



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

UNIDAD SINALOA



**Efecto de la Ablación del Pedúnculo Ocular
Sobre Variables Reproductivas, Inmunológicas y
Metabólicas en Hembras Reproductoras de
*Macrobrachium americanum***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTA:

JAZMIN ASUSENA AGUIÑAGA CRUZ

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2011.

***“Sólo cerrando las puertas detrás de uno se abren
ventanas hacia el porvenir”***

Francoise Sagan (1935 – 2004).



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 29 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091620, adscrito a CIIDIR-SINALOA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas en hembras reproductoras de *Macrobrachium americanum*, 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 jasmine_2923@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jazmin Aguiñaga
Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz

Nombre y firma



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa, a 13 de OCTUBRE del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del CIIDIR-SINALOA en su sesión ORDINARIA No. 10 celebrada el día 06 del mes de OCTUBRE conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Aguñaga</u>	<u>Cruz</u>	<u>Jazmin</u>	<u>Asusena</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)								
		Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>6</td><td>2</td><td>0</td></tr></table>		B	0	9	1	6	2	0
B	0	9	1	6	2	0				

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas en hembras reproductoras de *Macrobrachium americanum*.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Ablacionar el pedúnculo ocular en hembras de *Macrobrachium americanum* para acelerar el tiempo de ciclo de muda y alargar los periodos de reproducción.

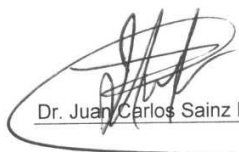
2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y Dr. Héctor Manuel Esparza Leal

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Las instalaciones del CIIDIR-Unidad Sinaloa. Mismo que será financiado por CECyT 2010 y SIP 2010 con número de registro 20100413.

Que cuenta con los recursos y la infraestructura para bioensayos del Departamento de Acuicultura.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

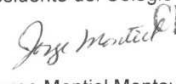

Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

Aspirante

JAZMIN AGUINAGA
Jazmin Asusena Aguñaga Cruz


Dr. Héctor Manuel Esparza Leal

Presidente del Colegio


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 4:00 horas del día 29 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SIN. para examinar la tesis titulada:

Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas en hembras reproductoras de *Macrobrachium americanum*.

Presentada por el alumno:

Aguñaga

Cruz

Jazmin Asusena

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	6	2	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



Dr. Juan Carlos Sainz Hernández



Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



Dr. Wenceslao Valenzuela Quiñonez



Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojorquez



Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR-IPN
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

AGRADECIMIENTOS A PROYECTOS

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Acuacultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del proyecto CECyT 2010 y SIP 2010 (Con número de registro 20100413). El alumno/a Jazmin Asusena Aguiñaga Cruz fue apoyado con una beca CONACYT con clave 36019.

DEDICATORIA

A ti HIJA por el tiempo que no compartí contigo por la realización de esta meta profesional y personal. Te amo Pau.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jesús Aguiñaga y Antonia Cruz por el apoyo que siempre me han brindado. Los admiro y los amo.

A mi esposo Genaro, por la ayuda brindada durante la realización de los experimentos y por alentarme a seguir adelante. Te amo Diarte.

A mis directores de tesis Dr. Juan Carlos Sainz Hernández y Dr. Héctor Manuel Esparza Leal gracias por su amistad antes que nada y por los aportes dados para la finalización de esta tesis.

A los doctores Dagoberto Armenta, Cesar Escobedo, y Wenceslao Valenzuela quienes formaron parte del comité tutorial, gracias por sus comentarios y aportes durante cada tutorial presentado.

Al M. en C. Jesus Arturo Fierro Coronado por su apoyo en los análisis de laboratorio. Gracias por compartir tus conocimientos y sobre todo gracias por la amistad brindada desde que te conocí y por hacer más amenas las largas horas de trabajo. Nunca cambies y menos conmigo ehh ☺. Gracias Arturchhh

A mi amigocha Nancy Reyes por ser mi confidente y mi amiga durante el transcurso de la maestría, extrañaré esas pláticas contigo. Te quiero.

A Celestino Vargas por el apoyo técnico brindado durante cada seminario.

A Dorin Ortiz Fèlix por la ayuda en cada trámite realizado para las becas otorgadas.

Gracias a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta me ayudaron para culminar esta meta.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
GLOSARIO	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Clasificación taxonómica.....	3
2.2. Morfología, reproducción y ciclo de vida	3
2.3. Sistema endocrino en crustáceos	5
2.4. Ablación y sistema inmune de crustáceos.....	7
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVOS	10
5.1. General.....	10
5.2. Específicos	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. Área de colecta y captura de organismos	11
6.2. Manejo y mantenimiento de organismos.....	12
6.3. Evaluación de técnicas de ablación unilateral del pedúnculo ocular en machos de <i>M. americanum</i>	12

6.4. Ablación unilateral del pedúnculo ocular de hembras de <i>M. americanum</i>	14
6.5. Ablación unilateral del pedúnculo ocular de hembras de <i>M. americanum</i>	¡Error!
Marcador no definido.	
6.6. Muda, supervivencia y eventos reproductivos en hembras de <i>M. americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas	15
6.6.1 Muda y supervivencia	15
6.6.2. Eventos reproductivos.....	15
6.7. Toma de muestras y análisis para evaluar las variables inmunológicas en hemolinfa de hembras de <i>M. americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas.....	16
6.7.1. Tiempo de coagulación de la hemolinfa.....	16
6.7.2. Conteo Total de Hemocitos.....	16
6.7.3. Actividad del sistema profenoloxidasa (proFo y FO).....	17
6.8. Toma de muestras y análisis para evaluar las variables metabólicas en hemolinfa de hembras de <i>M. americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas	17
6.8.1. Tasa de ingesta de alimento	17
6.8.2. Determinación del consumo de oxígeno	18
6.8.3. Glucosa.....	18
6.8.4. Lactato	19
6.8.5. Triglicéridos.....	20
6.8.6. Proteína total.....	20
6.8.7. Análisis estadístico.....	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Efecto de diferentes técnicas de ablación unilateral del pedúnculo ocular en machos y hembras de <i>M. americanum</i>	22
7.1.1. Variables asociadas al dolor	22
7.1.2 Variables asociadas a la incomodidad	24

7.1.3. Variables asociadas a hormonas	25
7.2. Efecto de la técnica de ablación CSCX en hembras	27
7.2.1 Supervivencia.....	27
7.2.3. Ciclo de muda	27
7.2.4. Tiempo de coagulación de la hemolinfa, conteo total de hemocitos y sistema profenoloxidasa (proFO y FO)	29
7.2.5. Tasa de ingesta de alimento y consumo de oxígeno	33
7.2.6. Glucosa, lactato, proteína total y triglicéridos en plasma	34
8. DISCUSIÓN.....	37
8.1. Efecto de diferentes técnicas de ablación del pedúnculo ocular sobre machos de <i>M. americanum</i>	37
8.2. Efecto de la ablación del pedúnculo ocular en hembras de <i>M. americanum</i>	38
8.2.1. Variables reproductivas y supervivencia	38
8.2.2. Variables inmunológicas	41
8.2.3. Variables metabólicas	43
9. CONCLUSIONES	47
10. BIBLIOGRAFÍA.....	48

GLOSARIO

Ablación ocular: Extirpación del pedúnculo ocular del organismo.

Anestésico: Fármaco utilizado para inhibir la sensibilidad táctil y/o dolor de un organismo, sea en todo o parte de su cuerpo.

Chasqueo: Cuando un animal contrae el abdomen provocando un impulso de escape en respuesta a un estímulo como la manipulación.

CHH (hormona hiperglicémica de crustáceos): Neurohormona liberada por el órgano X (OXSG) y participa en el metabolismo de carbohidratos.

Coagulación: Mecanismo esencial del sistema de defensa en crustáceos para evitar la pérdida de hemolinfa por una herida en organismos con sistema circulatorio abierto.

Dolor: Sensación aflictiva y por lo general desagradable en el cuerpo. Puede tratarse por lo tanto, de una experiencia sensorial y objetiva (el dolor físico) o emocional y subjetiva (el dolor anímico).

Eclosión: Ruptura de la envoltura del huevo con liberación de nauplios al medio ambiente.

Encorvamiento: Curvatura del abdomen hasta que los pleópodos tocan el lado frontal del cuerpo.

Estrés: El estrés es una respuesta inespecífica del organismo ante un estímulo inespecífico (cualquier demanda específica que se le solicite). El estrés es siempre una respuesta de carácter fisiológico ante un agente estresor externo o interno. Durante el

estrés se produce una segregación de hormonas que producirán cambios a distancia en diversas partes del organismo.

Glándula: Es un órgano cuya función es sintetizar sustancias químicas, como las hormonas, para liberarlas, a menudo en la corriente sanguínea y en el interior de una cavidad corporal o su superficie exterior.

GIH (hormona inhibidora de la gónada): Hormona que inhibe el desarrollo gonádico en crustáceos, es liberada por el órgano X (OXSG).

Glucosa: Carbohidrato monosacárido ($C_6H_{12}O_6$). Principal fuente de energía para el metabolismo celular.

Glucogénesis: Proceso de síntesis de glucógeno.

Hemocianina: Pigmento respiratorio de moluscos y crustáceos. Es una proteína que contiene cobre y su función es transportar oxígeno.

Hemocitos: Células sanguíneas presentes en la hemolinfa involucradas en funciones de coagulación, fagocitosis, encapsulamiento, nodulación, etc.

Hemolinfa: Fluido corporal de invertebrados equivalente a la sangre de vertebrados.

Hormona: Es una sustancia orgánica de naturaleza proteica o lipídica que se sintetiza en una glándula endócrina y ejerce algún efecto fisiológico sobre otras células a las cuales llega por vía sanguínea.

Hepatopáncreas: Glándula digestiva de crustáceos. Interviene en diversas funciones metabólicas tales como síntesis, absorción, secreción y metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.

Intermuda: Estadio del ciclo del muda donde todas las capas del exoesqueleto están presentes dándole una apariencia dura y gruesa. En esta etapa el animal genera células y tejidos y acumula reservas.

Metabolismo: Conjunto de reacciones catalizadas enzimáticamente que tienen lugar en la célula viva.

Metabolismo anaerobio: Tipo de metabolismo donde no se requiere oxígeno.

MIH (hormona inhibidora de la muda): Hormona encargada de inhibir el proceso de muda en crustáceos y es liberada por el órgano X (OXSG).

Muda: Nombre común de la exuvia o exoesqueleto desprendido del cuerpo de artrópodos.

Órgano X (Glándula sinusal): Complejo endócrino de crustáceos localizado en la base del pedúnculo ocular que produce hormonas reguladoras de procesos fisiológicos. En esta estructura se producen los neuropéptidos de la familia de CHH/MIH/GIH que intervienen en procesos relacionados con el crecimiento, reproducción y muda de los crustáceos.

Plasma: Fracción líquida y acelular de la sangre.

Proteína: Son polímeros que están constituidos por aminoácidos unidos por medio de enlaces peptídicos. Presentan función de defensa, estructural, enzimática, hormonal, contráctil, homeostática y de transporte.

Sistema endocrino: Es el conjunto de órganos y glándulas que segregan hormonas, que son liberadas al torrente sanguíneo y regulan funciones.

Sistema inmune: Sistema de defensa de un organismo que consiste en respuestas no específicas y específicas. Se compone de órganos, tejidos, células, fluidos y moléculas (proteínas, carbohidratos, etc.) que reconocen moléculas y microorganismos extraños y actúa para neutralizarlos o destruirlos.

Triglicéridos: Son un tipo de lípidos, que se forman por una molécula de glicerol. También conocidos como triacilglicéridos o triacilglíceroles, los triglicéridos forman parte de las grasas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación taxonómica de <i>Macrobrachium americanum</i> (Bate, 1868).....	3
Figura 2. Características morfológicas de machos (2a) y hembras (2b) de <i>M. americanum</i>	4
.Figura 3. Trampa "Nasa" para captura del langostino <i>M. americanum</i> (3a) y área de captura de organismos en el Río Sinaloa (3b).....	11
Figura 4. Invernadero donde se llevó a cabo el trabajo experimental (4a) y tinas de 1000 L donde se mantuvieron los langostinos <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionados y no ablacionados (4b).	12
Figura 5. Cámara de respirometría utilizada en el presente estudio.	18
Figura 6. Hembra de <i>Macrobrachium americanum</i> posterior a ser ablacionada por la técnica de corte, tapando la herida y con aplicación previa de xilocaína al 5 %.	26
Figura 7. Supervivencia en hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas.	27
Figura 8. Número de ciclos de muda por hembra de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas.....	28

Figura 9. Duración promedio del ciclo de muda en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. 28

Figura 10 . Tiempo promedio de coagulación de la hemolinfa en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar..... 29

Figura 11. Promedio del conteo total de hemocitos en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P<0.05$). 30

Figura 12. Actividad de la profenoloxidasas total (proFO total) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar..... 31

Figura 13. Actividad de la fenoloxidasas total (FO total) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.. 31

Figura 14. Actividad específica de profenoloxidasas (proFO) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar..... 32

Figura 15. Actividad específica de la fenoloxidasas (FO) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar y letra diferente representa diferencias significativas ($P<0.05$). 32

Figura 16. Promedio de tasa de ingesta de alimento en hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P<0.05$).	33
Figura 17. Consumo de oxígeno en hembras no ablacionadas y ablacionadas.....	34
Figura 18. Concentración promedio de glucosa en plasma de la hemolinfa de hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.....	35
Figura 19. Concentración promedio de lactato en plasma de la hemolinfa de hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.....	35
Figura 20. Concentración promedio de de proteína total en plasma de la hemolinfa de hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar	36
Figura 21. Concentración promedio de triglicéridos en plasma de la hemolinfa de hembras de <i>Macrobrachium americanum</i> ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P<0.05$).	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables asociadas al dolor. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo con aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras).22

Tabla 2. Variables asociadas a la incomodidad. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo con aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras).....24

Tabla 3. Variables asociadas a hormonas. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo y aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras). El tiempo pasado antes de alimentarse es en segundos con su desviación estándar; letras diferentes arriba del valor promedio muestran diferencias significativas.25

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la ablación del pedúnculo ocular en hembras reproductoras de *Macrobrachium americanum* sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas, con la finalidad de reducir los ciclos de muda y alargar los periodos de reproducción para obtener un mayor número de desoves por hembra. Se trabajó con dos grupos de organismos: (1) ablacionados (EA) y (2) no ablacionados (NA), utilizando para cada caso 20 y 17, respectivamente. Una vez que los organismos del primer grupo fueron ablacionados, se inicio el registro de las variables reproductivas en los dos grupos (tiempo de ciclo de muda, número de mudas y desoves por organismo). Para evaluar el comportamiento de las variables inmunológicas (tiempo de coagulación de la hemolinfa, número total de hemocitos, proFo y FO) y metabólicas (tasa de ingesta, consumo de oxígeno, glucosa, lactato, proteína total y triglicéridos) en ambos grupos de organismos, se tomó muestra de hemolinfa a los cuatro días de eclosionar los huevos. Los resultados obtenidos mostraron que en el grupo NA, los 20 organismos presentaron una muda, para posteriormente solo cinco mudaron por segunda ocasión. De igual forma, el grupo de 17 hembras EA presentaron una primer muda, de estas se presentó una segunda muda solo en 11 organismos, una tercer muda en 5 organismos y cuarta muda en un organismo. El tiempo promedio para un ciclo de muda en el grupo NA fue de 31.2 ± 3.4 días, mientras que en EA fue de 29.3 ± 5.4 días, sin presentarse diferencias significativas entre estos. En los dos grupos solo se presentó un desove por organismo. El tiempo de coagulación de la hemolinfa no presentó diferencias significativas entre los dos grupos (EA = 41 s y NA = 36 s). El número total de hemocitos presentó diferencias significativas entre los grupos, observándose una mayor concentración en el grupo EA. La proFo medida en unidades de actividad en 20 μ L de muestra de SLH, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos (NA = 3.74 ± 2.4 y EA = 4.6 ± 2.4), al igual que la FO. La tasa de ingesta de alimento fue diferente entre grupos, observándose mayor consumo en el grupo EA (EA = 0.05 ± 0.02 y NA = 0.04 ± 0.01 g alimento/g animal/día). La concentración de glucosa en el plasma de la hemolinfa del grupo EA (28.9 ± 21.20 mg/dL) fue menor a la que se registró en el

grupo NA (38.12 ± 17.3 mg/dL). En contraste a lo observado en la concentración de lactato, donde la menor concentración se presentó en el grupo NA (34.08 ± 14.5 mg/dL), que fue un comportamiento similar a lo registrado en la concentración de proteína total y triglicéridos, donde el grupo NA presentó menores valores (417 ± 182 y 64.5 ± 17.2 mg/dL, respectivamente). En los tres primeros casos, no se presentaron diferencias significativas, pero en la concentración de triglicéridos sí. Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales del presente estudio, permiten inferir que la ablación no es recomendable para acelerar el proceso de reproducción, ya que bajo ésta condición no se produjo una mayor cantidad de larvas, el ciclo de muda no logró reducirse y, aunque la maduración gonádica se estaba llevando a cabo, ésta no se sincronizó con la muda, ocasionando que las hembras entrarán en un desbalance que limitó su producción de huevecillos.

ABSTRACT

We evaluated the effect of eyestalk ablation in reproductive females of *Macrobrachium americanum* on reproductive, immunological and metabolic variables. The main goal was to analyze if removing the X Organ Sinus Gland reduce the time of moulting cycle and reproduction periods to obtain a greater number of spawnings per female. Two groups was arranged, the first group was a control and was not ablated (NA) n= 20 Females. The second group was unilaterally ablated (EA) n= 17 Females. Variables were recorded as time of moulting cycle, number of seedlings and the number of spawnings per organisms. For immunological variables (hemolymph clotting time, total number of hemocytes, and total phenoloxidase and profenoloxidasas), feeding rate, and metabolites (oxygen consumption, and concentration in haemolymph of glucose, lactate, total protein and triglycerides). Haemolymph samples were taken four days after hatching in each group. The 20 organisms in the NA group had 1 moulth, and then only 5 moulted a second time. While the 17 females EA had 1 first moult, 11 females presented a second moult, and a third molt occurred just in 1 organism. The average in time for moulting cycle in NA females was 31.2 ± 3.4 days, meanwhile for the group EA was 29.3 ± 5.4 days, no significant difference was detected $P=0.212$. Both groups showed only one spawn per female. Clotting time of hemolymph was not significantly different ($P=1.00$) between the EA group (41 seconds) and NA (36 seconds). Significant higher concentration of total number of hemocytes was observed in the EA group ($P=0.0022$). The NA group showed a mean activity of 4.19 of total proPO activity units ± 2.4 in 20 μ L of sample (SLH), the EA group showed 4.6 ± 2.4 units of activity. Similar results were presented in the activity of the total FO. In both cases there were no significant differences ($P=0.330$ and $P=0.521$, respectively). Significant differences in the rate of food intake ($P=0.007$) with a higher consumption in the EA group (0.05 ± 0.02 g food/g animal/day) than in NA (0.04 ± 0.01 g food/ g animal/day). Concentration of glucose in plasma of the EA group (28.9 ± 21.20 mg/dL) was lower, but not significant ($P=0.166$) when compared with the NA group (38.12 ± 17.3 mg / dL). In contrast, concentration of lactate, was lower in group NA (34.08 ± 14.5 mg/dL) and was

not significantly different ($P = 0.632$) from EA group. Protein concentration in NA females was 417 ± 182 mg/dL and it was not significant ($P=0.935$) from compared with EA group.

Concentration of triglycerides was significantly lower ($P=0.022$) in the group NA (64.5 ± 17.2 mg/dL). These results indicate that the ablation technique in order to generate greater number of larvae in less time is not recommended for this species as the molting cycle could not be reduced although by the presence of triglycerides in hemolymph, gonadal maturation was carried out, but these two processes were not synchronized, causing an unbalance in females limiting the production of eggs.

1. INTRODUCCIÓN

Los crustáceos son el grupo más abundante y diverso dentro de los invertebrados y juegan un papel importante dentro de los ecosistemas debido a su adaptación en diversos ambientes (Maxwell *et al.*, 2009). Dentro de éstos, destacan por su importancia los decápodos, entre los cuales se incluyen las jaibas, langostas, langostinos, camarones y por su adaptación al cultivo e importancia comercial resaltan los dos últimos (López-López, 2004).

El orden decápoda incluye a la familia *Palaemonidae* dentro de la cual se encuentra el género *Macrobrachium*, éste constituye uno de los géneros más diversos, abundantes y ampliamente distribuidos con aproximadamente 200 especies descritas (Jayachandran, 2001). Las especies de este género están distribuidas por todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Soluap, 1998). En México, estos organismos se encuentran tanto en la vertiente del Golfo de México como a lo largo del Pacífico. En el primer caso, las especies más abundantes reportadas son *M. acanthurus*, *M. olfersii* y *M. carcinus*. Mientras que en la costa del Pacífico se encuentran *M. digueti*, *M. acanthochirus*, *M. tenellum* y *M. americanum* (Álvarez, 1997). Se ha reportado que todas las especies de *Macrobrachium* pasan parte de su ciclo de vida en agua dulce y en algunos casos los juveniles se encuentran en aguas salobres o marinas (Holthuis, 1952).

El langostino del Pacífico (*M. americanum*, Fig. 1) o llamado localmente en Sinaloa “Cauque”, es una de las especies distribuidas en México que alcanzan mayor tamaño (New, 2002). Su distribución abarca desde el estado de Baja California hasta Chiapas y en Sinaloa es común encontrar esta especie en la mayoría de los ríos y arroyos, donde normalmente es capturada para su consumo y venta local (Arana, 1972). Por lo cual, ésta especie es una de las de mayor interés en Sinaloa, ya que se considera que tiene un alto potencial para la acuicultura de agua dulce debido a que

alcanza un tamaño de 40 cm y es un producto comestible de alta demanda en el mercado (García-Guerrero y Apun-Molina, 2008).

Los langostinos han sido capturados por el hombre desde hace muchos siglos, sin embargo, es difícil hablar de una pesquería, pues generalmente es una actividad complementaria y realizada en forma artesanal. Esta actividad es estacional, generalmente asociada a la época de lluvias y los organismos capturados son consumidos localmente o tienen una distribución limitada (Holschmint, 1990). Las características propias de esta especie lo hacen atractivo para su cultivo, sin embargo, hoy en día no se cuenta con registro de un intento serio por cultivarlo (Sainz, 2006). Llama la atención que aún no se tiene la tecnología implementada y el conocimiento del comportamiento de esta especie para lograr su cultivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular en hembras reproductoras de *M. americanum* sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas, con el propósito de potenciar el proceso de reproducción a través de acelerar el proceso de muda e incrementar el número de hembras ovadas en cortos periodos de tiempo y así tener la disponibilidad de larvas en todo el año para llevar a cabo su cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animal

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Familia: Palaemonidae

Género: *Macrobrachium*

Especie: *americanum*

Nombre común: Cauque
o acamaya



Figura 1. Ubicación taxonómica de *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868).

2.2. Morfología, reproducción y ciclo de vida

Dentro de las características morfológicas y reproductivas de *M. americanum*, se ha reportado que los machos son considerablemente más grandes que las hembras, con el segundo par de extremidades torácicas o quelas muy largas y gruesas, cabeza de gran tamaño, abdomen compacto y órganos genitales localizados en la base de la quinta extremidad torácica (Holtschmit, 1990). Las hembras son más pequeñas, el segundo par de extremidades o quelas más cortas y delgadas, con una cámara de incubación debajo del abdomen formado por la prolongación de la pleura abdominal y los pleópodos. Sus órganos genitales están localizados en la base de la tercera extremidad torácica (Rodríguez, 1993).

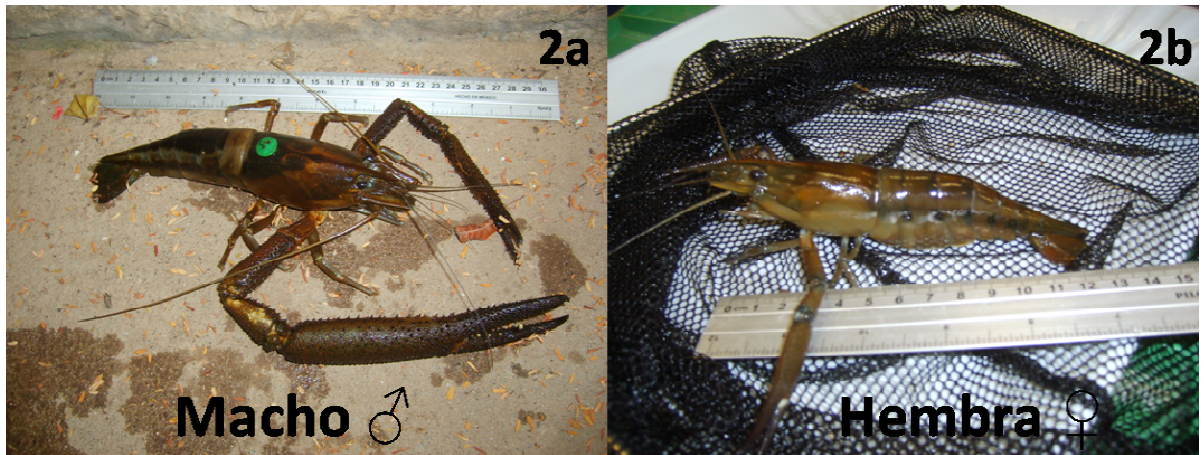


Figura 2. Características morfológicas de machos (2a) y hembras (2b) de *M. americanum*.

Las hembras tienen el télico cerrado, por lo que la copula inicia después del proceso de muda (Chang, 1992), tiempo donde el macho deposita espermatozoides en la base de las patas de la hembra. Inmediatamente después, ésta ovoposita y la fecundación de los óvulos se efectúa al contacto con el espermatozoides. Las hembras grandes producen generalmente más óvulos que las pequeñas. Los huevos se fijan en las cerdas de los pleópodos de la hembra y su incubación se efectúa en un período de alrededor de 19 días, en temperaturas de 26 a 28 °C. Las hembras fertilizadas migran hacia regiones de aguas salobres donde los huevos eclosionan, esto ocurre principalmente en la época de lluvias (Espinoza, 1987). Desde el momento de la eclosión, las larvas son nadadoras activas; sin embargo, inicialmente no son tan fuertes como para resistir el embate de la corriente y cualquier larva que es eclosionada en el río es arrastrada hacia aguas salobres. Transcurridos entre 35 y 55 días de la eclosión, las larvas atraviesan aproximadamente por 11 etapas antes de ser juveniles (Espinoza, 1987).

2.3. Sistema endocrino en crustáceos

Tanto en *M. americanum* como en el resto de los crustáceos, diversos procesos fisiológicos y metabólicos regulan su ciclo de vida y a su vez estos procesos dependen de un control hormonal. El sistema endocrino de éstos se encuentra compuesto por tejido neuroendocrino y glandular (Beltz, 1988; Keller y Sedlmeier, 1988). Como tejido glandular se tiene al complejo órgano X seno de la glándula (OXSG), que es el principal centro neuroendócrino de los crustáceos y que se ubica en la base de cada pedúnculo ocular. En éste se sintetizan y almacenan las hormonas que se secretan a la hemolinfa para regular diversos procesos metabólicos, dentro de los cuales se incluye los procesos de crecimiento, muda y equilibrio osmótico, entre otros (Lockwood, 1967).

En los crustáceos, la muda y reproducción son los eventos que incluyen mayor movilización de reservas energéticas. La movilización de reservas que se da en los procesos de muda y reproducción está regulada por secreciones hormonales (Adiyodi, 1984). El OXSG es el mayor centro de regulación neuroendocrina en los crustáceos, es estructural y funcionalmente análogo al sistema de los vertebrados denominado hipotálamo-neurohipofisarias (Cooke y Sullivan, 1982).

Las hormonas inhibitoras del OXSG inhiben la producción de hormonas en el órgano Y, donde se origina la hormona de la muda denominada ecdisona, que se secreta a la hemolinfa como un precursor, para ser convertida en la hormona activa 20-OH-ecdisona (Huberman, 1996). El órgano Y está localizado en la cámara branquial anterior en todos los crustáceos, puede aparecer como una masa compacta en cangrejos marinos o como una masa menos compacta en los cangrejos de río y langostas (Lanchaise *et al.*, 1993).

El langostino *M. americanum* es una especie de télico cerrado por lo cual el proceso de muda es indispensable para llevar a cabo la reproducción (Holschmint, 1990). Éste proceso ha sido manipulado en diversas especies con factores tales como

la temperatura, periodos de luz, alimentación y ablación del pedúnculo ocular, siendo ésta última la que mayormente puede acelerar el proceso de reproducción según algunos reportes (Shin-Ichi *et al.*, 1988).

En camarones peneidos se ha practicado la ablación del pedúnculo ocular desde 1970, con resultados exitosos, ya que se ha logrado acelerar el proceso de reproducción obteniendo mayor producción de larvas en cortos periodos de tiempo (Bray y Lawrence, 1992). En un estudio realizado con *Litopenaeus vannamei* donde se realizó ablaciones uni y bilaterales para determinar el comportamiento de las variables reproductivas, metabólicas e inmunológicas, se logró *acortar el ciclo de muda*. Además se *determinó que* la concentración de glucosa fue menor en hembras que en machos, lo cual indica que la concentración de glucosa varía con el desgaste de las hembras por el proceso de reproducción provocando que el lactato se incremente en las hembras debido a que se realiza la obtención de energía por la vía anaerobia (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). En este mismo estudio, el conteo total de los hemocitos no se vio afectado por la ablación o el sexo de los organismos, aunque hubo una tendencia a disminuir con respecto al grado de ablación al igual que lo reportado para *Farfantepenaeus paulensis* (Perazzolo *et al.*, 2002)

Por otro lado Ponnunchamy *et al.* (1980), estudiaron la ablación unilateral y bilateral en *M. lachneri*, *obteniendo* una alta mortalidad en los organismos ablacionados bilateralmente, pero no en los ablacionados unilateralmente. Los organismos sobrevivientes a la ablación bilateral mostraron mayor consumo de alimento (47.70 mg/organismo) con respecto a los ablacionados unilateralmente (19.19 mg/organismo). Lo cual se debió a que los organismos ablacionados bilateralmente presentaron mayor actividad. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en la frecuencia de mudas entre los organismos no ablacionados, ablacionados unilateral y bilateralmente. En contraste con lo reportado por Okumura y Aida (2001), quienes determinaron que en hembras y machos de *M. rosenbergii*, los intervalos de muda son más cortos en organismos ablacionados en comparación con los no ablacionados, observando de igual manera que en los organismos ablacionados los

niveles de ecdiesteroides aumentan rápidamente y el desarrollo ovárico en todas las hembras fue más corto en comparación a las que no se ablacionaron.

2.4. Ablación y sistema inmune de crustáceos

Los reportes sobre el efecto de la ablación en la respuesta del sistema de defensa de *M. americanum* son nulos. Aunque de acuerdo a lo reportado para otros crustáceos, la ablación genera una herida que podría propiciar la entrada de agentes patógenos al organismo (Söderhall y Cerenius, 1994). Lo cual puede provocar que se activen mecanismos de defensa (Bach, 1984). Dichos mecanismos pueden ser evaluados a través de evaluar parámetros inmunológicos y fisiológicos tales como la concentración de proteína en la hemolinfa, conteo total de hemocitos, actividad fenoloxidasa, producción de radicales libres y actividad fagocítica entre otras variables (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

El langostino *M. americanum* es una especie que se reproduce entre los meses de junio a septiembre en el estado de Sinaloa, las hembras son de télico cerrado por lo que el proceso de muda es necesario para su reproducción, éstos ciclos tienen un tiempo promedio de 30 días, debido a esto se limita la obtención de un mayor número de desoves por hembra en periodos cortos de tiempo. Por ello la necesidad de acortar éstos ciclos y alargar los periodos de reproducción para mantener la disponibilidad de postlarvas en todo el año. En otros crustáceos, la reproducción puede ser acelerada mediante la ablación del pedúnculo ocular, ya que en su base se encuentra ubicado el OXSG que regula el proceso de la muda, reproducción, entre otros procesos. Por tal motivo se aplicó esta técnica en las hembras de *M. americanum*, con el fin de acortar el tiempo para completar un ciclo de muda y lograr más eventos de reproducción que pueden llevar a obtener un mayor número de desoves por hembra, pudiendo potenciar con ello la masificación de producción de postlarvas, que conlleve a establecer cultivos con este crustáceo.

4. HIPÓTESIS

- Las hembras de *M. americanum* resisten la ablación unilateral del pedúnculo ocular y esta técnica acelera el proceso de muda, reproducción y afecta el comportamiento normal de las variables inmunológicas y metabólicas.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Determinar el efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas en hembras de *M. americanum*.

5.2. Específicos

- Evaluar técnicas de ablación unilateral del pedúnculo ocular en machos de *M. americanum* para utilizar la más adecuada en hembras de la misma especie.
- Determinar el efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre el periodo del ciclo de muda, número de eventos reproductivos y supervivencia en hembras de *M. americanum*.
- Evaluar el efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre variables inmunológicas (tiempo de coagulación de la hemolinfa, conteo total de hemocitos y sistema profenoloxidasa [proFo y FO]) y metabólicas (tasa de ingesta de alimento, consumo de oxígeno, glucosa, lactato, triglicéridos y proteína total) en hembras de *M. americanum*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de colecta y captura de organismos

En los meses de abril-agosto del 2010 se realizó una colecta de langostinos *M. americanum* en el Río Sinaloa, dentro del área correspondiente al municipio de Sinaloa de Leyva, México (107°27'56" y 108°40'22" Longitud Oeste, 25°39'54" y 26°25'49" Latitud Norte). Los organismos se colectaron mediante el uso de trampas llamadas "Nasas", las cuales se colocaron de noche y se revisaron por la mañana. Dentro de las trampas se colocó tilapia como carnada que sirvió para atraer a los organismos. Los organismos capturados se recogían por la mañana y se trasladaban a un laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa en hieleras de 90 a 120 L de capacidad, con aireación constante suplida por un compresor portátil de 12 volts.



Figura 3. Trampa "Nasa" para captura del langostino *M. americanum* (3a) y área de captura de organismos en el Río Sinaloa (3b).

6.2. Manejo y mantenimiento de organismos

Una vez obtenidos los organismos se procedió a darles un baño profiláctico con formolaldehído al 4 % y posteriormente se separaron por sexo, para colocar 10 hembras y 2 machos en tinas de 1000 L (Fig. 3). La toma de parámetros como temperatura y oxígeno disuelto se realizó a las 16:00 h con un oxímetro marca YSI. La alimentación se realizó diariamente a las 16:30 h con trozos de filete de pescado (tilapia) con un 10 % de la biomasa total de los organismos. Semanalmente se realizó recambio de agua en las tinas de un 90 %.



Figura 4. Invernadero donde se llevó a cabo el trabajo experimental (4a) y tinas de 1000 L donde se mantuvieron los langostinos *Macrobrachium americanum* ablacionados y no ablacionados (4b).

6.3. Evaluación de técnicas de ablación unilateral del pedúnculo ocular en machos de *M. americanum*

Para determinar el estrés que se genera por efecto de la ablación del pedúnculo ocular y utilizar la mejor técnica en la ablación de hembras, tomando en cuenta la mayor escases de éstas, se diseñó un bioensayo con tres tratamientos: (a) ligado en la base del pedúnculo [LF], (b) ablación por un corte en el lóbulo ocular y extracción del contenido [CS] y (c) ablación con corte en la lóbulo ocular, extracción del contenido del pedúnculo y cubrimiento de la herida para facilitar la coagulación [CSC]) y un grupo

control sin ablación, cuyo manejo y mantenimiento fue similar al de los organismos ablacionados. Adicionalmente los tratamientos donde los organismos fueron ablacionados fueron divididos en dos subgrupos cada uno para analizar el efecto del anestésico xilocaína en gel 5 % (AstraZeneca) con respecto a organismos no anestesiados. La aplicación de la xilocaína consistió en colocar alrededor del pedúnculo una capa del anestésico con un cotonete. Transcurridos 2 min después de la aplicación se procedió a realizar la ablación. Tomando en cuenta que la coagulación en organismos “normales” es de 35 segundos, un periodo similar de tiempo se usó para mantener a los animales ablacionados dentro del agua previo cubrimiento de la herida. Cada subgrupo y grupo control constó de 10 organismos de un peso promedio de 100 g (total de organismos experimentales = 70). En todos los tratamientos, los organismos se alimentaron con pescado fresco diariamente (ración = 10% de la biomasa), pero previo a evaluar las variables relacionadas con la alimentación se les mantuvo en ayuno por 24 h.

En cada uno de los tratamientos se analizaron las siguientes variables: tiempo transcurrido antes de la alimentación, porcentaje de alimentación después de 2 horas, roce de la zona traumatizada, chasqueo, desorientación, refugio, agresividad, caminar hacia atrás y encorvamiento del abdomen. La evaluación de cada variable se realizó tomando en cuenta lo descrito a continuación y las diferencias significativas entre estas se determinaron con una prueba de hipótesis de diferencia entre las proporciones de diferentes poblaciones (Daniels, 2004).

- Tiempo transcurrido antes de la alimentación: Tiempo entre la liberación del organismo después del tratamiento e inicio del consumo de alimento.
- Roce del área traumatizada: Número de organismos que frotaron el pedúnculo durante las dos horas posteriores al tratamiento.
- Chasqueó: Número de organismos que sacudió el abdomen durante el tratamiento y los 20 min posteriores a su liberación.
- Desorientación: Número de organismos que caminaron sin dirección, chocando con algún objeto u otros organismos.

- Refugio: Número de organismos que buscó refugio durante los 10 min posteriores a haber sido liberados del tratamiento.
- Agresividad: Número de organismos que mostraron un comportamiento agresivo. En este caso también se determinó el nivel de agresividad (nivel 0: cuando los organismos se encontraron con otro y continuaron su camino; nivel 1: cuando los organismos se encontraron con otro, lo empujaron con sus quelas y continuaron su camino; nivel 2: cuando los organismos se encontraron con otro, lo atacaron con sus quelas y continuaron su camino y, nivel 3: cuando los organismos se encontraron con otro y entraron en una lucha continua hasta que uno de ellos desistió.
- Caminar hacia atrás: Número de organismos que caminaron hacia atrás durante las dos horas subsecuentes a la liberación del tratamiento.
- Encorvamiento: Número de organismos que mostraron una curvatura del abdomen hasta que los pereiópodos tocaron el lado frontal del cuerpo.
- Porcentaje de alimentación después de dos horas del tratamiento: Porcentaje del consumo total de alimento, posterior a las dos horas de haber sido liberados del tratamiento. En esta última variable se realizó un Tukey con $\alpha=0.05$.

6.4. Ablación unilateral del pedúnculo ocular de hembras de *M. americanum*

Una vez probadas las técnicas de ablación en machos y determinado la técnica menos traumatizante para los organismos, se decidió ablacionar a las hembras en el periodo de intermuda (Chang, 1988) con la técnica CSC con xilocaína (CSCX) y se depositaron en tinas de 1000 L previo marcaje individual. Se formaron dos grupos: 1er grupo no ablacionadas (NA) con un total de 20 organismos y un 2do grupo ablacionadas (EA) con un total de 17 de organismos. Tanto al grupo NA y EA, se les evaluó las variables de comportamiento descritas anteriormente para machos ablacionados. De igual manera, se les evaluó las variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas que se describen más adelante.

6.5. Muda, supervivencia y eventos reproductivos en hembras de *M. americanum* ablacionadas y no ablacionadas

6.5.1 Muda y supervivencia

Una vez que se realizó la ablación se inició el registro del número de mudas por organismo en los dos grupos. El procedimiento fue hacer una revisión diaria (mañana y tarde) en las tinas donde se había confinado a cada grupo de organismos, para determinar la cantidad de organismos mudados (NA y EA). Para identificar cada uno de los organismos, estos fueron marcados de manera individual con un botón de identificación del cauque (BIC) numerado, el cual se colocó en la parte dorsal del cefalotórax. Debido a que durante la muda, el BIC se expulsaba junto con el exoesqueleto, éste se le colocaba nuevamente al organismo mudado y la muda se retiraba de la tina. También, los organismos muertos se retiraban de la tina para determinar la tasa de supervivencia al concluir la experimentación.

6.5.2. Eventos reproductivos

Después de que cada hembra se desprendió del exoesqueleto por el proceso de muda, ésta estuvo lista para aparearse con el macho, por lo que las hembras recién mudadas se retiraron de las tinas de 1000 L y se colocaron, en conjunto con un macho, dentro de acuarios de 40 L de capacidad, a una temperatura de 28 °C. Una vez llevado a cabo el apareamiento, el macho fue retirado del acuario. Las hembras ovadas se mantuvieron en los acuarios hasta la eclosión de los huevos.

6.6. Toma de muestras y análisis para evaluar las variables inmunológicas en hemolinfa de hembras de *M. americanum* ablacionadas y no ablacionadas

6.6.1. Tiempo de coagulación de la hemolinfa

Se extrajo una muestra de hemolinfa de la zona pericárdica de cada uno de los langostinos con una jeringa de insulina. La muestra se colocó en un portaobjetos y con la aguja de la jeringa se movió hasta observar la coagulación. Con un cronómetro se registró el tiempo transcurrido en segundos desde el sangrado hasta la coagulación.

6.6.2. Conteo Total de Hemocitos

Tanto para realizar los análisis del conteo total de hemocitos como para determinar la actividad del sistema profenoloxidasa, se tomaron muestras de hemolinfa de ambos grupos, posterior a los cuatro días de la eclosión de los huevos. Se utilizó una jeringa de 3 mL con 1000 µL de anticoagulante (Cloruro de Na 0.1M; Citrato de Na 0.114M; pH 7.5) y se extrajeron 500 µL de hemolinfa para mantener una relación 2:1.

De la muestra extraída para los análisis inmunológicos y metabólicos (1000 µL de anticoagulante + 500 de muestra de hemolinfa = 1500 µL de muestra), se tomó una alícuota de 50 µL y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, previamente etiquetados. El conteo de hemocitos se realizó bajo un microscopio compuesto (Carl Zeiss) utilizando una cámara de Neubauer, con una retícula de 0.01 mm. Solo se contabilizaron los hemocitos presentes en el cuadrante superior izquierdo e inferior derecho. El número de hemocitos por mililitro se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mL} = [(\text{Células contadas} / \# \text{ de cuadros contados}) \times 10000] [\text{Factor de dilución}]$$

6.6.3. Actividad del sistema profenoloxidasa (proFO y FO)

La medición de la actividad del sistema profenoloxidasa (proFO y FO) se realizó con la técnica descrita por Hernández- López *et al.* (1996). La actividad de la FO presente en el plasma se midió espectrofotométricamente por la formación de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). A 50 μ L de muestra, se le adicionaron 50 μ L de cacodilato buffer 10 M a pH 7 y 50 μ L de L-Dopa (3 mg/mL en agua destilada). Se incubó durante 10 mins a 25 °C. Posteriormente, se adicionaron 200 μ L de cacodilato buffer y se tomó la lectura en un lector de microplacas a una absorbancia de 492 nm. Se utilizó cacodilato procesado igual que la muestra, como control negativo. La proFO se determinó activándola previamente con tripsina (0.1 mg/mL en agua destilada) para convertirla en FO. La actividad de la FO activada se midió como se describió previamente. La actividad total fue expresada como el cambio en la absorbancia a 492 nm x min x mL de hemolinfa obtenida y la actividad específica fue expresada como el cambio en la absorbancia a 492 nm x min x mg de proteína presente en la muestra (la concentración de ésta proteína correspondió a la del sobrenadante lisado de hemocitos, cuyo análisis fue similar al utilizado para determinar la concentración de proteína total en plasma).

6.7. Toma de muestras y análisis para evaluar las variables metabólicas en hemolinfa de hembras de *M. americanum* ablacionadas y no ablacionadas

6.8.1. Tasa de ingesta de alimento

Los organismos se alimentaron por las tardes, diariamente, con una ración de pescado previamente macerado a una tasa del 10 % de la biomasa (biomasa = n° de organismos x peso promedio). De cada una de las tinas donde se mantenían los organismos (ablacionados y no ablacionados), diariamente (por las mañanas) se recogió el alimento no consumido, se pesó y se restó a la cantidad de alimento suministrado el día anterior, determinando la tasa de ingesta en g alimento/g orgs/día.

6.7.2. Determinación del consumo de oxígeno

La medición del consumo de oxígeno se realizó en 12 organismos (6 hembras no ablacionadas y 6 ablacionadas). El procedimiento consistió en colocar individualmente a cada organismo dentro de una cámara de respirometría, donde se midió el consumo de oxígeno cada 30 segundos (Fig. 4). La cámara de respirometría consistió de un tubo de acrílico transparente conectado a mangueras plástico, que permiten la circulación de agua, que es impulsada por una bomba eléctrica de 5 L/min (115 V-60 Hz). El mecanismo de funcionamiento de la cámara, permitió hacer circular el agua tanto dentro de la cámara como hacia fuera de ésta. La cámara tenía un orificio para introducir el sensor del medidor de oxígeno, lo que permitió medir el consumo del oxígeno. Cada medición concluyó retirando el organismo de la cámara cuando se alcanzó un nivel crítico de oxígeno disuelto (2 mg/L) dentro de ésta.



Figura 5. Cámara de respirometría utilizada en el presente estudio.

6.7.3. Glucosa

Para analizar tanto la concentración de glucosa como de lactato, triglicéridos y proteína total, en los dos grupos, se realizó una toma de muestra de hemolinfa a los 4 días posteriores de la eclosión de los huevos, evaluando cada una de estas variables como se describe a continuación:

La muestra de hemolinfa fue centrifugada a 800 g para la separación del paquete celular del plasma de este último se realizaron las mediciones para la concentración de glucosa, lactato, triglicéridos y proteína total. Para cada análisis se realizó una curva estándar para tener como referencia una concentración y absorbancia conocida y estas ser comparadas con las lecturas de cada análisis correspondiente.

Para determinar la concentración de glucosa se utilizó el kit comercial GOP-PAP (RANDOX Crumlin, Reino Unido) donde su principio es oxidar la glucosa presente en el plasma con la glucosa-oxidasas, liberando H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona con el 4-aminoantipirina y fenol en presencia de una peroxidasa para formar una quinoneimia coloreada que se detecta en la longitud de onda de 490 nm. Por lo que para evaluar la glucosa el procedimiento fue tomar 20 μ L del plasma y se le adicionó 200 μ L de la solución reactivo. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se tomó la lectura en un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

6.7.4. Lactato

Se utilizó un kit comercial PAP (RANDOX Crumlin, Reino Unido), cuyo principio es convertir el ácido láctico presente en el plasma de la hemolinfa en piruvato y H_2O_2 por la acción de la lactosa-oxidasas. En presencia de una peroxidasa hay una condensación de un precursor cromógeno y se produce color. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del ácido láctico en la muestra y se puede medir directamente en la longitud de onda de 535 nm. Para evaluar la concentración de lactato se tomaron 20 μ L de plasma y se le adicionaron 200 μ L de la solución reactivo, se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se tomó la lectura en el lector de microplacas a una longitud de onda de 535 nm.

6.7.5. Triglicéridos

Para medir la concentración de triglicéridos se utilizó el kit comercial cuyo principio es lisar los triglicéridos por medio de lipasas hasta glicerol y ácidos grasos. El glicerol + ATP y glicerocinasa forma L- α -glicerol-3-fosfato+ADP L- α -glicerol-3-fosfato+O₂ y glicerol-3-fosfato oxidasa, forma dihidroxiacetonafofosfato + H₂O₂ + 2-clorofenol + 4-aminoantipirina, forma 4-(o-benzoquinonamonoimina) fanezona + 2H₂O₂ + HCL. La intensidad del color desarrollado se puede medir espectrofotométricamente en una longitud de onda de 492 nm. El procedimiento para la evaluación fue tomar 20 μ L de la plasma y se colocarlos en una microplaca, se le adicionaron 200 μ L de la solución reactivo y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se tomó la lectura en el lector de microplacas en una longitud de onda de 490 nm.

6.7.6. Proteína total

Para evaluar la concentración de proteína total en hemolinfa, se determinó la concentración de proteína en plasma utilizando la técnica de Bradford (1976). La cual se basa en la unión del colorante comassie azul brillante G-250 a las proteínas, cuyo color puede ser medido espectrofotométricamente a 595 nm. Para evaluar su concentración se tomó 20 μ L de plasma y se colocó en la microplaca. Posteriormente, se le adicionó 200 μ L de la solución de Bradford, se incubó por 10 min y se tomó la lectura en el lector de microplacas a 595 nm. Se realizó una dilución 1:100 en las muestras para proteína en plasma.

Para las lecturas de glucosa, lactato, proteína total y triglicéridos se utilizó un lector de microplacas marca Multimodal Beckman Coolter (DTX 880). El análisis de cada muestra se llevo a cabo por triplicado.

6.7.7. Análisis estadístico

Para las variables del experimento de técnicas de ablación en machos se aplicó una Prueba de hipótesis entre las proporciones de dos poblaciones, a excepción de las variables de alimentación se aplicó una prueba de Tukey. Para las variables reproductivas, inmunológicas y metabólicas en hembras se utilizó una prueba No paramétrica Kruskal-Wallis. En los dos análisis se utilizó una significancia de $\alpha = 0.05$. Los análisis se hicieron con el programa STATISTICA versión 7.0.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de diferentes técnicas de ablación unilateral del pedúnculo ocular en machos y hembras de *M. americanum*

Estos bioensayos fueron hechos primero en machos y después en hembras reproductores de *M. americanum* tomando en cuenta los resultados obtenidos en los machos. En éstos se determinó el estrés causado por la ablación unilateral. Aquí, tres aspectos fueron evidentes en el comportamiento de los machos ablacionados con cada una de las técnicas usadas, encontrando variables asociadas al dolor, a la incomodidad y a la influencia hormonal. Se observó que las tres técnicas presentaron diferente grado de trauma en el organismo, siendo la técnica del ligamiento del pedúnculo la más dañina a pesar de la aplicación del anestésico (Xilocaína al 5 %).

7.1.1. Variables asociadas al dolor

Tabla 1. Variables asociadas al dolor. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo con aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras).

Variables asociadas al dolor	LFX (♂)	LF (♂)	CSX (♂)	CS (♂)	CSCX (♂)	CSC (♂)	Control (♂)	CSCX (♀)	Control (♀)
Chasqueo	100	100	30	80	30	70	0	20	0
Tocar el área traumatizada	100	100	60	80	30	10	0	20	0
No refugios	90	100	50	70	40	70	20	30	0

Diferencias significativas en la variable de chasqueo fueron detectadas en una cantidad de subgrupos (Tabla 1). El alto porcentaje ocurrió en los subgrupos LFX y LF

100%, los subgrupos CS y CSC tuvieron un 80% y 70% respectivamente, pero solo el subgrupo CSC mostró significancia ($P=0.03$) comparado con el subgrupo LF. Los subgrupos CSX y CSCX con xilocaína mostraron una menor significancia en tocar el pedúnculo ($P=0.01$ y $P=0.03$) comparado con los subgrupos CSX y CS. Los machos y hembras control no mostraron esta variable como se esperaba, y tuvieron una significancia menor ($P=0.037$) que los subgrupos CSX y CSCX. Las hembras del subgrupo CSCX no fue más significativo que las hembras controles ($P=0.06$).

Un cien por ciento de los organismos de los subgrupos LFX y LF tocaron el área traumatizada (Tabla 1), el subgrupo CSX decreció significativamente este comportamiento ($P=0.012$) a 60%, pero no fue significativo cuando se comparó con el subgrupo CS ($P=0.16$). Esta variable fue decreciendo significativamente en los subgrupos CSCX, CSC y en los machos y hembras control así como en las hembras tratadas CSCX ($P\leq 0.0005$). No se detectaron diferencias significativas ($P=0.999$) entre las hembras y machos controles y entre las hembras control tratadas CSCX ($P=0.068$).

Los organismos ligados tuvieron un 90% de no refugiarse para el subgrupos LFX y un 100% para el subgrupo LF (Tabla 1) sin diferencias significativas entre ellos ($P=0.15$). Los subgrupos CS y CSC mostraron un 70% en el comportamiento de no refugiarse el cual fue significativo menor ($P=0.03$) que el subgrupo LF. Incluso el 30% de diferencia entre los subgrupos CSCX y CSC no fue significativa ($P=0.09$). En los otros grupos LFX-LF y CSX-CS xilocaína no causó una significancia en el comportamiento de refugiarse ($P=0.15$ y $P=0.18$). La diferencia entre los machos y hembras controles no fue significativa ($P=0.068$). Las hembras tratadas mostraron un comportamiento significativo mayor de permanecer fuera de los refugios ($P=0.03$) que las hembras controles.

7.1.2 Variables asociadas a la incomodidad

Tabla 2. Variables asociadas a la incomodidad. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo y aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras).

Variable asociadas a la incomodidad	LFX (♂)	LF (♂)	CSX (♂)	CS (♂)	CSCX (♂)	CSC (♂)	Control (♂)	CSCX (♀)	Control (♀)
Desorientación	80	50	0	70	0	0	0	0	0
Caminar hacia atrás	80	80	0	10	0	10	0	0	0
Encorvamiento	0	0	30	50	0	10	0	0	0

La desorientación se presentó con mayor frecuencia encontrando diferencias significativas ($P=0.14$) en los subgrupos LFX, LF y CS con un 80, 50 y 70 %, respectivamente y en el resto de los subgrupos no se observó éste comportamiento (Tabla 2). Mientras que el encorvamiento solo se presentó en los subgrupos CS y CSX. En los subgrupos LFX y LF se observó que el 80 % de los organismos al caer a la tina caminaban hacia atrás y solo el 10 % de los organismos de los subgrupos CS y CSC presentaron este comportamiento. Los subgrupos LFX, LF y CS no mostraron diferencias significativas en el grado de desorientación ($P\geq 0.14$) con 80%, 50%, y 70% de desorientación, sin embargo los otros subgrupos no mostraron desorientación y fueron significativamente menores que los subgrupos mencionados anteriormente ($P\leq 0.004$).

Los subgrupos LFX y LF tuvieron el 80% de retroceso (Tabla 2). Los subgrupos mostraron un 10%, con diferencias significativas ($P=0.0001$). Todos los otros subgrupos

no mostraron esta variable CSX, CSCX, hembras CSCX y los controles, y la diferencia con CSX y CSCX no fue significativa ($P=0.15$), pero comparado con LFX y LF la diferencia si es significativa ($P=0.012$).

El encorvamiento fue causado mayormente en los subgrupos CSX y CS con 30% y 50% respectivamente pero no hubo diferencias significativas entre ellos ($P=0.18$). Estos subgrupos fueron significativamente altos ($P\leq 0.03$) que los otros subgrupos en los cuales el encorvamiento no se presentó (Tabla 2).

7.1.3. Variables asociadas a hormonas

Tabla 3. Variables asociadas a hormonas. Organismos ligados en la base del pedúnculo y con xilocaína (LFX), organismos ligados en la base del pedúnculo sin xilocaína (LF), corte y extracción del contenido del pedúnculo (CS), corte y extracción del pedúnculo y aplicación de xilocaína (CSX), corte, extracción del pedúnculo y presionando herida (CSC), corte, extracción del pedúnculo, presionando la herida y aplicación de xilocaína (CSCX), hembras corte, extrayendo el pedúnculo, presionando la herida y una aplicación de xilocaína (CSCX hembras). El tiempo pasado antes de alimentarse es en segundos con su desviación estándar; letras diferentes arriba del valor promedio muestran diferencias significativas.

Variable	LFX (♂)	LF (♂)	CSX (♂)	CS (♂)	CSCX (♂)	CSC (♂)	Control (♂)	CSCX (♀)	Control (♀)
Agresividad	1	2	2	0	1	0	3	0	0
% alimentación después de 2 h	30	50	70	90	100	85	46	80	37.50
Tiempo para alimentarse (S)	0	60 ± 11	120 ± 17	30 ± 10	0	0	200 ± 55	60 ± 9	2,400 ± 255

Los controles de machos y hembras tardaron significativamente más tiempo para alimentarse que todos los subgrupos tratados (Tabla 3) ($P\leq 0.005$) y entre los controles, el grupo de las hembras tardó significativamente ($P=0.0001$) más tiempo que los machos para alimentarse. Un tiempo significativamente menor ($P=0.004$) que el subgrupo CSX fue medido en los subgrupos LF y CSCX, y estos dos subgrupos fueron

significativamente altos en el tiempo para alimentarse que el subgrupo CS ($P=0.003$). El subgrupo con la menor diferencia significancia ($P=0.0006$) es del subgrupo CS, seguido de los subgrupos CSCX y LFX.

Los dos grupos controles machos y hembras tuvieron un bajo porcentaje de ingesta (Tabla 3). La ingesta de los subgrupos LFX y LF fue similar y no hubo diferencias significativas entre ellos ($P\geq 0.133$). El subgrupo CSX tuvo un 70% de ingesta y el subgrupos CS 90% no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($P=0.13$), pero entre los subgrupos CS y controles el porcentaje de ingesta fue significativo ($P= 0.02$). Los subgrupos CSCX y CSC tuvieron 100% y 85% los cuales fueron significativamente altos que los controles ($P\leq 0.02$).

Los valores de agresividad fueron significativos de un nivel al siguiente. Los diferentes niveles de agresividad se muestran en la tabla (Tabla 3).

La supervivencia en todos los subgrupos fue del 100% al término del experimento



Figura 6. Hembra de *Macrobrachium americanum* posterior a ser ablacionada por la técnica de corte, tapando la herida y con aplicación previa de xilocaína al 5 %.

7.2. Efecto de la técnica de ablación CSCX en hembras

7.2.1 Supervivencia

Como se observa en la figura 7, desde la recepción y mantenimiento de los grupos, que correspondió a cinco meses (junio a octubre), se presentó una baja supervivencia en ambos grupos, con 18 % en el grupo NA y 0 % en el grupo EA. En el mes de julio se presentó la mayor mortalidad para los dos grupos.

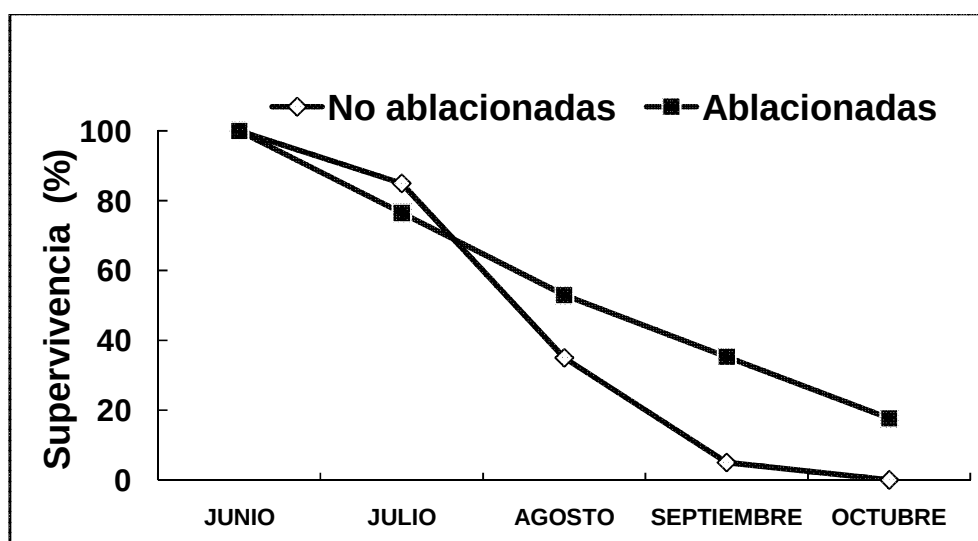


Figura 7. Supervivencia en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas.

7.2.2. Ciclo de muda

En el grupo NA 20 organismos de 20 presentaron una muda, posteriormente solo cinco mudaron por segunda ocasión (Fig.8). Mientras que de las 17 hembras del grupo EA todas presentaron un primer ciclo de muda, de estas se presentó un segundo ciclo de muda en 11 organismos, un tercer ciclo en 5 organismos y cuarta muda en un organismo. El tiempo promedio para un ciclo de muda del grupo NA fue de 31.2 ± 3.4

días, mientras que en el grupo EA fue de 29.3 ± 5.4 días, sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.212$; Fig. 9).

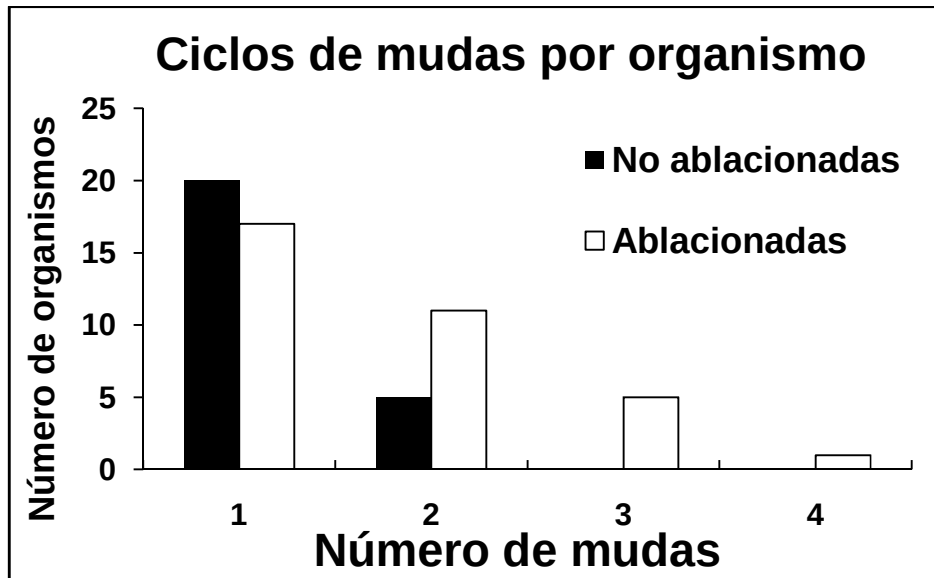


Figura 8. Número de ciclos de muda por hembra de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas.

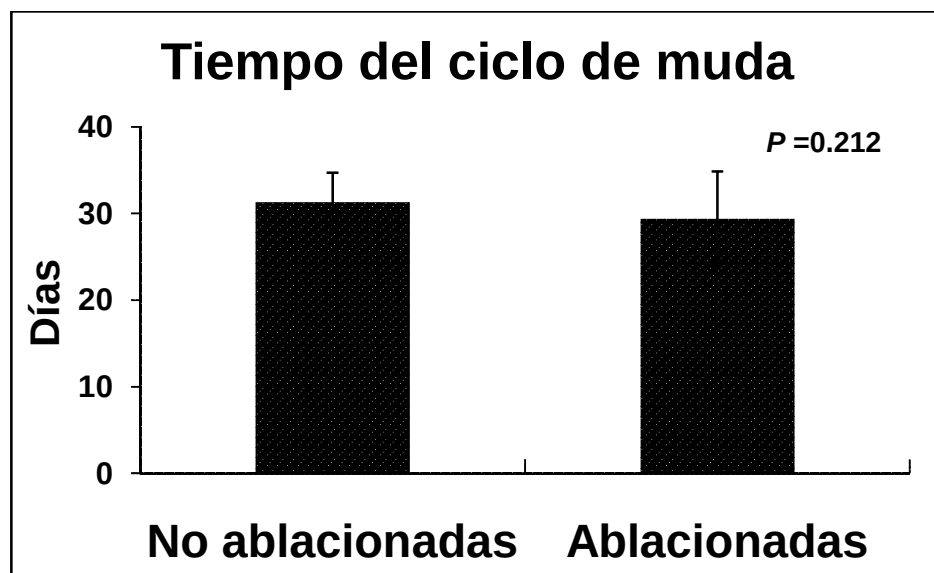


Figura 9. Duración promedio del ciclo de muda en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

7.2.3. Tiempo de coagulación de la hemolinfa, conteo total de hemocitos y sistema profenoloxidasa (proFO y FO)

No se presentaron diferencias significativas en el tiempo de coagulación de la hemolinfa entre los grupos EA (41 segundos) y NA (36 segundos; $P=1.00$; Fig. 10). En contraste a lo registrado en el conteo total de hemocitos, donde si se presentaron diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.0022$), registrando una mayor concentración de hemocitos en el grupo EA (Fig. 11).

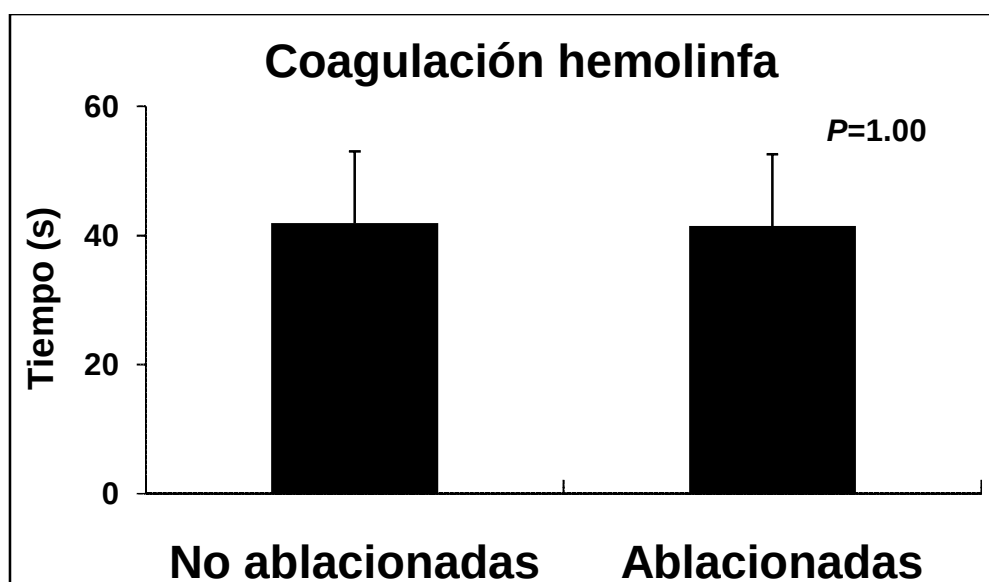


Figura 10 . Tiempo promedio de coagulación de la hemolinfa en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

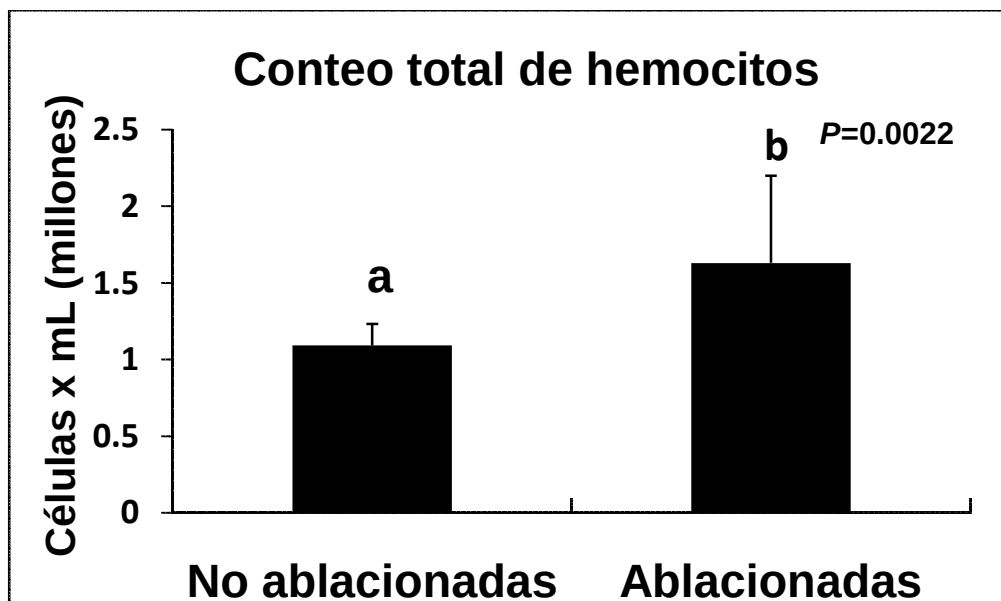


Figura 11. Promedio del conteo total de hemocitos en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P<0.05$).

Las hembras no ablacionadas presentaron una actividad promedio de la proFO total de 3.74 ± 2.4 unidades de actividad en 20 μL de muestra de sobrenadante lisado de hemocitos (SLH), actividad que fue menor a la que presentaron las hembras ablacionadas (4.6 ± 2.4 unidades de actividad; Fig.12). Se presentaron resultados similares en la actividad de la FO total, ya que la mayor actividad se registró en las hembras ablacionadas (7.3 ± 1.2 unidades de actividad en 20 μL de muestra de plasma). En ambos casos no se registraron diferencias significativas ($P=0.330$ y $P=0.521$, respectivamente; Figs.12 y 13), al igual que en la actividad específica de la ProFO ($P=0.262$), donde las hembras ablacionadas presentaron una mayor actividad (0.28 ± 0.1 unidades de actividad en 20 μL de SLH; Fig. 14). Mientras que en la actividad específica de la FO si se mostraron diferencias significativas ($P=0.031$), con una mayor actividad en las hembras no ablacionadas (6.2 ± 1.8 unidades de actividad en 20 μL de plasma; Fig.15).

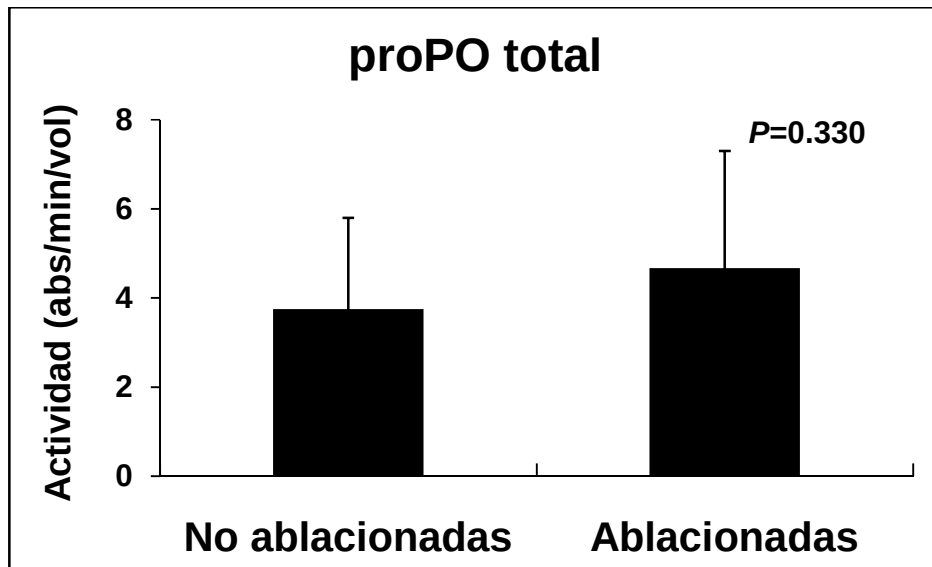


Figura 12. Actividad de la profenoloxidasa total (proFO total) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

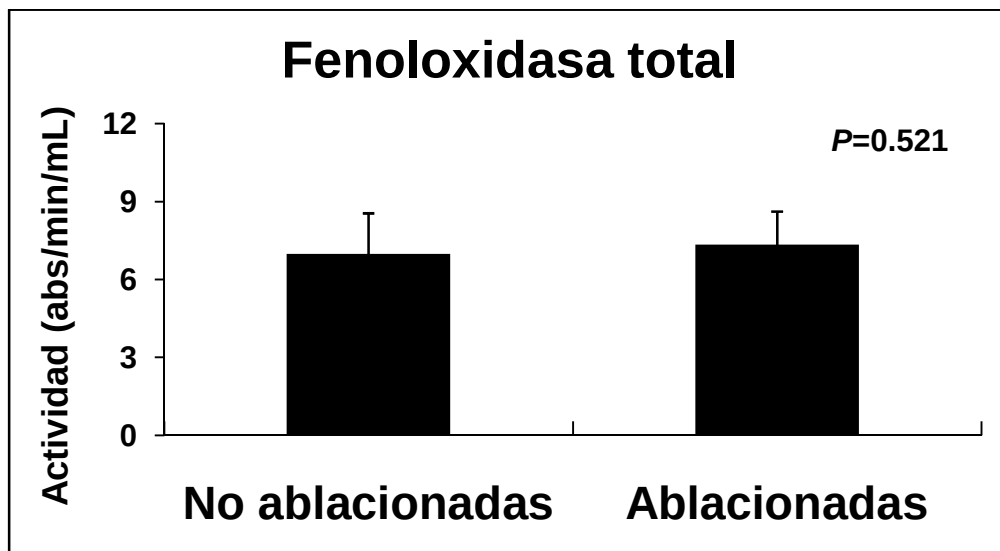


Figura 13. Actividad de la fenoloxidasa total (FO total) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

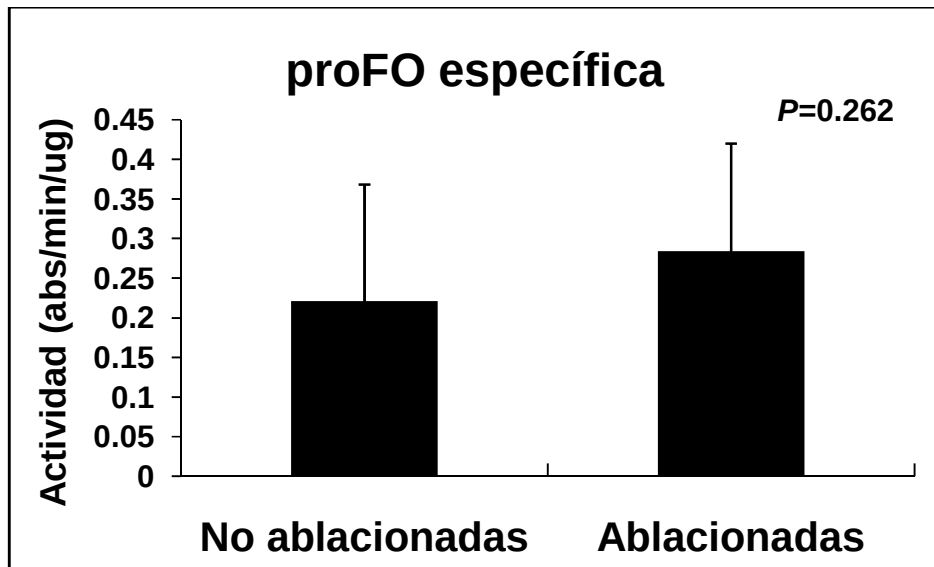


Figura 14. Actividad específica de profenoloxidas (proFO) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

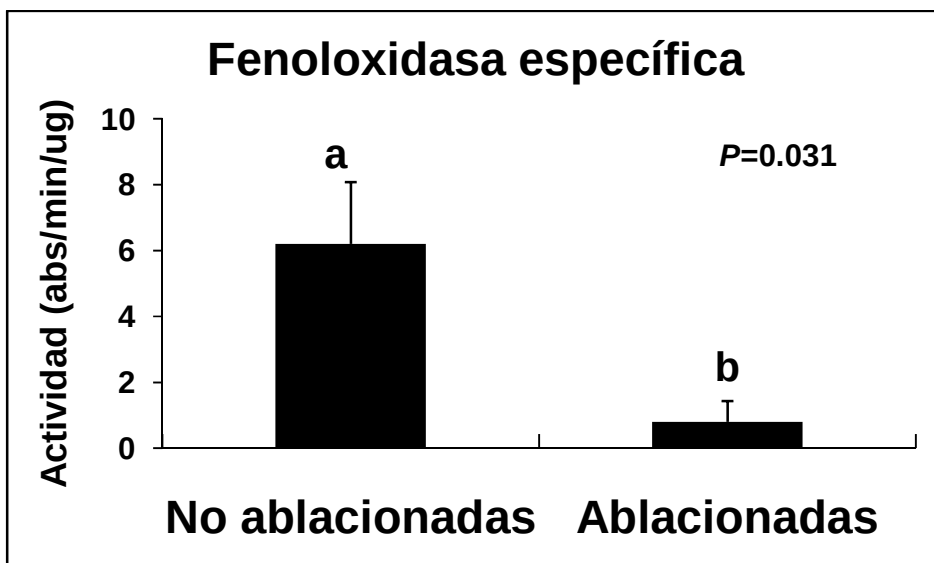


Figura 15. Actividad específica de la fenoloxidasa (FO) en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar y letra diferente representa diferencias significativas ($P<0.05$).

7.2.4. Tasa de ingesta de alimento y consumo de oxígeno

Se presentaron diferencias significativas en la tasa de ingesta de alimento ($P=0.007$; Fig. 16), observándose mayor consumo en el grupo EA (0.05 ± 0.02 g alimento/g orgs/día) que en el grupo NA (0.04 ± 0.01 g alimento/g orgs/día). Observándose el mismo comportamiento en el consumo de oxígeno, donde las hembras EA mantuvieron un mayor consumo de oxígeno que las NA (Fig. 16).

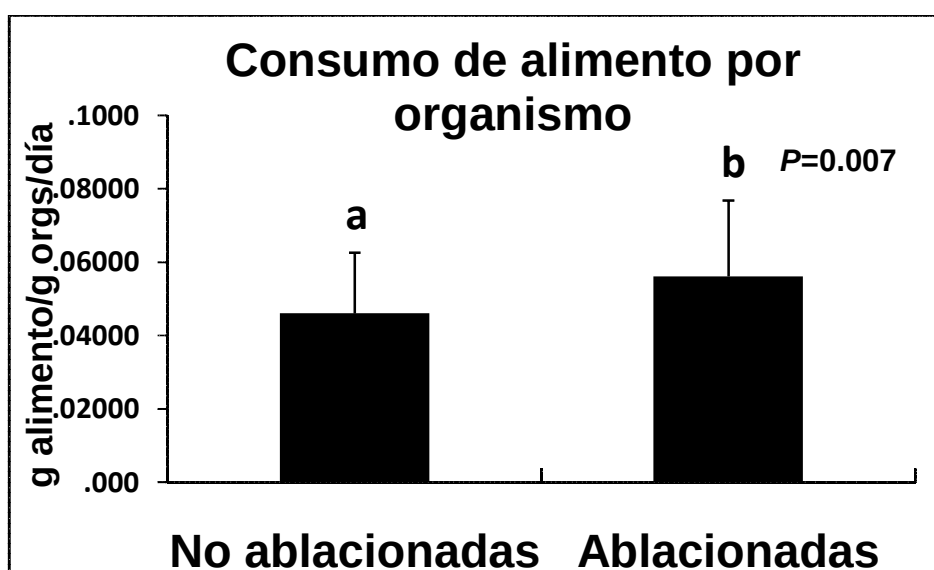


Figura 16. Promedio de tasa de ingesta de alimento en hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P<0.05$).

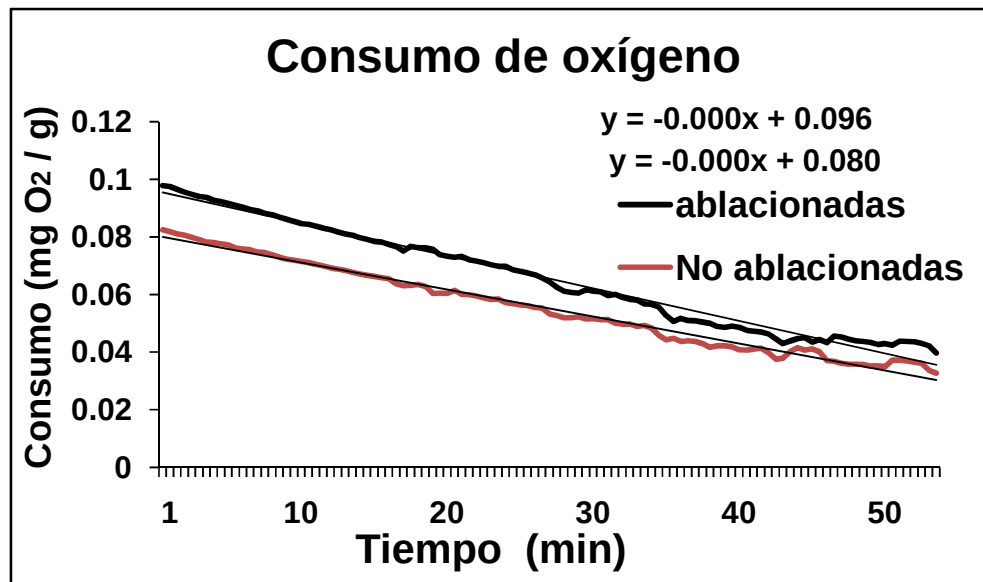


Figura 17. Consumo de oxígeno en hembras no ablacionadas y ablacionadas.

7.2.5. Glucosa, lactato, proteína total y triglicéridos en plasma

La concentración de glucosa en el plasma de la hemolinfa en el grupo EA (28.9 ± 21.20 mg/dL) fue menor a la que se registró en el grupo NA (38.12 ± 17.3 mg/dL). En contraste a lo registrado en la concentración de lactato, donde la menor concentración se presentó las hembras NA (34.08 ± 14.5 mg/dL), que fue un comportamiento similar a lo registrado en la concentración de proteína total y triglicéridos, donde las hembras NA presentaron sus menores valores (417 ± 182 y 64.5 ± 17.2 mg/dL, respectivamente). En los tres primeros casos no se presentaron diferencias significativas $P=0.166$, $P=0.632$ y $P=0.935$ (Figs. 18, 19 y 20) respectivamente, pero para triglicéridos si se registraron diferencias significativas $P=0.022$ (Fig.21).

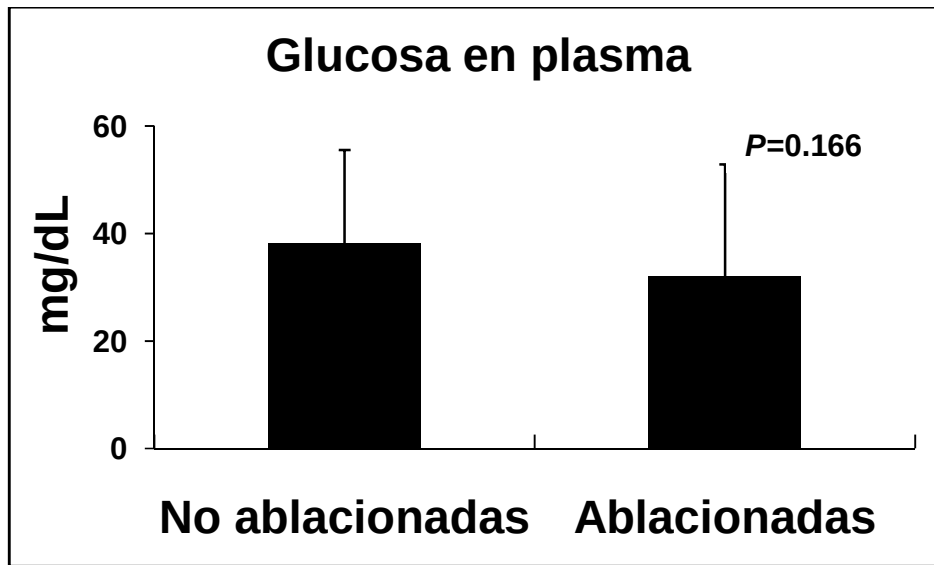


Figura 18. Concentración promedio de glucosa en plasma de la hemolinfa de hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

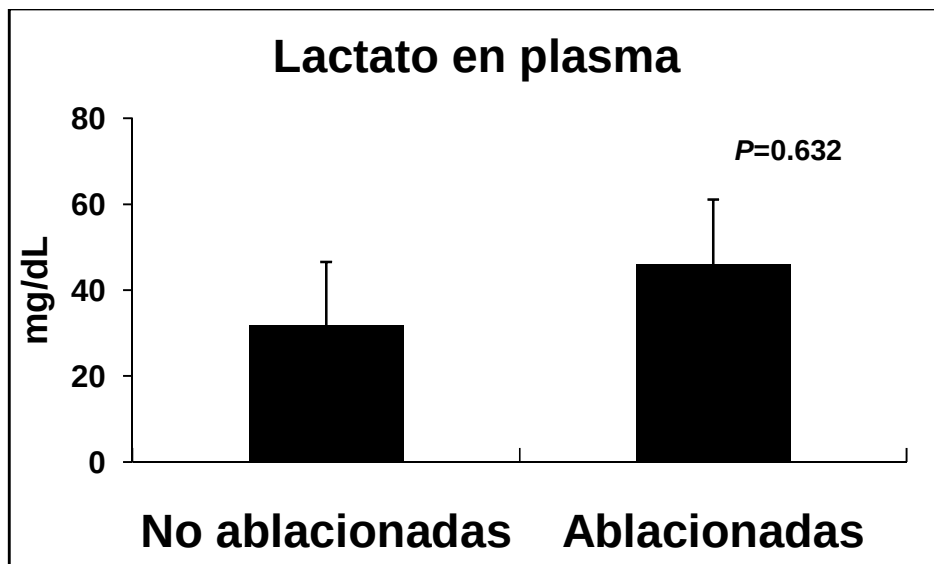


Figura 19. Concentración promedio de lactato en plasma de la hemolinfa de hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

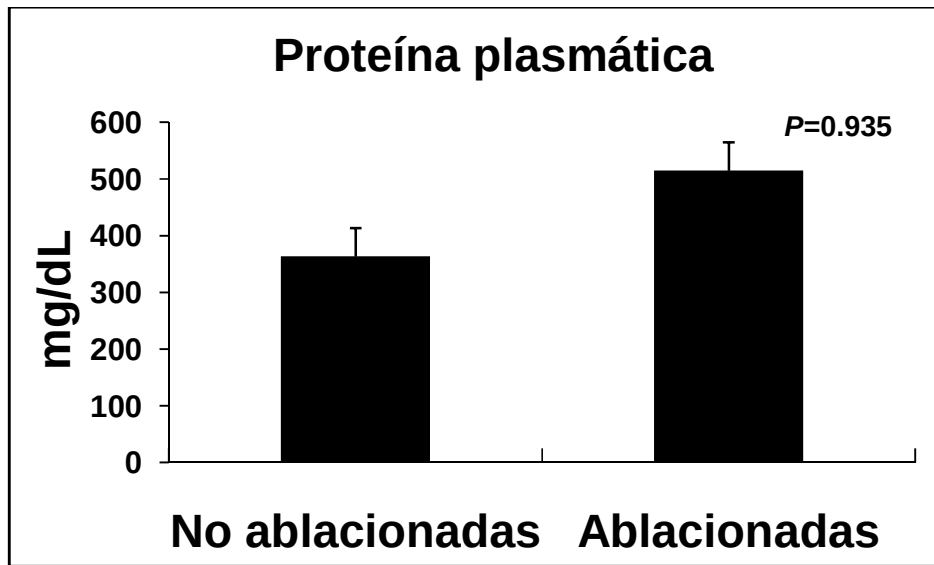


Figura 20. Concentración promedio de de proteína total en plasma de la hemolinfa de hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar.

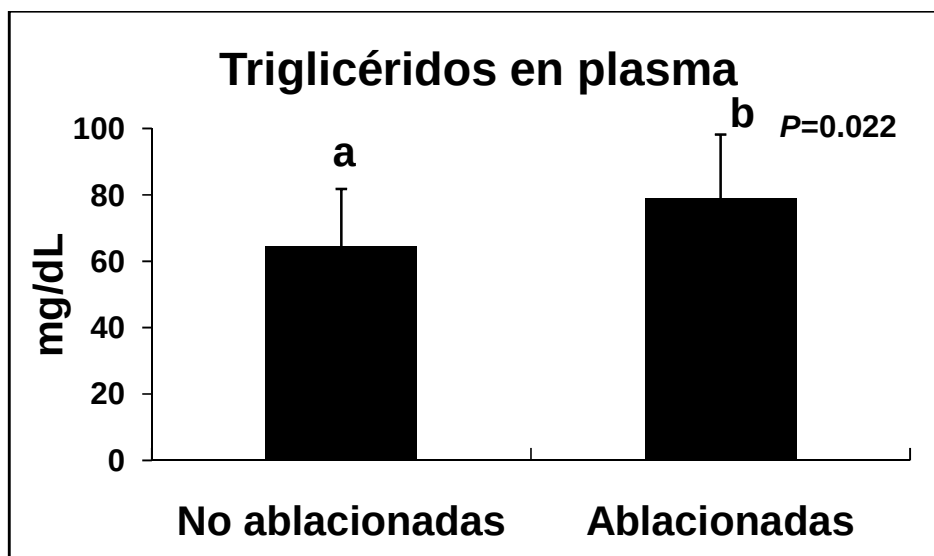


Figura 21. Concentración promedio de triglicéridos en plasma de la hemolinfa de hembras de *Macrobrachium americanum* ablacionadas y no ablacionadas. Se muestra la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

8.1. Efecto de diferentes técnicas de ablación del pedúnculo ocular sobre machos de *M. americanum*

El dolor que pueden sentir los crustáceos decápodos por diferentes manejos, tal como la ablación del pedúnculo ocular, aun sigue como debate abierto (Elwood *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2004; Newby y Stevens, 2008) y, en éste sentido se han realizado estudios sobre estímulos sensoriales que pueden causar daño tisular (Zimmerman, 1986; Sherwin, 2001; Dunlop y Laming 2005). En el presente estudio se experimentó con diversas técnicas de ablación del pedúnculo ocular, para eliminar el flujo de las hormonas del XOSG y determinar cuál de las técnicas era menos agresiva para *M. americanum*. Los resultados obtenidos mostraron que la ligadura del pedúnculo, incluso con la utilización de xilocaína, es más traumatizante que el resto de las técnicas, ya que esto promueve que el organismo mantenga un mayor contacto con la zona ligada, un mayor chasqueó, una mayor desorientación y los organismos tienden a caminar hacia atrás. La técnica CS tuvo un efecto intermedio en la expresión de dolor, pero el contacto del área traumatizada y la desorientación fueron significativamente más altos que en el tratamiento CSC. Con la técnica CSC no mostraron desorientación y presentaron un menor contacto del área traumatizada que con las técnicas LF y CS. Por el contrario, los organismos que no fueron ablacionados (machos y hembras) no mostraron contacto del área traumatizada, desorientación o chasqueó, lo que era de esperar, ya que no fueron sometidos a la ablación.

La ablación suele ser una técnica traumatizante utilizada en los laboratorios de crustáceos, esta técnica es aplicada a los organismos sin consideran que estos lleguen a sentir dolor. En general la técnica LF no es recomendable para aplicar a los organismos por el grado de trauma que mostraron los organismos, sin embargo la técnica de cortar y presionar la herida con una aplicación previa de xilocaína al 5 %

alrededor del pedúnculo ayuda a minimizar el trauma que puede llegar a ocasionar en los organismos.

8.2. Efecto de la ablación del pedúnculo ocular en hembras de *M. americanum*

8.2.1. Variables reproductivas y supervivencia

Se ha reportado que el pedúnculo ocular de crustáceos es un importante centro neuroendocrino/neuromodulador que no solo regula la fertilidad y reproducción, sino también la muda, balance iónico y osmótico, así como la pigmentación en crustáceos (Liss, 1988). En éste órgano se producen diversas hormonas tales como la hormona inhibidora de la muda (MIH), la inhibidora de la vitelogénesis (VIH), la hipergluceminante (CHH), la neurodepresora (NDH), la de pigmentación (PEH), entre otras (Beltz, 1988;Fingerman, 1995). Existen reportes que indican que la NDH bajo condiciones normales mantiene la regulación del ciclo diurno, deprimiendo el sistema motor del organismo y cuando ésta se elimina mediante la ablación del pedúnculo ocular se eleva la actividad motora de los organismos (Fingerman, 1995; Rosas *et al.*, 1995; Huberman, 1996). Lo que contrasta con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que los organismos expuesto a la ablación presentaron una menor agresividad que los organismos no ablacionados, lo cual se vio reflejado en la supervivencia, ya que esta fue mayor en los organismos ablacionados (ablacionados: 17 %; no ablacionados: 0 %) y según lo observado en nuestro estudio es posible que las hormonas del OXSG promueven la agresividad en *M. americanum* debido a que los organismos ablacionados mostraron una menor agresividad que los no ablacionados.

La alta mortalidad registrada en los organismos no ablacionados se debió más a los ataques por territorio, que son característicos de la especie y, este comportamiento está bien definido en la langosta *Panulirus ornatus*, donde se observó que después de ser ablacionadas, la mayoría de los organismos que murieron fue por el ataque de otros organismos debido a canibalismo y por no sobreponerse al evento de muda (Juinio-Meñez y Ruinata, 1996).Esto coincide con lo observado en nuestro estudio, donde 7 de los 17 organismos ablacionados murieron durante la muda o inmediatamente después

de ésta, Conklin *et al.* (1980) denominaron a esto como el “síndrome de muerte en la muda”, lo cual asociaron a deficiencias nutricionales en juveniles tempranos de *Homarus americanus*. Posteriormente, Ali y Wickins (1994) reportaron que el proveer a los organismos un suplemento alimenticio fresco ayuda a solventar el evento de muda en juveniles de *H. gammarus*.

El alimento utilizado en este estudio fue trozos de pescado fresco (tilapia), el cual había sido evaluado en un experimento anterior y con el que se obtuvo un mejor requerimiento nutricional de los huevecillos, con menores mortalidades en el proceso de muda (Sainz-Hernández, Datos no publicados). Por lo que podemos asumir que la mortalidad registrada en los organismos ablacionados durante el proceso de muda se debió más al descontrol hormonal que ocasiona la extirpación del OXSG que a la alimentación, lo que coincide con lo reportado para otros crustáceos como *L. vannamei* (Sainz-Hernández *et al.*, 2008), *Cryphiops caementarius* (Reyes-Avalos *et al.*, 2002) y *Panulirus argus* (Blanco y Fraga, 2003). Se ha reportado que la hormona de la pigmentación (PEH) se pierde con la extracción del OXSG, presentándose en los organismos y un cambio en la pigmentación posterior a la ablación, lo que está asociado a un desbalance hormonal con consecuencias fisiológicas que incluyen cambios en la cantidad y calidad de los componentes de su sistema inmune (Perazzolo *et al.*, 2002). Dicho cambio en coloración fue observado en el presente estudio en organismos ablacionados, ya que se observó que las hembras ablacionadas que tuvieron un tercer ciclo de muda tomaron una coloración gris-claro a diferencia de las hembras no ablacionadas que mantuvieron un color café-oscuro. En contraste, en otros crustáceos como *Cryphiops caementarius* no se observaron cambios de color en los camarones *ablacionados*, ni lograron acelerar la maduración (Reyes-Avalos *et al.*, 2002).

Con el fin de acortar el periodo de muda e inducir la maduración se ha aplicado la técnica de ablación en crustáceos como *L. vannamei* (Sainz-Hernández *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2003; Palacio *et al.*, 1999), *Penaeus semisulcatus* (Browdy y Samocha, 1985), *Panulirus spp* (Juinio-Meñez y Ruitana, 1996; Blanco y Fraga, 2003), *Cherax*

quadricarinatus (Sagi *et al.*, 1997), *Cryphiops caementarius* (Reyes-Avalos *et al.*, 2002) y *Macrobrachium spp* (Cunha y Yoshii, 2010; Okumura y Aida, 2001; Yao *et al.*, 2010) y, en todos los casos los resultados obtenidos han sido significativamente mejores que los obtenidos con solo la manipulación de factores físicos como la temperatura, luz y alimento (Shin-Ichi *et al.*, 1988).

La muda es un factor importante en la reproducción de las especies que presentan télico cerrado como las hembras de *M. americanum*, debido a que necesitan liberarse del exoesqueleto para iniciar la cópula con el macho (Chang, 1992). Lo cual implica que acelerando el periodo de muda se puede acelerar el proceso de reproducción. Los resultados de nuestro estudio muestran que la ablación unilateral no reduce el ciclo de muda en las hembras de *M. americanum*, esto coincide con lo observado en el camarón de río *Cryphiops caementarius*, donde la ablación de un solo pedúnculo no fue suficiente para disminuir las hormonas de la circulación, pues la ablación no afectó la maduración gonádica ni el tiempo del ciclo de muda (Reyes-Avalos *et al.*, 2002). Huberman (2000) considera que la ablación unilateral produce una repentina disminución hasta el 50 % en los factores que se originan en la glándula del seno, pero se desconoce si el tronco del pedúnculo puede hiperatrofiarse para compensar la pérdida del otro pedúnculo. Sin embargo, en crustáceos como *L. vannamei* si se ha logrado disminuir el periodo de muda con la ablación del pedúnculo ocular (Sainz- Hernández *et al.*, 2008), al igual que *M. rosenbergii* (Okumura y Aida, 2001) y *M. lanchesteri* (Ponnunchamy *et al.*, 1980).

La disminución en el periodo del ciclo de muda posterior a la ablación se atribuye a las bajas concentraciones de la hormona inhibidora de la muda (MIH) y como ya se ha mencionado, los crustáceos requieren liberarse del exoesqueleto para crecer, por lo la tasa de crecimiento en hembras inmaduras es relativamente alto (Ra'anan *et al.*, 1991), inicialmente ésta tasa es exponencial pero después de la maduración se reduce considerablemente, debido a que parte de su energía se dirige a la producción e incubación de los huevecillos (Hartnoll, 1982). En nuestro estudio los organismos ablacionados que presentaron más de un ciclo de muda, dicha muda estuvo más

relacionada con el crecimiento debido a que solamente se logró un desove, lo que puede indicar que las hembras no se estaban maduras o los componentes metabólicos involucrados en la reproducción no estaban sincronizados.

8.2.2. Variables inmunológicas

El tiempo de coagulación no presentó diferencias significativas entre los grupos, indicando que los componentes que participan en la coagulación no se ven afectados por la ablación del pedúnculo ocular. Sin embargo, si se presentaron diferencias significativas en el conteo total de hemocitos entre los organismos ablacionados y no ablacionados, lo cual ya ha sido reportado, aunque en algunos estudios dicho comportamiento no es tan consistente y en ocasiones la ablación no afecta la concentración de hemocitos (Le Moullac *et al.*, 1998; Perazzolo *et al.*, 2002; Maggioni *et al.*, 2004; Chand y Sahoo, 2006; Sainz *et al.*, 2008; Verghese *et al.*, 2008). El conteo total de hemocitos es el parámetro más usado para la evaluación del estado de salud de los crustáceos, a pesar de la gran variabilidad individual en el número de ellos. Un decremento y más raramente un incremento en el conteo total de hemocitos ha sido descrito en crustáceos en relación a varios factores de estrés (Le Moullac *et al.*, 1998). Si bien no hay trabajos realizados en *M. americanum* donde se evalúe el efecto de la ablación sobre el sistema inmune, en otras especies de crustáceos los resultados indican que el número de hemocitos no muestra diferencias significativas en organismos ablacionados con respecto a los no ablacionados, no obstante presentan una disminución al primer día después de la ablación (Maggioni *et al.*, 2004) y con el grado de ablación (unilateral o bilateral) que se realice en el organismo (Sainz-Hernández *et al.*, 2008). Por otro lado, otros autores reportan un aumento en el conteo de hemocitos (Verghese *et al.*, 2008) y en la langosta *P. homarus* determinaron que el conteo total de hemocitos y la actividad de la FO se incrementan posterior a las 2 h de la ablación, lo cual está asociado a la movilización de los hemocitos hacia la zona de la herida, ya que estos participan en la respuesta primaria de cicatrización (Le Moullac *et al.*, 1998).

Perez-Jar *et al.* (2006) reportaron que en reproductores no ablacionados de *L. schimittii* el número de hemocitos decrece con respecto a la actividad reproductiva. Truscott y White (1990), hacen alusión que las hormonas neuroendocrinas juegan un papel crucial en la variación del conteo total de hemocitos, así como, éstas regulan la muda, la variación en color y la glicemia, también podrían estar implicadas en la variación de los valores de los hemocitos. En crustáceos los hemocitos circundantes están envueltos en la producción de melanina vía el sistema profenoloxidasa, el cual juega un papel importante en las reacciones de defensa (Johanson and Söderhäll, 1989; Perazzolo y Barraco, 1997). El sistema profenoloxidasa es un sistema complejo en cascada proteolítica, desencadenada por la invasión de microorganismos, en la cual la fenoloxidasa (PO) es la enzima central. PO es usualmente encontrada en forma inactiva (proPO) dentro de los hemocitos granulados y su activación culmina con la formación de melanina un pigmento oscuro, que está presente usualmente en una variedad de reacciones inmunes. En camarones peneidos, enzimas del sistema proPO están localizadas en las células semigranulares y granulares (Vargas-Albores *et al.*, 1993; Perazzolo y Barroco, 1997). En el presente trabajo la actividad total de la proFO presentó diferencias significativas entre los organismos ablacionados y no ablacionados, observándose una mayor actividad en las hembras ablacionadas, lo cual se correlaciona con el mayor número de hemocitos presente en los organismos ablacionados, ya que los hemocitos son el mayor reservorio de esta enzima. Con respecto a la actividad específica de la proFO no se encontraron diferencias significativas entre los organismos ablacionados y no ablacionados. El componente final de la activación de la proFO es la FO, la cual oxida difenoles produciendo quinonas. Estos compuestos, continúan su transformación vía no enzimática hasta llegar a melanina (Söderhäll, 1982). Los resultados del presente estudio mostraron que la actividad total de FO en plasma no se ve afectada por la ablación, al igual que lo reportado para *L. vannamei* (Maggioni *et al.*, 2004). De igual forma Perazzolo *et al.* (2002) no detectaron diferencias significativas en la actividad de FO en hembras ablacionadas de *F. paulensis*. Con los resultados de la FO obtenidos en este estudio se puede asumir que las hembras ablacionadas posterior a eclosionar los huevecillos no requieren de activar el sistema proFO para contrarrestar el efecto de la ablación. Sainz-

Hernández (datos no publicados) menciona que en hembras ovígeras de *M. americanum* en el estadio 5 del desarrollo ontogénico y posterior a dos días de la eclosión, las hembras presentan una condición de vulnerabilidad alta, ya que aumenta el tiempo de coagulación de la hemolinfa y disminuye la actividad de la proFO.

Sin embargo, en el presente estudio si se presentaron diferencias significativas en la actividad específica de la FO entre los organismos ablacionados y no ablacionados, debido probablemente a la diferencia en la concentración de proteína plasmática, ya que esta actividad está relacionada con la concentración de proteína presente en el plasma y, está fue consistentemente mayor en los organismos ablacionados. Por lo cual se ha reportado que al evaluar la actividad de la FO es más apropiado medir la actividad total con el fin de determinar el estatus de salud del organismo, en lugar de la actividad específica de la FO, debido a que está última se encuentra más asociado a la concentración de proteína presente en la muestra (Perazzolo *et al.*, 2002).

8.2.3. Variables metabólicas

En crustáceos, diversos procesos metabólicos son regulados y controlados por el sistema neurosecretor localizado en la base de los pedúnculos oculares (Fingerman, 1974). El proceso de reproducción implica la movilización de lípidos para la maduración gonadal y la conversión del glucógeno en glucosa para sostener la demanda energética que este proceso requiere (Ramos y Fernández, 1981; Olivia *et al.*, 1989). La eliminación de la hormona CHH, que es la que controla la movilización y niveles de glucosa en hemolinfa, conlleva a una serie de cambios en la concentración de glucosa en hemolinfa. Rosas *et al.* (1993) reportaron que las hembras ablacionadas de *P. notialis* incrementan el ritmo respiratorio y por ende el requerimiento energético, lo que repercute en una mayor oxidación de la glucosa para obtener energía. Sin embargo, esto no fue observado en nuestro estudio, ya que no se presentaron diferencias significativas en la concentración de glucosa de organismos ablacionados y no ablacionados, lo cual implica que los organismos ablacionados lograron mantener

los niveles de glucosa en hemolinfa aun sin la presencia de CHH. Esta hormona se encuentra mayormente implicada en el consumo del alimento en crustáceos ya que actúa promoviendo la glucogénesis a partir del glucógeno de la glándula digestiva y el músculo (Keller y Sedlmeier, 1988; Santos y Keller, 1993). En organismos ablacionados esta hormona se pierde y no se promueve la glucogénesis necesaria para mantener los niveles de glucosa requeridos por el organismo. Por lo que el organismo se ve en la necesidad de obtener la glucosa por otros medios, en este caso del alimento. Esto se vio reflejado en las hembras ablacionadas que mostraron una mayor tasa de ingesta, ya que se presentaron diferencias significativas entre organismos ablacionados y no ablacionados.

Por otro lado, Sainz-Hernández *et al.* (2008) reportan que la ablación unilateral no es suficiente para eliminar la CHH circulante en hemolinfa y posiblemente los niveles de glucosa se mantienen de la transformación del glucógeno almacenado en hepatopáncreas. Por lo que otro factor que puede explicar este fenómeno es la medición del glucógeno almacenado en hepatopáncreas; sin embargo, en el presente estudio por cuestiones de disponibilidad de hembras no se logró medir esta variable, ya que para realizar este análisis se requería del sacrificio de los organismos.

Autores como Koshio *et al.* (1992) reportan una mayor eficiencia en la utilización de energía en langostas ablacionadas bilateralmente que las no ablacionadas, ellos no encuentran diferencias significativas en el metabolismo de estos organismos. Por otro lado, Radhakrishnan y Vijayakumuran (1984) reportaron altas mortalidades en langostas ablacionadas bilateralmente, sugiriendo que el alto requerimiento de oxígeno puede ser debido al aumento en el metabolismo y la alta tasa de alimentación de los organismos ablacionados. Resultados similares fueron encontrados en este estudio, ya que las hembras ablacionadas presentaron un mayor consumo tanto de alimento como de oxígeno, lo cual implica un mayor requerimiento energético en estas. También, se han reportado similares a estos en *P. notialis* (Rosas *et al.*, 1993).

Si bien la glucosa es el principal combustible para obtener energía de manera inmediata en el metabolismo de los organismos de manera aeróbica (Chang and O'Connor, 1983), también es posible obtener energía de manera anaeróbica por medio de la vía del ácido láctico. Con la ablación se pierde la hormona neurodepresora (NDH) que se encuentra asociada a la regulación del ciclo diurno, deprimiendo el sistema motor y sensor del organismo, con su eliminación se ha reportado que los organismos presentan mayor actividad (Sainz *et al.*, 2008; Huberman 1996). Fingerman (1995) menciona que el efecto neurodepresor parece ocurrir en todos los crustáceos. Sin embargo en nuestro trabajo, las hembras ablacionadas no mostraron mayor actividad que las no ablacionadas, posiblemente debido a que con la ablación no se logra eliminar por completo la circulación de la hormona NDH en hemolinfa. Además, es posible que el requerimiento energético lo obtengan ambos grupos de manera aerobia, lo cual implica no haber obtenido diferencias significativas en la concentración de lactato en hemolinfa.

Uno de los principales efectos de la extirpación del OXSG es una mayor producción de proteína en hemolinfa, esto ha sido reportado para otros crustáceos (Sainz-Hernández *et al.*, 2008, Carreño-León, 2000.). Algunos autores reportan una disminución en la concentración de proteína en hemolinfa en organismos ablacionados (Perazzolo *et al.*, 2002). En contraste a lo anterior, en nuestro estudio no se presentaron diferencias significativas en la concentración de proteína entre organismos ablacionados y no ablacionados, aunque se presentó una tendencia de mayor concentración en los organismos ablacionados, debido quizás a que se produjo mayor cantidad de hemocianina en estos por el mayor requerimiento de consumo de oxígeno, lo que concuerda con lo reportado por Chamberlain y Lawrence (1981) y Rosas *et al.*, (1993).

Con respecto a la concentración de triglicéridos en plasma, se registró una concentración mayor en las hembras ablacionadas. Spaargaren y Haefer (1994) observaron que el aumento lipídico en la gónada durante las etapas vitelogénicas concuerda con las variaciones de estos compuestos que se transportan en la hemolinfa.

De igual forma, Carreño-León (2000) encuentra una correlación negativa entre el peso del hepatopáncreas y el IGS, lo que indica que el peso del hepatopáncreas disminuye conforme madura el organismo, encontrando que existe una transferencia de nutrientes del hepatopáncreas hacia la gónada durante el proceso de maduración. Esto nos indica que las hembras de *M. americanum* cuando son ablacionadas presentan una mayor movilización de triglicéridos para la maduración gonádica con respecto a las que no se ablacionan. Lo cual hace suponer que en las hembras ablacionadas si se aceleró la maduración; sin embargo, el ciclo de muda no se logró reducir con la ablación lo que no permitió una sincronización entre los dos procesos, reflejándose esto en el número de desoves por hembra (se logró solo un desove). Probablemente la ablación provoca un descontrol en los procesos metabólicos regulados por hormonas (CHH, RPCH, MIH, HIV, entre otras) y al perderse con la eliminación del OXSG generan un descontrol en el organismo.

9. CONCLUSIONES

- La técnica de ablación del pedúnculo ocular que causó menor cantidad de estímulos negativos fue el que comprende la utilización de un anestésico previo al corte, el corte del pedúnculo ocular y la promoción de la coagulación de la hemolinfa.
- El 100 % de los machos y hembras de *M. americanum* sobrevivieron al procedimiento de ablación.
- El tiempo del ciclo de muda no disminuyó como consecuencia de la ablación y existen algunos elementos que indican que si hay una movilización de metabolitos con el propósito de madurar la gónada. Pero, bajo las condiciones experimentales del presente estudio no se presentó una sincronía entre la muda y maduración, lo cual implicó no obtener más desoves por hembra ni más huevos por hembra. Por el contrario, se detuvo los eventos reproductivos aun con eventos de muda.
- La ablación del pedúnculo ocular no altera variables del sistema de defensa interno.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adiyodi, R.G. 1984. Seasonal changes and the role of eyestalks in the activity of the androgenic gland of the crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Comparative Physiology & Ecology*. 9, 427-431.
- Álvarez, N.F. 1997. Los crustáceos DECÁPODOS de agua dulce de México, Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. E002. México D.F. 7 p.
- Arana, M. F. 1972. Experiencias sobre el cultivo del langostino *Macrobrachium americanum* (Bate) en el noroeste de México. CIFSA-Consultores. 1-16.
- Arcos, G.F., C. Vazquez-Boucard., E. Palacios., I.S. Racotta. 2003. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture*. 34, 749-755.
- Bate, S. 1868. On a new genus with four new species of freshwater prawns. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 363-368 p.p.
- Beltz, B. S. 1988. Crustacean neurohormones. pp. 235-258. En: *Endocrinology of selected invertebrates types*. (Alan R. Lis ed). Academic press. NY., USA.
- Blanco, W. y F. Ileana. 2003. Efecto de la ablación ocular en el crecimiento de juveniles de Langosta (*Panulirus argus*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA). 865-870.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*. 72, 248-254.
- Bray, W. A. and Lawrence, A.L. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. *Marine shrimp culture: Principles and practices*. (A.W. Fest y L.J. Lester eds). Elsevier. 93-170.
- Browdy, C.L. and Samocha T. M. 1985. The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture*. 49, 19-29.

- Chamberlain, G. W. and Lawrence A.L. 1981. Maturation, reproduction and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. Journal World Mariculture Society. 12, 209-224.
- Chan, S.M., Ranking, S.M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and haemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. Biological Bulletin. 175, 185–192.
- Chand, R.K., Sahoo, P.K. 2006. Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 258, 150-156.
- Chang, E.S. 1992. Endocrinology. Pp. 53-91. En: Marine shrimp cultura: Principles and practices. (A.W. Fest y L.J. Lester eds). Elsevier. USA.
- Conklin, D.F., D'Abrano, I.R., Bordner C.E. and Baun, N.A. 1980. A successful purified diet for the culture of juvenile lobster the effects of lecithin. Aquaculture. 21, 243-249.
- Cooke, I.M., and Sullivan R.E..1982. Hormones and neurosecretion. In: H. Atwood and D. Sandeman (Eds.). *The Biology of Crustacean*. (New York, Academic Press), Vol. 3, Ch. 6, pp. 206-291.
- Cunha, C.H. and Miyaco Y.O. 2010. The influence of eyestalk ablation on the reproduction of freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. Acta Scientiarum. Biology Science. 32, 217-221.
- Daniels, W.W. 2009. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa Wiley. México, D.F.
- Elwood, R., Barr, S., Petterson, L. 2009. Pain and stress in crustaceans? Appl. Anim. Behaviour Science. 118, 128-136.
- Espinoza, J. L. 1987. El langostino: Un alimento en peligro. México, Ingramex. v 10, p. 19-30.
- Fingerman, M. 1974. Comparative Endocrinology. In. Experimental Marine Biology. (N. Mariscal Ed.) Acad. Press. New York and London, Chap 5. 166-223.
- Fingerman, M. 1995. Endocrine mechanism in crayfish with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. American Zoology. 35, 68-78.

- García-Guerrero, M. and Apun Molina J. P. 2008. Density and shelter influence the adaptation to wild juvenile cauque prawns *Macrobrachium americanum* to culture conditions. North American Journal of Aquaculture. 70 (3), 343-346.
- Hartnoll, R. 1982. Growth In the Biology of Crustacea. Vol. Embriology, Morphology and genetics, (Ed. by L.G. Abele), pp 111-196. Academic Press, New York.
- Hernández-López, J., Gollas-Galvan T. y Vargas-Albores F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the Brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry Physiology 113, (1), 1-6
- Holtius, L. 1952. A general revision of the Paleomonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Paleomonidae. Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation 12: 1-396 (México, D.F. Natantia) of the Americas. II. The subfamily Paleomonidae. Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation 12, 1-396
- Holschmint, K.M. 1990. Manual técnico para el cultivo y engorda del langostino malayo. FONDEPESCA.
- Huberman A. 1996. Neurodepressing hormone (NDH): factor or fiction?. Pp. 1-17. En: Crustaceana. Vol. 69. (E.J. Brill y Leiden eds).
- Huberman A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture. 191, 191-208.
- Jayachaandran, K.V. (2001). Paleomonid Prawns: Biodiversity, Taxonomy, Biology and Management. Enfield: Science Publishers.
- Johanson M.W. y Sönderhäll K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Paraitol. Today, 5 (6), 171-176.
- Juinio-Meñez M. and Ruitana J. 1996. Survival growht and food conversión efficiency of *Panulirus ornatus* eyestalk ablation. Aquaculture. 146, 225-235.
- Keller, R. and Sedlmeier, D.A., 1988. Metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In: Endocrinology of Selected Invertebrate Types, Invertebrate Endocrinology, Vol. 2. Alan R Liss, New York, pp 315-326.
- Koshio, S., Castell, J.D. and O'Dor, R.K. 1992. The effect of different energy levels in the crabs-protein-based diets on digestibility, oxygen consumption, and ammonia

- excretion of bilaterally eyestalk-ablated and intact juvenile lobsters, *Homarus americanus*. Aquaculture. 108, 285-297.
- Lachaise F., Le Reux A., Hubert M., y Lafont R. 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (A review). Journal Crustaceana Biology. 13, (2), 198-234.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunology. 8, 621-629.
- Liss, A. L. 1988. Endocrinology of Selected Invertebrate Types, Invertebrate Endocrinology, Vol. 2., New York, pp 315-326.
- Lopez-Lopez, S. 2004. Estudio de la actividad enzimática digestiva de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Tesis doctoral La paz, B.C.S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 113 p.
- Lockwood, A. P. M. 1967. Aspects of the Physiology of Crustacea. San Francisco: W. H. Freeman.
- Maggioni, D.S., Andreatta, E.R., Hermes, E.M., Barroco, A. 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. Aquaculture. 241, 501-515.
- New, M. B., 2002. Farming freshwater prawns. A manual for the culture of the giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) 212 (1), FAO, Rome.m juveniles. North American Journal of Aquaculture. 70, 343-346.
- Newby, N.C. and Stevens, .E.D. 2008. The effects of the acetic acid "Pain" test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Appl. Animal Behaviour Science. 114, 260-269.
- Okumura, T. & A. Katsumi. (2001). Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fisher Scientific. 67, 1125-1135.

- Oliva, M., García E. and Valderrama S. 1989. Varizción de los lípidos tisulares durante la vitelogénesis del camarón Rosado *Penaeus notialis*. Revista de Investigación Marina. 10, 269-278.
- Perazzolo, L. M., Barraco, M. A., 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp, *Penaeus paulensis* and associated factors. Development. Comparative Immunologic. 21, 385-395.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barroco, M. A.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulinensis* submitted to environmental and physiologic stress. Aquaculture. 214, 19-33.
- Perez-Jar, L., T. Rodríguez-Ramos, L. Ramos., Y. Guerra-Borrego, I.S. Racotta. 2006. Changes in metabolic and immunologic variables of wild and pond-reared southern White shrimp *Litopenaeus schmitii* adult males during continuous reproductive activity. Aquaculture. 252, 591-597.
- Ponnunchamy,R., S. Ravichandra Reddy and K. Shakuntala. 1980. Effects of eyestalk ablation on growth and food conversion efficiency of the freshwater prawn *Macrobrachium lanchesteri* (De Man). Hydrobiology. 77: 77-80.
- Ra'anan, Z., Sagi A., Wax, Y., Karplus, I., Hulata, G., and Kuris, A.M. 1991). Growth, size rank, and maturation of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* analysis of marked prawns in an experimental population. Biological Bulletin. 181, 379-386.
- Radhakrishnan, E.V. and Vijayakumaran, M. 1984. Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus): 1. Onmoulting and growth. Indian Journal Fish. 31 (1): 148-155.
- Ramos, T.L. and Fernández I. 1981. Variaciones del metabolismo glucídico durante uel ciclo reproductor en la especie *Penaeus notialis*. Revista de Investigación Marina. 2, 141-156.
- Reyes-Avalos, W.E., Pilco-Plascencia, M., Olortegui-Morales, k. 2002. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular en la maduración ovárica y en el ciclo de muda de *Cryphiops caementarius* en laboratorio. Congreso Internacional Virtual de Acuicultura. 681-687.

- Rodríguez, G. et al. 1993. Fundamentos de Acuicultura Continental. Colombia, INPA. p. 173-178.
- Rodríguez, J. and Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119.
- Rosas C., Fernández I., Brito R y Diaz-Iglesias E. 1993. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of pink shrimp, *Penaeus notialis*. *Comparative Biochemistry Physiology*. 104A (1), 183-187.
- Rosas C., Bolongaro-Crevenna A., Sanchez A., Gaxiola G., Soto L. y Escobar E. 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biological Bulletin*. 189, 168- 174.
- Sagi, A., R. Shoukrun., Levy T., Barki, A., Hulata G., Karplus Han. 1997. Reproduction and molt in previously spawned and first-time spawning red-claw crayfis *Cherax quadricarinatus* females following eyestalk ablation during the winter reproductive-arrest period. *Aquaculture*. 156. 101-111.
- Sainz-Hernández, J. C. 2006. Propone CIIDIR Sinaloa impulsar el cultivo de langostinos de río. *Boletín de la COFAA-IPN*. 6:26-27.
- Sainz-Hernández J. C., Racotta I. S., Dumas S., Hernández-López J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*. 283, 188–193.
- Santos, E.A., and Keller, R., 1993. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *Journal Comparative Physiology*. 163B, 374-379.
- Sherwin, C.M. 2001. Can invertebrates suffer? Or how robust is argument-by-analogy? *Animal Welf*. 10, S103-S118.
- Shin-Ichi T., Kanasawa A. y Koshio S. 1988. Lipid metabolism in destalked prawn *Penaeus japonicas*: induced maturation and accumulation of lipids in the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaisho*. 54, 1115-1122.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanitazion a recognition system of arthropods? A review. *Development Comparative Immunology*. 6: 601-611.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. 1992. Crustacean inmunity *Annu. Rev. Fish. Dis.* 2, 3-23.

- Soluap, Erner. 1998. Alternativas de cultivos acuícolas. Offset Abad Cía. Ltda. Tomo III. Guayaquil, Ecuador. 664 p.p.
- Spaargaren D.H. y Haefner Jr. P.A.. 1994. Interaction of ovary and hepatopáncreas during the reproductive cycle of *Cragon cragon* (L.). II. Biochemical relationshos. J. Crustacean Biology. 14:6-19.
- Taylor, J., Vinatea, Ozorio L., Schuweitzer R., Andreatta R. E. 2004. Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent. Aquaculture. 233, 173-179.
- Truscott R. and White K.N. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. Functional Ecology. 4, 455-461.
- Vargas- Albores, F., Guzmán, M.A., Ochoa, J.L.A. 1993. An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochemistry Physiology. 106A, 299-303.
- Verghese, B., Radhakrishnan E., Padhi A. 2008. Effect of moulting, eyestalk ablation, starvation and transportation on the immune response of indian spiny lobster, *Panulirus homarus*. Aquaculture. 39, 1009-1013.
- Yao, J.J., Wen, L., Zhao, Y.L., He, D.J. and Zeng, C. 2010. Morfhogenesis of the eyestalk and expression of moult-inhibiting hormone during embryonic development of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana. 83 (8), 903-913.
- Zimmerman, M. 1986. Physiological mechanism of pain and its treatment. Klinische Anesthesiology intensive therapy. 32, 1-19.