



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**CAMBIOS FISIOLÓGICOS OCASIONADOS
POR EL MANEJO EN REPRODUCTORES
SILVESTRES DEL HUACHINANGO DEL
PACÍFICO *Lutjanus peru* DURANTE LA
INDUCCIÓN AL DESOVE Y CAUTIVERIO**

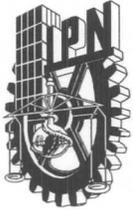
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

HILDA ELÍN PÉREZ PONCE

LA PAZ B.C.S., JUNIO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 13 del mes de Mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

“CAMBIOS FISIOLÓGICOS OCASIONADOS POR EL MANEJO EN REPRODUCTORES SILVESTRES DEL HUACHINANGO DEL PACÍFICO *Lutjanus peru* DURANTE LA INDUCCIÓN AL DESOVE Y CAUTIVERIO”

Presentada por el alumno:

PÉREZ

Apellido paterno

PONCE

materno

HILDA ELÍN

nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	6	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis


DRA. SILVIE DUMAS


DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ


DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ


DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

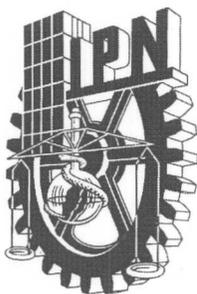

MC. FELIPE NERI MELO BARRERA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 17 del mes Mayo del año 2010, el (la) que suscribe HIDROBIOL. HILDA ELÍN PÉREZ PONCE alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A080069 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. SILVIE DUMAS y cede los derechos del trabajo titulado:

"CAMBIOS FISIOLÓGICOS OCASIONADOS POR EL MANEJO EN REPRODUCTORES SILVESTRES DEL HUACHINANGO DEL PACÍFICO *Lutjanus peru* DURANTE LA INDUCCIÓN AL DESOVE Y CAUTIVERIO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: silverelin21@yahoo.com.mx sdumas@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


HIDROBIOL. HILDA ELÍN PÉREZ PONCE

nombre y firma

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo fue desarrollado gracias al apoyo otorgado al proyecto SEP-CONACYT 60803: “Caracterización bioquímica y fisiológica del metabolismo energético en embriones y larvas de peces marinos: implicaciones en la calidad de los desoves”

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por la formación académica obtenida a través del grupo de investigadores y docentes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional, por las becas otorgadas.

A la Dra. Silvie Dumas por su dirección y asesoría del presente trabajo; al comité revisor: M. en C. Felipe Neri Melo, Dr. Sergio Hernández, Dr. Renato Peña y Dr. Ivan Murillo por contribuir con sus valiosos comentarios y observaciones.

Al personal de la Unidad Piloto de Maricultivo: Dra. Silvie Dumas, Dr. Renato Peña, M. en C. Mauricio Contreras, M. en C. Iram Zavala, M. en C. Juan Pablo Alcántar y Biol. Ivette Moguel por su apoyo y colaboración en el desarrollo de este trabajo, pero muy en especial por su invaluable amistad.

Al personal de apoyo técnico del CICIMAR: Martín Cuevas, Efraín Flores, Ciro Arista, Manuel Zamarrón y Alfredo Miramontes por el gran apoyo y buena disposición para ayudar en todo lo requerido durante el trabajo de campo.

Al Dr. Hector Nolasco por su asesoría en la determinación de la glucosa, a la Dra. Céline Audet por el apoyo en la determinación del cortisol y a la Química Ana María por facilitarnos el uso de la centrífuga.

A mi familia por apoyarme siempre de todas las maneras posibles en todo lo que he querido hacer, por creer en mí y alentarme a seguir adelante hasta alcanzar mis sueños, sin importar cuán difícil sea el camino.

A mis amigas y comadres Irela y Jareny por su gran apoyo, comprensión e incondicional amistad, por tener siempre una sonrisa y las palabras precisas para levantarme en los momentos de debilidad; a todos mis amigos y amigas que formaron parte de esta experiencia y que de alguna manera siempre expresaron su apoyo, gracias por su amistad!!!.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
RELACIÓN DE FIGURAS	v
RELACIÓN DE TABLAS	vi
GLOSARIO	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Definición de estrés y agente estresante.....	4
II.2. Niveles de respuesta.....	5
II.2.1. Respuesta primaria.....	7
II.2.2. Respuesta secundaria.....	8
II.2.2. Respuesta terciaria.....	12
II.3. Clasificación de la especie.....	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	18
V. HIPÓTESIS	18
VI. MATERIAL Y MÉTODO	19
VI.1. Manejo intenso.....	19
VI.1.1. Captura y transporte de los reproductores.....	19
VI.1.2. Inducción al desove.....	20
VI.2. Manejo leve de rutina y cautiverio.....	21
VI.3. Toma de muestras de sangre.....	22
VI.4. Procesamiento de muestras.....	23
VI.5. Determinación de los niveles de cortisol.....	23
VI.6. Determinación de los niveles de glucosa.....	24
VI.7. Viabilidad y porcentaje de eclosión.....	25
VI.8. Análisis estadísticos.....	25
VII. RESULTADOS	26
VII.1. Captura de reproductores.....	26

VII.2. Grupo control.....	26
VII.3. Primera Temporada.....	26
VII.3.1. Machos y Hembras.....	26
VII.3.2. Cortisol.....	27
VII.3.3. Glucosa.....	28
VII.3.4. Hematocrito.....	29
VII.3.5. Respuesta individual.....	30
VII.4. Segunda Temporada.....	32
VII.4.1. Cortisol.....	32
VII.4.2. Glucosa.....	33
VII.4.3. Hematocrito.....	33
VII.4.4. Respuesta individual.....	34
VII.5. Desempeño reproductivo.....	35
VII.5.1. Hembras.....	35
VII.5.2. Machos.....	38
VIII. DISCUSIÓN.....	39
VIII.1. Grupo control.....	39
VIII.2. Machos y hembras.....	41
VIII.3. Respuesta del estrés.....	42
VIII.3.1. Manejo intenso.....	42
VIII.3.2. Manejo leve de rutina y cautiverio.....	44
VIII.4. Respuesta individual.....	45
VIII.5. Desempeño reproductivo.....	46
IX. CONCLUSIONES.....	49
X. RECOMENDACIONES.....	50
XI. REFERENCIAS.....	51
XII. ANEXO.....	66

RESUMEN

Lutjanus peru es una especie con potencial de cultivo. El grupo de trabajo del CICIMAR-IPN ha realizado algunos estudios sobre la reproducción de esta especie, así como el desarrollo de un protocolo de manejo para inducir los desoves; sin embargo, no se ha logrado obtener desoves de alta calidad. La captura, manejo, transporte y confinamiento, son prácticas inevitables que suelen alterar la homeostasis de los peces, y por consiguiente afectar negativamente la reproducción. Es por esto que el presente trabajo pretende evaluar y comparar la respuesta del estrés ante un manejo intenso que implica la captura, el transporte y la inducción al desove así como el manejo leve de rutina aplicado durante el cautiverio, a fin de mejorar las prácticas de manejo para el cultivo de esta especie. Los reproductores fueron capturados con línea en 2 temporadas (2007 y 2008) durante la época de reproducción. Se transportaron aproximadamente por 3 h y se confinaron en tanques de 13m³. Para la inducción al desove, se aplicaron 2 dosis de LHRH-a a las 24 y 48h de la llegada en hembras (25µg/kg), y una dosis única a las 48 h en machos (50µg/kg). La colecta de los gametos se realizó entre 46 y 52 h después de la primera inyección en hembras y 24 h después de la inyección en machos. En la primera temporada, se utilizaron 3 tanques: en el primero se colocaron los peces recién llegados; en el segundo, aquellos que estaban recibiendo el tratamiento para la inducción; y en el tercero, se depositaron los organismos ya inducidos. En la segunda temporada, se utilizaron 2 tanques. En el primero se colocaron los organismos recién llegados; en el segundo, los que estaban en proceso de inducción y aquellos ya inducidos. Para evaluar la respuesta del estrés durante el manejo intenso, se tomaron muestras de sangre directamente del corazón inmediatamente después de la captura (control, n=14), 24 h después de su llegada y después de la colecta de los gametos. Para la muestra control se utilizaron organismos diferentes a los llevados al laboratorio. Durante el manejo leve de rutina se muestreó a los 2, 8, 13 y 15 meses de cautiverio. La madurez gonádica fue revisada a los 8, 11 y 21 meses. Se determinó el valor hematocrito, y las concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa mediante radioinmunoensayos y espectrofotometría, respectivamente. Por otro lado, se evaluó el desempeño reproductivo mediante el porcentaje de eclosión. Se capturaron 15 reproductores en la primera temporada y 21 en la segunda. Los niveles del grupo control para cortisol, glucosa y hematocrito fueron de 2.61±0.41ng/ml, 47.82±17.85ml/dl y 73.97±21.88%, respectivamente. La respuesta del estrés en machos y hembras no fue significativamente diferente; sin embargo en el caso del cortisol se observaron diferencias significativas entre los sexos a los 13 y 15 meses de cautiverio. Durante el manejo intenso, los niveles de cortisol y glucosa se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) y el valor hematocrito disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) con respecto al control en la primera temporada. En la segunda temporada se presentó un incremento significativo

($p < 0.05$) en los niveles de cortisol, mientras que no hubo ningún cambio en los niveles de glucosa y el valor hematocrito. En ambas temporadas, los niveles máximos de cortisol fueron registrados después de la colecta de los gametos. La concentración de cortisol se incrementó 16 veces (42.15 ng/ml) en la primera temporada y 68 veces (177.16 ng/ml) en la segunda. El aumento en la intensidad de manejo en la segunda temporada resultó en una alta mortalidad. Durante el manejo leve de rutina, se observó que los niveles de cortisol y hematocrito después de 13 meses, y la glucosa después de los 15 meses fueron similares a los presentados por el grupo control. La respuesta individual del estrés fue muy variable en los muestreos y temporadas; sin embargo fue posible identificar organismos con un alto y bajo grado de estrés. Por otro lado, se obtuvieron 3 desoves en la primera temporada y 5 en la segunda. En cuanto al desempeño reproductivo, de manera general se observó que el porcentaje de eclosión fue alto (81.2-96.2%). Tanto las hembras como los machos lograron madurar después de 11 meses en cautiverio. Se concluye que el aumento en la intensidad de manejo puede afectar la supervivencia, y que el protocolo ya establecido para la inducción al desove de esta especie es apropiado. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de cortisol, aunado al bajo número de desoves, no nos permite generalizar o establecer una tendencia del efecto que tiene el cortisol sobre el desempeño reproductivo. Otros estudios son requeridos para determinar si el estrés puede ser el responsable de la baja calidad de los desoves.

ABSTRACT

Lutjanus peru is a specie with potential for culture. In CICIMAR-IPN, some studies have been conducted on the reproduction of this specie, as well as a procedure to induce spawning but high-quality spawns has not been obtained. The capture, handling, transport and confinement are necessary practices that usually tend to alter the homeostasis of fish, and therefore adversely affect reproduction. The aim of this study is to evaluate and compare the stress response to an intensive handling that involves the capture, transport and induction of spawning and a less aggressive handling routine used during the captivity. A possible relation between the stress response during the intensive handling and the hatching rate was evaluated in order to optimize the handling practices in the culture of this species. The wild broodstock were caught by hook and line during 2 seasons (2007 and 2008) during the reproductive season. Fish were transported approximately 3 hours and were kept in tanks of 13m³. To induce spawning, 2 doses of LHRH-a (25µg/kg), were used in females at 24 and 48h after their arrival to the laboratory and a unique dose at 48 hours in males (50µg/kg). The collection of gametes was performed between 46 and 52 h after the first injection in females and 24 h after injection in males. In the first season, 3 tanks were used: at their arrival, fish were placed in a tank, moved to an other one after the hormone treatment and to a third one, after spawning. In the second season, only 2 tanks were used: The same tank was used for the fish at their arrival and after the hormone treatment and fish were placed in the second tank after spawning. Blood samples were taken by heart puncture immediately after capture (control, n=14), 24 hours after the arrival of fish and after the collection of gametes. The fish captured for the control sample were different from those used in the laboratory. During the less aggressive routine handling, fish were sampled at 2, 8, 13 and 15 months of captivity. The gonadal maturity was reviewed at 8, 11 and 21 months. Haematocrit value was determined. Plasma cortisol and glucose levels were analyzed by radioimmunoassay and spectrophotometry, respectively. Spawns were fertilized and the hatching rate was determined. Fifteen fish were captured in the first season and 21 in the second. Baseline levels of cortisol, glucose and haematocrit measured in the control were 2.61±0.41ng/ml, 47.82± 17.85ml/dl and 73.97±21.88%, respectively. The stress response of males and females was not significantly different; except for cortisol, where concentrations were significantly lower in males at 13 and 15 months of captivity. In the first season during the intensive handling, plasma cortisol and glucose levels increased significantly (p<0.05) and haematocrit value decreased significantly (p <0.05) compared with control. In the second season, a significant increase (p<0.05) was observed in cortisol levels, whereas there was no change in the plasma glucose levels and haematocrit. In both seasons, the maximum cortisol levels were recorded after the collection of gametes. The plasma cortisol

levels increased 16-fold (42.15 ng/ml) in the first season and 68-fold (177.16 ng/ml) in the second one. The increase in handling intensity in the second season resulted in high mortality. During captivity, cortisol and haematocrit were similar to those observed in the control at 13 and 15 months. Glucose was similar to control only in the 15th month. A large variation in the stress response was observed between individuals at each sampling and in both seasons. However, it was possible to identify organisms with high and low stress response. Three spawns were obtained in the first season and five in the second. In all spawns, the hatching rate was high (81.2-96.2%). The variability in cortisol levels, coupled with the low number of spawns do not allow to establish a relation between cortisol and hatching rate. Females and males reached maturity after 11 months in captivity. We conclude that the increase in the intensity of handling can affect the survival and that the protocol already established for induction of spawning and used in the first season is appropriated. Since a few spawns were obtained, further studies are required to determine if stress may be responsible for their low quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Régimen fototérmico bajo el cual fueron sometidos los reproductores para inducir la maduración gonádica.....	22
Figura 2. Concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa, y valor hematocrito en machos y hembras de <i>L. peru</i> durante la primera temporada.....	27
Figura 3. Concentraciones plasmáticas de cortisol en los reproductores de <i>L. peru</i> durante la primera temporada.....	28
Figura 4. Concentraciones plasmáticas de glucosa en los reproductores de <i>L. peru</i> durante la primera temporada.....	29
Figura 5. Valor hematocrito en reproductores de <i>L. peru</i> durante la primera temporada	30
Figura 6. Respuesta individual en las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa y valor hematocrito en reproductores de <i>L. peru</i> durante la primera temporada.....	31
Figura 7. Concentraciones plasmáticas de cortisol en reproductores de <i>L. peru</i> durante la segunda temporada.....	32
Figura 8. Concentraciones plasmáticas de glucosa en reproductores de <i>L. peru</i> durante la segunda temporada.....	33
Figura 9. Valor hematocrito en reproductores de <i>L. peru</i> durante la segunda temporada	34
Figura 10. Valores registrados en los reproductores de <i>L. peru</i> en los diferentes tiempos de muestreo para cada una de las variables evaluadas.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa, y valor hematocrito para grupo control de <i>L. peru</i>	26
Tabla 2. Peso de las hembras, diámetro de los oocitos a las 24h de haber llegado al laboratorio (DO), diámetro de huevo hidratado (DH), total de huevos desovados (THD), porcentaje de huevos viables (%HV), porcentaje de eclosión (%E) y niveles de cortisol plasmático a las 24 h de haber llegado (24h) y después de la colecta de los gametos (CG) en hembras desovadas de <i>L. peru</i>	37
Tabla 3. Diámetro de los oocitos (DO) y niveles de cortisol en plasma de las hembras que maduraron en cautiverio y fueron sometidas a un régimen fototérmico.....	37
Tabla 4. Peso total, niveles de cortisol y registro de presencia/ausencia de semen (SI/NO) en machos de <i>L. peru</i> durante el cautiverio.....	38
Tabla 5 (Anexo). Valor hematocrito registrado en cada uno de los tiempos de muestreo (24 h, colecta de gametos y después de 2, 8, 13 y 15 meses en cautiverio) en los reproductores de <i>L. peru</i> durante la primera temporada.....	66
Tabla 6 (Anexo). Valor hematocrito registrado en cada uno de los tiempos de muestreo en los reproductores de <i>L. peru</i> durante la segunda temporada.....	67
Tabla 7 (Anexo). Comparación del valor hematocrito obtenido en reproductores de <i>L. peru</i> por centrifugación y asentamiento.....	68

GLOSARIO

Agente estresante: Factor que provoca cambios en la homeostasis de un animal (Barton, 2002).

Cortisol: Glucocorticoide que estimula la movilización de aminoácidos del músculo y la gluconeogénesis hepática para aumentar la glucosa sanguínea (Randall *et al.*, 2002).

Eclosión: Proceso por el cual el embrión emerge de las envolturas del huevo (Balon, 1981).

Glucogenólisis: Degradación del glucógeno a glucosa-6-fosfato en el hígado (Randall *et al.*, 2002).

Gluconeogénesis: Síntesis de carbohidratos a partir de fuentes no carbohidratadas, como ácidos grasos o aminoácidos (Randall *et al.*, 2002).

Glucosa: Azúcar de seis carbonos que constituye el combustible metabólico primario celular (Randall *et al.*, 2002).

Homeostasis: Tendencia de los organismos a mantener una relativa estabilidad interna (Randall *et al.*, 2002).

Huevo: En peces su desarrollo comprende dos fases del desarrollo embrionario: segmentación y embrión. Inicia desde que es fecundado el oocito y termina en el momento de la eclosión (Balon, 1981).

Periodo de latencia: Tiempo que transcurre entre un estímulo y la respuesta que produce (Randall *et al.*, 2002).

Radioinmunoensayo: Es un método sensible y específico para determinar reacciones antígeno-anticuerpo, en el cual un reactivo marcado radiactivamente se utiliza directa o indirectamente para la medición cuantitativa del reactivo no marcado, estableciendo una fijación de Anticuerpo específico u otro sistema receptor (Moss *et al.*, 1982).

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la creciente demanda de peces como producto alimenticio, ha llevado a los cultivos hacia una producción intensiva, donde se consigue la mayor producción en el menor tiempo y espacio posibles; dichas prácticas, están ligadas a situaciones que implican altas densidades de cultivo, alteraciones en la calidad del agua, manejo frecuente y mayor riesgo en la incidencia de enfermedades (Flores-Quintana, 2002). Estos factores o agentes estresantes relacionados con las condiciones de mantenimiento son cambios en el entorno (estímulos externos) de los peces, capaces de alterar su homeostasis; y por consiguiente pueden afectar la producción de manera negativa (Wendelaar Bonga, 1997; Portz *et al.*, 2006). Es por esto, que uno de los principales objetivos de las investigaciones enfocadas al desarrollo, crecimiento y reproducción de los peces, es implementar estrategias y mecanismos que favorezcan mejores condiciones de mantenimiento y manipulación, dirigidas a la obtención de una producción óptima y una mejor calidad del producto (Pickering, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997).

La constante exposición de los peces a los agentes estresantes característicos del cultivo como el manejo, transporte y confinamiento, pueden resultar en efectos perjudiciales como la disminución en la tasa de crecimiento, disfunción reproductiva, incremento en la susceptibilidad a enfermedades, así como una reducida capacidad para mantener la homeostasis y resistir agentes estresantes adicionales (Noga *et al.*, 1994; Barton, 1997; Pankhurst & Van Der Kraak, 1997). Por lo que la información sobre el grado de alteración endócrina causada en el cultivo de peces por los diversos procedimientos de manejo, es muy valiosa para el desarrollo de técnicas de cultivo que minimicen las perturbaciones fisiológicas (Thomas & Robertson, 1991).

Por otro lado, debido a que el éxito reproductivo es dependiente de los mecanismos de control neuroendocrinos, así como de las condiciones ambientales como la temperatura, el fotoperiodo, la alimentación, la calidad del agua entre otros; es posible que los organismos presenten disfunciones reproductivas y la reproducción no se lleve a cabo (Matty, 1985). Sin embargo, cuando estas

condiciones y las prácticas de manejo son las adecuadas, es posible obtener buenos resultados. Pese a esto, la reducción del desempeño reproductivo es una situación común en la acuicultura, ya que cuando los organismos son sometidos a situaciones estresantes, la energía canalizada para la reproducción es reasignada en el uso catabólico durante el estrés (Donaldson, 1990; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar-Bonga, 1997). De esta manera, los agentes estresantes relacionados con el cultivo pueden actuar sobre la reproducción a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) provocando el descenso de los niveles de esteroides sexuales (Carragher & Pankhurst, 1991; Pankhurst & Dedual, 1994; Clearwater & Pankhurst, 1997), lo que trae consigo una disminución en el peso de la gónada, tamaño de los oocitos, sobrevivencia de la progenie, entre otros; así como un aumento de larvas deformes, y por ende una baja calidad de los huevos (Campbell *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997); sin embargo, las consecuencias reproductivas dependen del estado de madurez de la hembra y del grado de intensidad y duración del agente estresante (Pickering, 1992; Contreras-Sánchez *et al.*, 1998; Cleary *et al.*, 2002).

El huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*, es una especie de gran importancia comercial, principalmente en las costas del Pacífico; por lo que en los últimos años, el desarrollo de una tecnología de cultivo ha recibido gran atención. A la fecha, se han desarrollado procedimientos de manejo para la obtención de desoves mediante el uso de inductores hormonales como la HCG (hormona gonadotrópica humana) y la LHRH-a (Factor liberador de la hormona luteinizante) (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006); sin embargo, aún no se ha logrado obtener desoves de alta calidad. Brooks *et al.* (1997) señalan que uno de los factores que pueden afectar la calidad de los huevos, son las prácticas de manejo necesarias para su cultivo; por lo que las técnicas de captura y manipulación deben ser las apropiadas. En vista de lo anterior, existe la necesidad de evaluar los cambios fisiológicos ocurridos en los reproductores silvestres cuando son sometidos al manejo en cautiverio para la obtención de desoves, con el fin de determinar los posibles efectos del estrés, generados por la captura, transporte, confinamiento y manipulación, lo que permitirá mejorar el protocolo de manejo que

se tiene para el huachinango y por consiguiente evitar los problemas relacionados con el desempeño reproductivo a fin de lograr una mayor sobrevivencia en la producción larvaria. Aunado a esto, los resultados del presente trabajo podrán contribuir en la conformación de un lote de reproductores que presenten una baja respuesta ante los agentes estresantes que se dan durante el cultivo; ya sean condiciones ambientales o manejo de rutina. Basándonos en los resultados mostrados por los programas de selección de reproductores, donde se señala que la respuesta al estrés es hereditaria y que la respuesta individual es constante todo el tiempo (Pottinger & Carrick, 1999). Por lo que se ha sugerido que los peces que presentan una respuesta menor al estrés, podrían desempeñarse mejor en términos de crecimiento, reproducción y/o resistencia a las enfermedades que aquellos que presentan una respuesta mayor (Fevolden *et al.*, 1992).

II. ANTECEDENTES

II.1 Definición de estrés y agente estresante

El término estrés ha sido definido de diversas formas (Pickering, 1981); sin embargo, éste término en endocrinología fue definido originalmente en términos generales como “la suma de todas las respuestas fisiológicas a través de las cuales un organismo trata de mantener o restablecer su metabolismo normal a pesar de cualquier fuerza física o química” (Selye, 1950). Más adelante, Chrousos & Gold (1992) así como diversas revisiones sobre peces teleósteos (Barton & Iwama, 1991; Pickering & Pottinger, 1995; Wendelaar Bonga, 1997) han definido al estrés como una condición en la cual el estado homeostático, es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco, denominado agente estresante.

Los agentes estresantes son aquellos factores capaces de provocar cambios en el estado fisiológico de los organismos y se dividen en 3 tipos: a) Ambientales: incluyen cambios en la calidad y composición química del agua (temperatura, salinidad, turbidez, pH, metales pesados, entre otros); b) Físicos: aquellos factores relacionados con las prácticas acuícolas (captura, manejo, transporte, confinamiento); y c) Biológicos: aquellos asociados a las interacciones poblacionales (depredación, parasitismo, competencia por espacio y alimentación) (Barton, 2002).

La intensidad y duración de los agentes estresantes van a influenciar significativamente el estado fisiológico del organismo. De acuerdo a lo anterior, el estrés puede ser dividido en estrés agudo y estrés crónico. Si el agente estresante tiene una corta duración como lo que sucede en la práctica acuícola durante la captura, manejo, transporte, tratamientos profilácticos, etc., es llamado estrés agudo; mientras que, si el agente estresante es persistente y tiene una larga duración como lo que sucede con las altas densidades de cultivo, la variación en la calidad del agua, la dominancia social de los peces, entre otros, entonces es llamado estrés crónico (Pickering 1981; Laidley & Leatherland, 1988). En este

contexto, Barandica & Tort (2008) señalan que los agentes estresantes agudos involucran rápidos cambios fisiológicos, seguido de una recuperación a las pocas horas, por lo que los costos energéticos son reducidos. Por el contrario, los agentes estresantes crónicos o agudos repetitivos, involucran cambios fisiológicos de larga duración y frecuentemente largos periodos de recuperación, mayor costo energético y de funcionamiento, debido a la persistencia del agente estresante y al efecto derivado de la respuesta del estrés.

II.2. Niveles de respuesta

La respuesta de los peces ante los agentes estresantes ha sido agrupada en términos de cambios primarios, secundarios y terciarios, los cuales involucran todos los niveles de organización de un organismo, desde el nivel celular hasta el de individuo. Estas respuestas implican cambios bioquímicos y fisiológicos que tienen la finalidad de contrarrestar los disturbios, a fin de mantener en equilibrio su medio interno (Wedemeyer, 1996). Muchos de los cambios fisiológicos ocurridos durante estos procesos de compensación, pueden ser utilizados como índices para evaluar el efecto del estrés sobre los peces (Wedemeyer *et al.*, 1990).

II.2.1. Respuesta primaria

La exposición de los peces a los agentes estresantes induce una cascada neuroendócrina que implica la activación del eje simpático-cromafin y del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal. La acción conjunta de estas hormonas van a potenciar la respuesta del organismo, con la finalidad de enfrentar los disturbios ocasionados por los diversos agentes estresantes en el menor tiempo posible y, de esta manera, minimizar los efectos negativos de los mismos (Sumpter, 1997).

Eje Simpático-Cromafin

El eje simpático-cromafin es el responsable de la síntesis y liberación de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) desde el tejido cromafin; localizado tanto en las paredes de la vena cardinal posterior, como en la parte anterior o cabeza del riñón (Reid *et al.*, 1995). La liberación de las catecolaminas es rápida,

y sus niveles se incrementan en cuanto el estímulo externo es percibido, con la finalidad de aumentar la frecuencia respiratoria y cardiaca, el transporte de oxígeno y la movilización de los sustratos energéticos necesarios en cualquier situación de estrés (Randall & Perry, 1992; Reid *et al.*, 1998).

Eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HHI)

Este eje es el encargado de la síntesis y secreción de corticoides como el cortisol. La producción del cortisol es llevada a cabo en las células interrenales, y su liberación es más lenta que la de las catecolaminas ya que, a diferencia de estas, el cortisol no se encuentra almacenado y su síntesis es precedida por una cascada hormonal (Chester *et al.*, 1980; Barton, 2002).

El eje HHI es iniciado o activado por impulsos nerviosos en respuesta a los diversos agentes estresantes. Esta información nerviosa es percibida por las células neurosecretoras hipotalámicas induciendo la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Este neuropéptido es transportado por los axones desde el hipotálamo a la hipófisis anterior (adenohipófisis) donde activa la producción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH). Esta hormona es liberada al torrente sanguíneo, por el cual circula hasta el tejido interrenal, estimulando la síntesis y secreción del cortisol (Van der Boon *et al.*, 1991; Ruane *et al.*, 1999; Belanger *et al.*, 2001). Los niveles de cortisol aumentan significativamente durante el estrés (Pickering, 1981; Ortuño *et al.*, 2002; Sulikowski & Howell, 2003; Chongmin *et al.*, 2004) y son responsables del incremento en la concentración de la glucosa plasmática en respuesta a la demanda energética necesaria para incrementar la tasa metabólica y el consumo de oxígeno (Sumpter, 1997).

Generalmente, los niveles plasmáticos de cortisol en peces no estresados son menores a 10 ng/ml (Pankhurst & Sharples, 1992; Haukenes, 2001; Rotllant *et al.*, 2001; Barton, 2002); incluso Pankhurst & Sharples (1992) señalan que estos valores permanecen bajos (2-8 ng/ml), aún cuando los organismos son muestreados bajo el agua utilizando equipo de buceo, o capturados con línea y anzuelo e inmediatamente muestreados (aprox. 4 ng/ml). Sin embargo, se han

reportado valores mayores de niveles basales a estos para peces no estresados. Tal es el caso de *Dicentrarchus labrax* con 20 ng/ml (Planas *et al.*, 1990; Cerdá-Reverter *et al.*, 1998) y *Perca fluviatilis* que presentó 45 ng/ml en condiciones de cultivo (Acerete *et al.*, 2004). Estas variaciones en los niveles basales pueden deberse a factores como temperatura, nutrición, estado de madurez gonádica, la especie, y muy importante, el método por el cual se obtuvo la muestra (Barton & Iwama, 1991; Gamperl *et al.*, 1994).

Cuando los organismos son sometidos a agentes estresantes agudos, los niveles de cortisol aumentan rápidamente en pocos minutos y regresan a títulos basales en una o más horas. Este incremento puede ser de 10 a 100 veces respecto a sus niveles basales, por lo que concentraciones entre 30-300 ng/ml son características de la elevación del cortisol después del estrés (Barton & Iwama, 1991); sin embargo, hay notables excepciones. Biswas *et al.*, (2006) señalaron para *Pagrus major* un rápido incremento de cortisol (190.1 ng/ml) a los 30 minutos de ser sometida a estrés agudo por manejo y confinamiento regresando a sus niveles basales (10.9 ng/ml) a las 24 h; de igual manera cuando Begg & Pankhurst (2004) sometieron a *Acanthochromis polyacanthus* a confinamiento y nado forzado, los niveles de cortisol más altos (30 ng/ml) fueron registrados entre los 10 y 15 minutos, mientras que la recuperación (12 ng/ml) ocurrió a las 24 h. Por otra parte, cuando el agente estresante es crónico las concentraciones de cortisol pueden permanecer elevadas, aunque por debajo de los niveles máximos, lo que demuestra que la secreción del cortisol depende de la intensidad y duración del estímulo (Barton *et al.*, 1980; Pickering y Pottinger, 1989). Son pocos los estudios que han sometido a los peces a agentes estresantes crónicos en un intento por caracterizar los niveles máximos de cortisol ocurridos en estas situaciones. *Scaphirhynchus albus* y *Polyodon spathula* mostraron las concentraciones máximas de cortisol cerca de los 13 y 60 ng/ml respectivamente cuando fueron sujetos a confinamiento y manejo continuo (Barton *et al.*, 1998, 2000); estudios similares en juveniles de salmón, las concentraciones máximas de cortisol excedieron los 500 ng/ml (Strange *et al.*, 1978) y alcanzaron los 1400 ng/ml en la

perca rayada (Noga *et al.*, 1994). Esto enfatiza la amplia variación de la respuesta al estrés entre especies.

II.2.2. Respuesta secundaria

El estrés es un proceso demandante de energía, y los organismos tienen que movilizar los sustratos energéticos para enfrentarlo. Como consecuencia de la liberación de las catecolaminas y el cortisol, se van a activar una serie de procesos metabólicos destinados a favorecer una mayor disponibilidad de sustratos que pueden ser utilizados como fuente de energía en diversos tejidos como cerebro, branquias y músculo (Iwama *et al.*, 2006).

La elevación de la glucosa en sangre como respuesta al estrés es ocasionada por la acción de las catecolaminas, específicamente por la epinefrina, la cual funciona para proveer energía calórica para la reacción de “lucha o huida”. La fuente primaria de la elevación de la glucosa es el glucógeno del hígado y músculo (Barton & Iwama, 1991). Este patrón de hiperglucemia es atribuido a la acción que tienen las catecolaminas de estimular la glucogenolisis, induciendo la liberación de glucosa desde el hígado como una respuesta mediada a corto plazo; en este sentido, las catecolaminas actúan y son degradadas rápidamente después del estrés; sin embargo, los niveles de glucosa permanecen elevados, lo que sugiere que el cortisol, el cual también permanece elevado, juega un papel importante en cuanto al mantenimiento de los niveles de glucosa a largo plazo mediante la estimulación de la gluconeogénesis en el hígado (Iwama *et al.*, 2006).

La medición de las concentraciones de glucosa plasmática, lactato, iones en plasma y los parámetros hematológicos son los índices metabólicos de respuesta secundaria (Rotllant & Tort, 1997; Rotllant *et al.*, 2000). El aumento en la glucosa plasmática es uno de los cambios fisiológicos más utilizados ya que puede ser determinado de manera rápida y fácil mediante el uso de kits comerciales utilizando únicamente un espectrofotómetro o un colorímetro. Sin embargo, existen factores extrínsecos como la temperatura, la dieta, el estadio de desarrollo, el tiempo desde la última alimentación y la estación del año los cuales

pueden afectar el almacenamiento de glucógeno en el hígado y de esta manera alterar la magnitud de la respuesta hiperglucémica provocada por el estrés (Vijayan & Moon, 1992). Los niveles plasmáticos de glucosa comparados con los del cortisol suelen incrementarse hasta 2 veces respecto a sus concentraciones basales después de la exposición a los agentes estresantes. Su concentración aumenta de forma más lenta pero permanece elevada por periodos más prolongados (Schreck, 1981, Holloway *et al.*, 1994; Pottinger & Carrick, 1999).

Los intervalos típicos en los peces no estresados, se encuentran entre los 50 y 150 mg/dl, mientras que pueden registrarse valores entre 100 y 250 mg/dl después de la exposición a los agentes estresantes (Barton, 2002). Diversas investigaciones, han demostrado que existe una correlación positiva entre el incremento de los niveles plasmáticos de cortisol y los niveles de glucosa tanto en experimentos donde administraron de manera exógena el cortisol (Vijayan *et al.*, 1996); como en aquellos donde aplicaron diversos agentes estresantes, como lo es la captura (Fagundes & Urbinati, 2008), transporte (Sandodden *et al.*, 2001; Urbinati *et al.*, 2004), manejo (Thomas & Robertson, 1991; Acerete *et al.*, 2004;), confinamiento (Begg & Pankhurst, 2004; Biswas *et al.*, 2006) y altas densidades de cultivo (Montero *et al.*, 1999).

Por otro lado, Hosoya *et al.* (2007) al exponer a *Melanogrammus aeglefinus* a estrés crónico por manipulación no observaron evidencia de una respuesta significativa en cuanto a la glucosa, a pesar del incremento en los niveles de cortisol. De igual manera Barton & Schreck (1987) reportaron la carencia de respuesta en la glucosa ante estrés crónico en la trucha arcoíris cuando fueron manipulados diariamente por 10 semanas. Estos resultados indican que el uso de los niveles de glucosa plasmática no siempre resultan ser indicadores sensibles y adecuados para evaluar el estrés crónico en los peces. Asimismo, Vijayan *et al.* (1990) registraron una disminución en los niveles de glucosa cuando *Salvelinus fontinalis* fue sometido a estrés crónico debido a las altas densidades de cultivo; indicando que dicho descenso podía ser atribuido a la alta utilización de la glucosa como combustible energético.

Por otro lado, la alteración de las células y bioquímica de la sangre, así como el estado hormonal pueden ser indicativos de condiciones ambientales inapropiadas o bien de la presencia de agentes estresantes como químicos tóxicos, altas densidades, mala calidad del agua, entre otros (Wedemeyer *et al.*, 1990). Los parámetros hematológicos son indicadores de respuestas secundarias que pueden proveer información útil acerca de la salud de los peces (Wedemeyer, 1996). Algunos de los parámetros hematológicos utilizados como indicadores son: hematocrito, concentración de hemoglobina, número de eritrocitos, leucocrito, tiempo de coagulación, entre otros (Barton & Iwama, 1991). La determinación de estos parámetros es sencilla, además, la obtención de la muestra es relativamente fácil; sin embargo difieren de una especie a otra debido a que están relacionados con los factores ambientales (Graham, 1997; Leatherland *et al.*, 1998).

Las catecolaminas y el cortisol liberados como respuesta al estrés, además de movilizar los sustratos energéticos, están involucrados en la regulación osmótica y iónica. Las catecolaminas modulan las funciones cardiovasculares y respiratorias manteniendo un adecuado suministro de oxígeno en los tejidos (Randall & Perry, 1992). Este mecanismo homeostático incluye el incremento en el flujo sanguíneo branquial y la permeabilidad de las branquias, lo que facilita el intercambio de oxígeno y bióxido de carbono. El resultado del incremento en el intercambio gaseoso también incrementa la permeabilidad al agua y algunos iones en las branquias manifestándose en peces marinos como una pérdida de agua y una afluencia de iones en la sangre y, en peces dulceacuícolas, como una ganancia de agua y pérdida de iones (Portz *et al.*, 2006). Sin embargo, estos cambios pueden resultar en serios desequilibrios que comprometen la capacidad osmorregulatoria y por consiguiente la sobrevivencia (Wendelaar Bonga, 1997; Cech, 2000). Las catecolaminas, en particular la epinefrina produce este desequilibrio en los iones y en los niveles del agua corporal, provocando el hinchamiento de los eritrocitos, modificando el número y tamaño de las células y el valor hematocrito (Barandica & Tort, 2008). El hematocrito es el porcentaje del volumen total de la sangre que ocupan los eritrocitos. El aumento en el hematocrito puede ser causado por el hinchamiento de los glóbulos rojos o por el

aumento en el número de eritrocitos en circulación ocasionado por la contracción del bazo como estrategia para incrementar la capacidad de transporte del oxígeno en la sangre durante periodos de alta demanda energética; mientras que la disminución en el hematocrito puede ser indicativo de anemia o de la presencia de una posible enfermedad (Young & Cech, 1993, 1994a; Caldwell & Hinshaw, 1994; Wendelaar Bonga, 1997). Los cambios ocurridos en este parámetro después de situaciones de estrés, pueden indicar una hemoconcentración o una hemodilución debida a perturbaciones osmorregulatorias (Morgan & Iwama, 1997). El hematocrito presenta variaciones debido a diferentes factores inter e intraespecíficos. Los factores interespecíficos tienen que ver con el modo de vida y el hábitat, por lo que valores bajos corresponden a especies bénticas y sedentarias, mientras que valores altos corresponden a especies pelágicas y activas (Romestand *et al.*, 1983; Wilhelm Filho *et al.*, 1992). Las variaciones intraespecíficas pueden ser debidas al estado nutricional, dieta, reproducción, factores genéticos, sexo, edad, peso, y a algunos parámetros ambientales como la salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, cambios estacionales y ciclos diarios. Sin embargo, el valor hematocrito puede ser afectado de igual manera por las técnicas y métodos utilizados durante la toma de la muestra (García *et al.*, 1992).

Barton *et al.* (2000) mencionan que los valores basales del valor hematocrito pueden fluctuar entre el 25-40%; sin embargo, una vez que los organismos son expuestos a agentes estresantes, generalmente muestran un aumento en este valor que oscila entre el 40 y 50 %. Existen diversos estudios en los cuales se ha registrado un aumento en el valor hematocrito cuando los peces son sometidos a estrés, como lo ocurrido cuando *Oncorhynchus mykiss* fue sometida a hipoxia (Wells & Weber, 1991; Caldwell & Hinshaw, 1994), durante el confinamiento en *Sparus aurata* (Molinero & González, 1995;); manejo de *Pleuronectes platessa* (Fletcher, 1992), ejercicio moderado y exhaustivo en *Morone saxatilis* (Young & Cech, 1993; 1994b), transporte de *Brycon cephalus* (Urbinati *et al.*, 2004); transporte y fotoperiodo en *Pseudoplatystoma corruscans* (Fagundes & Urbinaí, 2008) entre otros. Por otra parte, existen excepciones a lo mencionado anteriormente, ya que en un estudio asociado a estrés crónico por la

alta densidad de cultivo en *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al.*, 2004) así como durante el estrés agudo ocasionado por la captura de *P. corruscans* fue registrada una disminución significativa en el valor hematocrito, lo que probablemente puede ser atribuido a la hemodilución provocada por pérdida iónica y reducción de la osmolaridad (Morgan & Iwama, 1997).

II.2.3. Respuesta terciaria: Reproducción

El éxito reproductivo es dependiente de complicados mecanismos de control endócrino así como de las variables ambientales, siendo la temperatura y el fotoperiodo muy importantes. Sin embargo, en condiciones de estrés, la secreción de los corticosteroides y catecolaminas pueden afectar directa o indirectamente aspectos de la respuesta terciaria o funciones particulares, incluyendo la resistencia a las enfermedades, el crecimiento, la alimentación y la capacidad reproductiva (Randall & Perry, 1992; Iwama *et al.*, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). Estas alteraciones en el sistema inmune o en la función reproductiva pueden no presentarse horas después de la exposición a los agentes estresantes como sucede con otros indicadores mencionados anteriormente, pero si semanas o meses posteriores.

En los reproductores mantenidos en cautiverio, las prácticas de cultivo a las cuales los peces están sujetos, son probablemente uno de los factores más importantes que afectan los procesos de maduración reduciendo la tasa de supervivencia larvaria. Sin embargo, algunas especies aún bajo estas condiciones pueden tener un crecimiento y desarrollo gonadal normal, pero resulta necesario utilizar hormonas análogas liberadoras de gonadotropina para inducir la ovulación y la espermiación, así como masaje abdominal para la obtención de los gametos y una fertilización artificial para el éxito reproductivo. De esta manera, en cautiverio, la ausencia de los estímulos ambientales pueden ocasionar la presencia de disfunciones reproductivas. En las hembras se conocen 3 tipos: 1) Cuando no se completa la vitelogénesis; 2) Cuando los peces completan la vitelogénesis, pero no la maduración final y/o ovulación, con el consecuente desarrollo de atresia; y 3) Cuando los oocitos completan la maduración final y ocurre la ovulación pero no el

desove. Mientras que los machos pueden producir espermatozoides sin motilidad, o de una alta viscosidad que impide la mezcla apropiada con los huevos (Zohar & Mylonas, 2001). El desarrollo gonadal y la gametogénesis se encuentran bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Eje Hipotálamo-hipófisis-gónada

El funcionamiento de este eje inicia con la recepción de los estímulos ambientales, que a su vez son percibidos por las células neurosecretoras del hipotálamo, las cuales van a estimular la secreción de las hormonas gonadotrópicas (GTH I y II) en la glándula hipófisis. La GTH I controla el desarrollo de la gónada y las primeras etapas de la gametogénesis; la GTH II controla la maduración final de los oocitos. Estas gonadotropinas viajan por el torrente sanguíneo hasta las gónadas donde sus acciones están mediadas a través de los esteroides producidos por las células foliculares de los oocitos y las células somáticas de los testículos culminando con la maduración de los gametos (Donaldson, 1990; Barry *et al.*, 1995). En diversos estudios se ha indicado que el cortisol generado por el estrés tiene un efecto negativo sobre la reproducción. Para mostrar los efectos que tiene el cortisol sobre la reproducción, Carragher *et al.* (1989) colocaron implantes de cortisol en organismos maduros e inmaduros de trucha arcoíris, observando una disminución en el peso corporal y de la gónada, así como un descenso en la secreción de esteroides sexuales. Short *et al.* (1995) por su parte, en estudios realizados en *Gadus morhua* en cautiverio, los cuales fueron sometidos a estrés durante la época de desove, mostraron un aumento en el cortisol y una mayor producción de larvas deformes; de igual manera Campbell *et al.* (1992) al someter a la trucha arcoíris a estrés crónico antes del desove observaron un incremento en los niveles de cortisol relacionados con una disminución en el tamaño de los huevos y en la tasa de supervivencia de la progenie. Carragher & Sumpter (1990) así como Pankhurst & Van Der Kraak (1997) señalan que el cortisol actúa directamente sobre la esteroideogénesis gonadal. De esta manera la disminución de los esteroides sexuales afectan los procesos de maduración reduciendo la calidad de los huevos. La calidad de los

huevos ha sido definida como la capacidad de un óptimo desarrollo embrionario y sobrevivencia de las larvas a la primera alimentación (Bromage & Roberts, 1995). Algunos factores que afectan ésta calidad son el estado endócrino de las hembras durante la ovogénesis, la dieta de los reproductores, el complemento de nutrientes depositados dentro del oocito, las condiciones fisicoquímicas del agua en la cual los huevos son incubados y las prácticas de manejo (Brooks *et al.*, 1997). Diversos criterios y métodos han sido utilizados para evaluar y explicar la calidad de los huevos de peces marinos (Carrillo *et al.*, 2000; Kjorsvik *et al.*, 2003). Siendo el porcentaje de eclosión, fertilización y la proporción de huevos viables, criterios morfológicos utilizados como indicadores de dicha calidad (Kjorsvik *et al.*, 2003).

II.3. Características de la especie

El huachinango, *L. peru* pertenece al Orden Perciformes y a la Familia Lutjanidae, en la cual Allen (1983) y Allen y Robertson (1994) incluyen 17 géneros y 103 especies. Para el Pacífico mexicano, se presentan 10 especies, de las cuales se han identificado 9 en la captura comercial. *L. peru* es una especie demersal, que habita los mares tropicales, subtropicales y templados (Allen, 1983; Allen & Robertson, 1994). Amezcua-Linares (2006) describe a la especie como una especie costera, que generalmente se encuentra en zonas abiertas sobre fondos rocosos, arenosos y arrecifes, en profundidades entre 50 y 90m. Su área de distribución abarca desde las costas de Bahía Magdalena y parte central del Golfo de California Sur, México hasta las costas de Perú. Algunos estudios sobre la biología de esta especie han abundado sobre los hábitos alimenticios, señalando a *Lutjanus peru* como una especie carnívora, cuya dieta incluye moluscos, crustáceos y peces (Santamaría-Miranda, 2003a; Rojas-Herrera *et al.*, 2004). La talla máxima es de 95 cm de longitud total; mientras que la talla de primera madurez en zonas cercanas a la Bahía de La Paz es de 250-300 mm de longitud (Reyna-Trujillo, 1993). No obstante, la talla de primera madurez así como el periodo de desove varía de acuerdo a la zona de estudio. En cuanto al desarrollo gonádico, se reporta que es asincrónico y el desarrollo de los oocitos ha sido descrito en básicamente 5 fases (Reyna-Trujillo, 1993; Lucano-Ramírez *et al.*,

2001; Santamaria-Miranda *et al.*, 2003b). Cruz-Romero *et al.* (1996) señalan que el stock de *Lutjanus peru* ha sido explotado más intensivamente que *L. guttatus* y *L. argentiventris*; sin embargo, las tres figuran como especies sobreexplotadas. Por su parte Díaz-Urbe *et al.* (2004) reportaron que contrario a lo que señala la Carta Nacional Pesquera, la pesquería no tiene posibilidades de desarrollarse si la mortalidad por pesca incidental así como por la pesca artesanal continúan sin ser reguladas como hasta ahora. Otro tipo de trabajos que han sido realizados, incluyen aquellos sobre la determinación de la edad utilizando otolitos (Rocha-Olivares & Gómez-Muñoz, 1993), diversidad genética (Rocha-Olivares & Sandoval-Castillo, 2003), potencial de cultivo y reproducción (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006) y crianza larvaria (Zavala-Leal, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

El huachinango del Pacífico *L. peru*, es una especie de gran importancia comercial. Se caracteriza por su alto valor económico debido a la calidad y sabor de su carne, reportando un buen ingreso para el pescador. Actualmente, las estadísticas oficiales han registrado de manera general una disminución en las capturas y señalan que el estado de la pesquería está siendo aprovechada al máximo sustentable (Carta Nacional Pesquera, 2004).

La gran demanda de ésta especie para el consumo humano, ha despertado el interés de los productores sobre la engorda de esta especie en jaulas flotantes. Sin embargo, debido a que la tecnología de cultivo para el huachinango está en sus primeras fases de desarrollo en las instituciones dedicadas a la investigación, estos proyectos han sido abastecidos a partir de juveniles silvestres. Por lo que la necesidad de producir crías de peces es cada vez más importante.

Ante esta situación, el CICIMAR-IPN ha desarrollado diversas investigaciones sobre el potencial de cultivo de *L. peru*, las cuales han estado orientadas hacia la reproducción y el desarrollo de la crianza larvaria en cautiverio (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006; Zavala-Leal, 2007). En estos estudios, se ha logrado la maduración gonádica y la obtención de desoves mediante el uso de un régimen fototérmico y la aplicación de hormonas exógenas, las cuales proveen una solución a los problemas de disfunción reproductiva. También se han determinado las condiciones ambientales necesarias para mejorar la eficiencia alimenticia durante la primera alimentación de las larvas. Sin embargo, aun quedan preguntas por resolver. Por ejemplo, se ha observado que los desoves de los animales capturados en el campo resultan a menudo, ser de mala calidad, ya que una gran proporción de huevos no son viables; no obstante, diversas causas pueden estar involucradas.

La calidad de los huevos puede estar influenciada por el estado endócrino de las hembras; y este a su vez, depender de las prácticas de manejo que comprometen el bienestar de los reproductores y por ende el éxito reproductivo.

De esta manera, resulta de suma importancia conocer los cambios fisiológicos que ocurren en cada uno de los niveles de respuesta al estrés después de que los reproductores de *L. peru* son sometidos a agentes estresantes como la captura, transporte y manipulación durante la inducción al desove y el cautiverio. Esto permitirá modificar y adecuar de manera correcta estas prácticas a fin de minimizar su impacto negativo; ya que el éxito del cultivo y reproducción dependen de ellas. En vista de lo anterior, el presente trabajo pretende evaluar las alteraciones fisiológicas ocurridas en los reproductores sujetos a diferentes rutinas de manejo con la intención de evaluar y mejorar los protocolos de manipulación ya establecidos para la inducción de los desoves.

V. OBJETIVOS

General:

- Evaluar los cambios fisiológicos ocurridos en reproductores silvestres del huachinango del Pacífico *L. peru*, ante los procedimientos de rutina (captura, transporte, inducción al desove, manejo y confinamiento), a fin de mejorar las prácticas de manejo para el cultivo de esta especie.

Específicos:

- Determinar las concentraciones de los diferentes indicadores de estrés cortisol, glucosa y valor hematocrito en los reproductores sometidos al manejo y cautiverio.
- Determinar diferencias entre machos y hembras en las concentraciones de cortisol y glucosa, y valor hematocrito.
- Describir la variación individual de los indicadores de estrés en respuesta a las dos rutinas de manejo.
- Identificar una relación entre la magnitud de la respuesta al estrés y el desempeño reproductivo del huachinango del Pacífico *L. peru*.

V. HIPÓTESIS

El manejo de los reproductores de *L. peru* durante la captura, transporte, confinamiento e inducción al desove producirán diversos cambios fisiológicos que alteraran la homeostasis de los organismos. Estas respuestas se verán reflejadas en el aumento del hematocrito y las concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa; las cuales repercutirán según la intensidad y duración de los agentes estresantes en los procesos reproductivos e incluso en la misma supervivencia de los reproductores.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

VI. 1. Manejo intenso

VI.1.1. Captura y transporte de los reproductores

La captura de los reproductores de huachinango fue realizada durante la época de reproducción (Reyna-Trujillo, 1993), durante los meses de septiembre-octubre 2007 y 2008 en La Ribera, B.C.S., México. Los organismos fueron capturados con línea de mano (hilo nylon y anzuelo); una vez que el pez quedaba asegurado en el anzuelo, éste era subido lentamente a la embarcación, y depositado en viveros hechos con tubos de policloruro de vinilo (PVC de 70 cm de longitud y 25 cm de diámetro) cubiertos en sus extremos con malla. Los viveros fueron sumergidos a más de 20 metros de profundidad. Una vez que la captura terminó, los viveros fueron subidos lentamente dando tiempo de recuperación de 15 minutos cada 10 metros, para favorecer la descompresión de los organismos.

Para el transporte del sitio de pesca a la playa, los peces fueron retirados de los viveros y colocados en un tanque de 600 litros de capacidad situado en la embarcación. El tanque contaba con una bomba sumergible 1 100 GPM (galones por minuto) para permitir la aireación. Durante el traslado de los organismos a la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) del CICIMAR-IPN, se utilizó un contenedor con capacidad de 1.5 m³ con suministro de oxígeno puro y agua de mar. Se colocó hielo en este tanque para poder bajar la temperatura del agua 4°C por debajo de la temperatura ambiente. En cada viaje se transportó de 1 a 4 individuos. En la UPIMA, los organismos fueron colocados en tanques de 13 m³ evitando que la diferencia entre la temperatura de transporte y la de los estanques no sobrepasara 1°C.

Los tanques estaban equipados con filtro de arena, biológico y lámpara UV para mantener la calidad del agua. Se mantuvo un fotoperiodo controlado de 12 h luz y 12 h oscuridad, así como una temperatura de 25°C y una salinidad de 35 ups.

VI.1.2. Inducción al desove

Veinticuatro horas después de su llegada al laboratorio, los organismos fueron anestesiados en agua de mar con 400 ppm de 2-fenoxietanol hasta su adormecimiento (sin respuesta a estímulos externos y cese de los movimientos operculares). La temperatura del baño de anestésico fue la misma que la de los tanques. A cada pez se le determinó el peso y sexo (ejerciendo masaje abdominal) y se le colocó una marca digital intramuscular (BioMark). Una vez que el sexo de los organismos fue determinado se llevo a cabo la inducción al desove de la siguiente manera:

En las hembras, se tomó una muestra de los oocitos con una cánula de plástico de 2 mm de diámetro exterior y 1 mm de diámetro interior. Los oocitos fueron observados en un microscopio estereoscópico conectado a una cámara digital (Hitachi KP-D50) y se digitalizaron. Para estimar el estadio de madurez se determinó el diámetro de los oocitos mediante un sistema digital de análisis de imágenes (Image Pro Plus). Cuando el promedio del diámetro de los oocitos fue $\geq 400 \mu\text{m}$ (Pintos-Terán *et al.*, 2003), se llevo a cabo la inducción hormonal aplicando dos inyecciones intramusculares de $25\mu\text{g}/\text{kg}$ del factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH-a) en un intervalo de 24 horas cada una (Pelcastre-Campos, 2006). La colección de los gametos fue realizada entre 46 y 52 horas después de la primera dosis de LHRH-a mediante masaje abdominal. Los oocitos fueron depositados en un recipiente de plástico, y posteriormente fueron pesados y fertilizados.

En los machos, la inducción hormonal fue realizada a partir de una dosis única de $50\mu\text{g}/\text{kg}$ de LHRH-a 48 horas después de la llegada de los organismos al laboratorio (Pelcastre-Campos, 2006). El semen fue obtenido 24 horas después de la aplicación intramuscular de la dosis hormonal mediante masaje abdominal, y fue colectado con jeringas de plástico estériles de 1 ml directamente del poro genital, previamente lavado con agua destilada y secado.

En la primera temporada, se contó con 3 tanques. Cada vez que llegaban organismos al laboratorio, estos eran colocados en el tanque 1. A las 24 h después de su llegada, fueron capturados con una red y colocados uno por uno en un contenedor en el cual fueron anestesiados con 2-fenoxietanol para posteriormente registrar peso, sexo, colocar marca intramuscular y recibir la primera dosis de LHRH-a en el caso de las hembras. Finalizado el registro de cada reproductor, éstos fueron colocados en el tanque 2 para facilitar al día siguiente, su posterior identificación y aplicarles la dosis hormonal correspondiente sin necesidad de ser anestesiados. Entre 46 y 52 h después de la aplicación de la primera dosis de LHRH-a en las hembras, éstas fueron capturadas, identificadas y anestesiadas para la obtención de los gametos mediante masaje abdominal. El primer intento para obtener el desove se realizó a las 46 h, pero si esto no ocurría la hembra era regresada al tanque y muestreada nuevamente un par de horas después sin exceder las 52 h, hasta que lograba desovar o cuando los oocitos ya no mostraban ningún avance en cuanto a su maduración final. Cada revisión fue realizada con ayuda de una cánula que permitió tomar una muestra de los oocitos, e inmediatamente fue observada en el microscopio estereoscópico. Finalizada la colecta de gametos en cada organismo, los reproductores eran sometidos a un baño de agua dulce durante 10 minutos y colocados en el tanque 3 donde permanecieron los meses siguientes.

En la segunda temporada, se utilizaron únicamente 2 tanques por lo que los reproductores capturados en campo fueron colocados conforme iban llegando al laboratorio en el tanque 1; éstos organismos fueron manipulados después de 24 h de su llegada de la misma manera que los de la temporada 1. Sin embargo, una vez que fueron pesados, marcados y sexados fueron colocados en el tanque 2 donde compartían espacio con aquellos que ya habían iniciado o finalizado el tratamiento de inducción.

VI.2. Manejo leve de rutina y cautiverio

Durante su muestreo y manejo en cautiverio, los peces fueron mantenidos en tanques de 13m³, bajo un régimen fototérmico (Fig. 1) que permitió inducir la

maduración gonádica (Dumas *et al.*, 2004). Periódicamente fueron muestreados y revisados para evaluar el estrés y el estado de madurez, o aplicar tratamiento profiláctico. En cada uno de estos muestreos, los peces fueron capturados, anestesiados e identificados como se describió en la sección anterior, para tomar una muestra de sangre.

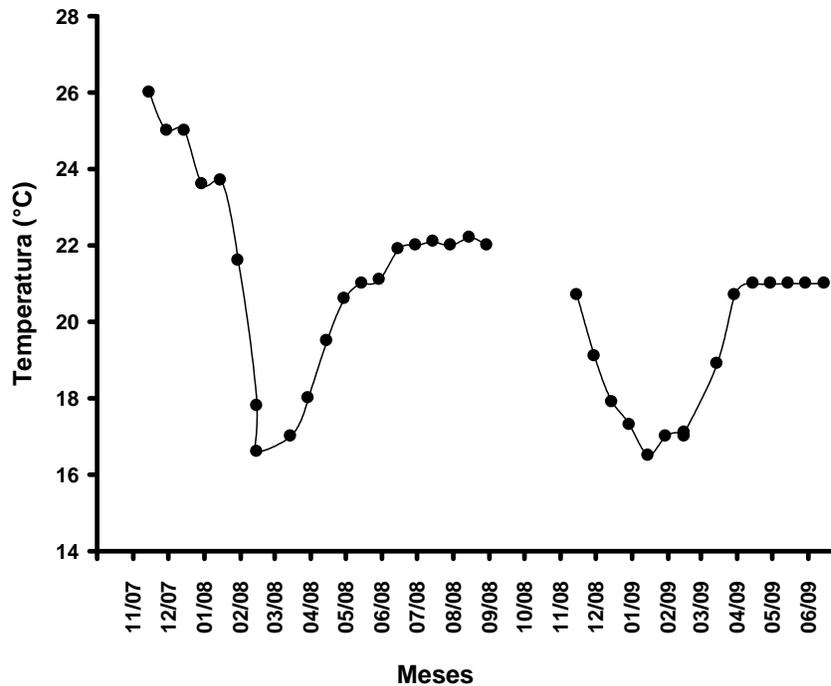


Figura 1. Régimen fototérmico bajo el cual fueron sometidos los reproductores para inducir la maduración gonádica.

VI.3. Toma de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron tomadas directamente del corazón (1.0-1.5ml) con jeringas heparinizadas de 3 ml. La sangre fue trasvasada a tubos Eppendorf, los cuales fueron colocados en hielo para su posterior procesamiento. Se llenaron dos tubos capilares heparinizados para determinar el valor hematocrito. Durante la inducción al desove (manejo intenso), se tomaron dos muestras de sangre acordes a los procedimientos de manipulación y una muestra control. La primera muestra fue tomada 24 h después de la llegada de los organismos al laboratorio cuando fueron pesados, marcados y sexados; la

segunda muestra se obtuvo después del desove de las hembras o colecta del semen en machos (CG). En el caso de las hembras que no lograban desovar, la colecta de sangre fue realizada la última vez que fue revisada. Para la muestra control, se utilizaron organismos diferentes a los que fueron llevados al laboratorio. Estando en campo, los huachinangos fueron capturados y las muestras de sangre fueron tomadas en el momento que los peces fueron subidos a la embarcación.

Durante el manejo leve de rutina y cautiverio, se tomaron cuatro muestras de sangre. La primera se tomó cuando los organismos se vieron aclimatados al cautiverio, es decir, cuando aceptaron comida de manera rutinaria; lo que ocurrió a los 2 meses aproximadamente. El resto de las muestras se obtuvieron a los 8, 13 y 15 meses de cautiverio. El grado de madurez fue revisado a los 8, 11 y 21 meses de cautiverio.

VI.4. Procesamiento de muestras

Los tubos Eppendorf con sangre fueron centrifugados a 6000 rpm (3823.56 G) por 5 minutos a 5°C utilizando una microcentrífuga refrigerada Eppendorf. Posteriormente se separó el sobrenadante (plasma) del paquete celular (glóbulos rojos) y el plasma fue repartido en tubos de 0.5 ml (100 µl de plasma por tubo) y fueron congelados a -80°C en un ultracongelador (Thermo Scientific) para posteriormente determinar la concentración plasmática de cortisol y glucosa.

Para obtener el valor hematocrito, los capilares fueron mantenidos en posición vertical durante 48 h favoreciendo el asentamiento de los glóbulos rojos. La distancia ocupada por el plasma y por los glóbulos rojos fue medida con una regla (200±1.0 mm), reportándose el resultado en porcentaje de acuerdo a:

$$\text{Hematocrito (\%)} = \frac{\text{distancia ocupada por los glóbulos rojos}}{\text{distancia ocupada por glob rojos y plasma}} \times 100$$

VI.5. Determinación de los niveles de cortisol

Los niveles de cortisol en plasma fueron determinados por radioinmunoensayos, utilizando un kit comercial (ImmuChem Coated Tube No. FK0904,05). El plasma congelado fue liofilizado para facilitar el transporte de las muestras a las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar en Rimouski, Canadá; donde la determinación de las concentraciones plasmáticas de cortisol fueron realizadas.

El kit contenía tubos con antígeno para cortisol, 6 estándares de cortisol (0, 1.0, 3.0, 10, 30 y 100 mg/dl) y cortisol marcado con yodo (I^{125}). Se construyó una curva estándar a partir de los 6 estándares de cortisol y se utilizaron 3 controles. El control utilizado esta comercialmente disponible y consta de 3 concentraciones conocidas de cortisol (baja, normal y alta). El procedimiento fue el siguiente: Primero se colocó 25 μ L de cada estándar, muestra control y muestra problema en su respectivo tubo con antígeno. Posteriormente se adicionó 1.0 ml del cortisol marcado con I^{125} a todos los tubos. Los cuales fueron agitados con ayuda de un vortex e incubados por 45 min a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Finalizada la incubación, el contenido de los tubos fue decantado y posteriormente leído en un contador gamma calibrado para I^{125} . A partir de la curva estándar, el contador gamma mostró las concentraciones de cortisol de cada muestra problema en mg/dl, las cuales fueron convertidas posteriormente a ng/ml.

VI.5. Determinación de los niveles de glucosa

Los niveles de glucosa en plasma fueron determinados usando un kit comercial (Sigma-Aldrich GAHK-20). Primero se construyó una curva estándar utilizando diferentes volúmenes (10 μ L-100 μ L) de una solución de glucosa con concentración conocida (Solución estándar de glucosa 1mg/ml) incluida en el kit. La muestra problema fue colocada en hielo hasta su descongelación. Posteriormente, 20 μ L de cada muestra problema fue colocada en un tubo de ensaye al cual se le agregó 0.5 mL de la solución Glucosa Assay (incluida en el kit) y 0.5 mL de agua destilada. Se dejó incubar a temperatura ambiente 15 min y se leyó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro (GenesysTM 10 Series).

Para el blanco de reactivo se llevó a cabo el mismo procedimiento sustituyendo el plasma o muestra problema por agua destilada. Finalmente, la concentración de glucosa fue determinada en mg/dl con ayuda de la curva estándar.

VI.7. Viabilidad y porcentaje de eclosión

El total de huevos obtenido por cada hembra fue pesado para estimar el número de huevos obtenidos por desove; tomando en cuenta que 1g equivale a 3512.5 huevos y 1ml a 2600 huevos (datos no publicados). Posteriormente los huevos fueron fecundados con una mezcla de semen de por lo menos 2 machos y colocados en una probeta de 500 ml. Los huevos que flotaban fueron considerados huevos viables mientras los que se hundieron fueron considerados no viables. Los huevos viables fueron incubados en una tolva de 100 l con agua filtrada a 25°C. Después de un periodo de 2 horas, fueron sembrados por cuadruplicado en bolsas Ziplock de 4 litros previamente llenadas con 2 L de agua de mar tratada (filtro mecánico de 0.1 μm , luz UV, clorada y tiosulfatada). Aproximadamente 24 horas después, cuando se observó el mayor número de larvas eclosionadas, el contenido de las bolsas fue filtrado y fijado con 2-fenoxietanol al 4% y se evaluó el porcentaje de eclosión, distinguiendo entre huevos no eclosionados y larvas, mediante un microscopio estereoscópico

VI.8. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas X^2 (ji cuadrada) para determinar diferencias significativas entre los sexos para cada variable indicadora de estrés (niveles plasmáticos de cortisol y glucosa en plasma y valor hematocrito); así como para determinar diferencias significativas entre el control y los diferentes tiempos de muestreo.

La utilización de las pruebas estadísticas se determinó de acuerdo al cumplimiento de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y posteriormente se aplicó la X^2 . Se realizaron correlaciones simples (Spearman) para determinar la relación existente entre el cortisol, glucosa y hematocrito en los diferentes tiempos de muestreo.

VII. RESULTADOS

VII.1. Captura de reproductores

Los reproductores de *L. peru* fueron capturados durante 2 temporadas de reproducción 2007 y 2008 (septiembre-octubre). En la primera temporada se capturaron 15 organismos, 10 machos y 5 hembras, mientras que en la segunda temporada se obtuvieron 21 organismos, 2 machos y 19 hembras. El estado de madurez gonádica indicó que las hembras cumplían con el criterio del diámetro de los oocitos (diámetro mayor a 400 μ m), considerándolos como oocitos vitelogénicos avanzados; por lo que las hembras fueron aptas para recibir el tratamiento hormonal para inducir la maduración final y el desove, obteniendo tres desoves en 2007 y cinco en 2008.

VII.2. Grupo control.

En la Tabla 1 se presentan los valores registrados en el grupo control para cada una de las variables indicadoras de estrés.

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa, y valor hematocrito (promedios \pm desviación estándar) para grupo control de *L. peru*.

Variables indicadoras de estrés	Valor promedio	N
Cortisol (ng/mL)	2.61 \pm 0.41	14
Glucosa (mg/dL)	47.82 \pm 17.85	12
Hematocrito (%)	73.97 \pm 21.88	6

VII.3. Primera Temporada.

VII.3.1. Machos y Hembras

Las concentraciones de cortisol plasmático presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sexos a los 8 y 15 meses; mientras que los niveles de glucosa y valor hematocrito no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los tiempos de muestreo (Fig. 2). Por otro lado, debido a que las

diferencias entre el sexo solo se presentaron en dos tiempos de muestreo para el cortisol, se consideraron todos los datos en un solo grupo sin distinción de sexo.

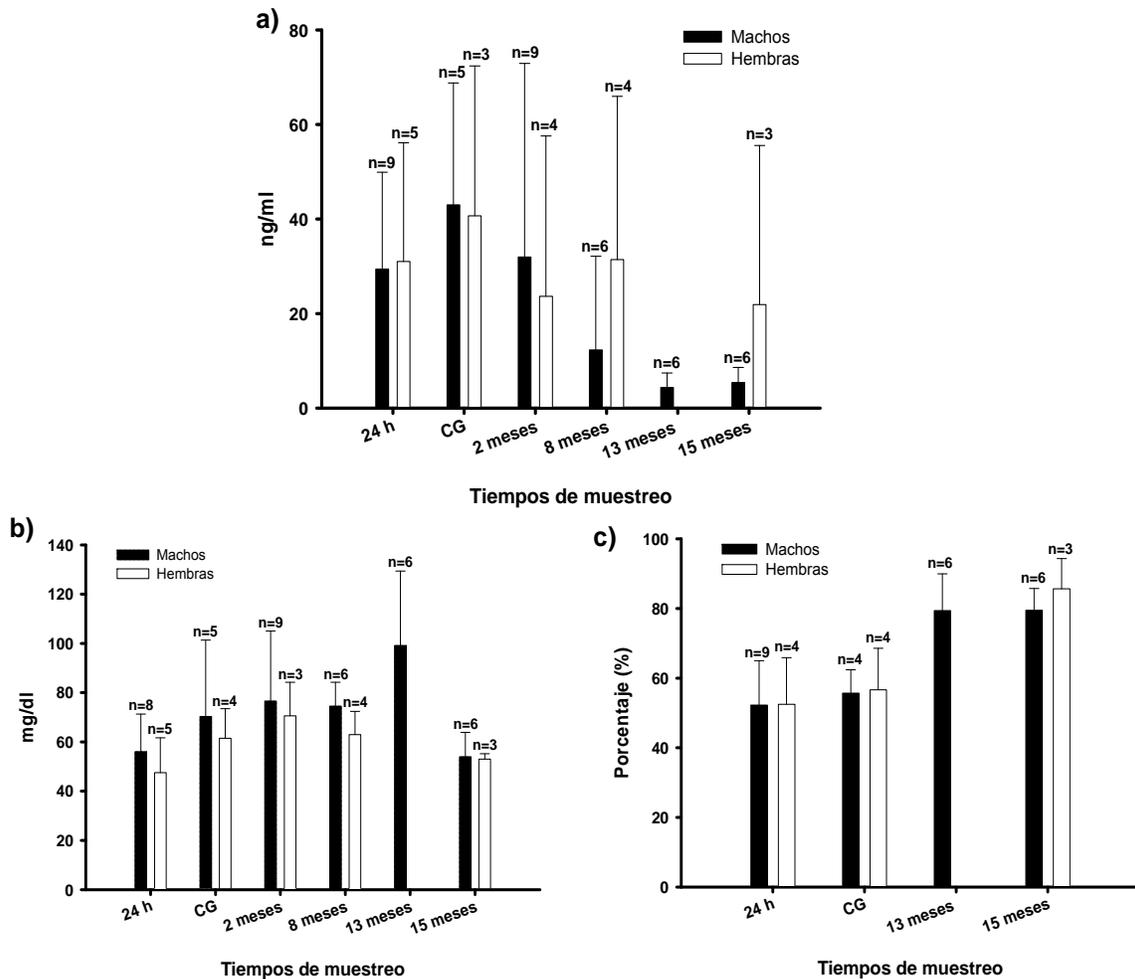


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de a) cortisol, b) glucosa, y c) valor hematocrito (promedio \pm desviación estándar) en machos y hembras de *L. peru* después de un manejo intenso (24 h y colecta de gametos (CG)) y después del manejo leve de rutina y cautiverio (2 meses, 8 meses, 13 meses, 15 meses).

VII.3.2. Cortisol

Las concentraciones plasmáticas de cortisol fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que el control durante todos los tiempos de muestreo, excepto a los 13 y 15 meses de cautiverio. Las concentraciones promedio más altas fueron registradas después de la colecta de los gametos (CG= 42.15 ± 25.85 ng/ml),

mientras que las más bajas se presentaron después de 13 meses de cautiverio (4.38 ± 3.03 ng/ml) (Fig. 3).

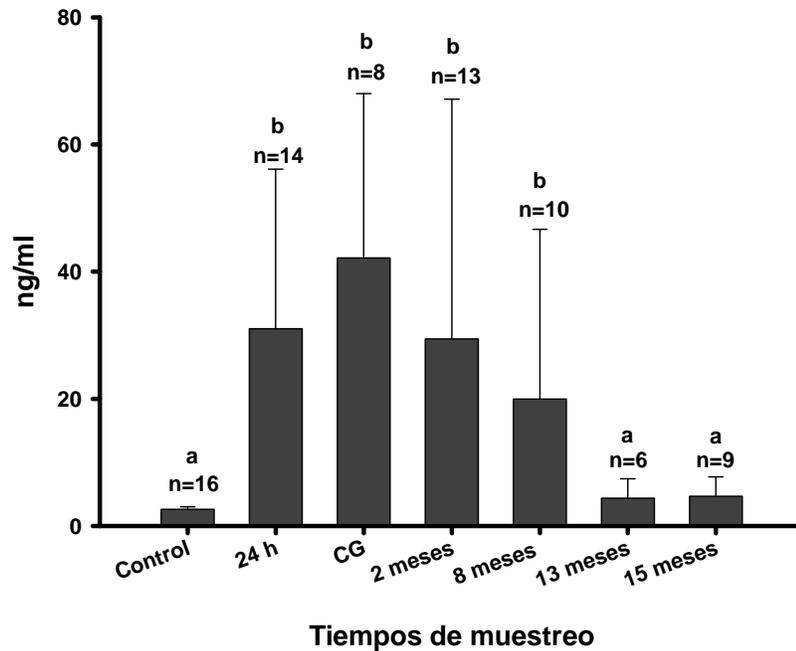


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de cortisol (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “a” indican que no hay diferencias significativas con el grupo control ($p > 0.05$).

VII.3.3. Glucosa

Las concentraciones de glucosa fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) a las del grupo control durante todo el estudio, excepto a las 24 h después de la llegada y a los 15 meses de cautiverio. El valor máximo promedio fue registrado a los 13 meses (99.12 ± 30.25 mg/dl) mientras que los mínimos se presentaron a las 24 h (52.77 ± 14.88 mg/dl) (Fig. 4).

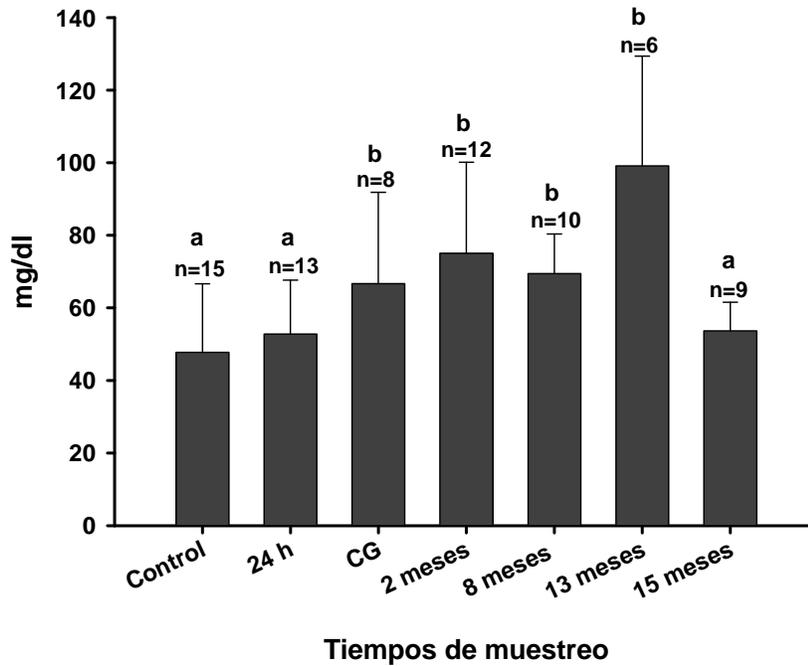


Figura 4. Concentraciones plasmáticas de glucosa (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “a” indican que no hay diferencias significativas con el control ($p > 0.05$).

VII.3.4. Hematocrito

Los valores más altos del hematocrito se presentaron a los 15 meses de cautiverio ($81.54 \pm 7.28\%$) y los más bajos a las 24 h de haber llegado al laboratorio ($52.34 \pm 12.36\%$). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y el muestreo durante el manejo intenso (24 h y después de la colecta de gametos (CG)) pero no a los 13 y 15 meses de cautiverio (Fig. 5).

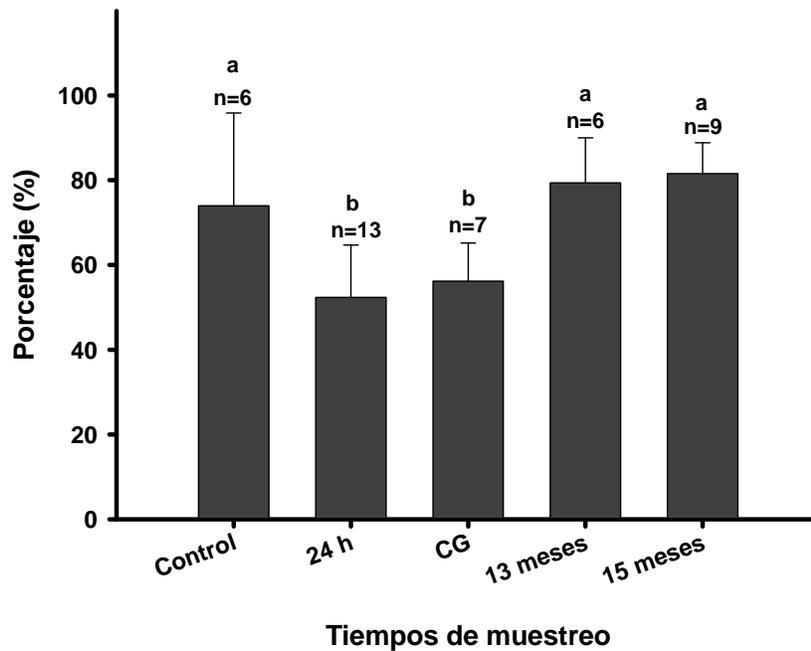


Figura 5. Valor hematocrito (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “a” indican que no hay diferencias significativas con el control ($p > 0.05$).

VII.3.5. Respuesta individual

Cada uno de los reproductores, mostró una respuesta diferente al estrés por manejo y cautiverio durante los meses de estudio (Fig. 6). El valor hematocrito fluctuó entre 35 y 94%; la glucosa entre 30 y 133 mg/dl y el cortisol entre 2.5 y 130 ng/ml. Cabe destacar el comportamiento del organismo 12, el cual se caracterizó por mostrar niveles altos de cortisol durante todo el estudio, mientras que el 5 y el 7 siempre mostraron niveles bajos. Los organismos restantes exhibieron valores altos y bajos en los diferentes tiempos de muestreo. No se encontró ninguna relación significativa ($p > 0.05$) entre el aumento en los niveles plasmáticos de cortisol con el comportamiento de los niveles plasmáticos de glucosa y el valor hematocrito. Finalmente, todos los peces mostraron un incremento en el peso corporal durante el transcurso de este estudio.

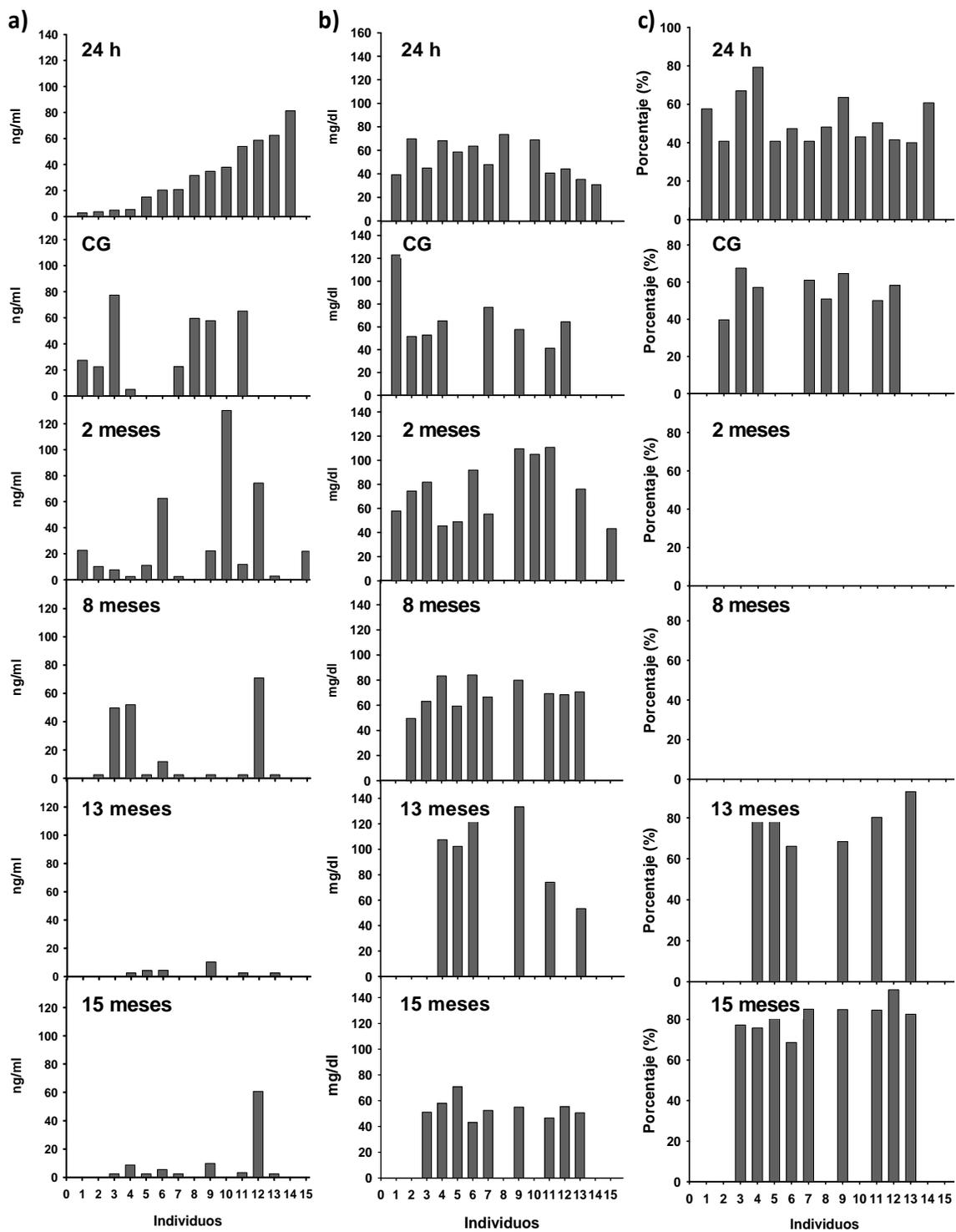


Figura 6. Respuesta individual en las concentraciones plasmáticas de a) cortisol, b) glucosa y c) valor hematocrito en reproductores de *L. peru*.

VII.4. SEGUNDA TEMPORADA

Los datos obtenidos en esta temporada no fueron separados por sexo, debido a que solo se capturaron 2 machos; por lo que los valores se analizaron como sexos combinados. En esta temporada, los peces fueron manipulados utilizando únicamente 2 tanques, este hecho resultó en una mayor densidad de organismos, además de un aumento en la intensidad de manejo. La mortalidad de los reproductores fue alta, lo que permitió evaluar únicamente el manejo intenso. Durante el proceso de inducción murieron 3 hembras y después de la colecta de los gametos murieron 15 hembras y 2 machos. De todos los organismos capturados, solo una hembra sobrevivió.

VII.4.1. Cortisol

Los niveles plasmáticos de cortisol fueron significativamente mayores al grupo control tanto a las 24 h de la llegada como después de la colecta de los gametos (CG) (Fig. 7). La concentración promedio más alta fue registrada después de la colecta de los gametos (177.16 ± 207.39 ng/ml), incrementándose aproximadamente 68 veces respecto a los niveles del grupo control.

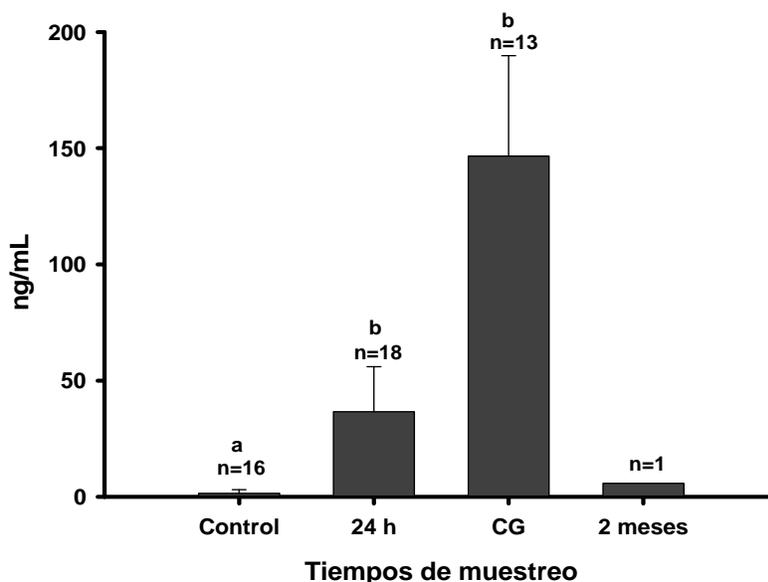


Figura 7. Concentraciones plasmáticas de cortisol (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “b” indican que no hay diferencias significativas con el control ($p > 0.05$).

VII.4.2. Glucosa

Los niveles plasmáticos de glucosa durante el manejo intenso se mantuvieron bajos (Fig. 8) y no fueron significativamente diferentes ($p>0.05$) del grupo control.

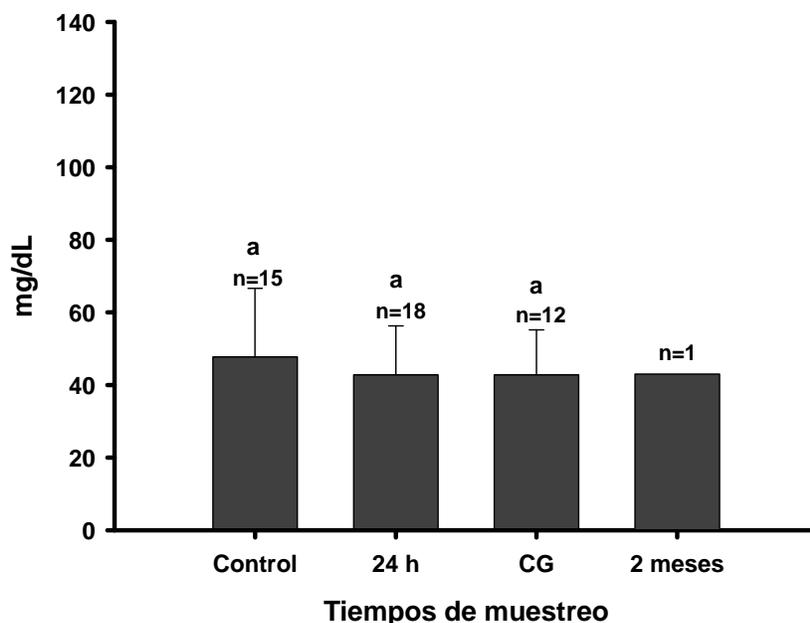


Figura 8. Concentraciones plasmáticas de glucosa (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “a” indican que no hay diferencias significativas con el control ($p>0.05$).

VII.4.3. Hematocrito

No se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el valor hematocrito registrado en el grupo control y los tiempos de muestreo correspondientes al manejo intenso (Fig. 9).

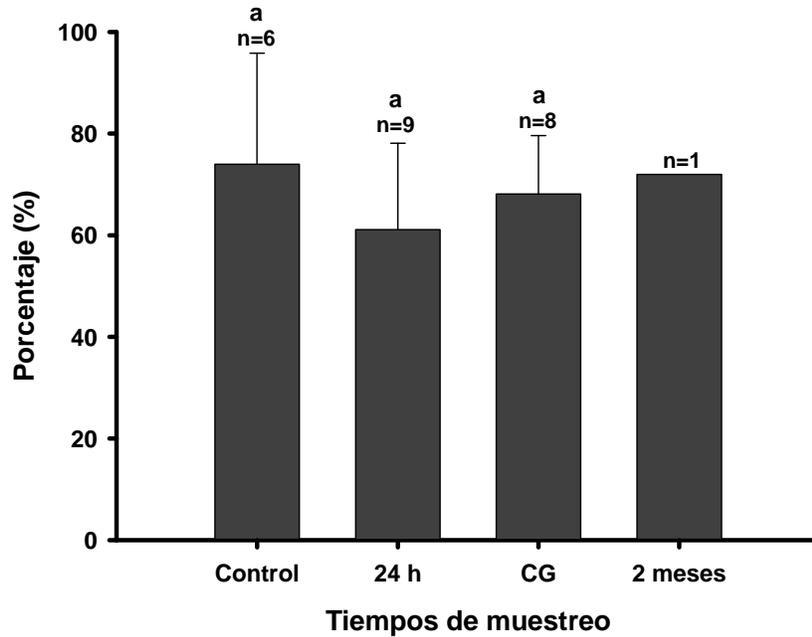


Figura 9. Valor hematocrito (promedio \pm desviación estándar) en reproductores de *L. peru*. Las letras “a” indican que no hay diferencias significativas con el control ($p > 0.05$).

VII.4.4. Respuesta individual.

Durante el manejo intenso, se observó que la respuesta al estrés fue diferente entre los reproductores (Fig. 10). El valor máximo y mínimo que alcanzó el cortisol fue 3.5 y 665.9 ng/ml, la glucosa 24 y 78 mg/dl y el hematocrito 32 y 91% respectivamente. El incremento en los niveles plasmáticos de cortisol no presentó ninguna relación significativa ($p > 0.05$) con el comportamiento de los niveles de glucosa y el valor hematocrito. En esta temporada la mortalidad fue independiente de los niveles de cortisol ya que los peces con altos y bajos niveles de cortisol murieron.

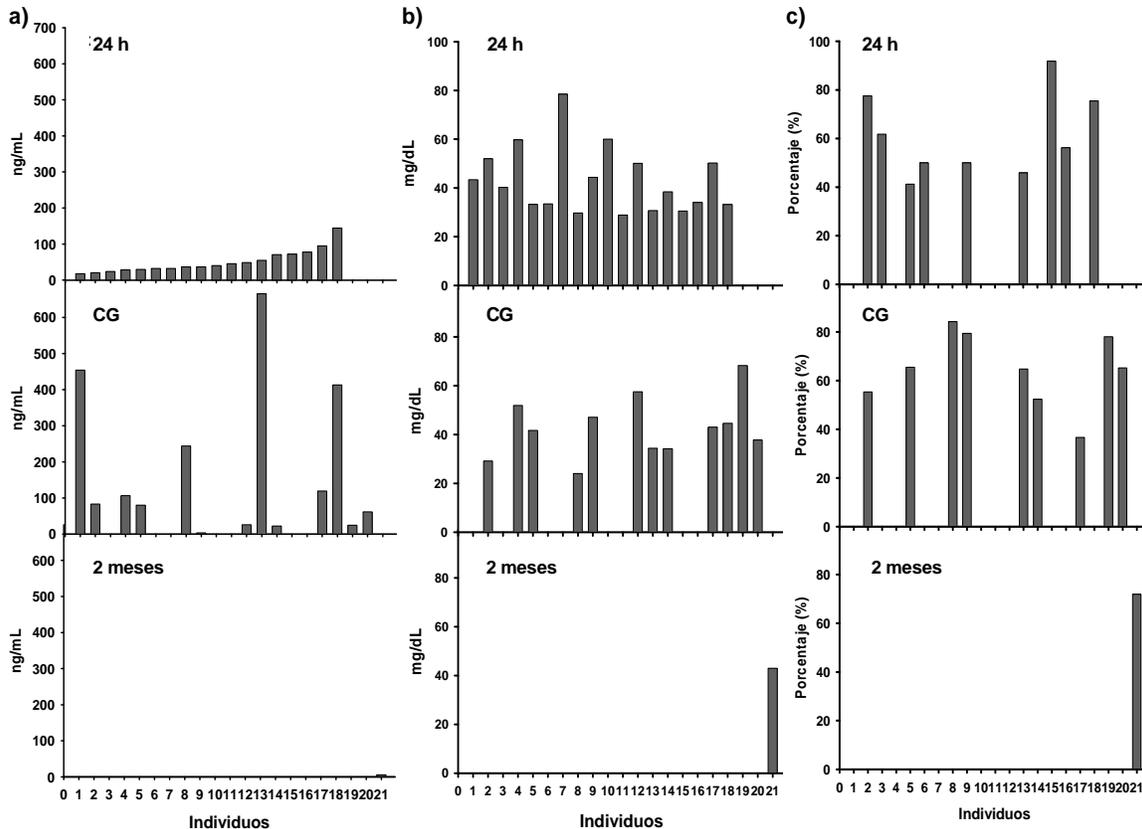


Figura 10. Valores registrados en los reproductores de *L. peru* en los diferentes tiempos de muestreo para cada una de las variables evaluadas. a) cortisol; b) glucosa; y c) hematocrito.

VII.5. DESEMPEÑO REPRODUCTIVO

VII.5.1. Hembras.

Los reproductores fueron manipulados e inducidos al desove con LHRH-a obteniendo 3 desoves en la primera temporada y 5 desoves en la segunda temporada (Tabla 2).

En la primera temporada, 5 hembras fueron capturadas y 3 de ellas desovaron. Los niveles plasmáticos de cortisol registrados 24 horas después de su llegada y al momento de colectar los desoves variaron entre 5 y 77 ng/ml en las hembras desovadas (Tabla 2). De acuerdo al criterio de flotabilidad de los huevos, el 100% de huevos fueron viables en las 3 hembras. Los porcentajes de eclosión determinados en las hembras 3 y 7 fueron altos y mayores al 80% (Tabla 2). De

las 2 hembras restantes (hembras que no desovaron), una murió horas después de recibir la segunda dosis de LHRH-a mostrando el valor de cortisol más alto (81.25 ng/ml) registrado a las 24 h; mientras que la otra hembra presentó niveles de cortisol bajos (3.77 ng/ml), un tamaño de oocitos previo a la inducción de 0.43 ± 0.04 mm y; sin embargo, no logro desovar. Las hembras que sobrevivieron fueron revisadas a los 8 y 11 meses en el primer año que siguió a su llegada al laboratorio (2008), y de nuevo al año siguiente (2009) después de 21 meses de permanecer en cautiverio bajo un régimen fototérmico (Tabla 3). Las hembras 3 y 7 presentaron oocitos en vitelogénesis avanzada con un diámetro de 0.31 ± 0.04 y 0.42 ± 0.06 mm respectivamente a los 11 meses de cautiverio (22°C); mientras que la hembra 12 los presentó hasta los 21 meses de cautiverio (21°C). De manera consistente, esta hembra presentó niveles de cortisol más altos que las otras en todos los muestreos (Fig. 6).

En la segunda temporada se capturaron 19 hembras de las cuales 5 desovaron. Los niveles de cortisol registrados a las 24 horas de su llegada y después de la colecta de los gametos fueron altamente variables, de 24 a 413 ng/ml. Sólo tres de estos desoves fueron fertilizados y corresponden a los obtenidos por las hembras 12, 15 y 19. Los porcentajes de eclosión fueron de 96 y 91% en las hembras 12 y 15, respectivamente; mientras que la hembra 19 mostró el porcentaje de eclosión más bajo (16%).

La única hembra sobreviviente de esta temporada (hembra 21), después de 8 meses en cautiverio logro madurar y desovar. Presentó 0.78 ± 0.03 mm de diámetro de huevo hidratado y 325, 257 huevos totales desovados. El porcentaje de eclosión obtenido fue de 51.75% y los niveles plasmáticos de cortisol registrados en los muestreos anteriores fueron muy cercanos a los basales (5.86 ng/ml a los 6 meses de cautiverio).

Tabla 2. Peso de las hembras, diámetro de los oocitos a las 24h de haber llegado al laboratorio (DO), diámetro de huevo hidratado (DH), total de huevos desovados (THD), porcentaje de huevos viables (%HV), porcentaje de eclosión (%E) y niveles de cortisol plasmático a las 24 h de haber llegado (24h) y después de la colecta de los gametos (CG) en hembras desovadas de *L. peru*.

Hembras	Peso (kg)	DO (mm)	DH (mm)	THD	%HV	%E	Cortisol (ng/ml)	
							24 h	CG
Primera Temporada								
3	2.9	n/d	0.75±0.02	130,000	100	81.2	5.0	77.3
7	4.0	n/d	0.81±0.03	286,000	100	90.6	20.8	22.5
12	2.2	0.43±0.04	n/d	26,000	100	n/d	58.7	n/d
Segunda Temporada								
4	5.2	0.45±0.04	0.75±0.03	118,459	100	n/d	28.1	106.7
12	5.2	0.39±0.05	0.75±0.02	430,281	100	96.2	48.7	25.7
15	3.0	n/d	0.75±0.02	491,750	100	91.2	144.5	413.3
19	4.2	0.39±0.04	0.77±0.03	618,200	n/d	16	n/d	24.3
20	2.2	0.41±0.04	n/d	19,293	n/d	n/d	n/d	61.5

n/d: Dato no determinado.

Tabla 3. Diámetro de los oocitos (DO) y niveles de cortisol en plasma de las hembras que maduraron en cautiverio y fueron sometidas a un régimen fototérmico.

Hembras	8 meses		11 meses		21 meses	
	DO (mm)	Cortisol (ng/ml)	DO (mm)	Cortisol (ng/ml)	DO (mm)	Cortisol (ng/ml)
Primera Temporada						
3	s/d	49.8	0.31±0.04	n/d	0.41±0.4	n/d
7	s/d	2.5	0.42±0.06	n/d	0.44±0.06	n/d
12	s/d	70.96	s/d	n/d	0.45±0.05	n/d
Segunda Temporada						
21	0.45±0.04	n/d				

s/d: Sin desarrollo. n/d: Dato no determinado.

VII.5.2. Machos

En la primera temporada fueron capturados 10 machos. Todos los machos que fueron inducidos con LHRH-a presentaron semen al momento de la colecta de los gametos. Las concentraciones plasmáticas de cortisol a las 24 horas de su llegada y al momento de la colecta de semen, variaron desde los 3 hasta los 65 ng/ml. Los peces fueron muestreados a los 2, 8, 13 y 15 meses y la maduración fue revisada solamente a los 8, 11, 13 y 21 meses de cautiverio registrando únicamente la presencia o ausencia de semen (Tabla 4). Solamente el macho 13 presentó esperma de manera constante en todos los muestreos. A excepción de los machos 5 y 6 que nunca presentaron semen, en los machos restantes se observó semen en alguno de los muestreos. A partir de los 8 meses todos los individuos a excepción del macho 4 presentaron niveles de cortisol por debajo de los 11 ng/ml. A los 13 meses de cautiverio todos los machos fueron inducidos para obtener semen y fertilizar los desoves obtenidos por las hembras de la segunda temporada; respondiendo exitosamente a la inducción los machos 11 y 13 (Tabla 4).

Tabla 4. Peso total, niveles de cortisol y registro de presencia/ausencia de semen (SI/NO) en machos de *L. peru* durante el cautiverio sometidos a régimen fototérmico.

	Variable	4	5	6	9	11	13
8 meses	Peso	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	Semen	NO	NO	NO	NO	NO	SI
	Cortisol	52.0	2.5	11.8	2.5	2.5	2.5
11 meses	Peso	4.2	3.6	4.7	3.6	3.8	3.7
	Semen	NO	NO	NO	SI	SI	SI
	Cortisol	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
13 meses	Peso	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	Semen	NO	NO	NO	NO	SI	SI
	Cortisol	2.5	4.1	4.4	10.3	2.5	2.5
21 meses	Peso	4.5	4.1	3.6	4.0	4.3	4.1
	Semen	SI	NO	NO	SI	NO	SI
	Cortisol	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

n/d: Dato no determinado.

VIII. DISCUSIÓN

Este estudio abarcó el análisis integral de la respuesta que presenta el huachinango del Pacífico *L. peru* cuando es sometido a los agentes estresantes propios de su cultivo; ya que los tres niveles de respuesta a) primaria: cortisol; b) secundaria: glucosa y hematocrito y; c) terciaria: reproducción, fueron evaluados a fin de mejorar las prácticas de manejo para su cultivo.

Los agentes estresantes utilizados en este estudio fueron elegidos por dos razones, la primera y más importante, porque son procedimientos relevantes e inevitables en la práctica acuícola, sobre todo cuando se pretende desarrollar una tecnología de cultivo; y la segunda, porque son procedimientos simples y reproducibles.

VIII.1. Grupo control

Los parámetros fisiológicos, bioquímicos y hematológicos son frecuentemente utilizados para evaluar el nivel de estrés causado por los diferentes agentes estresantes en los peces. Los niveles control de los indicadores de estrés son un punto de partida muy importante para comparar y establecer el efecto que tiene la intensidad y magnitud de cada uno de los agentes estresantes que ejercen presión sobre los organismos. Sin embargo, la carencia de estos valores de referencia en algunas especies, resulta ser un problema al momento de interpretar y comparar los datos obtenidos (Pankhurst & Sharples, 1992; Carragher & Rees, 1994; Fanouraki *et al.*, 2007). En este estudio los valores obtenidos en el grupo control para cortisol y glucosa plasmática, son similares a los valores basales reportados en otros estudios para diferentes especies; mientras que el valor hematocrito registró un valor promedio por arriba de lo reportado.

Wedemeyer *et al.*, (1990) mencionan que los niveles plasmáticos de cortisol en peces no estresados son menores de 30-40 ng/ml; sin embargo, Pankhurst & Sharples (1992) señalan valores aún más bajos, menores a 10 ng/ml. Para *L. peru*, los niveles plasmáticos de cortisol al momento de la captura (control) fueron

de 2.61 ± 0.41 ng/ml. Esto concuerda con lo registrado en organismos marinos silvestres recién capturados como *Cynoscion nebulosus* con 6 ng/ml (Safford & Thomas, 1987), *Scorpius violaceus* con 3.3 ng/ml (Pankhurst *et al.*, 1992) y *Pagrus auratus* con 3.8 ng/ml (Bollard *et al.*, 1993). A pesar de que los animales acababan de experimentar estrés por la captura; el tiempo de latencia después de la acción del agente estresante, ocurre entre 5 y 15 min tanto en salmónidos como en especies marinas de ambientes templados y tropicales (Sumpter *et al.*, 1986; Thomas & Robertson, 1991; Pankhurst *et al.*, 1992; Pankhurst & Dedual, 1994; Grutter & Pankhurst, 2000; Begg & Pankhurst, 2004); por lo que los valores bajos de cortisol observados en el huachinango, representan sus valores normales, ya que la captura y la toma de sangre fue realizada en menos de 5 minutos, por lo que está dentro del tiempo de latencia.

Los niveles plasmáticos de glucosa en peces no estresados oscilan en un intervalo bastante amplio entre los 50 y 150 mg/dl (Barton *et al.*, 2002). El nivel plasmático promedio registrado durante la captura en *L. peru* fue de 47.82 ± 17.85 mg/dl, el cual se encuentra dentro del intervalo mencionado, y es cercano a lo mostrado en otros peces marinos como *Sciaenops ocellatus* (Thomas & Robertson, 1991), *Hemigymnus melapterus* (Grutter y Pankhurst, 2000), *Sparus aurata* (Rotllant *et al.*, 2001), *A. polyacanthus* (Begg & Pankhurst, 2004) y *Pagrus pagrus* (Fanouraki *et al.*, 2007). Las concentraciones de glucosa que presentó el grupo control, fluctuaron entre los 26.4 y 83.4 mg/dl; estas variaciones pueden ser debidas a la ingestión reciente de alimento (Driedzic & Hochachka 1978; Farbridge & Leatherland, 1992).

Respecto al valor hematocrito, Wilhelm Filho *et al.*, (1992) analizaron los parámetros hematológicos de 80 especies marinas del Atlántico suroeste y encontraron que el valor hematocrito promedio de los teleósteos, tomando en cuenta 52 especies es de $41.0 \pm 14.3\%$. Por su parte, Barton *et al.*, (2002) señalan que el rango típico de este valor en peces no estresados es de 25-40%, como lo reportado en algunas especies marinas como *S. violaceus* (Pankhurst, *et al.*, 1992), *P. auratus* (Canfield *et al.*, 1994), *S. auratus* (Molinero & González, 1995),

Scophthalmus maximus (Waring *et al.*, 1996) y *G. morhua* (Magill & Sayer, 2004). El valor hematocrito promedio registrado al momento de la captura en *L. peru* fue de 73.97 ± 21.88 %. Este valor es muy alto, por lo que se consideró que la técnica de evaluación pudo haber generado una sobreestimación. Se realizaron algunos ensayos, comparando muestras asentadas y centrifugadas obtenidas de un mismo individuo, y se observó que el valor hematocrito evaluado mediante la técnica de asentamiento siempre fue mayor que el determinado por centrifugación (ver ANEXO). De esta manera, el valor hematocrito obtenido en el grupo control no es concluyente, por lo que es necesario realizar nuevas pruebas para explicar este resultado.

VIII.2. Machos y hembras.

En este trabajo se encontró que no hay diferencias significativas en la respuesta ante situaciones de estrés entre machos y hembras. No obstante se observó que a los 13 y 15 meses de cautiverio cuando los organismos muestran concentraciones similares a las del control indicando una aclimatación a las condiciones de cautiverio, estas concentraciones fueron significativamente menores en los machos. Se ha reportado en salmónidos sometidos a una variedad de condiciones estresantes, que la concentración del cortisol puede diferir según el sexo; encontrando típicamente niveles más altos en las hembras que en los machos (Hane *et al.*, 1966; Pickering & Christie, 1981; McBride *et al.*, 1986). Sin embargo, se menciona que estas diferencias ocurren en organismos maduros pero no en inmaduros (Kubokawa *et al.*, 1999; Øverli *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha señalado que existen diversos factores tanto intra como interespecíficos que pueden causar variaciones en el hematocrito, siendo el sexo uno de ellos. Jawad *et al.* (2004) reportaron para *Tenualosa ilisha* un valor hematocrito mayor en machos que en hembras. Estos autores sugieren que las diferencias pueden ser debidas a la alta tasa metabólica en los machos. En el presente trabajo, no se observaron diferencias entre los sexos. Sin embargo, fuera de estudios existentes en salmónidos, son pocos los trabajos que evalúan estos indicadores de estrés en machos y hembras en respuesta a los diferentes agentes estresantes.

VIII.3. Respuesta al estrés

VIII.3.1. Manejo Intenso

Los resultados de este estudio mostraron que dicha manipulación provocó una respuesta significativa de estrés en ambas temporadas; reflejándose en el incremento de los niveles plasmáticos de cortisol. Estudios previos han reportado esta situación en una gran variedad de especies incluyendo *P. pagrus* (Bollard *et al.*, 1993); *A. polyacanthus* (Begg & Pankhurst, 2004); *M. saxatilis* (Wang *et al.*, 2004); *P. major* (Biswas *et al.*, 2006); *Danio rerio* (Ramsay *et al.*, 2009) y *D. labrax* (Lupatsch *et al.*, 2010).

En ambas temporadas, los niveles plasmáticos máximos promedio de cortisol fueron registrados después de la colecta de los gametos, es decir, la última manipulación para obtener desoves. Dichas concentraciones se incrementaron 16 veces (42.15 ng/ml) en la primera temporada y 68 veces (177.16 ng/ml) en la segunda respecto a las concentraciones control. Reflejando claramente que la severidad y duración de los agentes estresantes, influyen la magnitud de la respuesta obtenida (Barton *et al.*, 1980; Pickering & Pottinger, 1989; Barton & Iwama, 1991; Carragher & Rees, 1994).

En la segunda temporada se utilizaron únicamente dos tanques, y conforme los animales iban llegando del campo al laboratorio eran colocados en el tanque 1, pero en el tanque 2 se juntaban peces que acababan de recibir la primera dosis de LHRH-a con aquellos que habían recibido la segunda dosis, además de otros peces que ya habían finalizado el tratamiento de inducción. La densidad de animales fue alta y la manipulación de los peces se caracterizó por un fuerte aumento en la persecución con la red, lo que no ocurre cuando se cuenta con un tercer tanque, como fue el caso en la primera temporada. Estos peces experimentaron varios disturbios y manipulaciones, por lo que altas concentraciones de cortisol plasmático fueron registradas. Se ha demostrado que la respuesta del estrés es acumulativa cuando los agentes estresantes son repetidos en un periodo corto de tiempo (White & Fletcher, 1989; Waring *et al.*,

1997; Mugnier *et al.*, 1998 y Barton, 2002). Barton & Iwama (1991) señalan que la acumulación de la respuesta a las distintas perturbaciones en un periodo de tiempo insuficiente para que los organismos se recuperen, podría ser perjudicial para los mismos. De esta manera, en la segunda temporada se observó una amplificación en la respuesta del estrés, y como resultado una alta mortalidad; situación que no permitió mantener en cautiverio más de un animal del total de organismos capturados. Situaciones similares han sido encontradas en *Oncorhynchus tshawytscha* (Maule *et al.*, 1988), *Oncorhynchus mykiss* (Flos *et al.*, 1988) y *S. maximus* (Mugnier *et al.*, 1998).

En peces, ha sido bien documentado que el cortisol tiene efectos sobre el metabolismo intermediario para mantener la homeostasis bajo situaciones de estrés, por lo que resulta común encontrarlo manteniendo una correlación positiva con la glucosa (Van der Boon *et al.*, 1991; Chrousos & Gold, 1992). A este respecto, aunque no hubo una correlación significativa entre el cortisol y la glucosa; en la primera temporada fue posible observar en algunos casos un aumento en los niveles plasmáticos de cortisol, aunado a un incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa. La liberación de las catecolaminas producen un rápido incremento en la glucosa plasmática mediante la acción glucogenolítica (Wendelaar Bonga, 1997), mientras que el cortisol permite mantener la hiperglucemia (Iwama *et al.*, 2006). En la segunda temporada, a pesar de observar concentraciones más altas de cortisol, no se presentaron diferencias significativas entre el control y los tiempos de muestreo en la glucosa plasmática. Un incremento en la utilización de la glucosa como sustrato para la producción de energía y metabolismo podría explicar la ausencia de cambios significativos como lo sugerido por Vijayan *et al.* (1990) así como Carragher & Rees (1994). Por otra parte, Reid *et al.* (1998) mencionan que la exposición de los peces a los agentes estresantes agudos repetidos, pueden insensibilizar y atenuar la respuesta neuroendócrina y metabólica siguiente, durante la exposición a un nuevo agente estresante. La ausencia de cambios en las concentraciones de glucosa plasmática ha sido también observada en situaciones de estrés crónico como la alta densidad de organismos (Barton & Schreck, 1987; Hosoya *et al.*, 2007). Con base a estos

resultados, estos autores consideran que la glucosa no es un buen indicador para evaluar el estrés crónico.

Respecto a lo que corresponde al hematocrito, se observó una disminución en este valor, el cual fue significativo en la primera temporada, pero no para la segunda. Sin embargo, aun cuando el hematocrito fue menor que el control, los valores obtenidos en la segunda temporada siguen siendo altos comparados con los valores obtenidos en peces estresados como *Oncorhynchus mykiss* (Wells & Weber, 1991), *Brycon cephalus* (Urbinati *et al.*, 2004), *Plectropomus leopardus* (Frisch & Anderson, 2005) y *G.morhua* (Olsen *et al.*, 2008). Con base a estudios previos en otras especies sometidas a diversos agentes estresantes, se esperaba el aumento significativo de este valor (Randall & Perry, 1992; Young & Cech, 1993, 1994b; Perry & Tufts, 1998; Rotllant *et al.*, 2001; Barcellos *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2006) debido al incremento en el número o tamaño de los eritrocitos (Nikinmaa, 1990; Pankhurst *et al.*, 1992; Caldwell & Hinshaw, 1994; Sandler *et al.*, 2000). Altos valores de hematocrito han sido observados en especies activas como escómbridos (68%) (Wilhelm Filho *et al.*, 1992; Perry & Tufts, 1998) y túnidos (75-83%) (Wells *et al.*, 1986), debido a que la capacidad de transporte de oxígeno es mayor que en peces menos activos; sin embargo, el huachinango no presenta estas características por lo que los datos obtenidos en este trabajo deben ser tomados con precaución hasta que se desarrolle un estudio más completo en cuanto a la hematología de esta especie. Este estudio nos permitirá verificar si los altos valores obtenidos pueden ser explicados por la técnica usada.

VIII.3.2. Manejo leve de rutina y cautiverio

En *L. peru*, los niveles plasmáticos de cortisol a los 2 y 8 meses; y los niveles de glucosa a los 2, 8 y 13 meses de cautiverio, fueron más altos que los niveles control. Mientras que 1 año después, estos valores y el valor hematocrito no fueron diferentes del control, lo que sugiere una aclimatación al cautiverio y también, que las condiciones que prevalecían en los tanques de cultivo eran las

apropiadas. En diversas investigaciones, la aclimatación de los peces criados en cautiverio a las condiciones de los tanques experimentales ocurre en un periodo de 1 a 2 semanas; tiempo suficiente para que los niveles de cortisol y glucosa se estabilicen y vuelvan a sus niveles basales (Thomas & Robertson, 1991; Hosoya *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se trata de organismos silvestres recién capturados, los investigadores suelen mantenerlos de 1 a 2 meses sin perturbaciones externas antes de iniciar el trabajo experimental (Sleet & Weber, 1983; Contreras-Sánchez *et al.*, 1998; Magill & Sayer, 2004). Por otro lado, cuando se ha obtenido un lote de reproductores silvestres, se ha demostrado que si se minimiza el estrés por manipulación durante el confinamiento y mantenimiento, es posible que después de 1 o 2 años, los peces logren la maduración gonádica como lo ocurrido en este estudio, y probablemente desoves espontáneos (Álvarez-Lajonchere & Puello-Cruz, 2009).

La manipulación de rutina que se lleva a cabo para verificar la madurez gonádica dura muy poco tiempo, ya que los peces fueron rápidamente capturados, anestesiados, manipulados y regresados al tanque en aproximadamente 5 minutos. De esta manera, la intensidad y magnitud de los agentes estresantes fue menor a la aplicada durante el manejo intenso, lo cual se vio reflejado en las bajas concentraciones de cortisol registradas. Al respecto, se ha señalado que la aclimatación a los diversos agentes estresantes se manifiesta como una respuesta más atenuada y un periodo de recuperación más rápido, lo que determinará que los organismos estén mejor adaptados fisiológicamente para hacer frente a situaciones estresantes posteriores (Young & Cech, 1993; Schreck *et al.*, 1995).

VIII.4. Respuesta individual

El incremento en los niveles plasmáticos de cortisol ha sido muy variable entre individuos en cada muestreo. Pottinger *et al.*, (1992) señalan que dicha variabilidad puede ser atribuida a que la respuesta del estrés es altamente individualizada, hereditaria y estable todo el tiempo. Adicionalmente, la intensidad del agente estresante, puede ser otra causa de la variabilidad de la respuesta observada en los individuos entre muestreos. Esto debido a que cuando los peces

son muestreados, el primer pez capturado no experimenta la misma intensidad de manejo que el último pez muestreado. Además, este orden varía entre los diferentes muestreos. Sin embargo, algunos individuos mostraron respuestas constantes durante todo el estudio.

La variabilidad entre individuos puede traer ventajas en condiciones de cultivo, ya que puede permitir seleccionar un lote de reproductores que sea más tolerante a los agentes estresantes comunes de manejo; por lo que organismos con una baja respuesta al estrés podrían desempeñarse mejor en términos de crecimiento, reproducción y resistencia a enfermedades (Fevolden *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha indicado que organismos con una alta respuesta suelen adaptarse más rápido a los cambios en el ambiente, así como a factores sociales, comparados con aquellos que muestran una baja respuesta (Fevolden *et al.*, 1992).

Por otro lado, en este estudio se observó un incremento en el peso de los reproductores durante los meses de cautiverio, lo cual fue un buen indicador de la aclimatación al cautiverio, ya que se ha demostrado que cuando los organismos son sometidos a estrés por confinamiento éstos comienzan a perder peso y a ser susceptibles a enfermedades debido a una disminución en la inmunocompetencia (Wendelaar Bonga, 1997).

VIII.5. Desempeño reproductivo

El estrés afecta la capacidad reproductiva de los organismos, y por ende la calidad de los desoves. En este apartado, se utilizó como indicador al cortisol para tratar de establecer si hay una relación entre el estrés experimentado por los reproductores con la respuesta a la inducción al desove y también con el porcentaje de eclosión. Existen diversos estudios que señalan un efecto directo del cortisol sobre la reproducción afectando el tamaño de los huevos, la tasa de supervivencia larvaria, la movilidad de las larvas así como la disminución de los esteroides sexuales (Campbell *et al.*, 1994; Short *et al.*, 1995; Contreras-Sánchez *et al.*, 1998; Morehead *et al.*, 2000).

En este estudio, el bajo número de hembras en la primera temporada, no permitieron realizar el análisis estadístico correspondiente para establecer diferencias en la respuesta del estrés presentada por las hembras desovadas y no desovadas; mientras que en la segunda temporada la gran variabilidad presentada en el cortisol no permitió observar ninguna tendencia del efecto del estrés sobre el desempeño reproductivo en ninguno de los tiempos de muestreo del manejo intenso. Sin embargo, Pankhurst & Dedual (1994), señalan que el proceso reproductivo puede ser afectado principalmente por el estrés producido durante la captura y transporte de los organismos silvestres debido a que son agentes estresantes traumáticos. Otros estudios han mostrado que el estrés provoca la supresión de los esteroides sexuales una hora después de la captura (Carragher & Pankhurst, 1991; Jardine *et al.*, 1996; Haddy & Pankhurst, 1999; Cleary *et al.*, 2002). Cuando *Acanthopagrus butcheri* fue inducida al desove con LHRH-a 24 h después de la captura, el número de hembras ovuladas fue menor comparado con las hembras inyectadas al momento de la captura (Haddy & Pankhurst, 2000). Por lo que es probable que el estrés generado desde la captura haya reducido la respuesta al tratamiento hormonal permitiendo el desove solo en algunas hembras.

Por otro lado, la calidad de los desoves fue evaluada, mediante la determinación del porcentaje de eclosión. Diversos factores pueden afectar dicha calidad, incluyendo el estado endocrino de las hembras, la alimentación de los reproductores, los nutrientes depositados en el oocito, así como por la calidad del agua en la incubación. Sin embargo, el estrés ocasionado por las diversas prácticas de manejo es probablemente el factor que mayor efecto tiene sobre esta calidad (Brooks *et al.*, 1997).

De manera general, en ambas temporadas se observó un porcentaje de eclosión alto (81.2 - 96.2%). No obstante, debido a que las hembras presentaron una respuesta de cortisol variable aunado al bajo número de desoves, no nos permiten generalizar o establecer una tendencia de la relación entre las concentraciones de cortisol y el porcentaje de eclosión. En la segunda temporada,

una hembra mostró un porcentaje de eclosión muy bajo, sin embargo, fue asociado con niveles plasmáticos de cortisol bajos. Esta hembra fue capturada al final de la temporada de reproducción, y tomando en cuenta que *L. peru* es un desovador múltiple, es posible que los huevos obtenidos no tuvieran la misma calidad que los obtenidos de hembras capturadas a mitad de la temporada. De igual manera *P. pagrus* y *Paralichthys orbignyanus* presentaron una considerable variación en la calidad de los huevos producidos en los diferentes desoves de la misma estación reproductiva (Kjesbu *et al.*, 1996). Giménez *et al.*, (2006) encontraron que huevos de alta calidad se produjeron a mitad del periodo de los desoves en *Dentex dentex*, mientras que huevos de baja calidad se produjeron al final o al inicio del periodo de desoves. Es importante señalar que todas las hembras presentaron 100% de huevos viables ya que en años anteriores y bajo diferentes condiciones de manejo, los desoves presentaron una gran proporción de huevos no viables (Datos no publicados).

Respecto a la maduración en cautiverio, se observó que tanto hembras como machos lograron madurar. Este resultado comprueba una vez más que el régimen fototérmico establecido para esta especie (Dumas *et al.*, 2004) permite la maduración gonádica. Los niveles bajos de cortisol en los muestreos también indican que las condiciones de cautiverio fueron las apropiadas. Estas condiciones son: la calidad del agua, la alimentación, la ausencia de parásitos y la densidad de cultivo. Además, los peces fueron mantenidos a una baja densidad, la cual fue todavía menor a la utilizada en años anteriores donde el 100% de las hembras nunca maduraron (Datos no publicados).

IX. CONCLUSIONES

- 1) El aumento en la intensidad de manejo afectó la supervivencia de los reproductores de *L. peru*.
- 2) En este estudio el valor hematocrito control y su comportamiento como respuesta del estrés no son concluyentes, por lo que estos datos deben ser tomados con precaución.
- 3) El cortisol resultó ser un buen indicador de estrés en esta especie y la glucosa un indicador complementario del cortisol; sin embargo, su utilización por si sola debe ser tomada con precaución.
- 4) Existe una respuesta diferencial por parte de los reproductores ante el estrés, lo que permitiría seleccionar un lote de reproductores que presente una respuesta menor al manejo.
- 5) El régimen fototérmico y la aclimatación de los reproductores a las condiciones de manejo y cautiverio registrada en los bajos niveles plasmáticos de cortisol permitieron la maduración gonádica de *L. peru*.
- 6) La alta variabilidad presentada por los reproductores en los niveles plasmáticos de cortisol, aunado al bajo número de desoves no permitieron establecer un patrón general del efecto que tiene el estrés producido por el manejo sobre el desempeño reproductivo tanto en las hembras silvestres como en aquellas aclimatadas al cautiverio.

X. RECOMENDACIONES

- 1) Se recomienda determinar el tiempo en el cual se presentan cambios en las concentraciones de cortisol, glucosa, y valor hematocrito después de la aplicación de los agentes estresantes; así como el tiempo que les toma regresar a su estado basal.
- 2) Medir la respuesta de estrés a la captura, transporte y después de la aplicación de la segunda dosis de LHRH-a para conocer el efecto del estrés durante todo el proceso de inducción y tener un panorama más amplio sobre el estrés repetido que sufren los reproductores durante este proceso.
- 3) Medir concentraciones de esteroides sexuales para determinar el efecto del cortisol sobre la reproducción.
- 4) Evaluar otras variables, además del porcentaje de eclosión que permitan determinar el efecto del estrés sobre la calidad de los desoves.
- 5) Desarrollar estudios sobre la hematología de esta especie para comprender de manera clara el comportamiento del hematocrito y los efectos del estrés sobre los parámetros sanguíneos.
- 6) Contar con un número mayor de reproductores al utilizado en este estudio, que permita realizar todos los experimentos, además de establecer un patrón o tendencia del efecto que tiene el estrés durante el manejo de inducción y cautiverio sobre la calidad de los desoves.

XI. REFERENCIAS

- Acerete, L., S.R. Balasch, E. Espinosa, A. Josa & L. Tort. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture 237: 167-178.
- Allen, G.R. 1983. FAO Species catalogue. Vol. 6. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of Lutjanid species known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol. 6. FAO, Rome, 208 p.
- Allen, G.R. & D.R. Robertson. 1994. Fishes of the Tropical Eastern Pacific. University of Hawaii Press. Honolulu, 332 p.
- Álvarez-Lajonchere, L. & A.C. Puello-Cruz. 2009. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles del pargo flamenco, *Lutjanus guttatus*. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. CIAD., 212 p.
- Amezcu-Linares, F. 2006. Peces demersales de la plataforma continental del Pacífico Central de México. UNAM / ICMYL / CONABIO, 184 p.
- Balon, E.K. 1981. Saltatory processes and altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. American Zoologist 21: 573-596.
- Barandica, C.L.M. & B.L. Tort. 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Físicas, Exactas y Naturales 32(123): 267-284.
- Barcellos, L.J.G., L.C. Kreutz, S.M.G. De Souza, L.B. Rodríguez, I. Fioreze, R.M. Quevedo, L. Cericato, A.B. Soso, M. Fagundes, J. Conrad, L. De Almeida Lacerda & S. Terra. 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237: 229-236.
- Barry, T.P., M. Ochial & J.A. Malison. 1995. In vitro effects of ACTH on interrenal corticosteroidogenesis during early larval development in rainbow trout. General and Comparative Endocrinology 99: 382-387.
- Barton, B.A. 1997. Stress in finfish: Past, present and future, a historical perspective, 1-33. En: Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schrek (Eds.). Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 278 p.

- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology 42:517-525.
- Barton, B.A., H. Bolling, B.L. Hauskins, C.R. Jansen. 2000. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. Albus* x *platorhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. Comparative Biochemistry and Physiology 103A: 445-450.
- Barton, B.A. & G.K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1: 3-26.
- Barton B.A., J.D. Morgan & M.M. Vijayan. 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish, 111-148. En: Adams, S. M. (Eds.). Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, 656 p.
- Barton, B.A., R.E. Peter & C.R. Paulencu. 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37: 805-811.
- Barton, B.A., A.B. Rahn, G. Feist, H. Bolling & C.B. Schreck. 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. Comparative Biochemistry and Physiology 120A: 355-363.
- Barton, B.A. & C.B. Schreck. 1987. Influences of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 62: 299-310.
- Begg, K. & N.W. Pankhurst. 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. Journal of Fish Biology 64: 133-145.
- Belanger, J.M., J.H. Son, K.D. Laugero, G.P. Moberg, S.I. Doroshov, S.E. Lankford & J.J. Cech, Jr. 2001. Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Aquaculture 203: 165-176.

- Biswas, A.K., M. Seoka, K. Takii, M. Maita & H. Kumai. 2006. Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. Aquaculture 252: 566-572.
- Bollard, B.A., N.W. Pankhurst & R.M.G. Wells. 1993. Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Sparidae). Comparative Biochemistry and Physiology 106A(1): 157-162.
- Bromage, N.R. & R.J. Roberts. 1995. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, U.K., 424 p.
- Brooks, S., C.R. Tyler & J.P. Sumpter. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?. Reviews in Fish Biology and Fisheries 7: 387-416.
- Caldwell, C.A. & J. Hinshaw. 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. Aquaculture 126: 183-193.
- Campbell, P.M., T.G. Pottinger & J.P. Sumpter. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. Biology of Reproduction 47: 1140-1150.
- Campbell, P.M., T.G. Pottinger & J.P. Sumpter. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. Aquaculture 88: 313-327.
- Canfield, P.J., N. Quartararo, D.L. Griffin, G.N. Tsoukalas & S.E. Cocaro. 1994. Haematological and biochemical reference values for captive Australian snapper, *Pagrus auratus*. Journal of Fish Biology 44: 849-856.
- Carragher J.F. & N.W. Pankhurst. 1991. Stress and reproduction in a commercially important marine fish, *Pagrus auratus* (Sparidae), 253-255. En: Scott, A.P., D.E. Sumpter, D.E. Kime & M.S. Rolfe (Eds.). Reproductive Physiology of Fish. Sheffield FishSymp 91.
- Carragher, J.F. & C.M. Rees. 1994. Primary and secondary stress response in golden perch, *Macquaria ambigua*. Comparative Biochemistry and Physiology 107A: 49-56.
- Carragher, J.F. & J.P. Sumpter. 1990. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. General and Comparative Endocrinology 77: 403-407.
- Carragher, J.F., J.P. Sumper, T. Pottinger & A. Pickering. 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout,

Salmo trutta and *Salmo gairdneri* Richardson. General and Comparative Endocrinology 77:310-320.

Carrillo, M., S., Zanuy, F., Oyen, J. Cerda, J.M. Navas & J. Ramos. 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness 61-74. En: Basurco, B. (Ed.). Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 47. Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. CIHEAM, Zaragoza, Spain, 394 p.

Carta Nacional Pesquera.2004. Diario Oficial de la Federación. México. D.F. 13/03/2004.

Cech, J.Jr. 2000. Osmoregulation in bony fishes. En: Stickney, R.R. (Ed.). Encyclopedia of Aquaculture. Wiley, New York, 1063 p.

Cerdá-Reverter, J.M., S. Zanuy, M. Carrillo & J.A. Madrid. 1998. Time-course studies on plasma glucose insulin, and cortisol in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. Physiology & Behavior 64(3): 245-250.

Chester, J.I., W. Mosley, I.W. Henderson & H.O. Garland. 1980. The interrenal gland in pisces, 396-523. En: Chester, J.I. & I.W. Henderson (Eds.). General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex. Academic Press, London, 670 p.

Chongmin, W., W. King & L. Curry. 2004. Physiological indicators of divergent stress responsiveness in male striped bass broodstock. Aquaculture 232: 665-678.

Chrousos, G.P. & P.W. Gold. 1992. The concept of stress and stress system disorders. Overview of physical and behaviour homeostasis. The Journal of the American Medical Association 267: 1244-1252.

Clearwater, S.J. & N.W. Pankhurst. 1997. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gunard. Journal of Fish Biology 50: 429-441.

Cleary, J.J., S.C. Battaglione & N.W. Pankhurst. 2002. Capture and handling stress affects the endocrine and ovulatory response to exogenous hormone treatment in snapper, *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider). Aquaculture Research 33: 829-838.

- Contreras-Sánchez, W.M., C.B. Schreck, M.S. Fitzpatrick & C.B. Pereira. 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction 58: 439-447.
- Díaz-Urbe, J., E. Chávez & J. Elorduy-Garay. 2004. Evaluación de la pesquería del huachinango (*Lutjanus peru*) en el suroeste del Golfo de California. Ciencias Marinas 30(4): 561-574.
- Donaldson, E.M. 1990. Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. American Fisheries Society Symposium 8:109-122.
- Driedzic, W.R. & P.W. Hochachka. 1978. Metabolism in fish during exercise. En: Hoar, W.S. & D.J. Randall (Eds.). Fish Physiology Vol.7. Academic Press, New York, 198 p.
- Dumas, S., O. Rosales-Velázquez, M. Contreras-Olguín, D. Hernández-Ceballos & N. Silverberg. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormonal-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. Aquaculture 234: 615-623.
- Fagundes, M. & E.C. Urbinati. 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. Aquaculture 276: 112-119.
- Fanouraki, E., P. Divanach & M. Pavlidis. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture 265: 294-304.
- Farbridge, K.J & J.F. Leatherland. 1992. Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5' monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry 10: 245-257.
- Fevolden, S.E., T. Refstie & K.H. Røed. 1992. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. Aquaculture 104: 19-29.
- Fletcher, C.R. 1992. Stress and water balance in the plaice *Pleuronectes platessa*. Journal of Comparative Physiology 162B: 512-519.
- Flores-Quintana, C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Revista de Ictiología 10 (1/2): 57-78.
- Flos, R., L. Reig, O. Torres & L. Tort. 1988. Primary and secondary responses to grading and hauling in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Aquaculture 71: 99-106.

- Frisch, A. & T. Anderson. 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). Comparative Biochemistry and Physiology 140A, 317-327.
- Gamperl, A.K., M.M. Vijayan & R.G. Boutilier. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes-techniques and applications. Reviews in Fishiology and Fisheries 4: 215-255.
- García, M.P., G. Echeverría, F.J. Martínez & S. Zamora. 1992. Influence of blood sample collection on the haematocrit value of two teleosts: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comparative Biochemistry and Physiology 101A(4): 733-736.
- Giménez, G., A. Estévez, F. Lahnsteiner, B. Zecevic, J.C. Bell, R.J. Henderson & J.A. Sánchez-Prado. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture 260: 232-243.
- Graham, J.B. 1997. Air-breathing Fishes: Evolution, diversity and adaptation. Academic Press, USA, 299 p.
- Grutter, A.S. & N.W. Pankhurst. 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. Journal of Fish Biology 57: 391-401.
- Haddy, J.A. & N.W. Pankhurst. 1999. Stress induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black stream. Journal of Fish Biology 55: 1304-1316.
- Haddy, J.A. & N.W. Pankhurst. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. Aquaculture 191: 351-366.
- Hane, S., O.H. Robertson, B.C. Wexler & M.A. Krupp. 1966. Adrenocortical response to stress and ACTH in Pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and steelhead trout (*Salmo gairdnerii*) at successive stages in the sexual cycle. Endocrinology 78: 791-800.
- Haukenes, H. 2001. Characterization of the impact of a chronic density stressor on the neuroendocrine and innate immune responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to an acute challenge with lipopolysaccharide. PhD Thesis. University of South Dakota, USA.

- Holloway, A.C., P.K. Ready, M.A. Sheridan & J.F. Leatherland. 1994. Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol and glucose concentration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. Biological Rhythm Research. 25: 415-432.
- Hosoya, S., S.C. Johnson, G.K. Iwama, A.K. Gamperl & L.O.B. Afonso. 2007. Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. Comparative Biochemistry and Physiology 146A: 78-86.
- Iwama, G.K., L.O.B. Afonso & M.M. Vijayan. 2006. Stress in Fishes. En: Evans, D.H. & J.B. Clairborne (Eds.). Physiology of Fishes. CRC Press, USA, 605p.
- Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schreck. 1997. Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 278 p.
- Jardine, J.J., Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R. 1996. Capture and confinement stress in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety 33: 287–298.
- Jawad, L.A., Al-Mukhtar & H.K. Ahmed. 2004. The relationship between haematocrit and some biological parameters of the indian shad, *Tenuulosa ilisha* (Family Clupeidae). Animal Biodiversity and Conservation 27(2): 47-52.
- Kjesbu, O.S., P. Solemdal, P. Bratland & M. Fonn. 1996. Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morhua*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 610-620.
- Kjorsvik, E., K. Hoehne-Reitan & K.I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 226: 9-20.
- Kubokawa, K., T. Watanabe, M. Yoshioka & M. Iwata. 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture 172: 335-349.
- Laidley, C. E. & J.F. Leatherland. 1988. Cohort sampling, anesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. Journal of Fish Biology 33: 73-88.

- Leatherland, J.F., J.S. Ballantyne, G. Van der Kraak. 1998. Diagnostics assessment of no-infectious disorders of captive and wild fish populations and the use of fish as the sentinel organisms for environmental studies, 335-366. En: Leatherland, J.F. & P.T.K. Woo. Fish Diseases and Disorders Volume 2: Non-infectious disorders. CAB International, University of Minnesota, 400 p.
- Lucano-Ramírez, G., M. Villagrán-Santa Cruz, S. Ruiz-Ramírez & T. López-Murillo. 2001. Histology of the oocytes of *Lutjanus peru* (Nichols and Murphy, 1922) (Pisces, Lutjanidae). Ciencias Marinas 27(3): 335-349.
- Lupatsch, I., G.A. Santos, J.W. Schrama & J.A.J. Verreth. 2010. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 298(3-4): 245-250.
- Magill, S.H. & M.D.J. Sayer. 2004. The effect of reduced temperature and salinity on the blood physiology of juvenile Atlantic cod. Journal of Fish Biology 64, 1193-1205.
- Matty, A. J. 1985. Fish Endocrinology. Croom Helm & Timber Press, London, 230 p.
- Maule, A.G., C.B. Schreck, C.S. Bradford & B.A. Bruce. 1988. Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile Chinook salmon past dams on the Columbia River. Transactions of the American Fisheries Society 117: 245-261.
- McBride, J.R., V.H.M. Fagerlund, H.M. Dye & J. Bagshaw. 1986. Changes in structure of tissue and in plasma cortisol during the spawning migration of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). Journal of Fish Biology 29: 153-166.
- Molinero, A. & J. González. 1995. Comparative effects of MS222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. Comparative Biochemistry and Physiology 111A: 405-414.
- Mommsen, T.P., M.M. Vijayan & T.W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9: 211-268.
- Montero, D., M.S. Izquierdo, L. Tort, L. Robaina & J.M. Vergara. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiology and Biochemistry 20: 53-60.

- Morehead, D.T., A.J. Ritar & N.W. Pankhurst. 2000. Effect of consecutive 9 or 12 months photo-thermal cycles and handling on sex steroid levels, oocytes development and reproductive performance in female striped trumpeter *Latris lineate* (Latrididae). Aquaculture 189: 293-305.
- Morgan, J.D. & G.K. Iwama. 1997. Measurements of stressed states in the field, 247-268. En: Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schreck (Eds.). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge U.K., 278 p.
- Moss, A.J., G.V. Dalrymple & C.M. Boyd. 1982. Radioinmunoensayo práctico. Editorial Reverté, Barcelona, 200 p.
- Mugnier, C., A. Fostier, S. Guezou, J. Gaignon & L. Quemener. 1998. Effect of some repetitive factor son turbot stress response. Aquaculture International 6: 33-45.
- Nikinmaa, M. (Ed.). 1990. Vertebrate red blood cells: adaptations of function to respiratory requirements. Zoophysiology 28: 1-262.
- Noga, E.J., J.H. Kerby, W. King, D.P. Aucoin & F. Giesbrecht. 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* x *Morone americana*). American Journal of Veterinary Research 55: 405-409.
- Olsen, R.E., K. Sundell, E. Ringø, R. Myklebust, G. Hemre, T. Hansen & Ø. Karlsen. 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture 280, 232-241.
- Ortuño, J., A. Esteban & J. Meseguer. 2002. Lack of effect of combining different stressors on innate responses of sea bream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology 84: 17-27.
- Øverli, Ø., C. Sørensen, G.E. Nilsson. 2006. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty? Physiology & Behavior 87: 506-512.
- Pankhurst, N.W. & M. Dedual. 1994. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate and gonadal steroids in a natural population of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology 45: 1013-1025.
- Pankhurst, N.W. & D.F. Sharples. 1992. Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper *Pagrus auratus*. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 43: 345-356.

- Pankhurst, N.W. & G. Van Der Kraak. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish, 73-93. En: Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck (Eds.). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 278 p.
- Pankhurst, N.W., R.M. Wells & J. F. Carragher. 1992. Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpiis violaceus* (Hutton), a marine teleost. Comparative Biochemistry and Physiology 101A: 335-339.
- Pelcastre-Campos, V.T. 2006. Inducción a la ovulación y espermiogénesis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) y almacenamiento de su semen. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. México, 98 p.
- Perry, S.F. & B.L. Tufts. 1998. Fish Respiration. Academic Press, London, 1325 p.
- Pickering, A.D. (Ed.). 1981. Stress and Fish. Academic Press, London, 367 p.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. Aquaculture 100: 125-139.
- Pickering, A.D. & P. Christie. 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. General and Comparative Endocrinology 44: 487-496.
- Pickering, A.D. & T.G. Pottinger. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiology and Biochemistry 7: 253-258.
- Pickering, A.D. & T.G. Pottinger. 1995. Biochemical effects of stress, 349-379. En: Hochachka, P.W. & T.P. Mommsen (Eds.). Environmental and Ecological Biochemistry. Elsevier, Amsterdam, 455 p.
- Pintos-Terán, P.A., M.O. Rosales, S. Dumas, H. Pliego & J.P. Alcántar. 2003. Características reproductivas del Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) en cautiverio. CIVA 2003. <http://www.CIVA2003.org.pp> 615-623.
- Planas, J., J. Gutierrez, J. Fernández, M. Carrillo & P. Canals. 1990. Annual daily variations of plasma cortisol in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Aquaculture 91: 171-178.
- Portz, D.E., C.M. Woodley & J.J. Cech. 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries 16:125-170.

- Pottinger, T.G. & T.R. Carrick, 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. Aquaculture 175: 351-363.
- Pottinger, T.G., A.D. Pickering & M.A. Hurley. 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 103: 275-289.
- Ramsay, J.M., G.W. Feist, Z.M. Varga, M. Westerfield, M.L. Kent & C.B. Schreck. 2009. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. Aquaculture 297:(1-4) 157-162.
- Randall, D., W. Burggren & K. French. 2002. Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones. McGraw-Hill Interamerican, España, 795 p.
- Randall, D.J. & S.F. Perry. 1992. Catecholamines, 255-300. En: Hoar, W.S., D.J. Randall & A.P. Farrell (Eds.). Fish Physiology The Cardiovascular System, Vol. XII B. Academic Press, New York, 340 p.
- Reid, S.G., N.J. Bernier & S.E. Perry. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comparative Biochemistry and Physiology 120C: 1-27.
- Reid, S.G., R. Fritsche, A.C. Jonsson. 1995. Immunohistochemical localization of bioactive peptides and amines associated with the chromaffin tissue of five species of fish. Cell Tissue Research 280: 499-512.
- Reyna-Trujillo, M. 1993. Desarrollo gonádico y época de desove del huachinango (*Lutjanus peru*) Nichols y Murphy, 1922 (Pisces: Lutjanidae) en Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México, 69 p.
- Rocha-Olivares, A. & V.M. Gómez-Muñoz. 1993. Validación del uso de otolitos para determinar la edad del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Perciformes: Lutjanidae) en la bahía de la Paz y aguas adyacentes, B.C.S., México. Ciencias Marinas 19: 321-331.
- Rocha-Olivares, A. & J. Sandoval-Castillo. 2003. Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Ciencias Marinas 29: 197-209.
- Rojas-Herrera, A.A., M. Mascaró, X. Chiappa-Carrara. 2004. Hábitos alimentarios de los peces *Lutjanus peru* y *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. Revista de Biología Tropical 52(4): 959-971.

- Romestand, B., E. Halsband, G. Bragoni, B. Knezevic, D. Maric & F. Prochnow. 1983. Etude hematologique comparée des constants erythrocytaires de quelques poissons marins et d'eaux douces. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 46: 147-156.
- Rotllant, J., R.J. Arends, J.M. Mancera, G. Flik & S.E. Wendelaar Bonga. 2000. Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. Fish Physiology and Biochemistry 23: 13-22.
- Rotllant, J., P.H. Balm, J. Perez-Sánchez, S.E. Wendelaar Bonga & L. Tort. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. General and Comparative Endocrinology 121(3): 333-342.
- Rotllant, J. & L. Tort. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. Journal of Fish Biology 51: 21-28.
- Ruane, N.M., S.E. Wendelaar Bonga & P.H.M. Balm. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. General and Comparative Endocrinology 113: 210-219.
- Safford, S.E. & P. Thomas. 1987. Effects of capture and handling on circulating levels of gonadal steroids and cortisol in the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus*, 142-149. En: Idler, D.R., L.W. Crim & J.M. Walsh. Reproductive Physiology of Fish. Memorial University of Newfoundland, St Johns, 312p.
- Sandodden, R., B. Finstad & M. Iversen. 2001. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anesthesia and recovery. Aquaculture Research 32, 87-91.
- Sandler, J., P.M. Pankhurst, N.W. Pankhurst & H. King. 2000. Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon. Journal of Fish Biology. 56: 506-518.
- Santamaría-Miranda, A., J. Elorduy-Garay & A. Rojas-Herrera. 2003a. Hábitos alimentarios de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) en las costas de Guerrero, México. Revista de Biología Tropical 51(2): 503-517.
- Santamaría-Miranda, A., J. Elorduy-Garay, M. Villarejo-Fuerte & A. Rojas-Herrera. 2003b. Desarrollo gonadal y ciclo reproductivo de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. Revista de Biología Tropical 51(2): 489-502.

- Schreck, C. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: Response to social and physical factors, 295-321. En: Pickering, A.D. (Ed.). Stress and Fish. Academic Press, New York, 367 p.
- Schreck, C.B., L. Jonsson, G. Feist & P. Reno. 1995. Conditioning improves performance of juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. Aquaculture 135: 99-110.
- Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. British Medical Journal 1: 1383-1392.
- Short, C.E., L.W. Crim & M.J. Morgan. 1995. The effects on spawning performance and larval development in Atlantic cod, *Gadus morhua*, 198. En: Goetz, F.W. & P. Thomas (Eds.). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin, University of Texas, 389 p.
- Sleet, R.B. & L.J. Weber. 1983. Blood volume of a marine teleost before and after arterial cannulation. Comparative Biochemistry and Physiology 76A(4): 791-794.
- Strange, R.J., C.B. Schreck & R.D. Ewing. 1978. Cortisol concentrations in confined juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Transactions of the American Fisheries Society 107: 812-819.
- Sulikowski, J.A. & W.H. Howell. 2003. Changes in plasma cortisol, glucose and selected blood properties in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*) associated with sequential movement to three experimental conditions. Journal of World Aquaculture Society 34(3): 387-397.
- Sumpter, J.P. 1997. The endocrinology of stress, 95-118. En: Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schreck (Eds.). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge, Cambridge University Press, 278 p.
- Sumpter, J.P., H.M. Dye & T.J. Benfey. 1986. The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH and cortisol levels in salmonid fishes. General and Comparative Endocrinology 62: 377-385.
- Thomas, P. & L. Robertson. 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulphate and metomidate. Aquaculture 96: 69-86.

- Urbinati, E.C., J.S. De Abreu, A.C.S. Camargo & M.A.L. Parra. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. Aquaculture 229: 389-400.
- Van der Boon, J., G.E.E. Van den Thillart & A.D.F. Addink. 1991. The effects of cortisol on intermediary metabolism in teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology 100A:47-53.
- Vijayan, M.M., J.S. Ballantyne & J.F. Leatherland. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture 88: 371-381.
- Vijayan, M.M., T.P. Mommsen, H.C. Glémet & T.W. Moon. 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in marine teleost, the sea raven. The Journal of Experimental Biology 199: 1509-15114.
- Vijayan, M.M. & T.W. Moon. 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49: 2260-2266.
- Wang, C., W. King & C. Woods. 2004. Physiological indicators of divergent stress responsiveness in male striped bass broodstock. Aquaculture 232: 665-668.
- Waring, C.P., M.G. Poxton & R.M. Stagg. 1997. The physiological response of the turbot to multiple net confinements. Aquaculture International 5: 1-12.
- Waring, C.P., R.M. Stagg & M.G. Poxton. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. Journal of Fish Biology 48: 161-173.
- Wedemeyer, G.A. 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman and Hall, New York, 232 p.
- Wedemeyer, G.A., B. Barton, D.J. McLeay. 1990. Stress and Acclimation, 451-489. En: Schreck, C.B. & P.B. Moyle (Eds.). Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 684 p.
- Wells R.M.G. & R.E. Weber. 1991. Is there an optimal haematocrit for trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? An interpretation of recent data based on blood viscosity measurements. Journal of Fish Biology 38: 53-65.
- Wells, R.M.G., R.H. McIntyre, A.K. Morgan & R.S. Davie. 1986. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. Comparative Biochemistry and Physiology 84A(1): 565-571.

- Wendelaar Bonga, B.S.E. 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77: 591-625.
- White, A. & T.C. Fletcher. 1989. The effect of physical disturbance, hypoxia and stress hormones on serum components of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. Comparative Biochemistry and Physiology 93A(2): 455-461.
- Wilhelm Filho, D., G.J. Eble, G. Kassner, F.X. Caprario, A.L. Dafré & M. Ohira. 1992. Comparative hematology in marine fish. Comparative Biochemistry and Physiology 102A(2): 311-321.
- Young, P.S. & J.J. Cech, Jr. 1993. Physiological stress responses to serial sampling and confinement in young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). Comparative Biochemistry and Physiology 105A(1): 239-244.
- Young, P.S. & J.J. Cech, Jr. 1994a. Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50: 2094-2099.
- Young, P.S. & J.J. Cech, Jr. 1994b. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 51: 1528-1534.
- Zavala-Leal, O.I. 2007. Efecto de la temperatura, intensidad de luz, tipo y densidad de presa en el eficiencia alimenticia durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 66 p.
- Zohar, Y. & C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.

XII. ANEXO

Se presenta el valor hematocrito obtenido en cada uno de los tiempos de muestreo de la primera temporada (Tabla 5). Los valores registrados a las 24h, CG, 13 meses y 15 meses fueron determinados por la técnica de asentamiento; mientras que los registrados a los 2 y 8 meses fueron determinados mediante centrifugación. Se observa que no hay mucha diferencia entre las muestras asentadas a las 24h y CG con aquellas centrifugadas a los 2 y 8 meses; sin embargo a los 13 y 15 meses, los valores de hematocrito obtenidos por asentamiento son muy altos comparado tanto con las que han sido centrifugadas como con las que han sido asentadas a las 24 h y CG.

Tabla 5. Valor hematocrito registrado en cada uno de los tiempos de muestreo (24 h, colecta de gametos y después de 2, 8, 13 y 15 meses en cautiverio) en los reproductores de *L. peru* durante la primera temporada.

Organismo	24 h	CG	2 meses	8 meses	13 meses	15 meses
1	57.64	n/d	34.40*	n/d	n/d	n/d
2	n/d	39.71	49.07*	53.65*	n/d	n/d
3	66.98	67.56	58.62*	52.53*	n/d	77.28
4	79.29	57.18	56.56*	60.98*	80.32	75.86
5	40.80	n/d	n/d	n/d	88.40	80.40
6	47.37	n/d	56.59*	54.86*	66.09	68.62
7	40.73	61.03	35.96*	53.57*	n/d	85.04
8	48.15	50.98	n/d	n/d	n/d	n/d
9	63.60	64.61	45.73*	48.81*	68.39	84.83
10	43.10	n/d	47.77*	n/d	n/d	n/d
11	50.41	50.07	44.08*	50.00*	80.28	84.62
12	41.52	58.26	43.57*	60.00*	n/d	94.63
13	40.06	n/d	55.92*	62.02*	92.78	82.58
14	60.77	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
15	n/d	n/d	37.30*	n/d	n/d	n/d

*: Muestras centrifugadas, n/d: Sin dato.

Se presenta el valor hematocrito registrado durante la segunda temporada (Tabla 6). A excepción de algunos organismos que presentan valores de

hematocrito muy altos (organismo 2, 15 y 18 a las 24 h) los valores hematocrito obtenidos por asentamiento y centrifugación son relativamente similares.

Tabla 6. Valor hematocrito registrado en cada uno de los tiempos de muestreo en los reproductores de *L. peru* durante la segunda temporada.

Organismo	24 h	CG	2 meses
1	32.05*	40.59*	
2	77.56	55.36	
3	61.76	n/d	
4	48.44*	46.55*	
5	41.18	65.48	
6	50.00	n/d	
7	46.43*	n/d	
8	32.18*	84.23	
9	50.00	79.43	
10	39.06*	n/d	
11	44.41*	n/d	
12	46.85*	36.44*	
13	45.85	64.76	
14	38.52*	52.37	
15	91.83	n/d	
16	56.21	n/d	
17	33.33*	36.67*	
18	75.43	N/D	
19	n/d	78.05	
20	n/d	65.26	
21	n/d	n/d	71.95

*: Muestras centrifugadas, n/d: Sin dato.

Estos resultados inconsistentes nos llevaron a cuestionar las técnicas utilizadas; y para aclarar estas dudas se realizó un experimento para determinar un factor de corrección entre los dos métodos. Se observó que el hematocrito en peces con 13 y 15 meses de cautiverio era mayor que el de aquellos muestreados durante el manejo intenso (24 h y CG); por lo que se decidió obtener muestras de sangre de los peces en los distintos tiempos de muestreo. Se muestrearon machos de la temporada 1 (2007) que tenían 22 meses de cautiverio, así como organismos capturados en el 2009 (peces diferentes a los de este estudio) que fueron muestreados a las 24 h y después de la colecta de los gametos. La toma de las muestras de sangre y el método para determinar el valor hematocrito por la

técnica de asentamiento fue ya descrito anteriormente. Para determinar el valor hematocrito por centrifugación, los capilares fueron centrifugados a 7000 rpm (4382.56 G) por 5 min (Centrifuga Eppendorf 5416). Una vez centrifugados, se midió con una regla ($\pm 1.0\text{mm}$) la distancia ocupada por el plasma y la distancia ocupada por los glóbulos rojos para obtener el valor hematocrito. El resultado fue reportado en porcentaje y calculado de la siguiente manera:

$$\text{Hematocrito (\%)} = \frac{\text{distancia globulos rojos}}{\text{distancia glob rojos+plasma}} \times 100$$

El valor hematocrito de cada muestra de sangre fue determinado por ambas técnicas (Tabla 7). Después se calculó el factor de corrección mediante un ajuste lineal, donde la ecuación de la recta fue la siguiente: $y = -17.3517 + (0.7981 \cdot \text{Asentados})$. Sin embargo al aplicar este factor de corrección en los datos asentados se observaron algunos valores muy bajos (14 a 17%), por lo que se decidió no utilizar este factor y presentar en la tesis solamente los valores obtenidos por asentamiento ya que eran más numerosos.

Tabla 7. Comparación del valor hematocrito obtenido en reproductores de *L. peru* por centrifugación y asentamiento.

Organismo	Sexo	Peso	Tiempo de muestreo	Centrifugación	Asentamiento
4	MACHO	4520	22 meses	75.16	98.84
5	MACHO	4100	22 meses	60.51	96.36
9	MACHO	3960	22 meses	49.48	81.92
11	MACHO	4342	22 meses	58.21	95.41
13	MACHO	4050	22 meses	65.53	96.79
A	MACHO	2470	24 h	31.97	54.47
B	MACHO	1930	24 h	30.82	55.02
C	MACHO	1560	24 h	28.08	52.05
D	MACHO	3730	24 h	36.36	74.89
E	MACHO	3850	24 h	27.41	55.87
F	MACHO	2370	24 h	34.68	73.85
A	MACHO	2470	CG	46.91	93.62
G	MACHO	1760	CG	38.66	78.01
H	MACHO	1640	CG	31.72	68.51