

Pruebas de alimentación en la investigación de nutrición en acuacultura

Por Luis Héctor Hernández Hernández

CANTIDAD DE PALABRAS 11616

HORA DE ENTREGA

14-JUL-2025 03:39P. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

117223941

**PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE NUTRICIÓN EN
ACUACULTURA**

Luis Héctor Hernández Hernández
Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario)

4 El presente trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación, proyecto **PE207519 “Mejoramiento de la enseñanza de Nutrición en Acuicultura en los Laboratorio de Investigación Científica del Bloque de Profundización de la Carrera de Biología”**

CONTENIDO

Presentación

Introducción

Capítulo 1. Pruebas de alimentación

I. Introducción

II. Diseño y desarrollo de pruebas de alimentación

Capítulo 2. Manejo ético de los organismos

I. Estrés

II. Estímulos dañinos (dolor y nocicepción)

III. Comités de bioética

Capítulo 3. Uso de anestésicos para toma de muestras y sacrificio

I. Anestesia y anestésicos, definiciones

II. Anestesia en organismos acuáticos

III. Anestésicos más utilizados

IV. Sacrificio de los organismos

Capítulo 4. Obtención de muestras

Capítulo 5. Parámetros de crecimiento

Referencias

Otras fuentes de información

Presentación

La Nutrición de Organismos Acuáticos o Nutrición en Acuicultura es un campo de investigación que tiene como objetivo principal determinar los requerimientos nutricionales de especies acuáticas de importancia comercial. Gran parte del desarrollo de este campo de investigación se ha dado después de ⁵ la década de los cincuenta del siglo XX y ha permitido, en gran medida, el desarrollo de la producción intensiva en la acuicultura con el uso de alimentos balanceados.

Sin duda, el desarrollo experimental más utilizado en la investigación del campo de la nutrición es la prueba de alimentación. Una planeación y desarrollo adecuados de una prueba de alimentación es esencial para la obtención de resultados representativos de una respuesta biológica normal y aplicables a la producción de organismos acuáticos. Así mismo y considerando que en los últimos años se han establecido reglas internacionales para el trato humanitario y ético del uso de animales en experimentación, el presente trabajo tiene como objetivo principal acercar a los alumnos de los semestres de séptimo y octavo de la Carrera de Biología en el diseño y ejecución de pruebas de alimentación para sus investigaciones en las materias de Laboratorio de Investigación Científica VII y VIII y de tesis en el Laboratorio de Producción Acuícola de la FES Iztacala.

Además, se considera que los futuros profesionistas (biólogos, médicos veterinarios o ingenieros acuícolas) que quieran integrarse al campo de la producción acuícola (ya sea en la investigación o en el aspecto práctico) deben de adquirir conocimientos, habilidades en el trato ético y el bienestar de los organismos.

Este material se desarrolló como parte del proyecto PAPIME “Mejoramiento de la enseñanza de Nutrición en Acuicultura en los Laboratorio de Investigación Científica del Bloque de Profundización de la Carrera de Biología” y se ha dividido en cinco partes: i) diseño y desarrollo de las pruebas de alimentación; ii) las condiciones ambientales más adecuadas para un manejo ético y humanitario de los organismos durante y al termino de las pruebas; iii) definiciones de anestesia y anestésicos, su uso durante las biometrías y sacrificio para la

obtención de muestras, disminuyendo el estrés y el sufrimiento innecesario de los organismos con los que se está experimentando; iv) obtención de muestras y v) índices de crecimiento que pueden ser utilizados para evaluar rápidamente el efecto de un tratamiento sobre los organismos.

Para el diseño y desarrollo de una prueba de alimentación, se pone en relevancia el uso de una estrategia conocida como las 3Rs y en la que se intenta definir el uso de alternativas a los organismos, a la reducción de estos en una prueba y a la utilización de técnicas que no causen estrés y sufrimiento. Hasta ahora México no cuenta con normas respecto al trato humanitario y ético de organismos acuáticos en la investigación, pero diferentes universidades han establecido comités de bioética que podrían avalar el uso de estos organismos en pruebas experimentales basados en normas internacionales. Estos avales empiezan a ser un requisito para solicitar fondos económicos para proyectos o publicar en revistas, por lo que es necesario que estudiantes conozcan este proceso para que puedan aplicarlo también en sus proyectos.

Introducción

Los estudios experimentales que utilizan organismos vivos juegan un papel fundamental en el desarrollo de nuevo conocimiento y un mejor entendimiento de diferentes procesos vitales. Particularmente en el estudio sobre la nutrición de organismos acuáticos, las pruebas de alimentación son una parte esencial en el desarrollo del conocimiento de los requerimientos nutricionales.

Ante la necesidad de realizar estas pruebas con organismos vivos, es importante considerar que su uso conlleva la responsabilidad de diseñarlas de forma eficiente y efectiva, así como el trato ético y humanitario hacia los organismos en experimentación.

El concepto de bienestar animal se ha aplicado en vertebrados terrestres desde hace décadas en países desarrollados como Estado Unidos, Canadá y de Europa, pero solo recientemente se empieza comprender la importancia que tiene también en los organismos acuáticos y solo en la última década ha recibido particular atención en los campos de la investigación y de la acuicultura. Así pues, las regulaciones sobre el bienestar de peces y crustáceos son cada vez más comunes a nivel internacional y los protocolos de investigación requieren los avales de comisiones o comités de bioética, que se ajusten a las normas nacionales y/o internacionales.

México cuenta con diferentes normas oficiales (NOM) sobre el cuidado, uso y sacrificio humanitario de diferentes especies de animales terrestres en condiciones de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-SAG/ZOO-2014, por ejemplo), pero no se tiene con una normatividad exclusiva para organismos acuáticos como peces y crustáceos en condiciones experimentales o de cultivo. Cabe señalar que algunos aspectos sobre el mantenimiento de los organismos pueden verse en la NOM-011-PESC-1993, en la que se describen las condiciones de sistemas de cuarentenas para especies acuáticas que son importadas a territorio nacional y que puede servir de punto de partida para el diseño de sistemas donde se realizan las pruebas de alimentación.

Sin duda, el país requiere desarrollar normatividad en este sentido, tener una base para el adecuado manejo y bienestar de los organismos acuáticos, así como de proveer de las

herramientas técnicas necesarias para los comités de bioética de diferentes instituciones académicas y/o investigación para la aprobación de protocolos de investigación que incluya el uso de estos organismos.

Por otro lado, es importante considerar que, a nivel internacional, la legislación para el cuidado y uso de organismos acuáticos se basa en la aplicación de las 3Rs (NRC 2011; Sloman et al. 2018): Reemplazo, Reducción y Refinamiento. Desarrollada por W. M. S. Russell y R. L. Burch en su libro “The principles of humane experimental technique” de 1959 y en el que se establecen las estrategias para reducir el dolor y estrés de animales en experimentos, mientras se mantiene la integridad científica. Recientemente se ha propuesto una R más, de **Rechazo** y que debería aplicarse a aquellos protocolos de investigación sometidos a los Comités de Bioética y que no demuestren la generación de nuevo conocimiento científico.

Como se ha mencionado anteriormente, México carece de una legislación adecuada sobre el mantenimiento y sacrificio de los organismos acuáticos que se utilizan en la investigación científica. La falta de normas genera dificultades para los Comités de Bioética para evaluar los protocolos de investigación que utilizan a estos organismos y regularmente, estos aspectos se pasan por alto cuando los proyectos se envían a revisión durante las convocatorias para obtener financiamiento. Por ello, la estrategia de las 3Rs debería de aplicarse al proponer un protocolo de investigación y al revisarse para su aprobación, con el fin último de mantener el bienestar de los organismos. El manejo ético de peces y crustáceos debe de ser una de las prioridades de los profesionistas que trabajan en investigación relacionada con acuicultura.

Capitulo 1.
Pruebas de alimentación

I. Introducción

La Acuicultura se define como la “producción de organismos acuáticos bajo condiciones controladas en al menos una etapa de desarrollo”. Esta actividad tiene siglos de desarrollarse en diferentes países del mundo, pero es en las últimas décadas se ha intensificado con un crecimiento promedio anual del 8% y actualmente produce cerca del 50% de los productos pesqueros que se consumen en el mundo (FAO 2022).

El crecimiento de la producción de esta actividad se debe a una combinación de diversos factores relacionados con el desarrollo tecnológico en el manejo de la calidad de agua y de enfermedades; pero sin duda, uno de los más importantes es el desarrollo y la utilización de alimentos balanceados durante las diferentes fases del ciclo productivo. Los alimentos proveen de la energía y nutrientes suficientes para que los organismos acuáticos puedan crecer y reproducirse bajo condiciones de cultivo intensivo. Dichos alimentos son el resultado de décadas de estudio en una rama de investigación que se denomina Nutrición en Acuicultura o de organismos acuáticos.

La nutrición de organismos acuáticos es un campo de estudio relativamente nuevo, cuando se compara con la nutrición de animales terrestres y de humanos (Hardy 2022a). Gran parte del desarrollo de este campo se ha dado después de la década de los 50s del siglo XX y de acuerdo con Hardy (2022b) el periodo entre 1958 y el 2000 se denomina como la era dorada de la investigación en la nutrición de organismos acuáticos, pues se han determinado la mayor parte de los requerimientos de las especies de importancia comercial. Para estas especies ya existen formulaciones de alimentos balanceados bien establecidas y actualmente la investigación está dirigida hacia el uso y el efecto de diferentes ingredientes en los alimentos, por ejemplo, fuentes alternativas de proteína (harinas de origen vegetal o animal) o de lípidos (aceites vegetales o de origen animal no convencionales). Así mismo, se determina el efecto de suplementos alimenticios como probióticos (bacterias, levaduras) o prebióticos (fibras y otros carbohidratos) u otros compuestos con potencial de mejorar el crecimiento o la respuesta inmune de los organismos.

Por otro lado, en especies emergentes o con potencial de cultivo se desarrollan investigaciones en la determinación de requerimientos de nutriente (por ejemplo, macronutrientes como proteínas, lípidos o carbohidratos; así como aminoácidos, ácidos grasos y micronutrientes, como vitaminas y/o minerales) en un estadio particular del ciclo de vida y con el objetivo de desarrollar los alimentos balanceados.

Considerando esto, las pruebas de alimentación son el diseño experimental más utilizado en la investigación en Nutrición y una parte indispensable en el desarrollo del conocimiento de los requerimientos nutricionales de organismos acuáticos. Este tipo de pruebas es ampliamente utilizado en el mundo y a continuación se enumeran algunos pasos necesarios para desarrollarlas en forma ordenada y obtener resultados que sean fiables y representativos de una respuesta biológica normal.

II. Diseño y desarrollo de pruebas de alimentación

El diseño experimental. Como ya se ha comentado, el desarrollo experimental más común en la investigación de nutrición es la prueba de alimentación, que se define como un diseño para establecer los efectos comparativos de diferentes tratamientos (alimentos, niveles de nutrientes específicos, etc.) sobre un grupo de organismos y durante un periodo determinado.

Considerando que las pruebas de alimentación son parte importante del proceso de investigación, es necesario hacer una planeación y diseño adecuados para la obtención de resultados confiables, representativos, reproducibles y que puedan ser tratados estadísticamente. Como en cualquier otro diseño experimental, las pruebas de alimentación requieren de una serie de pasos durante su planeación:

- i. Pregunta de investigación. Una parte fundamental del diseño experimental es el planteamiento de la pregunta de investigación, es decir, a qué problema se le quiere dar solución y permite definir el camino de la investigación.
- ii. Hipótesis. Es una proposición que no ha sido corroborada, pero se formula con base en indicios recopilados previamente.

iii. Objetivos. En este paso se establece el alcance global de la investigación (objetivo general) y será completado por medio de los objetivos particulares.

Durante el planteamiento de la pregunta de investigación, la hipótesis y los objetivos, se debe considerar la estrategia de las 3Rs: reemplazo, reducción y refinamiento. Presentada por primera vez por W. M. S Russell y R. L. Burch en 1959 en el libro “The principles of humane experimental technique”, esta estrategia tiene como objetivo reducir el dolor y estrés de animales en experimentos, mientras se mantiene la integridad científica. De acuerdo con la página web del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, <https://www.nal.usda.gov/animal-health-and-welfare/animal-use-alternatives>) los conceptos para esta estrategia son:

El **reemplazo** se refiere a si verdaderamente se requiere utilizar animales vivos en un experimento o hay la posibilidad de usar algún sustituto. Por ejemplo, si se determinará el efecto de alguna vitamina en la respuesta fisiológica de un órgano particular, se debe establecer si es necesario utilizar a un grupo de organismos para alimentarlos con diferentes concentraciones de la mencionada vitamina por un periodo determinado o si se puede utilizar un cultivo celular y analizar las respuestas de forma más directa. La respuesta del reemplazo depende de varios factores, pero sin duda los principales son las capacidades de infraestructura y económicas con las se cuenta: siguiendo con el ejemplo anterior, debe valorarse si para el cultivo se cuenta con una línea celular específica o se debe sacrificar organismos para obtener el órgano necesario y establecer el cultivo (se debe considerar también cuantos individuos se requieren para obtener células viables para establecerlo). Así mismo, si se cuenta con el presupuesto, el equipo, los materiales y reactivos para desarrollar este tipo de pruebas.

Después de este análisis sobre el reemplazo y si la respuesta final es que no se pueden reemplazar, entonces se debe considerar la utilización de un número mínimo de organismos (**reducción**) que permita la obtención de resultados confiables, representativos y reproducibles. Para esta parte es importante definir las respuestas que se pretenden medir al finalizar la prueba y el tamaño de las muestras necesarias para realizar los análisis correspondientes. Por ejemplo, para realizar análisis químico-proximales en el hígado se

requieren muestras mínimas de 0.5 g para determinar el contenido de proteína cruda, 0.3 g para el contenido de lípidos totales y 0.5 g para cenizas. Por tanto, es necesario obtener muestras de al menos 1.3 g para estas determinaciones. Con esta información será posible establecer el número de organismos mínimo para desarrollar la prueba.

Finalmente, y ya que se han establecido el número de organismos a utilizar, se deben proponer protocolos que minimicen el sufrimiento animal, por medio del *refinamiento* de las técnicas a desarrollar para el manejo, anestesia y sacrificio de los organismos.

Desarrollo de las pruebas. Para la prueba se deben considerar la disponibilidad de los organismos y si estos se tienen que adquirir, los costos y el transporte hacia las instalaciones donde se realizará la prueba. Además, se deben estimar los costos económicos de los insumos para los alimentos, costos de luz, agua, el equipo para mantener a los organismos y espacios disponibles.

En atención a la estrategia de las 3Rs (NRC 2011; Sloman et al. 2018), la preparación de los tratamientos y para que los datos obtenidos de una prueba de alimentación puedan ser usados en un análisis estadístico robusto, deben de atenderse los siguientes puntos:

1. Al menos tres repeticiones por cada uno de los tratamientos establecidos.
2. Cada una de las repeticiones debe de tener al menos 5 organismos, aunque es importante señalar que en la medida en que el número inicial de organismos sea mayor, es mejor. Esto debido a que durante la prueba existe la posibilidad de que se presente mortalidad y con un número bajo de organismos, se corre el riesgo de perder las repeticiones. Y desde el punto de vista estadístico, mientras haya un número mayor de organismos, más representativos serán los resultados. Este punto podría considerarse como una contradicción a la parte de *reducción* de la estrategia de las 3Rs, pero esta indica que se utilicen el número mínimo de organismos para asegurar resultados confiables y representativos de la respuesta que se desea medir.
3. Los organismos deben de ser pesados y posteriormente colocados de forma aleatoria en cada una de las repeticiones.
4. El peso inicial de los organismos debe ser similar entre todos los grupos.

Alimentación de los organismos. Para la alimentación de los organismos durante la prueba, se puede utilizar alguno uno de los dos siguientes regímenes:

- i. *Ad libitum* o a saciedad. Los organismos de un tanque son alimentados manualmente hasta que todos han comido, pierden interés en el alimento, y llegado este punto, se asume que están saciados. Esta técnica funciona bien con peces de rápido consumo y suele ser muy útil cuando se requiere conocer con exactitud el consumo del alimento, ya que se sabe la cantidad que se ofreció a los organismos.
- ii. Raciones con base en la biomasa. En este régimen se utiliza un porcentaje establecido a partir de la biomasa total de cada tanque y después de los cálculos correspondientes, la cantidad de alimento resultante es la que se ofrece a los organismos por día. De acuerdo con la experiencia desarrollada en el Laboratorio de Producción Acuícola, se pueden utilizar los siguientes porcentajes de acuerdo con el estadio de desarrollo de los organismos con los que se está realizando la prueba (**Cuadro 1**). Se recomienda utilizarla en organismos que se alimentan lentamente, cómo los camarones y langostinos. Es importante señalar que la determinación del consumo de alimento puede ser inexacta, ya que al ofrecer la cantidad conocida de alimento existe la posibilidad de que no todo sea consumido y una parte se pierda, ya sea por la solubilidad de algunos de los ingredientes o porque el alimento no consumido no sea colectado en su totalidad.

Cuadro 1. Porcentajes recomendados para alimentar bajo el régimen de raciones con base en la biomasa.

Peso del individuo (g)	% de la biomasa total recomendado
Crías (0.5 – 10)	10-15
Juveniles (10-200)	5-7
Adultos (>200)	3-5

El uso de uno u otro de alimentación régimen depende de la especie con la que se esté trabajando, estadio de desarrollo, hábitos alimenticios, la cantidad de alimento disponible y el tiempo de duración de la prueba de alimentación.

Biometrías. A lo largo de la prueba de alimentación, se deben realizar mediciones periódicas de peso y longitud de los organismos con el objetivo de monitorear el crecimiento y ajustar el tamaño de la ración diaria de alimento, sí se esta utilizando un régimen de raciones. La periodicidad para la obtención de dichas mediciones (a las que se les denomina biometrías) dependen de las especies y del estadio de desarrollo. Generalmente no se recomienda hacer biometrías en los estadios larvarios, ya que durante esta etapa los organismos son muy susceptibles al estrés causado por sacarlos del agua y medirlos o pesarlo, ocasionado fácilmente la muerte. En el caso de organismos en estadio de juvenil, se deben realizar las biometrías cada 10 días para peces y 15 ó 20 días para crustáceos. En el caso de adultos, la velocidad de crecimiento es muy baja y se pueden hacer mediciones mensuales.



Figura 1. Diferentes aspectos de biometrías realizadas en organismos acuáticos: **A** y **B** pesaje de crías de trucha arcoíris. **C** medición de la longitud total (incluyendo el largo

segundo par de periopodos) y **D**, pesaje de machos del langostino *Macrobrachium acanthurus*.

Al término de la prueba de alimentación es necesario realizar una biometría final, así como hacer la colecta de las muestras para análisis posteriores. Es importante enfatizar que al realizar todas las biometrías y para disminuir el estrés causado por la manipulación fuera del agua, es necesario anestésiar a los organismos.

Duración. La duración de una prueba de alimentación puede depender de varios factores, pero lo más importante es la respuesta esperada de los organismos al tratamiento al que son sometidos. La naturaleza química y el papel metabólico de los nutrientes con los que se está trabajando, son importantes a considerar para establecer la duración de una prueba. En nutrientes solubles en agua, por ejemplo los aminoácidos indispensables (aquellos que se requieren obligatoriamente en la dieta, debido a que no es posible sintetizarlos por el metabolismo), se observan los efectos de la deficiencia en dos meses aproximadamente. En el caso de los nutrientes solubles en lípidos (por ejemplo, vitaminas como la A, E, D y K), los signos de deficiencia empiezan a aparecer hasta después 4 meses.

Otro aspecto importante es la etapa de desarrollo de los organismos, en general los estadios de larvarios y en juveniles son más susceptibles a la deficiencia de nutrientes. Debido a que durante el desarrollo y el crecimiento se requiere de un flujo constante de nutrientes y a que los organismos no cuentan con reservas almacenadas, estas etapas de desarrollo son más susceptibles a las deficiencias nutricionales.

La supervivencia también es un factor para considerar, ya que cuando se registran valores menores al 30% en alguno de los tratamientos, se recomienda terminarla. Si no hay signos de alguna enfermedad causada por un organismo patógeno o por factores ambientales, el tratamiento está afectando el desarrollo y el crecimiento.

Capitulo 2.
Manejo ético de los organismos

Como se ha mencionado, las pruebas de alimentación son la base de los estudios en nutrición de organismos acuáticos y al planificar el desarrollo de una prueba de este tipo, deben considerarse diversos aspectos (espacio físico donde se realizará, estructuras de contención, etc.), así como un diseño experimental que permita la obtención de resultados científicamente válidos y también el bienestar de los organismos que se utilizarán en dicha prueba. Esto último es fundamental, ya que solo los datos obtenidos a partir de animales saludables y con comportamientos normales pueden ser considerados como representativos de una función biológica normal (AVMA 2020).

Considerando esto y como una parte medular del manejo ético hacia los organismos, es de suma importancia que los organismos utilizados en las pruebas, estén libres de:

- a) Situaciones que generen estrés, particularmente en situaciones prolongadas y/o
- b) Estímulos que puedan ser dañinos y llevar a situaciones de cambios de comportamiento o en las funciones fisiológicas normales.

I. Estrés

El estrés se define como una cascada de eventos fisiológicos que ocurren cuando un organismo intenta reestablecer su balance homeostático ante un cambio en las condiciones normales de desarrollo (Schreck et al. 2016). Bajo una condición de estrés (aguda o crónica), los organismos realizan cambios fisiológicos que les permite adaptarse a las nuevas condiciones. Se reconocen tres etapas en la respuesta al estrés, las dos primeras relacionadas a eventos de corto tiempo y la tercera a exposición de largo plazo. Las dos primeras pueden observarse modificaciones en la conducta y cambios a nivel fisiológico, durante la tercera se observan cambios a un nivel más profundo (NCR 2011).

La primera etapa se caracteriza por un aumento en el movimiento de los opérculos, cambios en el nado y conductas repetitivas de escape. Desde el punto de vista fisiológico, en esta etapa se liberan catecolaminas y corticosteroides. La segunda etapa empieza después de los 30 minutos de iniciar la primera y se caracteriza por un aumento en la glucosa en sangre, en el ritmo cardiaco, en la excreción de orina y algunos cambios en el

comportamiento, como nado errático o falta total de este. La tercera etapa se asocia a la exposición de largo plazo (estrés crónico) e incluye efectos como la propensión a enfermedades, disminución en el crecimiento y la reproducción.

¿Qué hacer durante las pruebas de alimentación para reducir situaciones de estrés en los organismos acuáticos que están en algún tratamiento? Lo primero que debe es proveer a los organismos de condiciones adecuadas de desarrollo: dependiendo de cada especie, se debe considerar el espacio suficiente y la calidad de agua similar en la que se desarrollan naturalmente los organismos.

Estructuras de confinamiento. Regularmente las pruebas de alimentación se realizan en estructuras de confinamiento, por ejemplo, peceras, tanques o estanques (**Figura 2**) y cuentan con un volumen limitado de agua, por lo que las condiciones ambientales en estos sistemas pueden cambiar rápidamente. Por ello, es necesario considerar la capacidad de carga, la cual se establece con respecto a la cantidad de organismos por unidad de volumen o por la biomasa que representan dicho número de organismos. Aunque la capacidad de carga de una estructura de contención puede variar de acuerdo con el equipo y la tecnología instalada, existen rangos que no pueden sobrepasarse. La información disponible señala que bajo condiciones normales en un tanque de agua dulce pueden mantenerse un total de 1.0 gramos de pez por litro de agua, es decir un total de 80 g en un acuario estándar de 80 litros o 200 peces de hasta una talla de 2 cm (Olivier y Kaiser 1997). Con respecto a peces marinos y debido a la compleja estructura química del agua marina, la capacidad de carga de estructuras de contención de esta naturaleza disminuye considerablemente con respecto a las de agua dulce. Se considera adecuado un total de 0.5 gramos de pez por litro de agua, es decir un total de 40 g en un acuario estándar de 80 litros o 40 peces de una talla de 2 cm aproximadamente (Wong y Benzie 2003). La información sobre crustáceos no está disponible y aunque es posible seguir las recomendaciones para peces, pero muchas especies son agresivas y la densidad debería ser menor o considerar los puntos que posteriormente se detallan.



Figura 2. Diferentes estructuras de contención que pueden ser utilizadas en las pruebas de alimentación: **A**, tanques de polipropileno de 500 L (flujo cerrado). **B**, sistema de recirculación con 3 tanques de polipropileno de 100 L. **C**, estanques de cemento (flujo abierto). **D**, tanques de fibra de vidrio de 1,500 L (flujo abierto). **E**, tanques de vidrio también, conocidos como peceras o acuarios, de 40 L.

Calidad de agua. Respecto a la calidad del agua (AFS 2014), las estructuras de confinamiento deben de contar con sistemas de filtración eficientes (adecuados al volumen) cuando son de flujo cerrado y es recomendable que la filtración sea mecánica, biológica y química. Además, se debe de contar con aireación continua y sistemas de mantenimiento de temperatura. Las revisiones periódicas de parámetros fisicoquímicos del agua, como oxígeno disuelto, concentración de nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos, pH, dureza, alcalinidad y/o salinidad, deben de ser parte integral del mantenimiento, ya que permiten tomar medidas correctivas ante modificaciones en las condiciones ambientales.



Figura 3. Aspectos de la determinación de parámetros fisicoquímicos del agua para monitorear la calidad del agua durante pruebas de alimentación: **A**, determinación de oxígeno disuelto y temperatura en una pecera con langostinos. **B** y **C**, determinaciones de nitrógeno amoniacal.

Respecto al mantenimiento de la calidad del agua, los sistemas de recirculación son una opción para el desarrollo de pruebas de alimentación. Estos sistemas constan, regularmente, de un filtro (usualmente de tipo mecánico y/o biológico, aunque puede incluir algún tipo de un sistema de desinfección como una lámpara de luz UV o un generador de ozono), un depósito de agua, una bomba y los tanques (**Figura 4**). Estos sistemas tienen algunas ventajas con respecto al uso de estructuras de contención individuales, pues al tener un volumen mayor (considerando el de los tanques más el del depósito de agua) la química del agua es más estable. Así mismo, el uso continuo del agua permite la reducción en el consumo y también el de la energía eléctrica. Sin embargo, también debe considerarse que los organismos mantenidos en este tipo de sistemas deben de monitorearse

continuamente, con el objetivo de detectar algún brote de enfermedad y evitar que se disperse a los otros tanques.

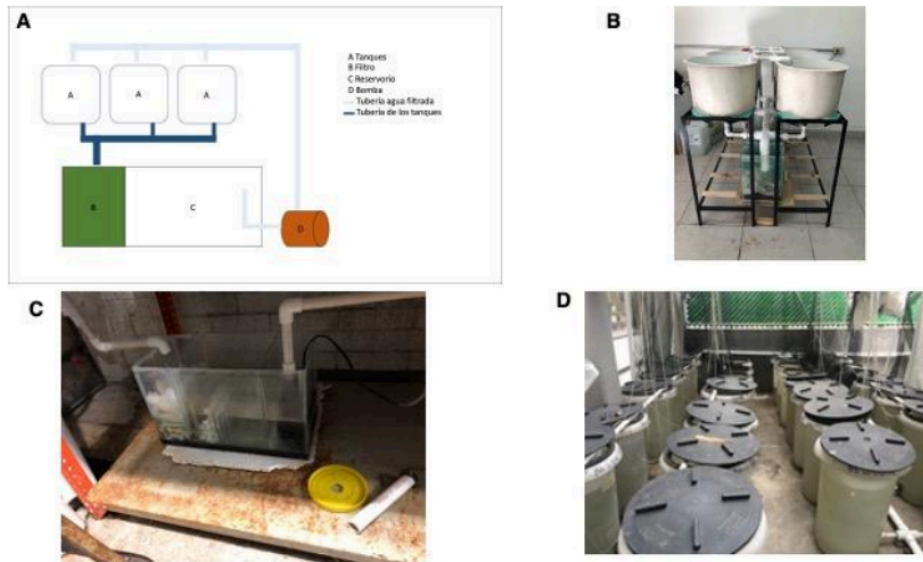


Figura 4. Sistemas de recirculación que pueden ser utilizados en las pruebas de alimentación: **A**, esquema general de un sistema de recirculación y la descripción de las partes. **B**, sistema de recirculación de 6 tanques de fibra de vidrio. **C**, detalle de un filtro de sistema de recirculación. **D**, sistema de 32 tanques de polipropileno.

Interacciones sociales. La interacción social de los organismos siempre se presenta en un grupo de organismos, pero es particularmente crítico en especies territoriales y es otro posible factor que genera estrés. Las agresiones constantes entre los organismos y particularmente de individuos dominantes al resto de los animales de forma continua, son una de las causas de estrés más frecuentes durante las pruebas de alimentación. En estos casos, la estrategia más común para disminuir agresiones es proveer de estructuras de resguardo a los organismos no dominantes (**Figura 5**). Aunque depende de las especies, también se recomienda aumentar el número de individuos para “distribuir” la agresión entre los organismos y en este caso, se recomienda utilizar estructuras de contención de un

mayor volumen. Finalmente, también se pueden usar refugios dentro de los mismos tanques para generar espacios individuales para cada uno de los organismos.

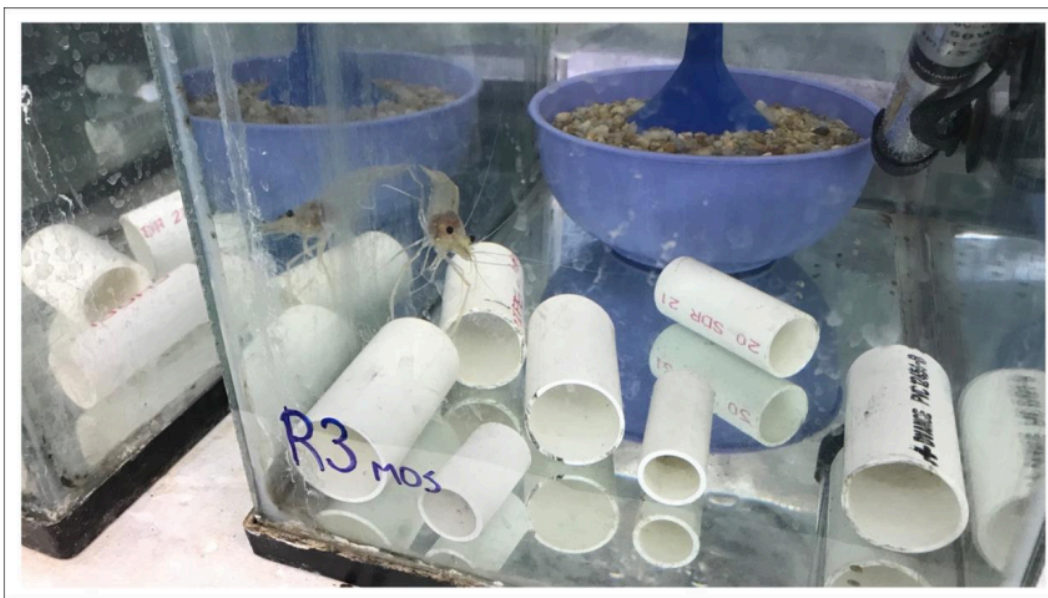


Figura 5. Estructuras de resguardo (tubos de PVC) en un tanque con langostinos y que permiten disminuir la agresión de organismos dominantes durante una prueba de alimentación.

Biometrías. Otro aspecto importante con potencial de generar estrés en los organismos es el muestreo para obtener datos de peso y/o longitud, conocido como biometría. El desarrollo de las biometrías implica capturar a los organismos, extraerlos del agua y manipularlos para obtener las medidas mencionadas. Aunque puede considerarse como un periodo muy corto de tiempo, el estrés causado puede incluso llevar a la muerte a los organismos. Por ello, es necesario anestésiar a los organismos antes de realizar las mediciones correspondientes.

Sin duda, la reducción del estrés al mantener condiciones ambientales óptimas de desarrollo de los individuos que se utilizan en una prueba de alimentación contribuye con el bienestar animal y con la obtención de datos que pueden considerarse como normales.

II. Estímulos dañinos (dolor y nocicepción)

Otra parte del manejo ético hacia los organismos corresponde a evitar el daño innecesario de los animales antes, durante y posterior a la toma de las muestras para análisis (AVMA 2020).

En este punto, existe un fuerte debate sobre si los organismos acuáticos (principalmente peces y crustáceos) sienten dolor. El concepto de dolor implica que se detecte un estímulo dañino y que este sea asumido conscientemente, es decir que el estímulo sea detectado y expresado de forma consiente. Por tanto, el dolor es una experiencia psicológica que implica tanto la percepción, como la parte emocional. Por otro lado, el concepto de nocicepción hace referencia a la detección de un estímulo dañino por parte del sistema nervioso exclusivamente.

Recientemente la AVMA (2020) señaló que al menos el grupo de los peces deberían de tener las mismas consideraciones respecto al manejo del dolor que los vertebrados terrestres. Esto debido a que el sistema nervioso de los peces es similar al de los vertebrados terrestres y se ha demostrado que las respuestas dolorosas en estos organismos no solo son reflejos.

En el caso de los crustáceos, todavía se debate si experimentan dolor o solo nocicepción, pero en todo caso responden de alguna forma a los estímulos dañinos.

Durante las pruebas de alimentación, se pueden realizar diferentes muestreos y pueden incluir la toma de peso y talla, así como de toma de muestras de sangre y de órganos. Para estas últimas, se utilizan técnicas intrusivas, lo que en la mayoría de los casos conlleva al sacrificio.

Para la obtención del peso y la talla se recomienda el uso de anestésicos, que permiten una disminución en el estrés ocasionado por sacarlos del agua, así como un mejor manejo de los organismos.

De la misma forma, las técnicas intrusivas para la toma de muestras de sangre y órganos requieren del sacrificio de los organismos. En estos casos, es indispensable anestesiarse a los organismos para evitar cualquier sufrimiento innecesario en primera instancia y reducir al

máximo que los organismos no presenten nocicepción, ya que los estímulos dañinos generan diversos cambios a nivel fisiológico y que pueden influir negativamente en algunas de las respuestas que se buscan medir (Readman et al. 2017).

III. Comités o comisiones de bioética.

De acuerdo con la NRC (2011) y la AFS (2014) las instituciones de educación e investigación deben de contar con comités o comisiones académicas de ética o bioética. Aunque depende de cada una de estas instituciones académicas, en general se recomienda que estos órganos colegiados regularmente son propuestos por el director de la institución y debe de estar conformado por al menos 3 personas, un investigador en activo y con cierta preparación en aspectos bioéticos, un médico veterinario, así como una persona quien no esté relacionada directamente con el área científica. Es importante señalar que al menos uno de los integrantes del comité debe de ser externo a la institución.

La comisión está encargada de revisar los protocolos de investigación en los que se propone utilizar organismos, así como de aprobarlos o proveer de opiniones a los investigadores proponentes de formas más adecuadas de manejo y cuidado de los organismos. Las opiniones vertidas por este comité deben de estar fundamentadas en las normas oficiales aprobadas por los gobiernos federales y estatales o en el caso de que no exista una legislación vigente, en propuestas de otros países.

Los comités también supervisan que los proyectos de investigación aprobados cumplan con lo estipulado en los protocolos presentados y generar de nueva cuenta, opiniones para corregir aquello que no se ajusta y en su caso, suspender las actividades del proyecto cuando hay violaciones graves a la integridad de los participantes de las actividades de investigación y efectos nocivos sobre los organismos.

Así mismo, tendrán la facultad de escuchar preocupaciones o quejas de personal relacionado con un proyecto de investigación sobre seguridad e integridad de los participantes y organismos.

Como ya se mencionó, México no se cuenta con una normatividad sobre bienestar de organismos acuáticos en proyectos de investigación y las que están disponibles son sobre vertebrados terrestres y difícilmente pueden adaptarse al ambiente acuático. Por ello, los comités de bioéticas establecidos en diferentes instituciones nacionales de investigación y de educación superior necesitan recurrir a normatividades internacionales para avalar proyectos de investigación relacionados con organismos acuáticos. Particularmente, en la FES Iztacala existe una Comisión de Ética (<http://antares.iztacala.unam.mx/cetica/> acceso en octubre de 2022) y que tiene como propósitos:

1. El cumplimiento de la normatividad nacional e internacional en lo relacionado con los problemas éticos que surjan en sus instalaciones, sedes alternas de investigación o docencia y en su inserción a la comunidad.
2. La salud y la defensa de la vida de los humanos y demás seres vivos.
3. El desarrollo de un criterio ético en su comunidad, directamente o apoyando a los comités respectivos internos o externos.
4. La formación de sus egresados con un criterio bioético y el conocimiento de la normatividad nacional e internacional.
5. Conductas éticas en todas las acciones de docencia, investigación y servicio relacionadas con la experimentación, la conservación y/o recuperación de los ecosistemas.
6. Que se constituya la CE en la FESI como un órgano de consulta y opinión en la elaboración de documentos, manuales y normas oficiales en materia de Ética, así como la implementación de una cultura ética.

También la FES Iztacala cuenta con Comisión de Bioseguridad (https://www.iztacala.unam.mx/fesi_bioseguridad.php acceso en octubre de 2022) y que tiene como función principal la revisión de proyectos de investigación que incluya el uso de organismos patógenos y/o sustancias radioactivas, así como el manejo de residuos biológico-infecciosos y químico peligrosos.

En estas comisiones se revisan los proyectos de investigación que involucren el uso de organismos y/o de sustancias que puedan afectar la salud humana. Es importante señalar que los proyectos de investigación requieren del aval de ambas comisiones antes de realizar

cualquier actividad. Es necesario presentar el protocolo de investigación, en el que se debe de describir a detalle el uso de organismos, las condiciones de mantenimiento, obtención de muestras, anestésicos a utilizar y técnicas de sacrificio en caso de ser necesario, así como las condiciones en las que los restos de los organismos se dispondrán finalmente.

Actualmente muchas instituciones que financian propuestas de investigación con organismos acuáticos empiezan a solicitar los avales de los comités de bioética para considerar incluso la revisión de un proyecto de investigación. Así mismo, cuando se somete un manuscrito para su publicación, las revistas internacionales y/o con factor de impacto, requieren también de la aprobación del protocolo de investigación por parte de estos comités de las instituciones de los autores donde se realizaron las pruebas de alimentación. Debido a ello, es inevitable que la aprobación por parte de los comités de bioética de protocolos de investigación sea un requisito para el desarrollo en el campo de la nutrición de organismos acuáticos.

Capitulo 3.
Uso de anestésicos para toma de muestras y
sacrificio

I. Anestesia y anestésicos, definiciones

Durante el desarrollo de las pruebas de alimentación es común que los organismos sean sometidos a periodos de estrés, particularmente cuando se realizan las biometrías, proceso en el que se toma el peso y la longitud. Durante estos procedimientos, los organismos requieren ser sacados del agua, manipulados para pesarlos y medirlos. Aunque este proceso debe ser rápido (no más de 3 minutos por organismos), el estrés puede generar efectos negativos en los organismos e incluso puede ser fatal para algunos estadios de desarrollo o para algunas especies (Neiffer y Stamper 2009).

Inducir un estado de anestesia es una práctica muy común para minimizar el estrés causado por la manipulación en organismos acuáticos. La anestesia se define como un estado biológico con la pérdida parcial o total de las sensaciones o del control voluntario del sistema neuromotor y es inducido por agentes químicos, conocidos como anestésicos.

Un agente anestésico debe de inducir el estado de anestesia lo más rápido posible, minimizando reacciones de hiperactividad o estrés en los organismos. Así mismo, debe ser de fácil aplicación y mantener al organismo anestesiado en el estado deseado. Los organismos deben de recuperarse lo más pronto posible, una vez que son removidos completamente del contacto con el anestésico. El agente anestésico debe de ser efectivo a concentraciones bajas y la concentración considerada como tóxica o sobredosis, debe de exceder por mucho a la dosis efectiva, para que se cuente con amplio margen de seguridad al aplicarlo. Es importante también que muestre alta solubilidad en agua dulce y marina, que sea fácil de conseguir, económico y finalmente, no tóxico para los humanos.

Los anestésicos producen diferentes niveles o etapas de anestesia en los organismos acuáticos y se puede dividir en cuatro (Coyle et al. 2004):

Etapas I. Sedación, en la que se reducen el movimiento del cuerpo, de los opérculos y de la respiración.

Etapas II. Anestesia, en la que hay pérdida parcial del equilibrio, pero hay reacciones a estímulos táctiles.

Etapa III. Anestesia general o quirúrgica, con la pérdida total del equilibrio y sin reacciones a estímulos táctiles.

Etapa IV. Muerte, en la que se detienen la respiración y el latido del corazón causado por una sobredosis del anestésico.

Cada una de estas etapas puede alcanzarse dependiendo de la dosis del anestésico y tiempo de exposición al que se someten a los organismos. Aunque no es muy común en las pruebas de alimentación, mantener a los organismos durante tiempo prolongados en una de las etapas de anestesia mencionadas, puede lograrse reduciendo la dosis del anestésico, pues este tiene un efecto acumulativo en el cerebro y en los músculos del organismo aun cuando en sangre la concentración del anestésico haya alcanzado un equilibrio.

II. Anestesia en organismos acuáticos

a. Anestesia en peces. La forma más común de anestésarlos es por inmersión en un baño con la concentración adecuada del anestésico. Este último es absorbido a través de las branquias y rápidamente entra el sistema circulatorio de los organismos (Coyle et al. 2004).

El proceso más sencillo para la inmersión es la utilización de un recipiente con agua del tanque o pecera donde se mantienen a los organismos, con aireación continua y agregar el anestésico a la concentración adecuada (ver más adelante), colocar al organismo y esperar la inducción de la anestesia. Aunque depende del anestésico utilizado, este proceso tarda entre 30 segundos y dos minutos como máximo, ya que, durante las pruebas de alimentación, es recomendable que los peces lleguen máximo a la etapa III (anestesia general) cuando se realiza la toma de peso y longitud (**Figura 6**).

Posterior a la toma de los datos mencionados, es necesario colocar al organismo en agua libre del anestésico, con aireación constante y dejar que se recupere antes de regresarlo al tanque o pecera original.

En organismos muy grandes como adultos reproductores, la inmersión puede ser poco práctica e incluso inútil y por ello se recomienda utilizar el anestésico en una concentración adecuada (ver más adelante), colocarlo en una botella con espray y rociarlo directamente

en las branquias. Este procedimiento es adecuado cuando los organismos se desovan manualmente y no tiene efectos negativos sobre los huevos o espermatozoides obtenidos.



Figura 6. Juveniles de trucha arcoíris en la fase III de anestesia (pérdida total del equilibrio y sin reacciones a estímulos táctiles), durante una biometría.

b. Anestesia en crustáceos. Se tiene poca información respecto a la inducción de la anestesia en crustáceos, debido a que no se practica de forma cotidiana en procesos de manejo de los organismos. Los crustáceos responden de forma diferente a la anestesia a como lo hacen los peces, probablemente porque los anestésicos no afectan los sitios de recepción de las sinapsis. Por ello, muchos anestésicos no son eficaces y se requieren concentraciones mucho más altas que en peces o no muestran efecto alguno. La mejor forma de anestésicar a estos organismos es usando frío (**Figura 7**), aunque se debe de tener cuidado con el proceso ya que un enfriamiento excesivo puede causar la muerte (Coyle et al. 2005).



Figura 7. Juvenil de langostino *Macrobrachium acanthurus* anestesiado mediante enfriamiento del agua con hielo al finalizar una prueba de alimentación y listo para la toma de muestra.

III. Anestésicos más utilizados

Metasulfonato de tricaina o MS-222. Este anestésico es el químico más utilizado a nivel mundial para peces, pero no tiene efecto alguno en crustáceos. Es un polvo cristalino blanco, sin olor y con una solubilidad de 1 g por litro a una temperatura de 20°C. La vía de administración más común es través de baños de inmersión y se recomienda disolverlo en agua destilada e igualar el pH con el agua de donde provienen los organismos a anestésiar con bicarbonato de sodio. El MS-222 se absorbe a través de las branquias y la piel, para llegar al torrente sanguíneo y distribuirse en todo el cuerpo. En el músculo bloquea los canales de sodio y en menor medida la ruta del potasio en las membranas de los nervios, actuando como un relajante muscular. La eficacia del MS-222 depende de varios factores fisicoquímicos del agua, de la especie y estadio de desarrollo que se están utilizando.

En general, dosis de 25 a 250 mg/l son seguras de utilizar en baños de inmersión. En el **Cuadro 2** se presenta las dosis más adecuadas para peces de acuerdo con lo reportado por **Readman et al. (2017)**.

Cuadro 2. Dosis recomendadas para diferentes grupos de peces utilizando el anestésico MS-222.

Organismos	Sedación (mg/l)	Anestesia (mg/l)
Salmonidos, incluyendo a la trucha arcoíris	10-80	80-100
Especies de aguas tropicales, como tilapia y peces de ornato	25-75	100-250

El uso de MS-222 puede tener algunos efectos negativos al momento de introducir a los organismos al baño, entre los que se pueden mencionar la elevación de ritmo cardíaco y de la respiración, acompañado de niveles elevados de glucosa en sangre. Así mismo, se ha reportado que altera los índices bioquímicos del plasma sanguíneo, el patrón hematológico, marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes, por lo que no es recomendable su uso cuando se pretende medir dichos parámetros como respuesta a un tratamiento. Como se ha mencionado, este anestésico no presenta efecto alguno en los crustáceos, por lo que no debe de utilizarse en estos organismos.

Aceite de clavo. El aceite de clavo es un líquido café oscuro que se obtiene a partir de flores, tallos y hojas del árbol del clavo por medio de una destilación. **Los ingredientes activos del aceite de clavo son el eugenol e iso-eugenol, que comprenden el 95% del aceite.** Se absorbe principalmente en las branquias, aunque también puede ingresar al organismo por medio de la piel y debido a que es altamente lipofílico, una vez dentro del torrente sanguíneo, se absorbe rápidamente en los tejidos con alto contenido de grasa y en el cerebro.

En general, las dosis con aceite de clavo desde 2 a 150 mg/l son seguras de utilizar en baños de inmersión. En el **Cuadro 3** se presenta las dosis más adecuadas para los organismos acuáticos (Javahery et al. 2012; Priborsky y Velisek 2018).

Cuadro 3. Dosis recomendadas para diferentes grupos de peces y crustáceos utilizando aceite de clavo.

Organismos	Sedación (mg/l)	Anestesia (mg/l)
Salmonidos, incluyendo a la trucha arcoíris	2-5	40-60
Especies de aguas tropicales, como tilapia	10	40
Especies de ornato pequeñas	0.02	0.05
Crustáceos	100	200

El uso de aceite de clavo puede tener efectos negativos sobre algunos parámetros hematológicos y bioquímicos en muestras de sangre de los organismos, su uso repetido y prolongado afecta el consumo de alimento y el crecimiento.

Otros anestésicos. La benzocaína o etil aminobenzoato, es químicamente similar al MS-222. Es un polvo blanco que no es soluble en agua y su uso en organismos acuáticos requiere una disolución previa en etanol o acetona. Se puede utilizar en concentraciones de entre 25 a 100 mg/l en la mayoría de las especies, con un margen bastante bueno de seguridad, aunque este puede reducirse a temperaturas altas (Coyle et al. 2004).

El Aqui-S es un producto desarrollado en Nueva Zelanda y está compuesto por isoeugenol y polisorbato 80. Una dosis de 20 mg/l es efectiva para la mayoría de los organismos acuáticos y la inducción parece ser libre de estrés, pues suprime la liberación de cortisol. También se ha reportado que tiene efectos sobre los crustáceos, pero a concentraciones 10 veces más que en peces. Es importante señalar que este producto no está disponible en México, pero es posible solicitarlo a Estados Unidos (Coyle et al. 2004; Coyle et al. 2005).

IV. Sacrificio de los organismos

Al término de una prueba de alimentación es necesario obtener diferentes muestras de tejido de los organismos, con el objetivo de realizar análisis posteriores y entender de mejor manera el efecto de los alimentos utilizados a nivel fisiológico, bioquímico e incluso genético. La toma de muestras, en la mayoría de los casos, conlleva el sacrificio de los organismos pues se requiere de la disección de diferentes órganos para realizar los análisis correspondientes. Debido a que esto implica técnicas intrusivas, es necesario sacrificarlos de la forma más humana posible, evitando al máximo la nocicepción.

El sacrificio de los organismos se realiza, regularmente con una sobredosis de anestesia ya que evita que los organismos sufran y que las muestras representen lo más fielmente posible al estado normal. Es necesario, sin embargo, asegurar que el organismo este en al menos la etapa III y se recomienda la destrucción del cerebro y de la parte anterior de la medula espinal.

El proceso de toma de muestras con el sacrificio de los organismos puede realizarse en varias fases. Si se requiere la obtención de sangre, es necesario colocar al organismo en un baño con el anestésico y cuando llegue a la etapa III (pérdida total del equilibrio y sin respuesta a estímulos táctiles) se toman las muestras de sangre. Esto debido a que se requiere que el corazón continúe bombeando sangre y no haya coagulación al momento de tomar la muestra. Posteriormente, se debe de asegurar la muerte con la decapitación y la destrucción de la medula, proceso que debe hacerse rápidamente (AVMA 2020). Después de este proceso, se puede hacer la disección de los tejidos necesarios. En el caso de solo requerir muestras de tejidos, los organismos deben de colocarse en la anestesia y realizar el sacrificio ya mencionado.

En general, la dosis de MS-222 que causa la muerte de los organismos es mayor a los 400 mg/l por un periodo de 5 minutos, aunque depende de la especie y del estadio de desarrollo. En el caso del aceite de clavo, una dosis de mayor a los 200 mg/l es suficiente. Como se ha mencionado, los crustáceos no son susceptibles a la mayoría de los anestésicos o se requieren de una concentración alta para inducir apenas la anestesia. Por ello se recomienda para su sacrificio el uso de frío, aunque esto puede durar entre 20 y 30 minutos,

dependiendo de la especie y el estadio de desarrollo. Sin duda, el proceso causa estrés en los organismos, pero hasta el momento no existe otra técnica más efectiva. Regularmente los organismos se colocan en bolsas con agua del mismo tanque y se colocan en una temperatura de entre 2 y 4°C. Se puede utilizar un recipiente con hielo o colocarlos directamente en el refrigerador y observarlos constantemente.

Capitulo 4.
Obtención de muestras

Toma de muestras para análisis. Al término de las pruebas de alimentación es común la obtención de muestras de diferentes tejidos para determinar el efecto de los tratamientos sobre ellos (**Figura 8**).

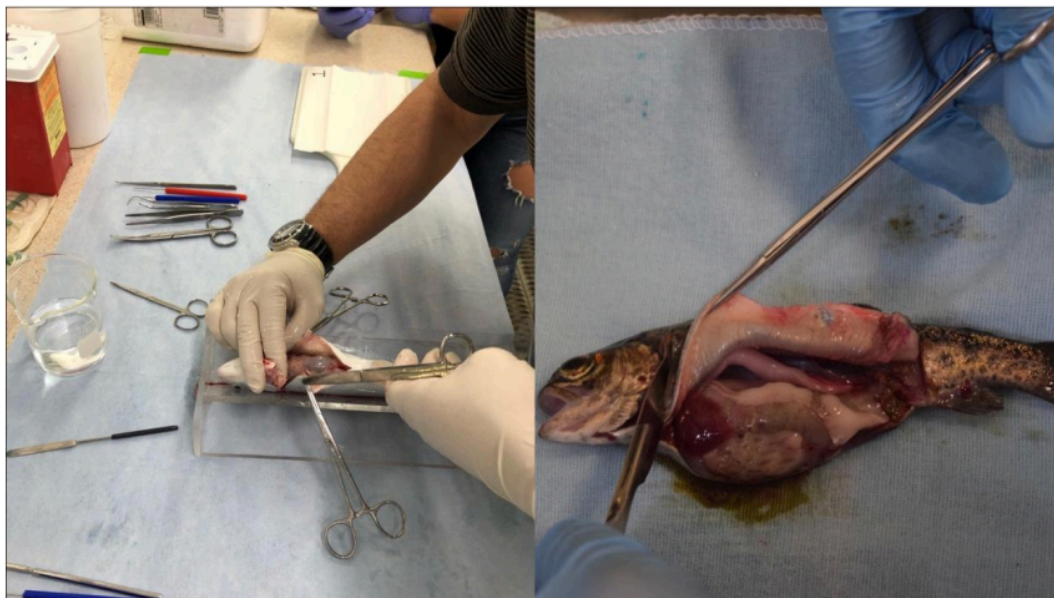


Figura 8. Algunos aspectos de la disección de juveniles de trucha arcoíris recién sacrificados para la obtención de muestras de tejido para análisis posteriores.

Sin duda, la toma de dichas muestras depende de lo establecido en los objetivos y se pueden incluir aquellas para determinar los contenidos de proteínas y/o lípidos, perfiles de aminoácidos y ácidos grasos, respuesta inmunológicas e incluso expresión de genes. Un aspecto importante que debe de ser tomado en cuenta para la realización de los muestreos es la preparación del material necesario de forma previa. Se debe considerar los materiales para anestesiarse a los organismos, para realizar la disección (charolas de disección, hojas de bisturí, tijeras, pinzas), los envases para la colecta de los tejidos (tubos previamente marcados con el tratamiento, el tipo de muestra y fecha del muestreo), así como de recipientes para mantener fríos o congelados los tejidos y materiales para la disposición de los desechos generados (papel periódico y bolsas de plástico).

Es recomendable realizar la disección de los órganos lo más rápido posible para evitar el deterioro de las estructuras o compuestos y que pueda afectar a los análisis que se realizaran posteriormente.

A continuación, se enlistan procedimientos generales para el manejo de las muestras de acuerdo con las técnicas de análisis de los tejidos:

a. Análisis químico-proximal. Para este tipo de análisis es muy común utilizar el cuerpo completo de los organismos, particularmente cuando estos son muy pequeños. También es posible determinar el efecto de algunos nutrientes en la composición proximal de diferentes órganos. Para el caso de organismos completos es altamente recomendable secarlos por medio de liofilización, ya que el secado con alta temperatura generada por un horno puede acelerar la descomposición de las muestras. Después de la liofilización, las muestras pueden mantenerse en tubos o bolsa de plástico, colocado en congelación entre -4 y -20 °C por máximo un año, aunque se recomienda hacer dichos análisis en un periodo no mayor a los 6 meses. Para el caso de órganos individuales, justo después de la disección pueden ser congelados inmediatamente y almacenarse en tubos o bolsas de plástico. También pueden ser liofilizados casi inmediatamente después de la disección. Debe de considerarse que algunos órganos tienen un alto contenido de agua (como el hígado) y durante el liofilizado se puede perder la mayor parte de la muestra. En todos los casos, las muestras deben de ser mantenidas en congelación entre -4 y -20° C por un periodo no mayor a los 6 meses.

b. Análisis bioquímicos. Para estos análisis se utilizan diferentes órganos, como músculo e hígado. Como en el caso de las muestras para análisis químico-proximal, las muestras pueden ser liofilizadas o procesadas directamente, y deben de congelarse inmediatamente después de la disección. Algunos análisis más comunes son las determinaciones de patrones de aminoácidos y/o ácidos grasos y deben mantenerse en congelación de -30° C por periodos no mayores las 3 meses.

c. Análisis de sangre. Las muestras de sangre deben de usarse de forma inmediata, especialmente si se requiere hacer una biometría hemática (tipos celulares y cantidad de cada uno de ellos). También es común utilizar el suero (se obtiene mediante la

centrifugación de la sangre sin la adición de anticoagulantes, después de dejarla coagular por 2 horas a 4 °C) o el plasma (se obtiene también mediante centrifugación, pero con la adición de anticoagulantes), los cuales se pueden ser congelados a -30° C por un periodo de no mayor a 10 días.

d. Análisis histológicos. Para el desarrollo de este tipo de técnicas es necesario utilizar un fijador como formol 4%, formol tamponado 4% o etanol 70%. Las muestras no requieren de refrigeración o congelación y pueden ser almacenadas por tiempo indefinido, aunque se recomienda realizar la técnica en un tiempo no mayor a 6 meses, pues las estructuras celulares pueden deteriorarse en el fijador, principalmente en formol sin ser tamponado.

e. Análisis inmunológicos. El procesamiento de las muestras para el determinar las respuestas inmunes depende prácticamente de cada técnica a desarrollar, pues se puede utilizar el órgano justo después de extraerlo (por ejemplo, la técnica de la actividad explosiva de los macrófagos requiere obtener los riñones, macerarlos y coleccionar inmediatamente las células para cultivarlas en un medio específico y posteriormente desarrollar la prueba) o congelar las muestras. Se recomienda que las muestras que puedan congelarse de forma inmediata y mantenerlas a -30° C y analizarlas dentro de los primero 30 días después de obtenerlas.

f. Análisis de la expresión de genes. Las muestras pueden tomar procesarse dependiendo de la rapidez con la que se realicen los análisis. Debido a que el ARN se desnaturaliza con facilidad después de la disección, es necesario estabilizarlo: si las muestras se procesarán justo después de obtener el tejido y en un periodo no mayor a una hora, se deben de colocar en hielo. Sí las muestras serán procesadas en el mismo día, pero no inmediatamente, se recomienda colocarlas en nitrógeno líquido para se congelen rápidamente y no haya perdida de ARN. Finalmente, sí los análisis no se realizarán dentro del primer día de la obtención de las muestras, lo mejor es colocarlas en una sustancia estabilizadora de ARN, como el RNAlater, congelarlas preferentemente a -80° C y analizarlas en un periodo no mayor a los 6 meses.

Anatomía de peces y crustáceos. La identificación de diferentes estructuras anatómicas externas e internas de los organismos acuáticos en experimentación es una parte importante durante la toma de muestras de los diferentes tejidos para su análisis posterior. A continuación, se presentan algunos esquemas de estructuras externas e internas en la trucha arcoíris y el langostino nativo *Macrobrachium acanthurus*.

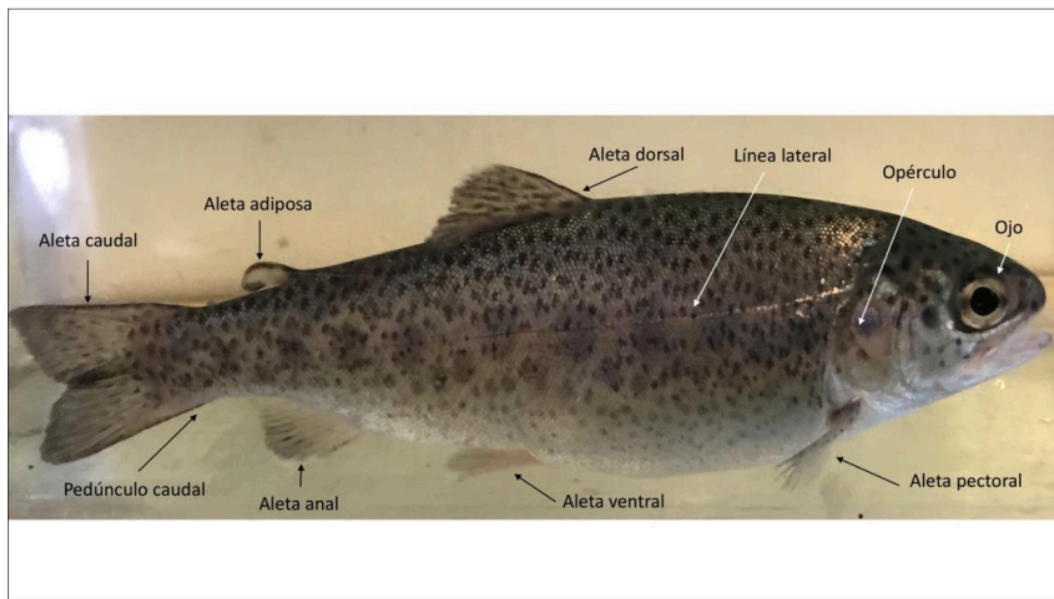


Figura 9. Estructuras externas de un juvenil de trucha arcoíris.

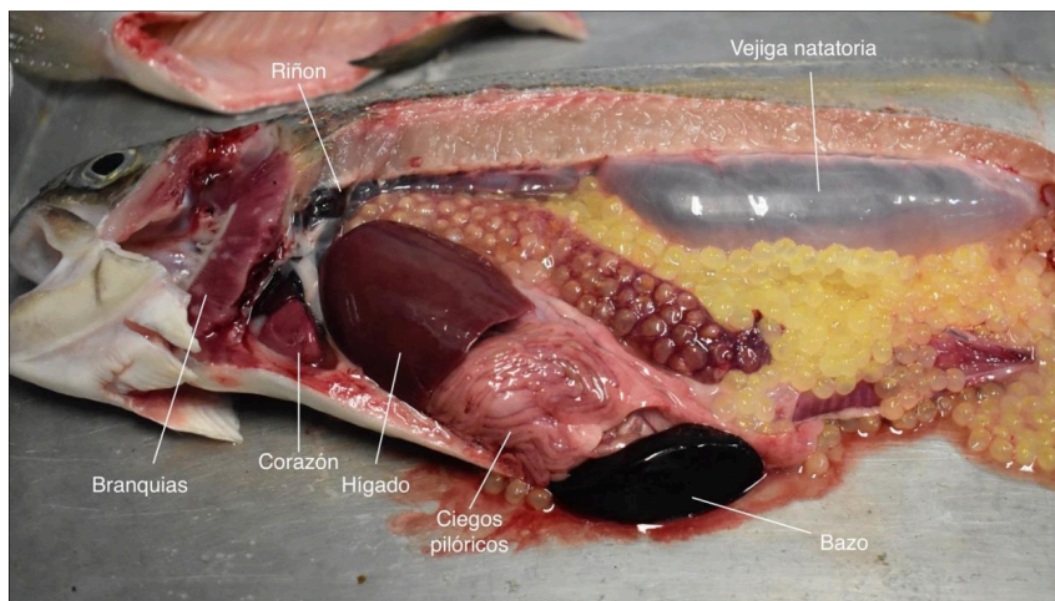


Figura 10. Estructuras internas de una trucha hembra y se observa el hígado, los ciegos pilóricos y los riñones, órganos susceptibles de colecta para análisis posteriores. También se observa el ovario con ovocitos en diferentes fases de desarrollo.

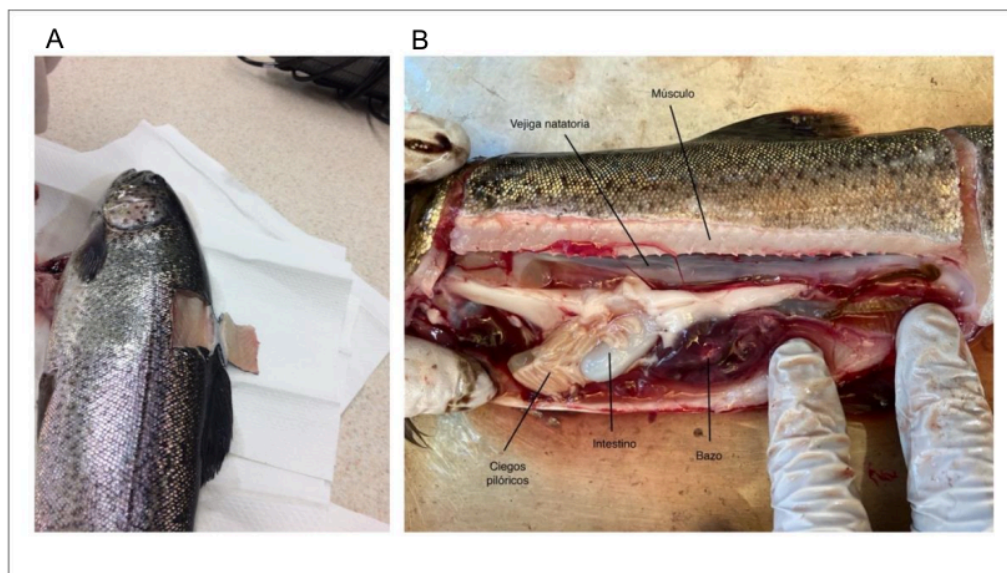


Figura 11. Estructuras internas en juveniles de trucha: A, corte en la parte dorsal para obtener muestras de músculo blanco. B, se observan otros tejidos que pueden ser colectados, ciegos pilóricos e intestino anterior.

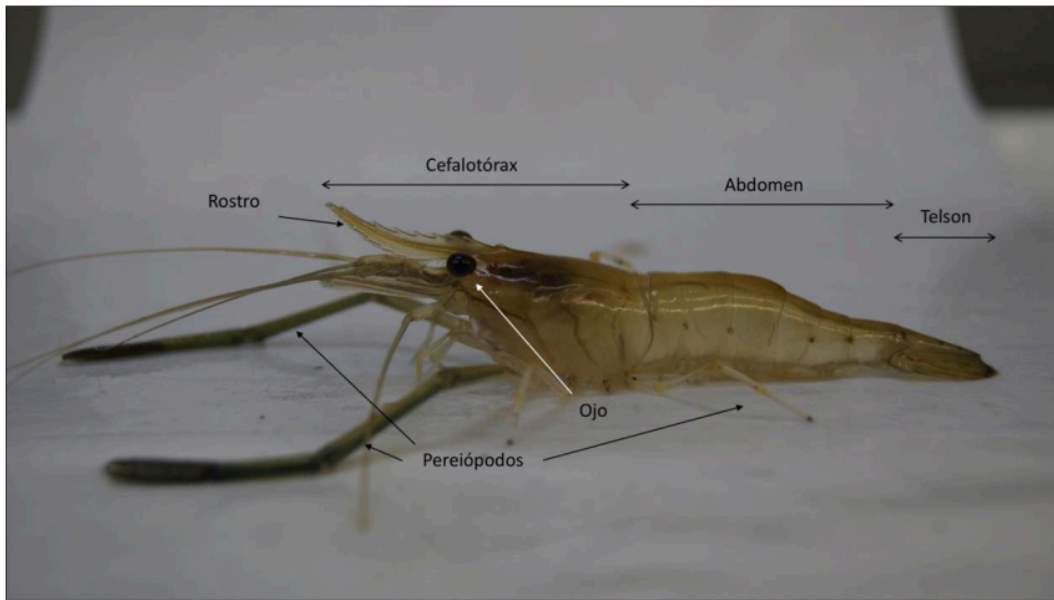


Figura 12. Esquemas de las estructuras externas de un langostino macho.

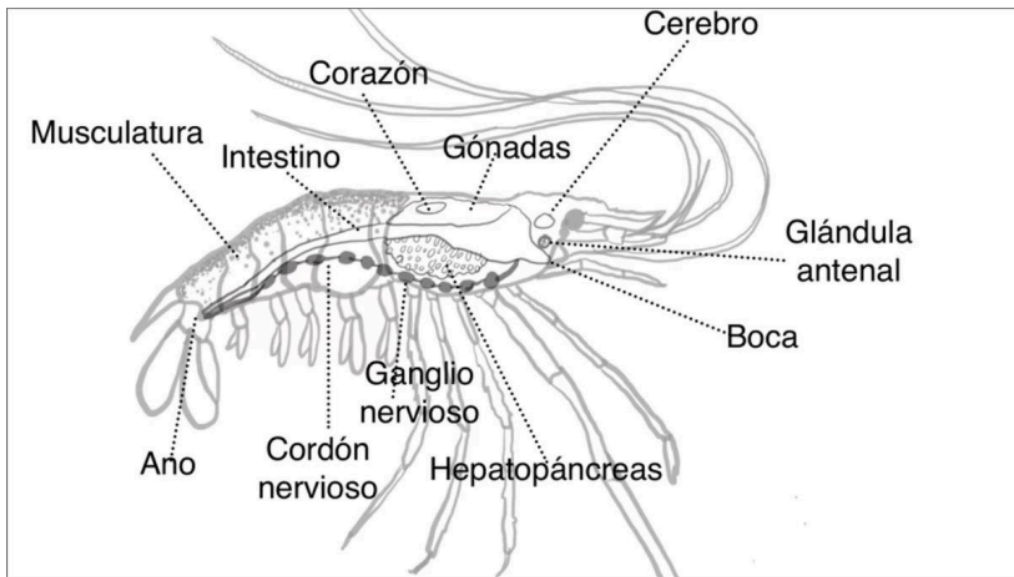


Figura 13. Esquema de las estructuras internas de langostino, el hepatopáncreas es el órgano donde se desarrollan la mayor parte de los procesos metabólicos de los crustáceos. También es posible tomar muestras de intestino y musculo.

Capitulo 5.
Parámetros de crecimiento

Al finalizar una prueba de alimentación, el crecimiento de los organismos es la respuesta más fácil de obtener e indicaría si un tratamiento tuvo un efecto sobre ellos. La determinación del crecimiento es muy útil en los peces y sus estadios de desarrollo como crías o juveniles. Bajo condiciones normales, los peces en estas etapas de desarrollo presentan tasas de crecimiento rápidas y los tratamientos con la deficiencia de algún nutriente tienen un efecto negativo sobre la velocidad del crecimiento de los organismos de forma notable.

En el caso de peces en organismos adultos o en proceso reproductivo, los diferentes índices son muy cercanos a cero, es decir, la velocidad de crecimiento disminuye notablemente. Esto se debe a que hay un cambio en el flujo energético; de generar aumento en la musculatura que permite el crecimiento de los organismos, la energía se dirige al desarrollo de gónadas y de los gametos, así como al desarrollo de caracteres sexuales secundarios.

El crecimiento en crustáceos en etapas de poslarvas y/o juveniles, debe recordarse, no es igual al de los peces. En el grupo de los crustáceos, el proceso se da en dos etapas: una propiamente de crecimiento y la otra es de muda del exoesqueleto (ecdisis), lo que genera escalonamiento en el desarrollo de los organismos. Por otro lado, en adultos y organismos en proceso reproductivo, se presenta también un cambio en el uso de energía que pasa del crecimiento al desarrollo de gónadas y gametos.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes índices para estimar el crecimiento y en nutrición de organismos acuáticos, el peso es la variable que se prefiere utilizar. Sin embargo, algunas veces es recomendable tomar también la longitud para poder calcular algunos otros parámetros.

Es importante señalar que los índices descritos a continuación se deben calcular con base en medidas individuales, es decir, considerando el peso de cada individuo de ser posible o el peso promedio por individuo.

Sin duda y considerando un escenario ideal, debería ser posible tomar medidas individuales de los organismos usados en una prueba. Esto puede lograrse mediante un

proceso de marcaje para cada individuo y que permita su fácil identificación a lo largo y al final de la prueba. Existen diversos tipos de marcas que pueden ser utilizados en peces, desde cintas identificadoras que se colocan en el pedúnculo caudal a etiquetas que se implanta en el ojo o chips que pueden ser colocados de forma intramuscular. El uso de estas técnicas de marcaje son caras y consumen tiempo, pero se puede obtener información más detallada (Figura 14).



Figura 14. Aspectos de marcas en peces para la identificación de individuos: A, se observa la lectura de un chip de identificación insertado en el musculo dorsal de un macho de trucha arcoíris. B, etiqueta o tag en el ojo de un juvenil de trucha y un acercamiento de la cabeza del mismo organismo, donde se aprecia la etiqueta de color naranja justo a un lado del ojo.

Si no se cuentan con recursos para establecer un marcaje adecuado de todos los organismos que participan en la prueba de alimentación, es común utilizar el peso promedio por organismo: se toma un numero conocido de organismos y se pesan, tomando el promedio como medida individual. El uso de esta técnica es rápido y no presenta ningún esfuerzo técnico o económico, pero en definitiva no es tan exacta como la descrita anteriormente.

En cualquier caso, los índices que se utilizan más comúnmente para determinar el crecimiento de los organismos acuáticos son:

a. Peso final (PF). Aunque no se requiere realizar cálculos para determinar el peso final, es importante señalarlo como la variable de respuesta inmediata para determinar el efecto de un tratamiento. Se expresa en gramos por individuo.

b. Ganancia en peso (GP). Este índice establece la diferencia entre el peso obtenido al final de la prueba (P_f) y el peso registrado al inicio (P_i). Con ello, se obtiene el peso que un organismo ha ganado en un tiempo determinado y existen dos formas de expresarlo:

1. La primera solo considera la diferencia entre el peso inicial (P_i) y el peso final (P_f) y el resultado indica cuantos gramos gana un organismo en un tiempo determinado. También se le conoce como ganancia en peso absoluta (GPA) y la fórmula para calcularlo es:

$$GPA = P_f - P_i$$

2. La segunda forma de calcularlo es utilizando la diferencia entre los pesos final e inicial y multiplicarlos por 100, para obtener el porcentaje. En este caso, la información obtenida refiere al porcentaje que gana el organismo con respecto al peso inicial. La fórmula para calcularlo es:

$$GP = [(P_f - P_i) \div P_i] \times 100$$

c. Tasa de crecimiento específico (TCE). Como la GP, la TCE establece la diferencia del peso entre el inicio (P_i) y el final (P_f), pero considerando al tiempo (usualmente número de días) en la ecuación. La información obtenida en este caso refiere al porcentaje (del peso) que un organismo ganó por día, por lo que se expresa en %/día. Es importante señalar que los datos obtenidos de peso deben transformarse a logaritmo de base natural y en valores menores a 1, se obtienen valores negativos cuando se realiza la transformación a base natural. Por ello se recomienda transformar los valores de peso menores a 1 g y utilizar miligramos.

La fórmula para calcular la TCE es:

$$TCE = [(lnPf - lnPi) \div tiempo] \times 100$$

d. Tasa de eficiencia del alimento (TEA) y Tasa de conversión del alimento (TCA). En estos dos índices se utilizan los datos obtenidos de alimento consumido (en base seca) y la ganancia en peso de los organismos (en gramos) y ambas expresan la cantidad de alimento necesario para generar incremento de peso en los organismos. La fórmula para calcular la TEA es:

$$TEA = \text{ganancia en peso (g)} \div \text{peso total del alimento consumido en base seca (g)}$$

Por otro lado, la TCA es el recíproco de la TEA y la fórmula para calcularlo es:

$$TCA = \text{peso total del alimento consumido en base seca (g)} \\ \div \text{ganancia en peso (g)}$$

Los valores de la TEA regularmente se encuentran entre 0 y 1. El mejor aprovechamiento del alimento se encuentra con los valores cercanos a 1. Considerando, por ejemplo, que se requieren 10 kilogramos de alimento para que los organismos ganen 5 kilogramos de peso, nos da un valor de TEA de 0.5 ($5 \div 10 = 0.5$).

Por el contrario, los valores de la TCA están por arriba de 1 y considerando el ejemplo anterior, nos va un valor TCA de 2 ($10 \div 5 = 2$). Usualmente se considera que valores de entre 1.5 y 2.0 representan un mejor aprovechamiento del alimento, aunque en algunas especies como la trucha o el salmón, los valores pueden ser de entre 1.0 a 1.3, y considerados como normales.

Otro índice relacionado con la TEA, es la tasa de eficiencia de la proteína (TEP) en la que únicamente se sustituye el alimento por el contenido de proteína del alimento en cuestión.

e. Coeficiente térmico de crecimiento (CTC). Aunque este índice fue propuesto desde la década de los noventa del siglo pasado, apenas se empieza a usar de forma cotidiana en las publicaciones relacionadas con el desarrollo de pruebas de alimentación. El CTC pretende

sustituir a tasa de crecimiento específico (TCE), ya que se considera que esta última tiende a sobreestimar los pesos de los organismos entre los valores iniciales y finales. Al utilizar los valores de peso elevado a $1/3$, el CTC permite una mejor representación del crecimiento entre los valores iniciales y finales utilizados. Además, permitiría hacer comparaciones entre experimentos con la misma especie, pero con condiciones ambientales diferentes, particularmente en lo referente a la temperatura. Al utilizar la temperatura promedio durante la prueba de alimentación, se corrige el efecto de esta sobre el crecimiento de los organismos. Actualmente, ambos parámetros se utilizan para estimar el crecimiento y es recomendable calcular ambos.

La fórmula para calcular el CTC es (Powell et al. 2020):

$$CTC = [(Pf^{\frac{1}{3}} - Pi^{\frac{1}{3}}) \div (\text{tiempo} \times \text{temperatura promedio})] \times 100$$

f. Factor de condición (K). El factor de condición es un índice que se ha utilizado regularmente en la biología pesquera e indica el estado de un organismo o condición, dada por la relación entre el peso, la longitud y en el único tiempo en que se realiza la medición. Básicamente los valores obtenidos solo permiten establecer si un organismo tiene un peso adecuado con respecto a su longitud o presenta sobrepeso o un peso bajo. Esto se determina con respecto a otros valores encontrados en la población. La fórmula para calcularlo es:

$$K = (\text{Peso} \div \text{Longitud})^3 \times 100$$

Consideraciones finales

Referencias

- American Fisheries Society (AFS). 2014. Guidelines for the use of fish in research. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. 89 pp.
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2020. AVMA guidelines of the euthanasia of animals: 2020 edition. AVMA, Illinois, USA. 121 pp.
- Coyle S.D., Duborow R.M., Tidwell J.H. 2004. Anesthetics in Aquaculture. SRAC Publications no. 3900. SRAC-USDA. 6 pp.
- Coyle S.D., Dasgupta S., Tidwell J.H., Beavers T., Bright L.A., Yasharian D.K. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 282-290.
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO, Roma, Italia. 226 pp.
- Hardy R.W. 2022a. History of fish nutrition. Part I: 1900-1958. *Aquafeed: advances in processing and formulation*, 14 (2): 28-32.
- Hardy R.W. 2022b. History of fish nutrition. Part II (1957-2000). *Aquafeed: advances in processing and formulation*, 14 (3): 30-33.
- Javahery S., Nekoubin H., Moradlu A.H. 2012. Effect of anesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1545-1552.
- National Research Council (NRC). 2011. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. The National Academies Press, Washington, DC, USA. 220 pp.
- Neiffer D.L., Stamper M.A. 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal*, 50: 343-360.
- Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993, Para regular la aplicación de cuarentenas a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificaes y notificarles, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de agosto de 1994.

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de agosto de 2001.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Que establece los métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de agosto de 2015.
- Oliver A., Kaiser, H. 1997. A comparison of growth, survival rate, and number of marketable fish produced of swordtails, *Xiphophorus helleri* Heckel (Family Poeciliidae), between two types of culture size. *Aquaculture Research*, 28: 215-221.
- Powell C.D., Tansil F., France J., Bureau D.P. 2020. Growth trajectory analysis of Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): comparisons of the specific growth rate, the thermal-unit growth coefficient and its adaptations. *Aquaculture Research*, 51: 480-489.
- Priborsky J., Velisek J. 2018. A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 26: 417-442.
- Readman G.D., Owen S.F., Knowles T.G., Murrell J.C. 2017. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. *Scientific Reports*, 7: 7102.
- Sloman K.A., Bouyoucos I.A., Brooks E.J., Sneddon L.U. 2018. Ethical considerations in fish research. *Journal of Fish Biology*, 94: 556-577.
- Schreck C.B., Tort L. 2016. 1 – The concept of stress in fish. *Fish Physiology*, 35: 1-34.
- Wong J.A, Benzie H. 2003. The effects of temperature, Artemia enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture*, 228:107-121.

Otras fuentes de información

Diseños experimentales

Gutiérrez P.H., de la Vara S.R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2da. ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. Ciudad de México, México. 545 pp.

Montoya-Márquez J.A., Sánchez-Estudillo L., Torres-Hernández P. 2011. Diseños experimentales ¿qué son y cómo se utilizan en las ciencias acuáticas? Ciencia y Mar, XV: 61-70.

Vega V.F., Guerrero G.S.R., Mejía A.A.B., de Quevedo M.R.G., Chong c.O., Badillo Z.D. 2017. Acuicultura experimental y calidad de agua, prácticas. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa. Puerto Vallarta, Jalisco. 203 pp.

Anestesia en organismos acuáticos

- Bressler K., Ron B. 2004. Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead bream (*Sparus aurata*). Israeli Journal of Aquaculture-Bamigedh, 56: 5-13.
- Martins T., Diniz E., Félix L.M., Antunes L. 2018. Evaluation of an anaesthetic protocols for laboratory adult zebra fish (*Danio rerio*). PLoS ONE, 13: e0197846.
- Pounder K.C., Mitchell J.L., Thomson J.S., Pottinger T.G., Sneddon L.U. 2018. Physiological and behavioural evaluation of common anesthesia practices in the rainbow trout. Applied Animal Behaviour Science, 199: 94-102.
- Yu N., Cao X., Wang Y., Kuang S., Hu J., Yang Y., Xu S., Zhang M., sun Y., Gu W., Yan X. 2020. Reduced stress responses by MS-222 in juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*). Journal of the World Aquaculture Society, 51: 1192-1207.
- Zahl I.H, Samuelsen O., Kiessling A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish Physiology and Biochemistry, 38: 201-218.

Crecimiento en organismos acuáticos

- Gómez M.J.L., Peña M.B., Guzmán S.J.L., Salgado U.I.H., Cervantes S.A., Bautista R.C., Alejo P.M.C. 2020. Determinación de la edad y crecimiento de organismos acuáticos con énfasis en peces. UNAM FES Zaragoza, Ciudad de México, México. 190 pp.
- Martínez-Porchas M., Martínez-Córdova L.R., Ramos-Enríquez R. 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. REDVET Revista electrónica de Veterinaria, 1-16.
- NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press. Washington, D.C., USA. 376 pp.

Pruebas de alimentación en la investigación de nutrición en acuicultura

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	antares.iztacala.unam.mx Internet	150 palabras — 1%
2	aquahoy.com Internet	40 palabras — < 1%
3	2001online.com Internet	16 palabras — < 1%
4	www.scribd.com Internet	14 palabras — < 1%
5	fuegocotidiano.blogspot.com Internet	12 palabras — < 1%
6	helvia.uco.es Internet	12 palabras — < 1%
7	www.bvssan.incap.org.gt Internet	12 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 12 PALABRAS