

EVALUACIÓN DE LA INMOVILIDAD TÓNICA COMO TÉCNICA PARA MINIMIZAR EL ESTRÉS DE MANEJO EN CAUTIVERIO DE CHUCHOS (*Myliobatis goodei*) MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LACTATO EN SANGRE

JULIETA JAÑEZ¹, CAROLINA ABRAHAM, ANDRÉS PALMERIO y FEDERICO ARGEMI
Acuario, Fundación Temaiken, Ruta 25 Km 0,700, 1625 - Escobar, Argentina

¹correo electrónico: jjanez@temaiken.org.ar

RESUMEN. La inmovilidad tónica (IT) es una respuesta innata y reversible al estrés que se observa en un gran número de taxones que incluye a los elasmobranchios. A pesar de que en acuarios constituye una herramienta segura en procedimientos de manejo animal, poco se sabe sobre su efecto fisiológico. La concentración de lactato en sangre se utiliza como indicador del estrés que deriva de la captura y el manejo de elasmobranchios. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta al estrés que se produce en *Myliobatis goodei* utilizando la IT como herramienta de manejo. Se sometieron trece ejemplares a IT constante e interrumpida durante las que se tomaron muestras de sangre a intervalos de 0, 10, 30, 60, 90 y 120 min. Se observó que en la IT_{const} la concentración de lactato (mmol l⁻¹) se mantiene relativamente estable por más tiempo ($t_0 = 1,23$; $t_{10} = 2,33$; $t_{30} = 3,23$; $t_{60} = 3,55$; $t_{90} = 4,48$; $t_{120} = 5,3$). La IT_{int} mostró que cada procedimiento genera un aumento de los niveles ($t_0 = 1,17$; $t_{10} = 2,19$; $t_{30} = 3,96$; $t_{60} = 5,04$; $t_{90} = 8,10$; $t_{120} = 8,42$). Los resultados indican que la IT_{const} previene incrementos significativos de los niveles de lactato en sangre; por lo tanto, se la puede considerar una herramienta útil para utilizar en procedimientos que requieren sujetar y retener organismos durante períodos de tiempo prolongados.

Palabras clave: Lactato, inmovilidad tónica, *Myliobatis goodei*, estrés.

EVALUATION OF TONIC IMMOBILITY AS A TECHNIQUE TO MINIMIZE STRESS IN THE HANDLING OF CAPTIVE SOUTHERN EAGLE RAYS (*Myliobatis goodei*) THROUGH BLOOD LACTATE MEASUREMENTS

SUMMARY. Tonic immobility (TI) is an innate and reversible response to stress observed in a large number of taxa that includes elasmobranchs. Although in aquariums it constitutes a safe tool in animal handling procedures, little is known about its physiological effect. Blood lactate concentration is used as an indicator of the stress derived from elasmobranchs catch and handling. The aim of this study was to evaluate the response to stress produced in *Myliobatis goodei* using TI as a handling tool. Thirteen specimens were subject to constant and interrupted TI during which blood samples were taken at 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min interval. It was observed that in TI_{const} lactate concentration (mmol l⁻¹) remains more stable through time ($t_0 = 1.23$; $t_{10} = 2.33$; $t_{30} = 3.23$; $t_{60} = 3.55$; $t_{90} = 4.48$; $t_{120} = 5.3$). TI_{int} showed that each procedure generates an increase in levels ($t_0 = 1.17$; $t_{10} = 2.19$; $t_{30} = 3.96$; $t_{60} = 5.04$; $t_{90} = 8.10$; $t_{120} = 8.42$). Results indicate that TI_{const} prevents significant increments in blood lactate levels; thus, it can be considered a useful tool to be used in procedures that require to secure and retain organisms for long periods of time.

Key words: Lactate, tonic immobility, *Myliobatis goodei*, stress.

INTRODUCCIÓN

El manejo de condriictios en acuarios es un procedimiento rutinario. La captura, sujeción y tratamiento de estos animales se realiza con procedimientos que tiendan a generar el menor estrés posible (Henningsen, 1994).

La evaluación del estrés producido en el animal, producto de estos manejos, se analiza comúnmente de manera cualitativa, a partir de observaciones postcaptura tales como comportamientos estereotipados, erráticos en la natación, abstinencia alimentaria, cambios de coloración, entre otros, según Rossi (com. pers.)¹. Brooks *et al.* (2011 a) reportó comportamientos de natación en círculos en tiburones sometidos a largos períodos de inmovilidad tónica (IT).

En acuarios, la IT es una técnica muy utilizada para el manejo postcaptura de grandes peces cartilagosos, ya sea para investigaciones científicas (Holland *et al.*, 1999; Murchie *et al.*, 2010; Brooks *et al.*, 2011 b) como para manejo en acuarios (Gruber, 1980; Henningsen, 1994). La inmovilidad tónica es una respuesta innata, reversible, que se exhibe en un gran número de taxa. Se caracteriza por un estado de inmovilidad y letargo que puede durar desde menos de un minuto hasta varias horas (Watsky y Gruber, 1990). En peces cartilagosos se induce mediante la rápida inversión dorso-ventral colocando al animal en posición horizontal invertida con la superficie ventral hacia abajo y la zona branquial sumergida, logrando una relajación del tono muscular y una reducción del ritmo respiratorio que las hace más profundas (Henningsen, 1994).

El uso de la IT en general tiene como objetivo la realización de ecografías, extracción de sangre, mediciones, etc., resultando un procedimiento beneficioso ya que se reduce la reacción del animal y facilita el manejo, demandando una mínima

restricción o sujeción (Henningsen, 1994). No obstante ello, los efectos fisiológicos de la IT son aún poco conocidos (Brooks *et al.*, 2011 a).

Davie *et al.* (1993) trabajaron con tiburones punta negra (*Carcharhinus melanopterus*) mantenidos en IT y provistos de irrigación branquial y encontraron que estos animales mantenían estables el ritmo cardíaco y la presión sanguínea. Brooks *et al.* (2011 a) estudiaron los efectos fisiológicos y comportamentales de la IT en juveniles de tiburón limón (*Negaprion brevirostris*) y encontraron que la IT es una experiencia estresante por sí misma, que magnifica el grado de perturbación observado en un número de parámetros químicos de la sangre.

Los peces reaccionan a la captura y manejo con respuestas fisiológicas más exageradas que el resto de los vertebrados. Al igual que los teleosteos, los elasmobranchios exhiben respuesta primaria y secundaria al estrés que se manifiestan en su bioquímica sanguínea (Marshall *et al.*, 2012).

En los últimos años, las mediciones de lactato en sangre y plasma se han vuelto un procedimiento común en investigaciones relacionadas con la respuesta metabólica a estresores en tiburones (Awruch *et al.*, 2011). Glucosa, lactato y pH son indicadores de estrés fisiológico destacados como respuesta a un ejercicio exhaustivo (Hassanein, 2010).

El presente trabajo pretende determinar la respuesta al estrés producido en chuchos (*Myliobatis goodei*) empleando la IT como herramienta de manejo y evaluando la concentración de lactato y glucosa en sangre como indicadores de respuesta secundaria al estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se emplearon 13 ejemplares (5 hembras y 8 machos) de chucho *M. goodei* de

¹Marco Rossi, Acuario, Fundación Temaikén, Ruta 25 Km 0,700, 1625 - Escobar, Argentina.

entre 37,5 y 87 cm de ancho de disco (AD) pertenecientes al Acuario de Fundación Temaiken, y nacidos allí. Los mismos fueron mantenidos en iguales condiciones de calidad de agua, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, en tanques auxiliares dentro de un sistema de recirculación de agua de mar de 1.000 m³.

Al inicio del tratamiento cada ejemplar fue capturado y colocado en un tanque de manera individual en base a su tamaño donde se realizó el procedimiento de IT.

Se diferenciaron dos tipos de tratamientos, uno donde los ejemplares fueron sometidos a IT constante (IT_{const}, n = 4) manteniendo al animal en posición horizontal invertida a lo largo de todo el procedimiento. El otro tratamiento denominado IT interrumpida (IT_{int}, n = 9), en el que se regresó al animal a su posición normal, interrumpiendo la IT entre cada toma de muestra. Se realizaron extracciones de sangre en el inicio del experimento (t₀) y a los 10, 30, 60, 90 y 120 min. Se consideró t₀ al momento en el que se alcanzó la IT, generalmente a los 2 min posteriores a la inversión del animal.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena caudal, utilizando agujas de 22G × 25 mm y jeringas de 1 ml. El volumen extraído fue de 0,1 ml. Las lecturas de lactato y glucosa se realizaron inmediatamente después de la extracción, empleando On Call[®] Plus para la medición de glucosa y Accutrend[®] Plus (Roche) para lactato (Awruch *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2011 a; Frick *et al.*, 2012).

Dado que se registró la concentración de glucosa y lactato en cada individuo para tiempos sucesivos, los datos se analizaron utilizando un ANOVA de Medidas Repetidas, con un factor fijo con dos niveles para los dos tratamientos (IT_{const} e IT_{int}) y el factor de medidas repetidas con seis niveles para los tiempos (0, 10, 30, 60, 90 y 120 min para lactato y 0, 10, 30, 60 y 90 min para glucosa). Se comprobaron los supuestos de Esfericidad y Homocedacea entre niveles. Se consideró un $\alpha = 0,05$ en todos los análisis.

RESULTADOS

Lactato en sangre

El análisis estadístico utilizado arrojó diferencias significativas en el factor de medidas repetidas ($p < 0,015$), indicando que hay un aumento en la concentración de lactato en sangre a medida que pasa el tiempo independientemente del tratamiento. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato en sangre entre tratamientos a partir de los 60 min, siendo mayor para los ejemplares sometidos a IT_{int} con respecto a IT_{const}, en todos los tiempos hasta el final del experimento ($p_s < 0,001$). La concentración máxima de lactato alcanzada fue a los 120 min, de $8,4 \pm 1,1$ mmol l⁻¹ para IT_{int} y $5,3 \pm 1,4$ mmol l⁻¹ para IT_{const}.

Para los ejemplares sometidos a IT_{int}, la curva de concentración de lactato mostró diferencias significativas en los intervalos de 30 y 90 min. con valores de $3,96 \pm 1,1$ y $8,1 \pm 1,5$ mmol l⁻¹ respectivamente. A partir de los 90 min se alcanza un valor máximo que se mantiene hasta el final de la experiencia (Figura 1).

En cuanto al tratamiento IT_{const}, la concentración de lactato aumentó significativamente a t₉₀ alcanzando un valor de $4,47 \pm 0,6$ mmol l⁻¹. En los tiempos siguientes de este tratamiento no se encontraron diferencias significativas hasta el final de la experiencia ($p_s > 0,2$).

Se observó un mayor incremento en la concentración de lactato en sangre a los 10 min para los ejemplares bajo el tratamiento de IT_{const} ($\Delta = 1,1$) (Figura 2). No se observan grandes incrementos en ninguno de los tiempos de muestreo. Por otro lado, para los chuchos bajo el tratamiento de IT_{int} se registraron dos picos a los 30 y 90 min, siendo el de mayor importancia el correspondiente a t₉₀, con un aumento neto de tres veces la concentración de lactato respecto al tiempo anterior.

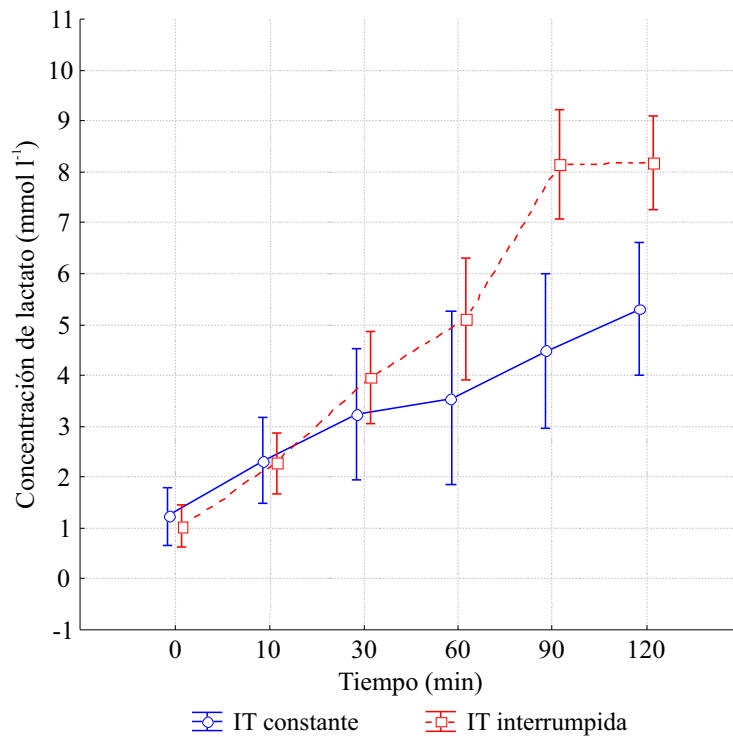


Figura 1. Curvas de la concentración de lactato en sangre de chuchos (*Myliobatis goodei*) sometidos a tratamientos de inmovilidad tónica (IT) constante e interrumpida en función del tiempo.

Figure 1. Blood lactate concentration curves of Southern eagle rays (*Myliobatis goodei*) subject to constant and interrupted tonic immobility (IT) treatments as a function of time.

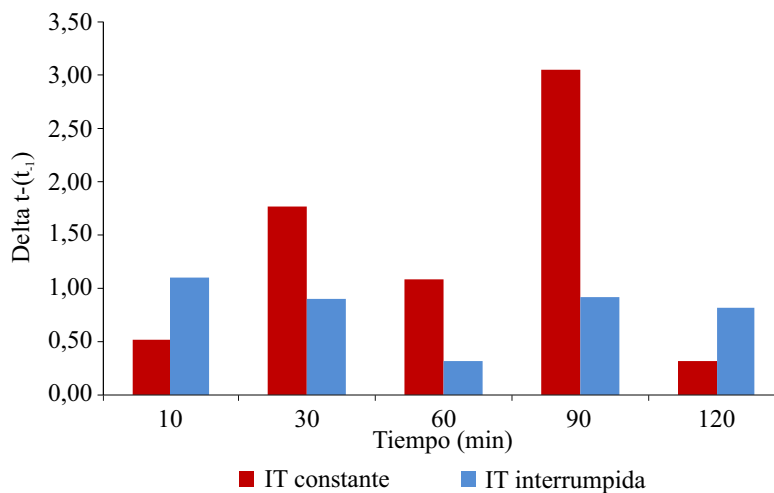


Figura 2. Incremento neto de la concentración de lactato en sangre respecto al tiempo anterior en chuchos (*Myliobatis goodei*) sometidos a tratamientos de inmovilidad tónica (IT) constante e interrumpida en función del tiempo.

Figure 2. Net increment of blood lactate concentration with respect to previous time in Southern eagle rays (*Myliobatis goodei*) subject to constant and interrupted tonic immobility (IT) treatments as a function of time.

Glucosa en sangre

El análisis estadístico utilizado arrojó diferencias significativas en el factor de medidas repetidas ($p < 0,001$), indicando que hay un aumento en la concentración de glucosa en sangre a medida que pasa el tiempo independientemente del tratamiento, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a ningún tiempo de muestreo. La concentración de glucosa varió desde $t_0 = 1,82 \pm 0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ hasta $t_{90} = 3,18 \pm 0,9 \text{ mmol l}^{-1}$ para los ejemplares sometidos a *ITconst* y desde $t_0 = 1,81 \pm 0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ hasta $t_{90} = 3,51 \pm 0,9 \text{ mmol l}^{-1}$ para la *ITint*.

El análisis estadístico de la variación de glucosa a lo largo del tiempo para cada tratamiento mostró diferencias significativas en t_{90} solo para *ITint* con respecto a los valores iniciales ($p < 0,02$).

Para los ejemplares bajo tratamiento *ITconst*, la glucosa mostró un aumento continuo durante el tiempo de experimentación que no presentó diferencias significativas en ningún período de muestreo (Figura 3).

DISCUSIÓN

Como es de esperar, en la manipulación de animales hay una respuesta al estrés que está asociada principalmente a la captura, traslado e inducción de la IT, y se genera en los momentos previos a la IT. Esto se presume a partir de que se registran valores de lactato en sangre en todos los ejemplares desde el inicio del tratamiento.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la IT por sí misma genera estrés en los organis-

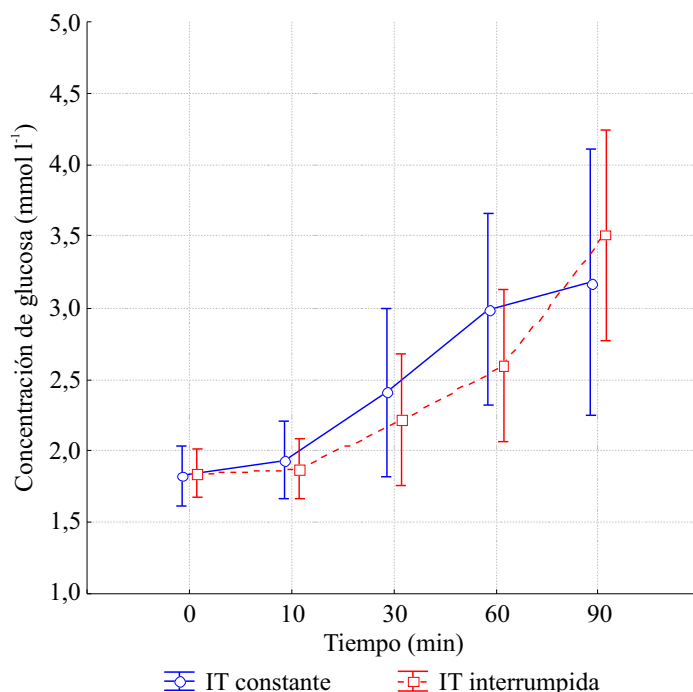


Figura 3. Curvas de la concentración de glucosa en sangre de chuchos (*Myliobatis goodei*) sometidos a tratamientos de inmovilidad tónica (IT) constante e interrumpida en función del tiempo.

Figure 3. Blood glucose concentration curves of Southern eagle rays (*Myliobatis goodei*) subject to constant and interrupted tonic immobility (IT) treatments as a function of time.

mos, ya que una vez inducida, se registran aumentos en la concentración de glucosa y lactato, independientemente que se hayan encontrado o no diferencias significativas a lo largo del tiempo o entre tratamientos. Esto también fue reportado por otros autores que analizaron un número de parámetros químicos de la sangre en *N. brevirostris* tales como CO₂, electrolitos (magnesio, sodio, potasio), glucosa y lactato que variaban cuando se inducía la IT (Brooks *et al.*, 2011 a).

En este estudio se pudo determinar que los chuchos mantenidos en IT constante muestran una respuesta al estrés atenuada respecto a la exhibida por los individuos en los que la IT fue interrumpida en forma sucesiva. En este caso, en el que los ejemplares fueron liberados y recapturados para la extracción de sangre, los mayores incrementos de lactato en sangre se manifestaron a los 30 y 90 min, lo que estaría reflejando el estrés producido por cada recaptura e inducción de la técnica, más que por la IT propiamente dicha. Se podría presumir que el hecho de regresar al animal a su posición normal luego de cada extracción, para volver a inducir la IT en el intervalo sucesivo, le genera una nueva situación de estrés que se vería reflejada en el aumento de lactato en sangre.

El estrés puede contribuir al incremento de los niveles de glucosa y a la disminución de las reservas de glucógeno, rompiéndose la glucosa y liberándola a la sangre. El lactato también incrementa sus niveles debido al estrés. En situaciones agudas se produce una demanda de energía y la vía anaerobia que produce el lactato queda disponible rápidamente (Brandica y Tort, 2008). El destino del lactato una vez que se reanuda el ejercicio aeróbico es desconocido, pero el hecho de que coincide con un incremento de la glucosa sugiere que el lactato puede ser retenido intramuscularmente y usado para la gluconeogénesis *in situ* (Hassanein, 2010).

Si bien se requiere continuar con los estudios evaluando otros parámetros fisiológicos que posibiliten una mejor comprensión de los efectos fisiológicos producidos por la IT, este trabajo nos

permitió determinar que la misma es una herramienta útil para muestreos que impliquen una manipulación del animal por períodos prolongados. La inmovilidad tónica en chuchos evita que se produzcan grandes aumentos del lactato, principalmente cuando el tiempo de retención del animal es superior a los 30 min.

BIBLIOGRAFÍA

- AWRUCH, C.A., SIMPFENDORFER, C. & PANKHURST, N.W. 2011. Evaluation and use of a portable field kit for measuring whole-blood lactate in sharks. *Mar. Fresh. Res.*, 62: 694-699.
- BRANDICA, M.L. & TORT, L. 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 32 (123): 267-284.
- BROOKS, E.J., MANDELMAN, J.W., SLOMAN, K.A., LISS, S., DANYLCHUK, A.J., COOKE, S.J., SKOMAL, G.B., PHILIPP, D.P., SIMS, D.W. & SUSKI, C.D. 2011 b. The physiological response of the Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezii*) to longline capture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 162: 94-100.
- BROOKS, E.J., SLOMAN, K.A., LISS, S., HASSAN-HASSANEIN, L., DANYLCHUK, A.J., COOKE, S.J., MANDELMAN, J.W., SKOMAL, G.B., SIMS, D.W. & SUSKI, C.D. 2011 a. The stress physiology of extended duration tonic immobility in the juvenile lemon shark, *Negaprion brevirostris* (Poey 1868). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 409: 351-360.
- DAVIE, P., FRANKLIN, C. & GRIGG, G. 1993. Blood pressure and heart rate during tonic immobility in the black tipped reef shark, *Carcharhinus melanopterus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 95-100.
- FRICK, L.H., WALKER, T.I. & REINA, R.D. 2012. Immediate and delayed effects of gill-net capture on acid-base balance and intramuscular

- lactate concentration of gummy shark, *Mustelus antarcticus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 162 (2): 88-93.
- GRUBER, S.H. 1980. Keeping sharks in captivity. *J. Aquaricult.*, 1, 6-14.
- HASSANEIN, L.H. 2010. The physiological and physical response to capture stress in sharks. *Plymouth Stud. Sci.*, 4: 413-422.
- HENNINGSSEN, A. 1994. Tonic immobility in twelve elasmobranchs: use as an aid in captive husbandry. *Zoo Biol.*, 13, 325-332.
- HOLLAND, K.N., WETHERBEE, B.M., LOWE, C.G. & MEYER, C.G. 1999. Movements of tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) in coastal Hawaiian waters. *Mar. Biol.*, 134, 665-673.
- MARSHALL, H., FIELD, L., AFIADATA, A., SEPULVEDA, C., SKOMAL, G. & BERNAL, D. 2012. Hematological indicators of stress in longline-captured sharks. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 162 (2): 121-129.
- MURCHIE, K.J., SCHWAGER, E., COOKE, S.J., DANYLCHUK, A.J., DANYLCHUK, E.E. 2010. Spatial ecology of juvenile lemon sharks (*Negaprion brevirostris*) in tidal creeks and coastal waters of Eleuthera, The Bahamas. *Environ. Biol. Fish.*, 89: 95-104.
- WATSKY, M. & GRUBER, S. 1990. Induction and duration of tonic immobility in the lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Fish Physiol. Biochem.*, 8: 207-210.

Recibido: 22-09-2015

Aceptado: 16-03-2016

