12±0.24 ^{ab}
	80	3	129.7±9.00	3.43±0.65 ^c	1.62±0.46 ^{ab}
	90	3	128.76±10.52	2.75±0.34 ^c	3.01±1.36 ^b
	100	3	153.36±30.38	3.45±0.45 ^c	2.67±0.50 ^b

Se observan diferencias significativas (P<0.05) para los tiempos de recuperación en los diferentes tratamientos experimentales evaluados, utilizando MS-222 como anestésico en reproductores de capaz (tabla 5 y figura 5).

En la anestesia de capaz (*P. grosskopfii*) con MS-222 tiene una rápida recuperación (menos de 5 minutos). Los planos I y II de recuperación no son dependientes de la concentración, debido que en todos los tratamientos se alcanzan tiempos similares; para el plano III de recuperación dependen de la concentración del anestésico: a mayor concentración mayor es el tiempo de recuperación. El tratamiento 1 con el menor tiempo de recuperación (P<0.5)

con 0.90 minutos aunque con este tratamiento no se alcanza plano III de anestesia y los de mayor tiempo de recuperación los tratamientos 4 y 5 con 3.01 y 2.67 min respectivamente sin presentar diferencias significativas ($P < 0.05$). Cuando se comparan los tiempos de recuperación en el plano V teniendo en cuenta el tiempo de inducción en el plano III, los resultados mostraron que el tratamiento 3 (80 mg/L) presentó los menores tiempos de inducción y recuperación con valores de 3.43 y 1.62 min respectivamente, como se muestra en la figura 6.

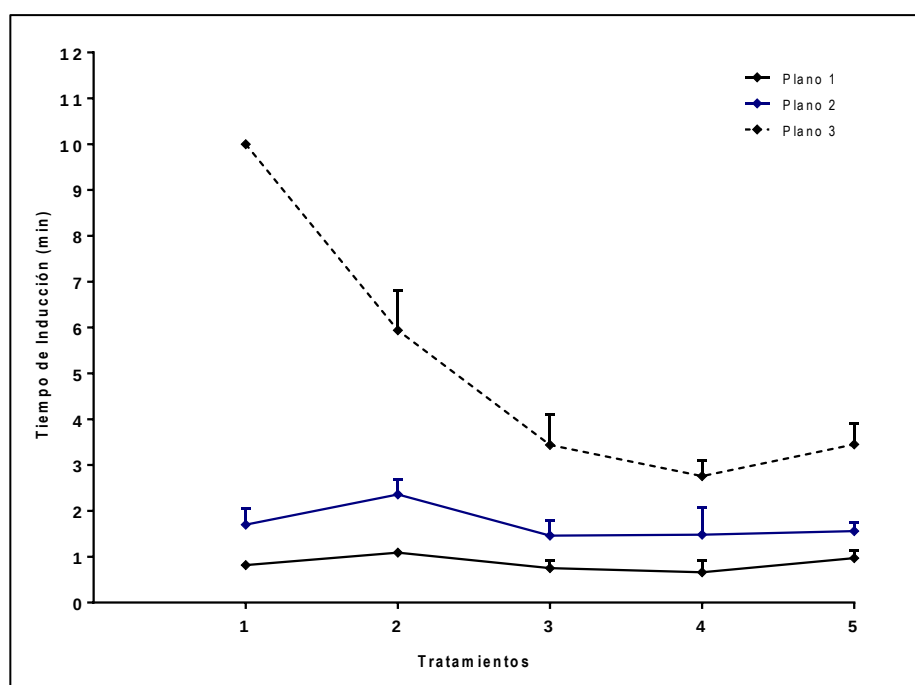


Figura 4. Tiempos de inducción a la anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos se reportan para los planos I, II y III de anestesia.

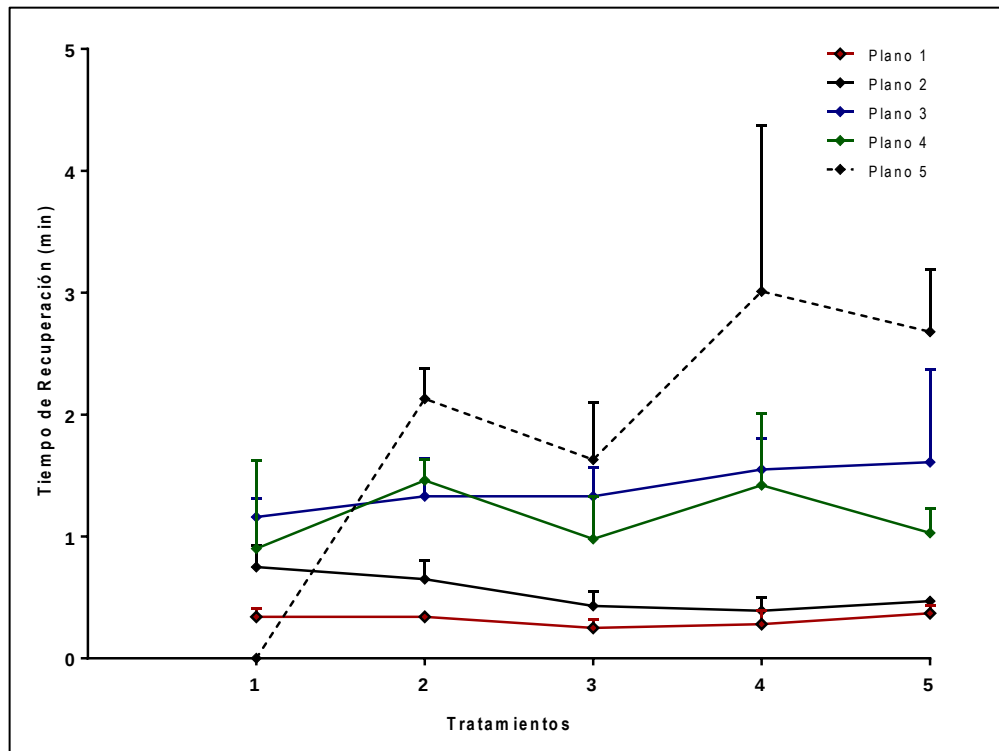


Figura 5. Tiempos de recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos de recuperación se reportan para los planos I, II, III, IV, V.

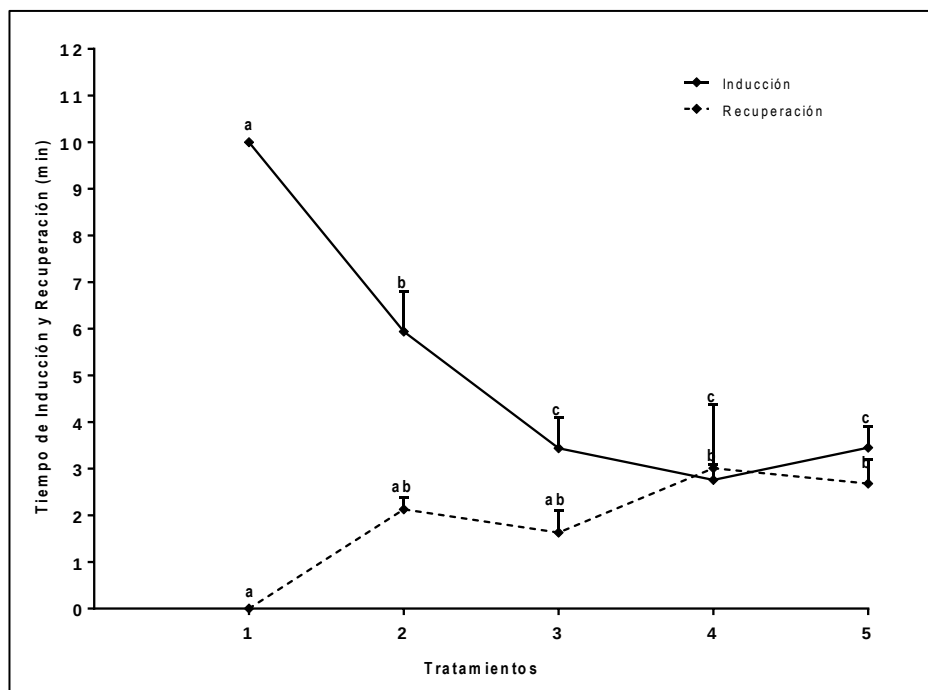


Figura 6. Tiempos de inducción y recuperación de la anestesia en reproductores de capaz (*Pimelodus grosskopfii*), utilizando MS-222 como anestésico, evaluando 5 tratamientos experimentales: T1:60, T2:70, T3:80, T4:90 y T5:100 mg/L. Los tiempos se reportan para el plano III de inducción y plano V de recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos experimentales ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Durante el período experimental las medias de los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los rangos considerados como adecuados para el cultivo de peces de clima cálido, de acuerdo con los registros que definen Teixeira et al. (2010).

Antes de efectuar cualquiera de los experimentos con las diferentes concentraciones de eugenol, se procede a realizar y evaluar los ensayos individuales con etanol, con el fin de descartar algún efecto de sedación o anestesia, donde se retira la idea que este llegase a provocar alguno de los efectos antes mencionados, como lo reportan Mylonas et al., (2005), para Robalo europeo (*Centropomus undecimalis*) y Dorado (*Dicentrarchus labrax*). Para la presente investigación el etanol utilizado en la dilución del anestésico no provocó reacciones adversas ni anestésicas en los reproductores de capaz evaluados.

Por primera vez se determinan los planos de anestesia en capaz (*P. grosskopfii*), donde el plano I confiere una disminución a los estímulos externos, es decir el animal presenta un menor grado de agilidad para realizar sus movimientos habituales normalmente. Para plano II se empieza a observar un nadado errático y pérdida parcial de su equilibrio, el animal opta por una posición de medio lado al momento de realizar su nado. Millán et al., (2012)

en *Pterophyllum scalare* reporta que el plano I de anestesia es de pérdida parcial del eje de nado, plano II pérdida total del eje de nado que corresponde al plano III de los capaz y como plano III correspondiente a colapso medular.

En el presente estudio en el plano III de anestesia se observó pérdida total del equilibrio, fin de la locomoción, movimiento leve de la aleta caudal y movimientos operculares lentos, los peces fueron extraídos del acuario inmóviles; en algunos casos al sacarlos del agua se encontraban con movimientos de la aleta caudal y rápidamente se sumergían de nuevo al anestésico. Weber, (2009) reporta en Lenguado (*Solea senegalensis*) plano II de anestesia como pérdida total del equilibrio y tono muscular con poca frecuencia de movimientos operculares y respuestas reflejas fuertemente atenuadas, también se asume que al no existir frecuencia opercular a simple vista, alcanzaba ya un plano III de anestesia.

Los anestésicos se determinan por los tiempos de inducción y recuperación, para evaluar la profundidad de la anestesia se evalúan indicadores donde los más comunes son: frecuencia cardiaca, respiratoria y presión arterial entre otros, estos siendo difíciles de evaluar además de que se trata de anestesias rápidas, por lo tanto, se definen en planos de anestesia (Hilde *et al.*, 2012), variando los planos de acuerdo a los autores y las especies a evaluar.

Estadios de planos de inducción y recuperación para el pez cebrá (*Danio rerio*), son reportados por Ayala, (2014), donde el periodo de inducción se describe como etapa 1, una pérdida parcial del eje de nado, etapa 2, como la pérdida total de su eje de nado, acompañado de una frecuencia opercular lenta, pero que se mantiene constante, etapa 3 como colapso medular. En esta etapa anestésica generalmente, existe una irrupción de la respiración, en la cual se ve afectada la transferencia de O₂, generando en el animal una acidosis respiratoria y por consiguiente un proceso de hipoxia. Por último, se clasifica una

cuarta etapa, o también llamada etapa de la muerte, donde se denota una pérdida total de los movimientos operculares, acompañado finalmente de un paro cardíaco (Wilson et al., 2009).

De igual manera se procede a describir las etapas de recuperación. La etapa 1 consta de una recuperación leve de sus movimientos operculares, aun sin recuperar su noto muscular. La etapa 2 constata de un inicio del movimiento de sus aletas e iniciación leve de sus movimientos corporales, por último la recuperación del eje de nado y total percepción a los estímulos y reflejos de huida, catalogada como etapa 3 de recuperación (Ayala, 2014).

Por estas experiencias mencionadas anteriormente se asume una pérdida total del equilibrio cuando el pez tiene situado su lado ciego mirando para arriba, siendo imposible recuperar su postura normal. Del mismo modo se define la recuperación, con un estado del pez a su postura normal, con la recuperación y movimientos de todas sus funciones motoras.

Durante los experimentos realizados con las diferentes concentraciones de eugenol y MS-222 no se reportó mortalidad de los individuos, los animales previamente anestesiados fueron observados durante un periodo de 24 horas, donde no se observó ninguna anomalía o algún tipo de patología por los procesos de anestesia realizados. De igual forma Souza y Alves, (2006), realizaron seguimiento por una semana donde tampoco reportan algún tipo de secuelas en juveniles de robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) tratados con eugenol.

Se considera el eugenol como uno de los anestésicos ideales, puesto que reúne 6 de los 8 criterios, entre los que se encuentra el generar un proceso de inducción de 3 minutos o menos, también el de no causar toxicidad para los peces en todos los niveles de tratamiento, no generan problemas de seguridad para mamíferos y bajos residuos sobre el tejido después del tiempo de retiro (Marking y Meyer, 1985). Tanganelli, (2014) en anestesia y toxicidad de Eugenol en juveniles de jundiá (*Rhamdia quelen*) reportan que esté

en pruebas sensoriales cambia el sabor de los filetes, por lo tanto no es recomendado para el uso en consumo humano.

La concentración de 30 mg/L de eugenol no fue eficaz en reproductores de capaz, puesto que el proceso de inducción tarda más del recomendado; según Roubach et al. (2001), la inducción debe resultar entre uno y tres minutos. Aunque un estudio reportado por Pérez et al., (2010) en pacú (*Piaractus mesopotamicus*) se determina que la concentración optima es de 30 mg/L para producir anestesia ideal.

Teniendo en cuenta las 5 concentraciones utilizadas de eugenol (20, 30, 40, 50 60 mg/L) como anestésico en el experimento, se determinó que a mayor concentración del anestésico menor es el tiempo de inducción, resultados similares fueron reportados por Vidal et al., (2006) y Cooke et al., (2004). Según los análisis estadísticos se observó que la concentración de 40 mg/L de eugenol resultó efectiva para inducir anestesia en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), acorde con lo reportado por Millán et al. (2012) en peces escalares (*Pterophyllum scalare*). Por otra parte Soto y Burhanuddin, (1995) reportan una dosis ideal de 100 mg/L para *Siganus lineatus*, mientras que en el experimento realizado por Oliveira et al.,(2006) con eugenol como anestésico para el manejo de juveniles de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), determinaron una dosis optima de 50 mg/L. Otro estudio realizado en el pez espada (*Xiphophorus helleri*) para labores de manipulación, donde se trabajó con concentraciones de 100,125 y 150 mg/L, determinaron que las concentraciones optimas tanto para hembras y machos son de 100 mg/L y 125 mg/L respectivamente.

A mayor concentración del anestésico menor será el tiempo de inducción, así lo determinaron Inoue et al., (2003) y Vidal et al., (2006). El uso de MS-222 presento gran eficacia en concentraciones de 80, 90, 100 mg/L, con pesos promedios de 129,7-128,7-153

g respectivamente, sin presentar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre estos tratamientos, con rápida recuperación. Debido al alto costo en el mercado, se recomienda el tratamiento de 80 mg/L con una inducción de 3.43 minutos y recuperación de 1.62 minutos, con el cual se genera un menor gasto del anestésico. Hinostroza et al., (2013) reportaron una concentración optima de 100 mg/L en paiches (*Arapaima Gigas*). Concentraciones más altas son reportadas en otras investigaciones, como la de Roubach et al. (2001), donde en juveniles de Matrinxã (*Brycon cephalus*) reportan una concentración optima de 150 mg/L con tiempos de inducción de 36 seg y 5.2 min de recuperación; Collymore et al. (2014) reporta la evaluación de cinco anestésicos en peces cebra (*Danio rerio*), donde se demostró que el MS-222 es óptimo a una concentración de 150 mg/L.

Es importante anotar que el eugenol es un producto económico cuando se compara con otros anestésicos usados actualmente en la acuicultura. Pudiendo, llegar a ser hasta treinta veces más económico que el anestésico MS-222, con una alta efectividad y un margen de seguridad aun mayor y en dosis muy bajas (Grush et al., 2004). Tomando en cuenta el costo-beneficio señalado anteriormente, el eugenol se considera una alternativa factible para la anestesia de peces en acuicultura.

CONCLUSIONES

- La dosis de eugenol que genera los mejores tiempos de inducción y recuperación en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), es de 40 mg/L, con tiempos de inducción y recuperación de 5.05 ± 0.46 y 6.56 ± 1.16 minutos respectivamente.
- La dosis de MS-222 que genera los mejores tiempos de inducción y recuperación en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), es de 80 mg/L, con tiempos de inducción y recuperación de 53.43 ± 0.65 y 1.62 ± 0.46 minutos respectivamente.
- Para el caso específico de reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), se recomienda el uso del eugenol ya que este genera menor costo al momento de utilización del anestésico, lo que sería muy benéfico para el productor.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alpharma. (2001): Alpharma Animal Health Ltd. MS222 (Tricaine methane sulphonate) Technical Bulletin 5 / 2001, Revised 9 / 01, pp. 6 Available at: <http://www.europharma.no/fiskehelse/datablad/bedovelse/MS222.pdf> (accessed on 12 May 2011).
- Ayala, N. (2014). Estudio comparativo de los efectos de los anestésicos Metanosulfonato de Tricaína (ms-222) y Eugenol, para su uso en el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba facultad de Veterinaria departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, España.
- Cooke, S., Suski, C., Ostrand, K., Trufts, B. y Wahl, D. (2004). Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 239(1-4), 509–529.
- Coyle, S., Durborow, R., y Tidwell, J. (2004). Anesthetics in aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, N. ° 3900. Texas, USA, 6.
- Cunha, F. y Rosa, I. (2006). Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *J Fish Biol* 69: 1504- 1512.
- Grush, J. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, New Rochele, 1(1).

- Gleed, R. y Ludders, J. (2001). Recent advances in veterinary anesthesia and analgesia: companion animals. International Veterinary Information Service [Internet], [accessed 18 may 2011].
- Hilde, I, Samuelsen, O, Kiessling, A. (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem*. 38:201–218.
- Hinostroza, E. y Serrano, E. (2013). Efecto anestésico del Metasulfonato de Tricaína en Paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. *Rev Inv Vet Perú* 2013; 24(4): 451-458
- Inoue, L., Santos, C. y Moraes, G. (2003) Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*. 33, 943-947.
- Kreinberg, H. (2000). The laboratory fish. pp. 503-511.
- Marín, G., Torres, A., Naranjo, L., Chacón, R. y Rondón, A. (2012), Concentración letal 50 a 96 horas de eugenol en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Orinoquia*. 16, 2.
- Marking, L., Meyer, F. (1985). Are better anaesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, Bethesda, 10, 2–5.
- Millán, L., Torres, A., Marín, G., Ramirez, W., Vásquez, M. y Rondón, I. (2012). Concentración Anestésica del Eugenol en Peces Escalares (*Pterophyllum scalare*). *Rev Inv Vet Perú*. 23 (2), 171-181.
- Mylonas, C., Cardinaletti, T., Sigelaki, I., y Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2- phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246, 467-481.

- Ohr, E. (1976). Tricaine methanesulfonate-I. pH and its effect on aesthetic potency. *Comp. Biochem. Physiol*, 54, 13–17.
- Oliveira, L., Branco, R., Luscher, A., y Rodamilans, G. (2006). Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Sci. Biol. Sci.* 28(3), 275-279.
- Perez, P., Santos, L., Augusto, A., Vieira, P., Solis, L. (2010). Aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *An. Vet. (Murcia)* 26, 69-76.
- Pirhonen, J. y Schreck, C. (2003). Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 220, 507-514.
- Roubach, R., Gomes, L. y Val, A. (2001). Safest level of tricaine methanosulfanate (MSS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amaz.* 31: 159-163.
- Smit, G., y Hattingh, J. (1979). Anaesthetic potency of MS 222 and neutralized MS 222 as studied in three freshwater species. *Comp. Biochem. Physiol.* 62C, 237–241.
- Soto, C. (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136, 149-152.
- Souza, V., Alves, T. (2006). A eficácia do óleo de cravo (eugenol) como anestésico no manejo de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, mantidos em cativeiro. Resúmenes *AQUACIENCIA* (Bento Gonçalves).CD-ROM.

- Suarez, R., Bernal, G., Velasco, J., Pinzon, M., Eslava, P. y Baldisserotto, B. (2014). Eugenol como anestésico para el manejo de juveniles del híbrido *Pseudoplatystoma metaense* por *Leiarius marmoratus*. *Orinoquia*, 18. 256-259.
- Tanganelli, R. (2014). Anestesia e toxicidade aguda do eugenol aplicado em juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Tesis Pregrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil.
- Teixeira, E., Oliveira, E., Saliba, S., Castro, E., Carvalho, P., Crepaldi, D. y Pimentel, L. (2010). Coeficientes de digestibilidade aparente de alimentos energéticos para juvenis de surubim. *R. Bras. Zootec*, 39(6),1180-1185.
- Velasco, Y., Palacios, C. y Cruz, P. (2008). Eficiencia anestésica de 2-fenoxieta- nol, benzocaina, quinaldina y metasulfonato de tricaina en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) *Revista MVZ Córdoba*, 13(3): 1435-1445
- Vidal, L., Albinati, R., Albinati, A. y Macedo, G. (2006). Utilização do Eugenol como Anestésico para o Manejo de Juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá*, 28, 3.
- Wilson, J., Bunte, R. y Carty, A. (2009). Evaluation of Rapid Cooling and Tricaine Methanesulfonate (MS222) as Methods of Euthanasia in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 48, Nº 6, November. Pages: 785–789.
- Zahl, I., Kiessling, A., Samuelsen, O., y Hansen, M. (2009). Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Effect of preanaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, 295, 62–69.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE DOS SUSTANCIAS ANESTÉSICAS SOBRE PARAMETROS SANGUÍNEOS ASOCIADOS AL ESTRÉS EN CAPAZ (*Pimelodus grosskopfii*)

RESUMEN

La hematología en peces es una herramienta importante en el sector de la piscicultura, basada en la evaluación y determinación de las condiciones fisiológicas y de salud normales en las diferentes especies. Diferentes actividades de rutina en las producciones acuícolas generan en cierto grado un nivel de estrés, que afectan el bienestar animal y por consiguiente no se llega a explotar al máximo todos sus parámetros productivos. Los animales usados en este experimento son previamente acondicionados y puestos en ayunas durante un periodo de 24 horas post – experimento. El presente estudio tuvo como objetivo principal, la evaluación de dos sustancias anestésicas y su efecto en la medición de tres parámetros sanguíneos asociados al estrés (Hematocrito, Hemoglobina y glucosa) en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*). La fase experimental constó de 4 fases: fase 1 (animales estresados sin anestesia, Eugenol), fase 2 (animales estresados con Anestesia, Eugenol), fase 3 (animales estresados sin Anestesia MS222) y fase 4 (Animales estresados con anestesia MS222). Para cada una de las fases se obtuvieron las muestras de sangre a los 5 minutos, 30 minutos 24 horas post-estrés. Aquellos animales estresados sin anestesia y con anestesia (Eugenol y MS222) no mostraron diferencias significativas en los parámetros hematocrito y hemoglobina en ninguno de los tiempos evaluados (5 minutos, 30 minutos, 24 horas), mientras que la variable Glucosa si presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) a

los 5 minutos con un valor de (116.86 g/dL) al momento de realizada la prueba de animales estresados sin anestesia; posteriormente se presentó un descenso a los 24 min con valores de (91.91 g/dL) y una estabilización a las 24 horas , con valores con (50.90 g/dL). Diferencias significativas vuelven hacer denotadas al momento de evaluar los animales estresados con anestesia MS-222, con niveles de glucosa de (79.18 g/dL), (60.91 g/dL), (48.49 g/dL) a los 5, 30 minutos y 24 horas, respectivamente. Lo anterior lleva a conferir que la variable glucosa si es un parámetro indicador de estrés en reproductores de capaz, debido a que fue el único indicador sanguíneo que mostro alteraciones significativas en la fase experimental. Al momento de diferir el anestésico de mayor efectividad en términos de glucosa, se elige el eugenol, ya que este tiene un efecto significativo en cuanto a los niveles de glucosa se refiere, esto dado luego de la primera toma a los 5 minutos post-estrés.

Palabras claves: hematología, glucosa, hemoglobina, hematocrito, MS-222, Estrés, eugenol, anestésico.

INTRODUCCIÓN

En la acuicultura el efecto del estrés, puede generar un impacto negativo que trae como consecuencia la generación de enfermedades, lo que puede afectar la reproducción y el crecimiento de los peces (Cho y Heath, 2000). La manipulación en reproductores, así como los procedimientos de extracción de gametos generados por las presiones que se ejercen a nivel abdominal generan un alto nivel de estrés, y esto se ve reflejado en la disminución de la fecundidad, calidad del desove y fertilidad, debido a un efecto de inmunosupresión por el que pasa el animal (Hobby y Pankhurst 1997).

Por las razones anteriormente mencionadas se hace útil el uso de anestésicos durante la manipulación de rutina (selección de reproductores, pesajes, mediciones, marcajes, tomas de muestras de sangre, biopsias entre otras) no solo para reducir daños físicos, sino también para generar una gran reducción del estrés (Cho y Heath, 2000).

Los valores hematológicos son importantes para la evaluación del estado fisiológico de los peces. Cambios en dichos parámetros dependen de la especie, estado de madurez y condiciones generales de salud (Hrubec *et al.*, 2001). En cuanto a la relación de los indicadores fisiológicos, el estudio de las características sanguíneas, puede contribuir a generar información complementaria para pronósticos y diagnósticos de las condiciones mórbidas en las distintas poblaciones de peces, como también para la identificación, diagnóstico y control de los diferentes tipos de estrés a los que las especies son sometidas, esto con un propósito común, mantener una adecuada salud y bienestar en los peces (Tavares *et al.*, 2003).

El objetivo de este trabajo fue la utilización de dos anestésicos comúnmente usados en la acuicultura, que previamente fueron evaluados en diferentes concentraciones y posteriormente, se opta por elegir la mejor dosis para cada uno de ellos. Es así como se procedió a determinar si el efecto de los anestésicos aplicados, inhiben el mecanismo del estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), mediante la determinación de parámetros sanguíneos asociados al estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pesca, selección y adaptación de los peces.

Los peces fueron extraídos del estanque con ayuda de chinchorro 24 horas antes de realizar las pruebas, esto con el fin de que el estrés generado durante la pesca no afecte los parámetros evaluados. Posteriormente fueron transportados en un contenedor con capacidad de 60 L (el transporte del lago al laboratorio duro aproximadamente 5 minutos). Se mantuvieron en tanques de 2000 L, con recambio y aireación constante. Al terminarse las pruebas, los individuos se mantuvieron en tanques de 2000L en observación durante 24 horas y se adiciono 1 g de sal por litro de agua como medida profiláctica.

Para la obtención para las muestras de sangre para los dos tratamientos de anestesia a evaluar (animales estresados con anestesia MS-222 y eugenol) se procede a utilizar la mejor dosis evaluada en el capítulo anterior (II), 80 mg/L para MS-222 y 40 mg/L para eugenol.

Química sanguínea

Para evaluar los indicadores de estrés, se utilizó la mejor concentración dada por los tiempos de inducción y recuperación (Ver capítulo II), para cada uno de los anestésicos (Eugenol y MS-222). Estos fueron determinados en un lote de 36 reproductores (18 por anestésico), evaluados en dos grupos: 1. Animales sometidos a estrés sin anestesia y 2. Animales sometidos a estrés con anestesia.

Animales sometidos a estrés sin uso de anestesia.

Se tomaron 9 reproductores de capaz por anestésico, los cuales se situaron en 1 tanque de 2000 L de capacidad. Posteriormente fueron capturados con ayuda de una polisombra y

expuestos al aire durante 3 minutos (como situación generadora de estrés). Rápidamente se pasaron individualmente a un sistema de acuarios (40 L d capacidad cada uno) que están compuestos por recirculación, control de temperatura, filtro mecánico, biológico y ultravioleta. Pasados 5 minutos, 30 minutos y 24 horas se sacaron de a dos peces al azar y se anestesiaron con el anestésico a evaluar durante 3 minutos; ágilmente se colocó en posición lateral sobre un paño húmedo y los ojos tapados, extrayendo la sangre de la vena caudal.

Animales sometidos a estrés con anestesia.

Se utilizó la misma metodología de los animales sometidos a estrés sin uso de anestesia, pero en este caso antes de la exposición al aire se anestesiaron con el anestésico a evaluar (Eugenol o MS-222) en el tanque de 2000 L durante 5 minutos, luego se pasaron a los acuarios de 40 L y por último se realizó la extracción de sangre.

Determinación de parámetros sanguíneos.

La extracción de las muestras de sangre se realizó por medio de punción de la vena caudal, con jeringa desechable y aguja de 22 x 32 mm, previamente humedecidas con heparina (10,000 U.I.). Se colectó un volumen aproximado de 1 mL de sangre, el cual se recibió en un vial previamente humedecido con heparina. Los parámetros de hematocrito (HTC), hemoglobina (HB) y glucosa se determinaron por triplicado para cada muestra.

-Microhematocrito.

Se realizó llenando capilar heparinizado de la mitad a $\frac{3}{4}$ partes; la sangre se tomó directamente del vial, sellándose por el extremo con critoseal. Los capilares se

centrifugaron a 11000 r.p.m., por un periodo de 5 minutos; posteriormente se midió con ayuda de una regla para microhematocrito.

Una vez efectuado lo anterior se realizó la determinación de hemoglobina y glucosa con ayuda de un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer lambda 35[®], utilizando kit comercial de Spinreact[®].

-Hemoglobina.

Se preparó el reactivo de trabajo así: para 250 mL del Stock: 245 mL agua destilada + 1 frasco (5 mL) de reactivo. Una vez preparado se mantuvo en refrigeración entre 2-8°C, protegido de la luz. Las pruebas se realizaron en cubetas de 1.0 cm de paso de luz, agregando 2.5ml del reactivo de trabajo y luego 10 µL de la muestra; se tapó y agitó suavemente dejándose incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente (25°C). Se calibró el espectrofotómetro para lectura a 540 nm y se leyó la absorbancia de la muestra frente al blanco. En todos los casos se utilizó una curva con el estándar correspondiente según las indicaciones del método.

El cálculo se realizó mediante patrón:

$$\frac{\text{Absorbancia de la Muestra}}{\text{Absorbancia del Patrón}} \times 15 \text{ (conc. Patrón) g/dL de hemoglobina en la muestra}$$

-Glucosa

Rápidamente se centrifugaron las muestras a 5.000 rpm y 12 °C durante 5 minutos, con el fin de obtener plasma que se utilizó para la determinación de glucosa. Se preparó el reactivo de trabajo así: El contenido de un vial de R2 Enzimas se disolvió en un frasco de R1 Tampón, se tapó y mezcló suavemente hasta disolver el contenido y se mantuvo en

refrigeración entre 2-8°C. Las pruebas se realizaron en cubetas de 1.0 cm de paso de luz, agregando 1 mL del reactivo de trabajo y 10 µL de la muestra; se tapó y agito suavemente dejándose incubar durante 20 minutos en temperatura ambiente (25°C). Se calibro el espectrofotómetro para lecturas a 505 nm y se leyó la absorbancia de la muestra frente al blanco. En todos los casos se utilizó una curva con el estándar correspondiente según las indicaciones del método.

El cálculo se realizó mediante patrón:

$$\frac{\text{Absorbancia de la Muestra}}{\text{Absorbancia del Patrón}} \times 100 \text{ (conc. Patrón) mg/dL de glucosa en la muestra}$$

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva, estimando la media y desvío estándar de las diferentes variables evaluadas. Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza ($P < 0.05$). En el caso que existieran diferencias significativas entre los tratamientos (anestésicos) estas fueron determinadas mediante una prueba de Tukey (< 0.05). Para los análisis se utilizará el análisis estadístico SPSS.

RESULTADOS

En el tratamiento donde se evaluó el anestésico eugenol en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), expuestos a condiciones de estrés, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en ninguno de los tiempos y parámetros evaluados (figura 7).

Por otra parte, en los individuos que no se les suministró eugenol no se observó diferencias significativas ($P>0.05$) para las variables hematocrito y hemoglobina en los diferentes tiempos de muestreo (5 minutos ,30 minutos y 24 horas). Por el contrario, para los promedios de glucosa se observan diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tiempos evaluados, a los 5 min se evidencian los niveles más elevados con valores de glucosa de 116.86 g/dL, a los 30 minutos se nota una disminución de los niveles con valores de 91.91 g/dL y a las 24 horas con una caída significativa de los niveles de glucosa con valores de 50.90 g/dL (figura 8).

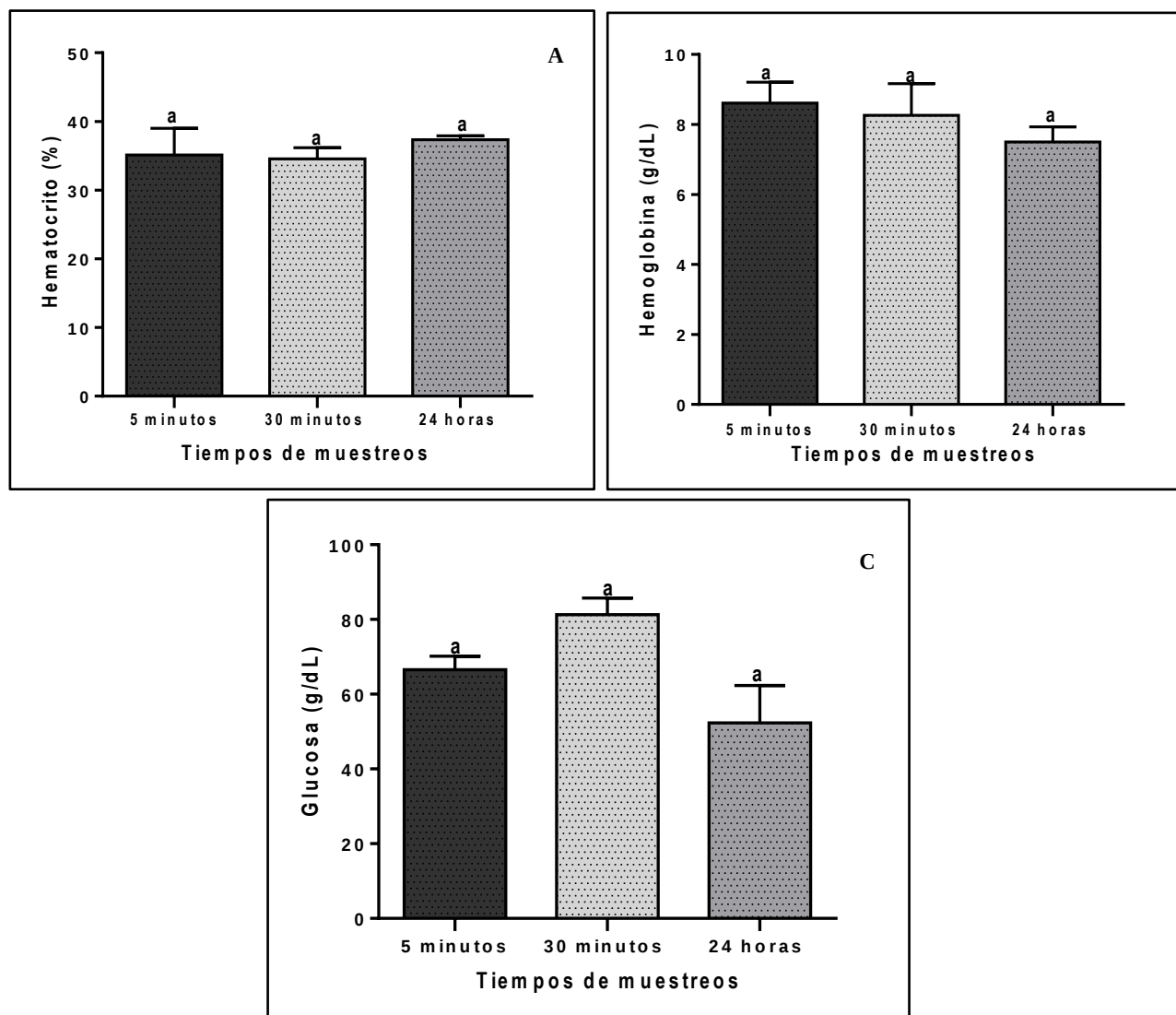


Figura 7. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando como anestésico eugenol. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).

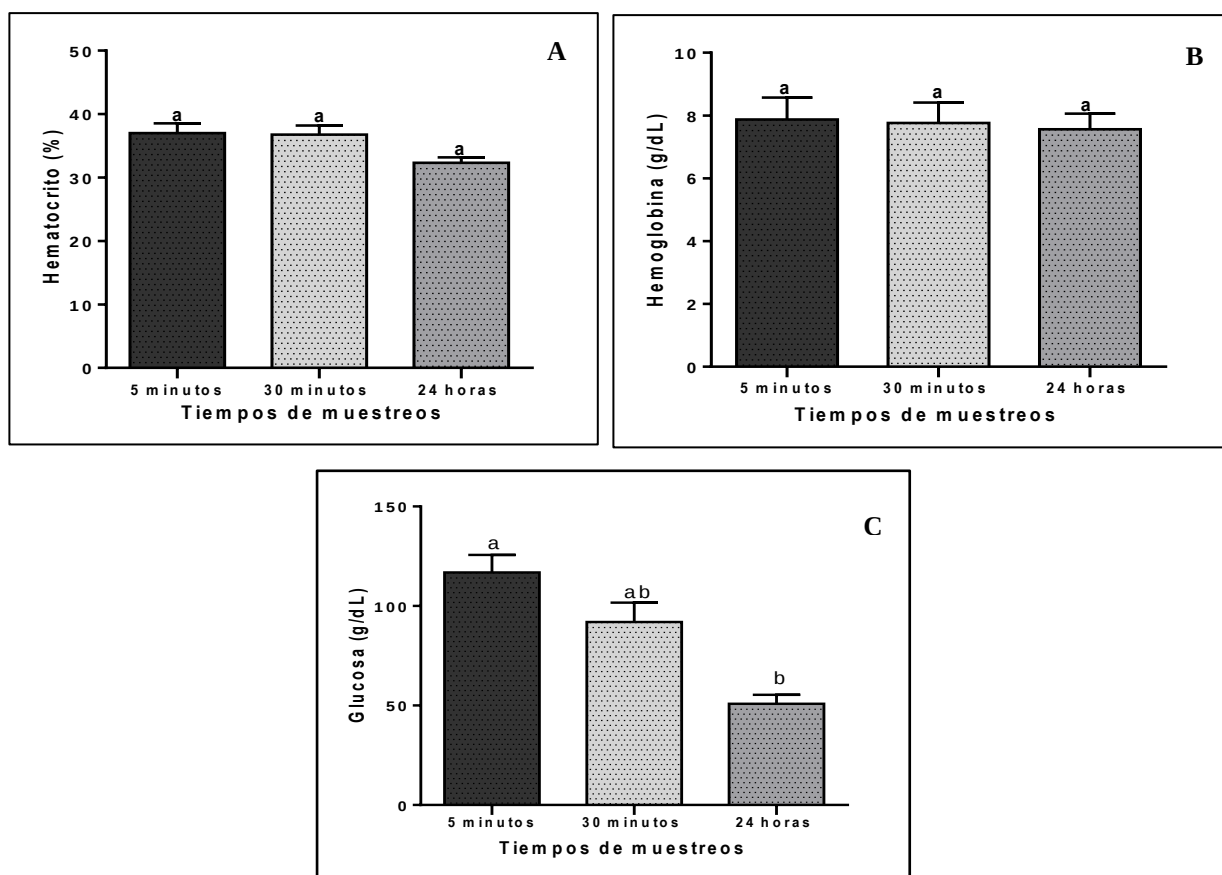


Figura 8. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), sin utilizar eugenol. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).

En el tratamiento donde se utilizó MS-222 como anestésico en individuos de capaz (*P. grosskopfii*), estresados, no se encontraron diferencias significativas para las variables de hematocrito y hemoglobina en los tiempos evaluados ($P > 0.05$), sin embargo en los valores de glucosa se observa que hay diferencias significativas entre los tiempos evaluados, ($P < 0.05$), a los 5 min con los niveles más elevados de glucosa 79,18 g/dL, a los 30 min se nota una disminución de los niveles con 60,91 g/dL y a las 24 horas con una caída significativa de los niveles de glucosa con 48,49 g/dL (figura 9) .

Por otra parte en individuos sin uso de anestésico no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos evaluados ($P>0.05$) para ninguna de las variables evaluadas (figura 10).

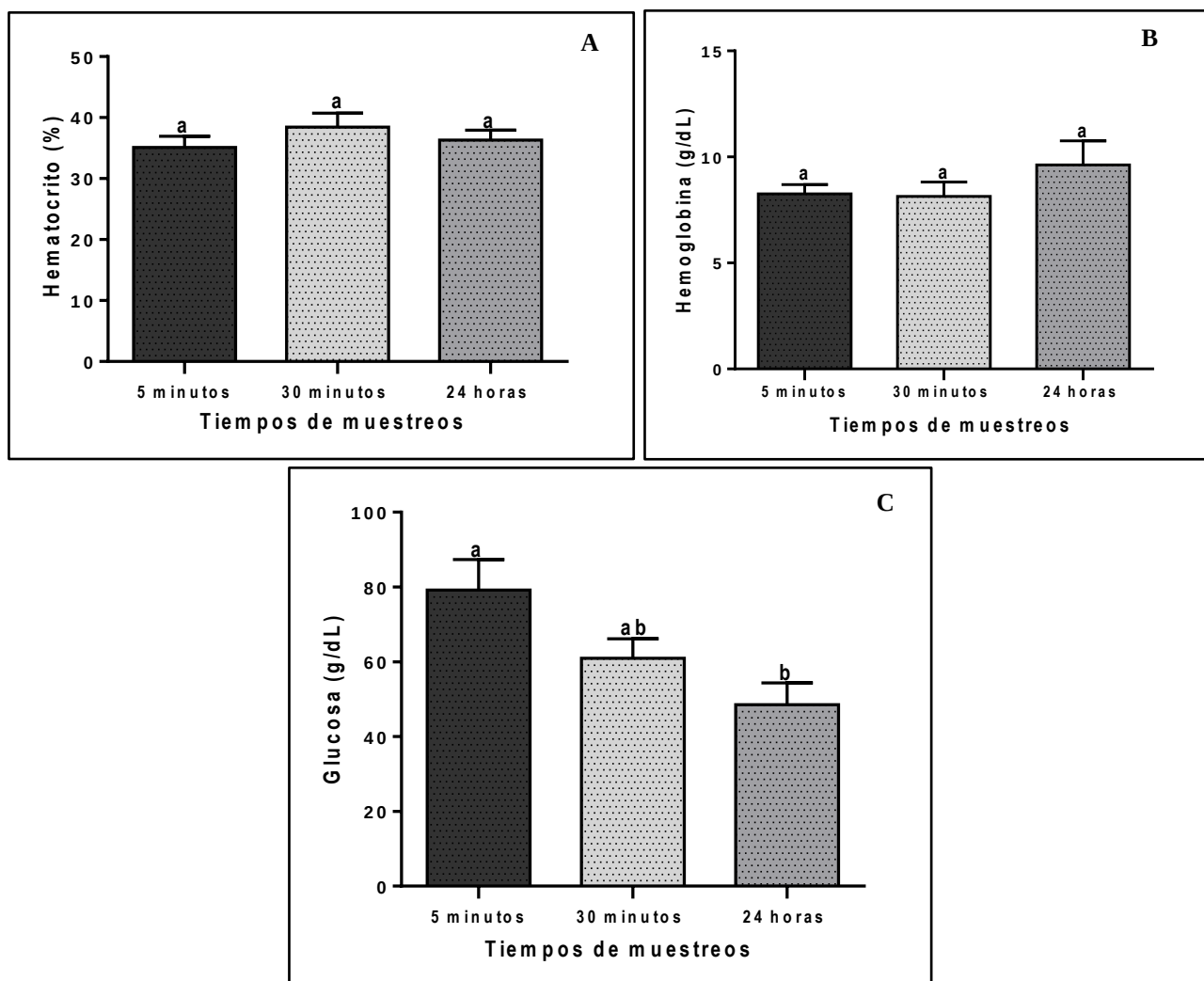


Figura 9. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), utilizando como anestésico MS-222. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).

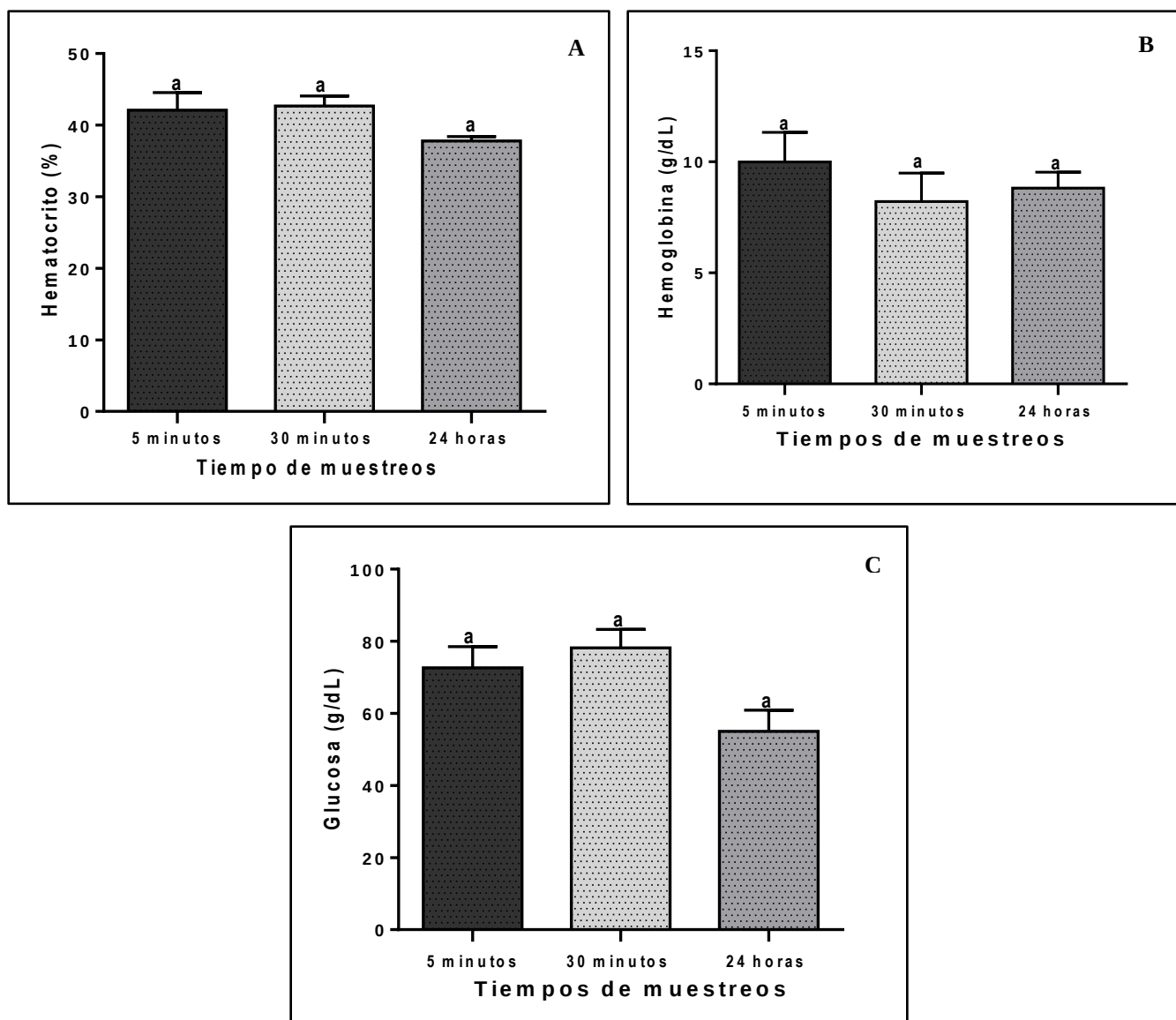


Figura 10. Parámetros sanguíneos asociados al estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), sin utilizar MS-222. A. Hematocrito (%); B. Hemoglobina (g/dL) y C. Glucosa (g/dL).

Para los diferentes tratamientos evaluados en los diferentes tiempos de exposición no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para las variables hematocrito y hemoglobina en animales estresados utilizando anestésico (eugenol o MS-222), ni en animales sin utilizar anestesia. Por otra parte para glucosa se observan diferencia

significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), con valores a los 5 min de 116.86 g/dL para el tratamiento 1 siendo los de mayor concentración y los de menor valor para los tratamientos 2 y 3 con valores de 66.54 g/dL y 72.65 g/dL respectivamente y para el tratamiento 4 valores de 79.18 g/dL. Para los 30 minutos y 24 horas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos como lo muestra la tabla 6.

Tabla 6. Variables evaluadas (hematocrito, hemoglobina y glucosa) en diferentes tiempos de muestreo para reproductores de capaz sometidos a estrés utilizando eugenol o MS-222 y sin la utilización de anestésico. T1= Animales estresados sin Anestesia (Eugenol); T2= Animales estresados con Anestesia (Eugenol); T3= Animales estresados sin Anestesia (MS-222) y T4= Animales estresados con Anestesia (MS-222).

Tiempos	Parámetro	T 1	T 2	T 3	T 4
5 minutos	Hematocrito %	37.00 $\pm$ 2.23	35.11 $\pm$ 4.67	42.11 $\pm$ 3.81	35.11 $\pm$ 3.19
	Hemoglobina (g/dL)	7.87 $\pm$ 0.35	8.61 $\pm$ 0.82	9.99 $\pm$ 0.75	8.26 $\pm$ 1.07
	Glucosa (mg/dL)	116.86 $\pm$ 15.95 ^a	66.55 $\pm$ 19.69 ^b	72.66 $\pm$ 2.24 ^b	79.18 $\pm$ 3.31 ^{ab}
30 minutos	Hematocrito %	36.78 $\pm$ 3.55	34.56 $\pm$ 3.25	42.67 $\pm$ 2.76	38.44 $\pm$ 3.15
	Hemoglobina (g/dL)	7.76 $\pm$ 0.37	8.26 $\pm$ 0.16	8.21 $\pm$ 1.42	8.14 $\pm$ 1.33
	Glucosa (mg/dL)	91.92 $\pm$ 22.21	81.27 $\pm$ 2.41	78.16 $\pm$ 14.48	60.92 $\pm$ 10.63
24 horas	Hematocrito %	32.33 $\pm$ 5.04	37.33 $\pm$ 2.99	37.78 $\pm$ 2.53	36.33 $\pm$ 4.50
	Hemoglobina (g/dL)	7.56 $\pm$ 0.47	7.50 $\pm$ 1.92	8.82 $\pm$ 0.89	9.62 $\pm$ 1.37
	Glucosa (mg/dL)	50.90 $\pm$ 9.68	52.33 $\pm$ 20.07	55.00 $\pm$ 3.69	48.50 $\pm$ 9.72

En la figura 11 se muestra la relación entre el peso de los reproductores con las diferentes variables evaluadas (hematocrito, hemoglobina y glucosa). Se observa que la variable hematocrito y hemoglobina presentan un comportamiento lineal, a diferencia de la variable

glucosa que es muy variable con respecto al peso, esto puede deberse a que en los animales existe algún tipo de alteración por el estrés al que son sometidos.

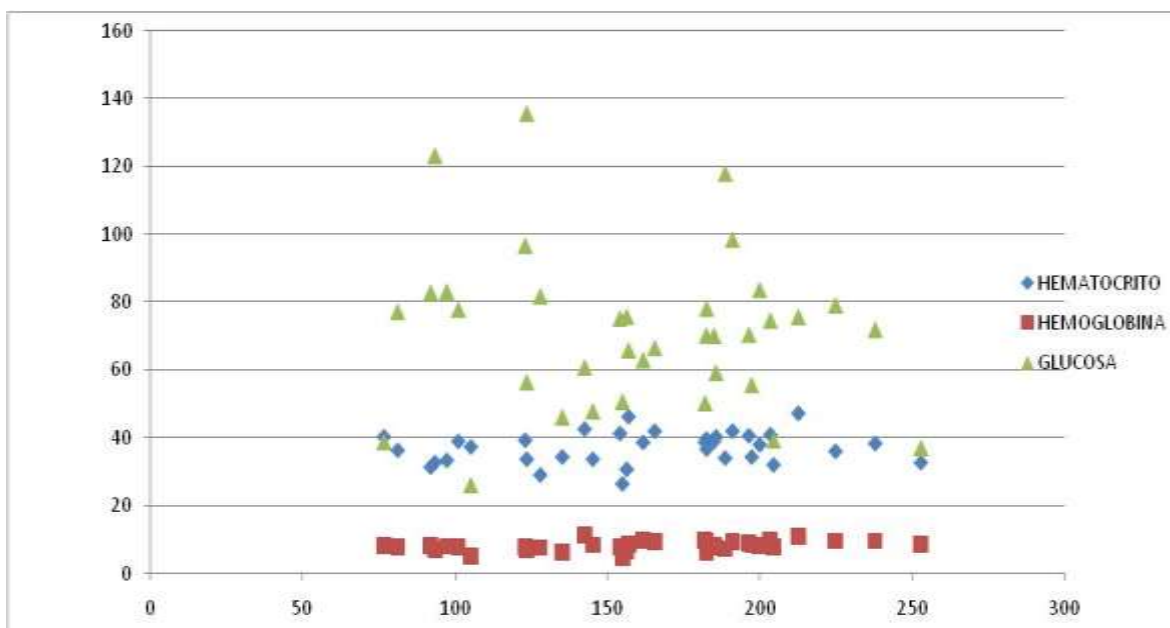


Figura 11. Relación entre el peso de los reproductores de capaz (*P. grosskopfii*), y las diferentes variables evaluadas.

DISCUSIÓN

Los parámetros hematocrito y hemoglobina no tuvieron diferencias significativas para aquellos animales que fueron sometidos a un estrés sin anestesia, así como tampoco hubo diferencias significativas para aquellos animales que fueron sometidos a procedimientos de estrés con anestesia tanto para eugenol como para MS-222 en ninguno de los tiempos evaluados (5 minutos -30 minutos y 24 horas). Weber. (2009) reporta datos similares en la evaluación de parámetros sanguíneos asociados al estrés en el pez lenguado (*Solea senegalensis*). Por otra parte, Los niveles de hematocrito y hemoglobina no muestran

alteraciones significativas ($P < 0.05$), en ninguno de los tiempos evaluados para eugenol al igual que con el uso de MS-222.

Para el parámetro glucosa, en los tratamiento (T1), animales estresados sin anestesia (Eugenol) y tratamiento (T4) animales estresados con anestesia (MS-222) se registró un aumento significativo ($P < 0.05$) en el tiempo de 5 minutos, pero tiende a disminuir a los 30 minutos y a estabilizarse a las 24 horas, dichas diferencias no son notables en el tratamiento (T2) animales estresados con eugenol, ni en el tratamiento (T3) animales estresados sin anestesia (MS-222), mientras que en la evaluación de glucosa para el lenguado (*Solea senegalensis*) se muestran aumentos significativos a los 20 y 30 minutos después de la exposición, de igual manera ocurre en la evaluación con el MS-222 donde se observa un aumento gradual y significativo a partir de los 10 min de exposición, frente al del grupo control (5 minutos).

Herrera *et al.*, 2013 evalúan en dorada (*Sparus aurata*) niveles de glucosa en animales sometidos a situaciones de estrés agudo. Como primera medida se obtienen muestras de sangre de los animales en un estado basal, aquellos animales son sometidos a situaciones de estrés agudo donde son expuestos 3 minutos al aire, es así como 30 minutos post-estrés se obtiene la muestra de sangre, resultados de glucosa no arrojan diferencias significativas ($P < 0.05$) en correlación entre su estado basal y el estrés generado a los 30 minutos, a diferencia de los resultados reportados en este trabajo, dichos niveles de glucosa en aquellos animales estresados sin anestesia (eugenol) (T1) existe una disminución a los 30 minutos después de generado el estrés, luego de existir una alteración significativa a los 5 minutos de tomada la muestra.

Índices hematológicos como bioindicadores de estrés son evaluados en tilapia (*Oreochromis aureus*) con el anestésico MS-222 a concentración de 90 ppm, donde la

variable hematocrito mostró un aumento significativo ($P < 0,05$) luego de las 2 horas post-anestesia; Tomada una nueva muestra a las 24 horas observaron un descenso del hematocrito. En cuanto a la concentración de hemoglobina no existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) para las 2 y 24 horas post-anestesia. Soivo et al., (1977) indican que el aumento de hematocrito es dependiente de la concentración del anestésico, por otra parte, Hatting y Pletzen, (1974) también encontraron aumento de hematocrito en peces de agua dulce anestesiados con MS-222. Caso distinto se presenta en los resultados de este trabajo, donde en reproductores de capaz (*P.grosskopfii*) en ninguno de los casos se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) al momento de evaluar el MS-222 y eugenol, teniendo como base la variable hematocrito.

Un estudio realizado por Valenzuela et al. (2002) en respuestas hematológicas de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), en situaciones de estrés hipóxico agudo, a los 5 minutos de generar el estrés, se tomaron muestras de sangre y observaron un aumento significativo ($P < 0,05$) en el hematocrito, pero en la hemoglobina no se notó dicho aumento, lo cual indicaba que los eritrocitos no eran lo suficientemente maduros, concluyendo que los cambios hematológicos son dependientes del grado de hipoxia y la velocidad del cambio de oxígeno, por lo tanto donde se generan cambios bruscos, los peces no tendrían tiempo para poner en marcha los mecanismos de respuesta como lo es la liberación de suficientes eritrocitos maduros para sostener los niveles de transporte de oxígeno en la sangre.

Ensayos realizados por Gómez et al. (2009) en el pez pacú (*Piaractus mesopotamicus*), en estrés por persecución e hipoxia durante 3 minutos, fueron previamente anestesiados con benzocaína con una concentración de 50 mg/L para la toma de muestras, se observaron aumentos significativos en los niveles de glucosa plasmática en todos los muestreos post-

estrés (15-30-120 minutos); en las variables hematocrito y hemoglobina presentaron aumento a los 15 minutos y posterior reducción durante el periodo de muestreo.

De alguna manera existe una correlación entre los parámetros hematocrito y hemoglobina, ya que dichos valores hemáticos están relacionados con el habitat y actividad que realizan las diferentes especies. Tavares-Dias y Moraes, (2004) manifiestan que los peces carnívoros, tienen una mayor concentración de hemoglobina en comparación con los animales de hábitos alimenticios herbívoros y omnívoros. Glazova, (1976) afirma que la variación en el hematocrito se debe a las adaptaciones fisiológicas de las especies, ya que son mayores los valores para aquellos que tienen una mayor actividad locomotora y actividad pelágica migratoria, y valores menores para los de hábitos bentónicos, lentos o sedentarios, en donde los eritrocitos son más grandes y se observan en un menor número.

En la variable hematocrito luego de generados los análisis estadísticos para cada uno de los tratamientos evaluados, animales sin anestesia y con anestesia, al no encontrar diferencias significativas ($P < 0,05$), en cierto nivel de confianza se puede decir que el % normal del hematocrito en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*) oscila entre el 35-40%, dato corroborado por Macías y Rincón., (2010) para la misma especie con un valor de hematocrito 37.8 %.

Según Gómez et al. (2009), en evaluación al estrés por persecución y exposición al aire durante 3 y 5 minutos en el pez pacú (*Piaractus mesopotamicus*), teniendo en cuenta tres parámetros asociados al estrés (hematocrito, hemoglobina, glucosa), con muestreos a los 5, 15, 30, 60 minutos y 24 horas, antes de obtener las muestras de sangre, los anestesiaron con benzocaína a una concentración de 66 mg/L, a los 5 minutos obtuvieron un aumento de glucosa en ambos tratamientos y con una recuperación de los valores de glucosa a las 24

horas; En cuanto a parámetros hematocrito y hemoglobina no se vieron alterados en ninguno de los tratamientos realizados.

Como efectos adversos según Rang et al., (2003) el MS-222 actúa sobre el sistema nervioso central y vascular. Hill et al., (2002), afirman que puede generar niveles elevados de glucosa sanguínea y posteriormente hace el efecto contrario sobre el sistema cardiovascular y respiratorio, Con aumento en el hematocrito, hemoglobina y las catecolaminas plasmáticas. En cuanto al eugenol hay depresión en el sistema cardiovascular, aumento en el hematocrito y catecolaminas plasmática.

Como hipótesis general, se puede decir que los niveles elevados de glucosa se dan por las demandas energéticas que causa el estrés para el metabolismo. Se puede decir que el eje hipotálamo –hipófisis- inter renal es el más funcional y el eje simpático cromafin es poco activado debido a que los hematocritos no se vieron afectado en los tratamientos evaluados.

CONCLUSIONES

- En la evaluación del parámetro hematocrito y hemoglobina se concluyó que no existieron aumentos significativos en ninguno de los 3 tiempos evaluados (5 min, 30 min y 24 horas), tanto para animales sometidos a estrés con y sin anestesia, por lo que bajo estas condiciones experimentales no son indicadores de estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*).
- Los valores más altos de glucosa se reportan a los 5 minutos post-estrés, pero tienden a estabilizarse luego de las 24 horas de tomada la muestra. Por lo que se podría considerar la glucosa como parámetro primordial para la medición de estrés en reproductores de capaz (*P. grosskopfii*).
- El efecto anestésico tanto de eugenol como MS-222, pareciera no tener algún efecto en la disminución de los 3 parámetros indicadores de estrés medidos en este trabajo.
- El eugenol sí posee un efecto inhibidor de estrés en cuando a indicadores de glucosa se refiere.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cho, G. y Heath, D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS22) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac Res*, 31,537-546.
- Gabriel, U., Ezeri, G. y Opabunmi, O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *Afr. J. Biotech.* 3, 463-467.
- Glazova, T. (1976). Physiological and biochemical blood characteristics of some species of tropical fish from the Pacific Ocean. *J. Ichtiol*, 16(1), 95–105.
- Gómez, W., Massago, H., Jordan, D. y Criscuolo, E. (2009) Respuesta del *Piaractus mesopotamicus* a estímulos de persecución e hipoxia. *Orinoquia*. 13(2), 93-100.
- Hattingh, J. y Pletzen, V. (1974). The influence of capture and transportation on some blood parameters of freshwater fish. *Com.Biochem.Physiol.* 49a, 607-609.
- Herrera, M., Lopez, D. y Roca, E. (2013). Eficacia de un método de determinación de cortisol fecal para la evaluación de estrés en la dorada (*Sparus aurata*) cultivada. IFAPA centro agua del pino. Ctra. Cartaya-punta umbría. 21459 cartaya, España.
- Hill, J., Davison, W. y Forster, M. (2002). The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heart ventricle, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol Biochem*, 27, 19–28.

- Hrubec, T., Smith, S. y Robertson, J. (2001). Age related in haematology and chemistry values of hybrid striped bass chrysops *Morone saxatilis*. *Vet. Clin. Path.* 30(1), 8-15.
- López, M. y Rincón, R. (2010). Caracterización sanguínea de diferentes especies icticas de la cuenca alta del rio Cauca (Colombia). *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 39 (1-2), 71-86.
- Rang, H., Dale, M., Ritter, J. y Moore, P. (2003) Pharmacology. *Churchill Livingstone*, London.
- Silveira, R. (2005). Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochormis aureus* (tilapia de cultivo) (Tesis Doctoral en ciencias) Coffigny la Paz, Baja California, USA.
- Tavares, M. y Moraes, F. (2004). Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress.
- Tavares, M., Schalch, Danio Rerio C. y Moraes, F. (2003). Hematological characteristics of brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, Sao Paulo State, Brazil. *Bol. Inst. Pesca*, 29(2): 109-115.
- Valenzuela, A., Alveal, K. y Tarifeño, E (2002). Respuestas hematológicas de truchas (*oncorhynchus mykiss*). *Gayana* 66(2), 255-261.
- Valenzuela, A., Oyarzún, C. y Silva, V. (2003). Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): serie blanca. *Gayana*, 67(1), 130 – 137.

ANEXOS REGISTRO FOTOGRÁFICO



Figura 12. Estadios de anestesia en reproductores de Capaz (*P. grosskopfii*). A, Plano II de anestesia (pérdida parcial del equilibrio y eje de nado). B, Presión en el pedúnculo (Reflejo de huida). C, Plano III de anestesia (pérdida total del equilibrio y fin de la locomoción). D, Recuperación de la anestesia plano II (recuperación del movimiento de aletas).

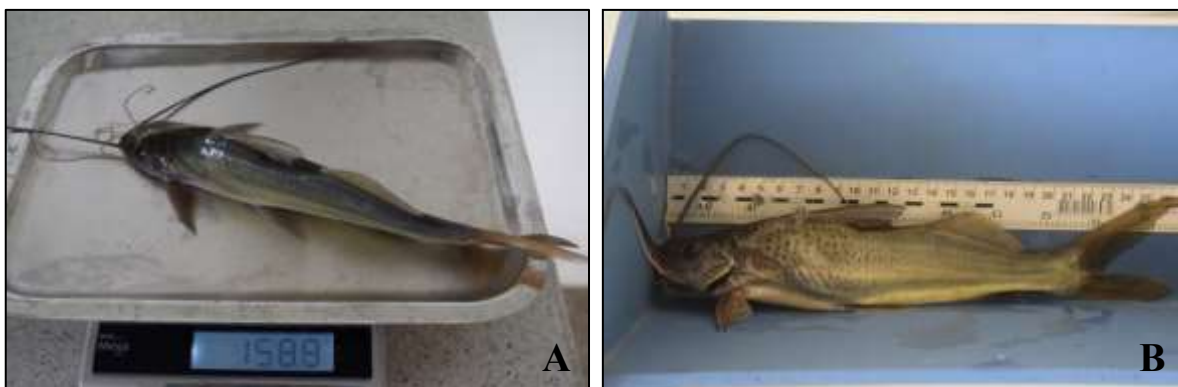


Figura 2. Biometría en reproductores de Capaz (*P. grosskopfii*). anestesiados. A, Pesaje en gramera. B, Medición de longitud total y estándar de los peces.

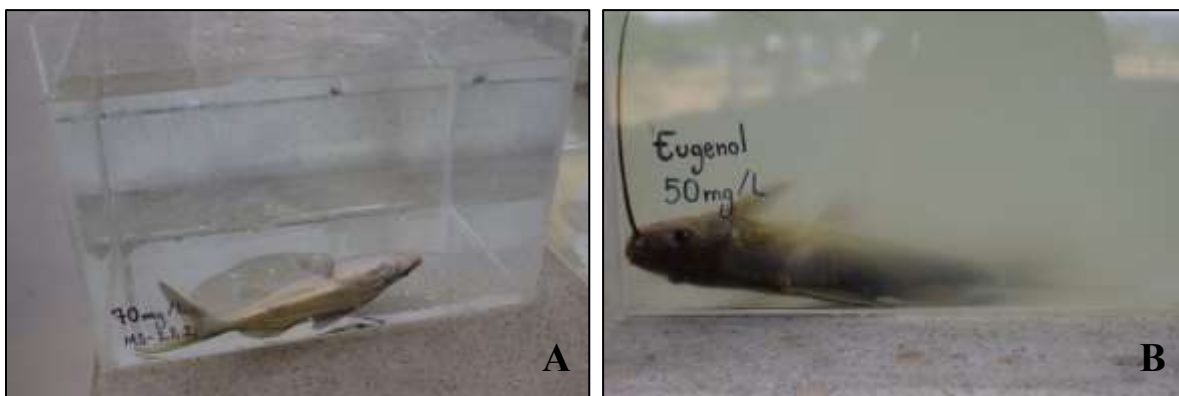


Figura 3. Determinación de tiempos de inducción. A, Evaluando plano III de inducción con MS-222. B, Evaluando plano III de inducción con Eugenol como anestesia.



Figura 4. Manejo de los peces para evaluar los efectos de los anestésicos sobre parámetros sanguíneos. A, Recepción de los peces en acuaviv para la toma de muestras. B, Exposición de los peces al aire durante tres minutos.

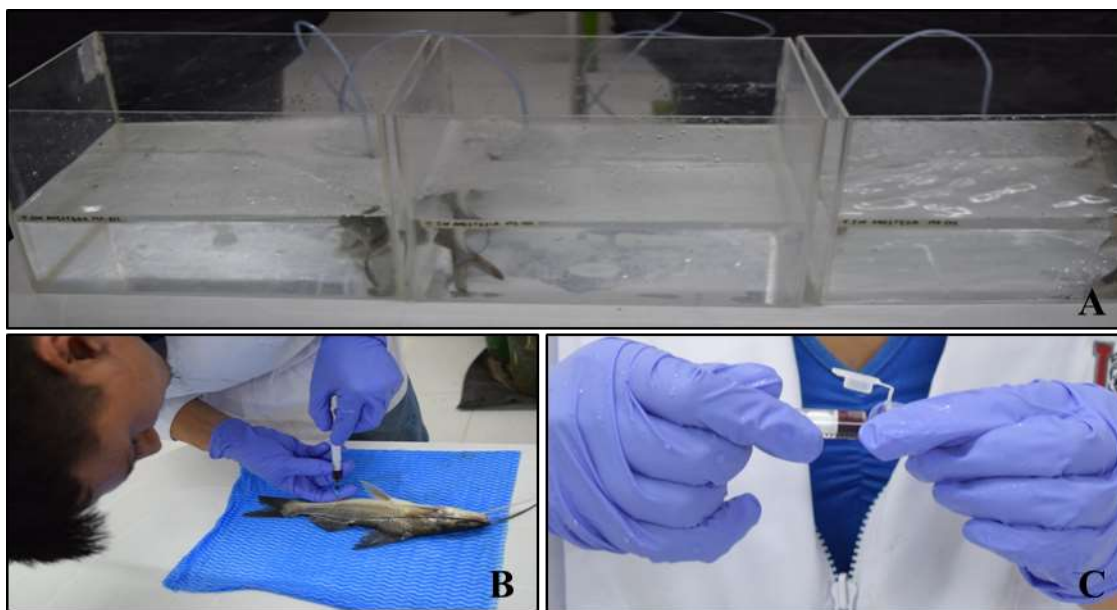


Figura 5. Toma de muestras de sangre de los peces. A, Anestesia, para la previa obtención de muestras de sangre. B, Toma de sangre por punción en la vena cava caudal. C, llenado de sangre en un vial con heparina.

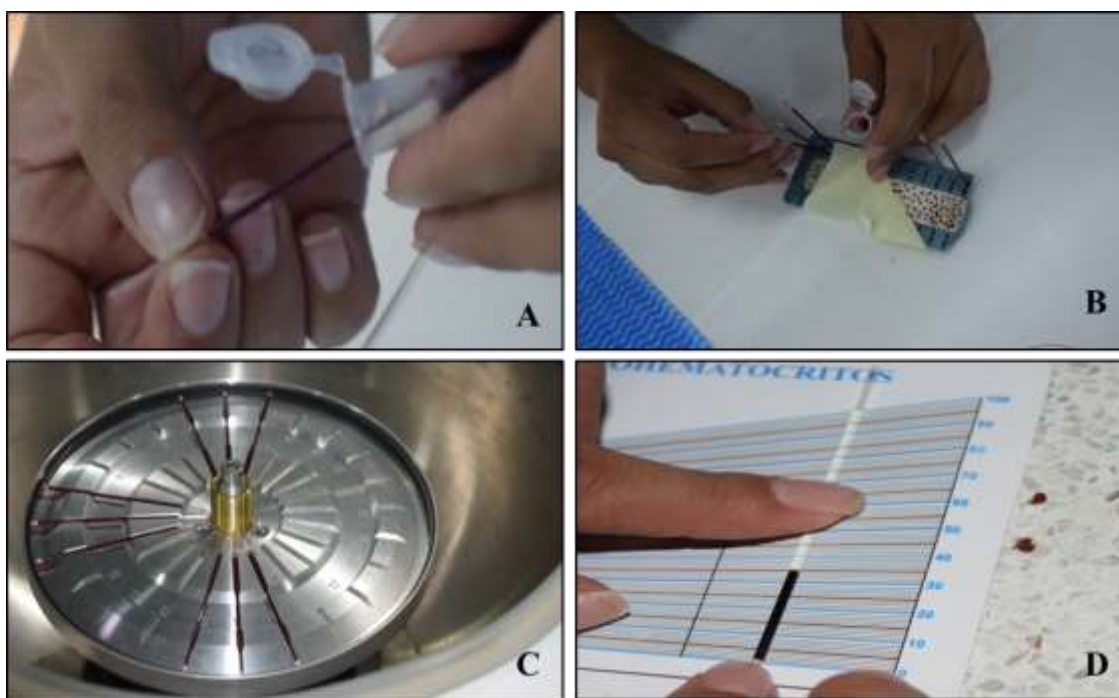


Figura 6. Determinación del Hematocrito. A, Llenado capilar $\frac{3}{4}$. B, Sellado del capilar por el extremo con crisoteal. C, Centrifugación de las muestras. D, Medición con ayuda de regla para micro hematocrito.



Figura 8. Determinación de Hemoglobina en Reproductores de Capaz. A, Toma del reactivo. B, Toma de las muestras. C, Muestras preparadas. D, Análisis de muestras en espectrofotómetro.



Figura 9. Determinación de Glucosa en Reproductores de Capaz (*P. grosskopfii*). A, Centrifugación para la obtención de plasma. B, Obtención del plasma. C, Toma del reactivo. D, Muestras preparadas.