

## Protocolo de muestreo de peces

### Módulo 2 – Bienestar de peces

Ponente: Mercedes Blázquez y Pol Llonch

#### Mantenimiento de peces en cultivo:

Para peces planos como lenguado y rodaballo se usarán tanques rectangulares con el fondo plano. La base se enriquecerá con arena para poder simular sus condiciones naturales. En el caso que la arena provoque heridas a los ejemplares se optará por cubrir el tanque con una tela de invernadero que tamice la luz para que puedan tener las condiciones de penumbra que tendrían en la naturaleza.

Para otras especies de cultivo como dorada o lubina se usarán tanques troncocónicos. De manera, la pendiente de la base facilitará la limpieza del tanque.

#### Anestesia

El anestésico recomendado es el MS-222, otro anestésicos también usado y permitido en experimentación: aceite de clavo o 2-fenoxietanol. Un agente anestésico es absorbido a través de las branquias y transportados vía la sangre arterial al sistema nervioso central. Las dosis recomendadas de anestésico, así como el tiempo de exposición dependen del tamaño del pez y del tipo de sedación (ligera o profunda) que se requiera. Generalmente, dosis más altas y temperaturas más cálidas están asociados con una inducción de la anestesia más rápida. Las temperaturas más altas también están asociadas a recuperaciones más rápidas. Las dosis altas tienden a demorar la recuperación y pueden resultar letales.

La anestesia está asociada con cambios en la fisiología de los peces. Deben ser cuidadosos cuando se selecciona la anestesia, particularmente cuando las medidas fisiológicas son los indicadores finales en un estudio, y cuando estos resultados vienen siendo comparados con los de otros estudios

**Aceite de clavo:** Los ingredientes activos del aceite de clavo son el eugenol y el iso-eugenol. existen restricciones en su uso en peces que van a servir de alimento para los humanos. El aceite de clavo no está aprobado por la FDA como un anestésico para los peces. La UE ha aprobado el límite máximo de residuo para iso-eugenol. El eugenol es un compuesto activo de Aqui-STM, que ha sido aprobado como anestésico en Australia, Chile, Finlandia, Nueva Zelanda e Islas Feroe, pero no en la UE ni en EEUU.

**MS-222 (metanosulfonato de triclaína):** anestésico ampliamente usado en peces y organismos poiquilotermos por la rápida inducción y tiempos de recuperación. Bloquea los canales de sodio en el músculo y reduce las vías del potasio en las membranas del nervio, actuando como un relajante muscular. Su uso está permitido en el Reino Unido, Italia, España y Noruega. En algunos países europeos tienen limitaciones respecto a su uso: en Italia, está aprobado solo para la vacunación y propósitos de investigación; en

EEUU, el MS-222 está aprobado por la FDA para su uso como anestésico en *Ictaluridae*, *Salmonidae*, *Esocidae*, y *Percidae*.

**2-fenoxietanol:** usado para la inmovilización por corto tiempo de los peces para el desove artificial y para manipular los peces fuera del agua. Este compuesto es rápidamente excretado, principalmente vía las branquias.

En un tanque con aireación destinado a la anestesia se disuelve el anestésico a la dosis convenida: **MS-222** (50-70mg/L; se necesitan unos 3 minutos para la inducción y alrededor de 10 minutos para la recuperación); **2-fenoxietanol** (0,2-0,5 ml/L; se necesitan unos 4 minutos para la inducción y entre 3-6 minutos para la recuperación); **Aceite de clavo** (Eugenol; 30-50 mg/L, alrededor de 3 minutos para la inducción y 5 minutos para la recuperación)

Los animales se colocan en el tanque con anestésico y durante este tiempo pasarán por diferentes estados. **(I)**: ralentización de los movimientos, las aletas pectorales se mueven con menos frecuencia y los movimientos se van tornando más lentos; **(II)**: pérdida parcial del eje de natación, el pez comienza a perder el equilibrio y se empieza a ladear; **(III)**: pérdida total del eje de natación; **(IV)**: pérdida total de reacción a estímulos, finalmente cesan los movimientos operculares y queda parado y tranquilo reposando en el fondo sobre su parte dorsal.

En este estado de anestesia se podrán realizar diferentes procedimientos como por ejemplo el marcaje o la extracción de sangre

### **Marcaje con pit-tags (“passive integrated transponder”)**

- Una vez anestesiado el pez se procede a su marcaje con un microchip (pit-tag)
- Se coloca el microchip en su jeringa correspondiente
- Se levanta una escama de la zona dorsal (aproximadamente a la altura del primer cuarto de la aleta dorsal).
- Cuidadosamente y en dirección paralela al cuerpo del animal se presiona el émbolo y se desliza el microchip dentro del músculo.
- Con cuidado se retira la jeringa y se limpia bien la zona con una solución de yodo

### **Extracción de sangre:**

- Una vez anestesiado, con cuidado y con guantes se saca al pez del tanque
- Se coloca sobre un paño humedecido en agua de mar previamente colocado sobre una cuña para poder facilitar la manipulación del pez sin producirle ningún daño
- El pez se sitúa sobre la zona dorsal y con la parte ventral hacia arriba
- Se introduce la aguja en la parte final de la cola (zona posterior del ano y del poro genital)
- Se comienza a estirar del émbolo poco a poco hasta que la sangre comienza a fluir a través de la jeringa.
- Una vez finalizada la extracción se extrae la aguja cuidadosamente y se desinfecta la zona con una solución de yodo

Una vez realizados los procedimientos (marcaje o anestesia o cualquier otro procedimiento), se devuelve el pez con cuidado al tanque de recuperación con aireación. Poco a poco pasará por cuatro estados diferentes: **(I)**: recuperación del movimiento opercular, **(II)**: recuperación del movimiento de las aletas, **(III)**: recuperación total del eje de natación, **(IV)**: recuperación del reflejo de huida. Tras la recuperación, el animal se devuelve al tanque de estabulación.

### **Eutanasia:**

En el caso de la eutanasia, esta se consigue por una sobredosis de anestésico (más dosis y más tiempo de exposición que la utilizada para la anestesia). Tras el paso IV de sedación total, con pérdida total de reacción a estímulos se produce el último estado que es **(V)**: colapso medular. Finalmente se confirmará la muerte mediante sección de la médula espinal.

## Protocolo de muestreo de pulpos

### Módulo 3 – Bienestar de cefalópodos

**Ponente: Roger Villanueva**

- **Obtención de ejemplares salvajes.** Es recomendable que los ejemplares sean capturados por pescadores experimentados que empleen artes de pesca poco agresivos con el ambiente y que causan el menor daño y estrés a estos animales. Los métodos de captura de pesca artesanal tipo trampa reducen los traumatismos y erosiones en la piel del animal.

- **Mantenimiento de pulpos en cultivo.** Es conveniente alojar ejemplares de pesos similares para reducir estrés y canibalismo. Como refugios se pueden utilizar recipientes de barro/cerámica y tubos de distinto diámetro, acorde con las tallas de los ejemplares estabulados. Es conveniente que el número de refugios sea superior al número de animales para reducir la competición por espacios.

- **Anestesia con cloruro de magnesio.** Manipulando con una red/salabre, el pulpo será trasladado desde el tanque de mantenimiento a un recipiente con agua de mar fresca y oxigenada. Por ejemplo, para un pulpo de 0.5 - 1 kg, se puede utilizar un recipiente de unos 40-50 litros. Es preferible utilizar agua procedente del tanque de mantenimiento del que procede el pulpo. Progresivamente añadiremos cloruro magnésico ( $\text{ClMg}_2$ ) hasta obtener una solución del 3.5 %. Es conveniente añadir la cantidad total de  $\text{ClMg}_2$  repartida en diversas subsoluciones en agua, de forma que el efecto anestésico sea progresivo. No es recomendable añadir  $\text{ClMg}_2$  en una dosis única ya que puede causar irritación y estrés. Para ello debe anotarse previamente el volumen de agua existente en el tanque de anestesiado, calibrando los aportes sucesivos y estimando la concentración final.

Ejemplo de dosis de  $\text{ClMg}_2$  a usar en un total de 10 litros agua de mar + 350 g de  $\text{ClMg}_2$ , introduciendo agua, anestésico y pulpo en un tanque de 40-50 litros de volumen.

- 1) Introducir el pulpo en 5 litros agua mar + 117 g  $\text{ClMg}_2$
- 2) Transcurridos 5 minutos, añadir 4 litros agua mar + 93.6 g  $\text{ClMg}_2$
- 3) Transcurridos 10 minutos, añadir 1 litro agua mar + 139.4  $\text{ClMg}$

- **Extracción de hemolinfa.** Este método permite extraer hemolinfa sin sacrificar al animal. La extracción se realizará con el animal anestesiado realizando la extracción a través de la vena cava. Se utilizará una jeringa de 1-5 ml y aguja de 25G (0,5x16 mm) insertando menos de la mitad de la longitud de la aguja y evitando contaminar la muestra con otros fluidos

- **Eutanasia.** Se llevará a cabo mediante sobredosis de anestésico  $\text{ClMg}_2$  al 5% durante 30-40 minutos. Se confirmará la muerte por el cese de la respiración. Tras comprobar que el animal está completamente anestesiado, se procederá a la destrucción del cerebro mediante varios cortes entre la línea media de los ojos empleando un bisturí o unas tijeras.

## Protocolo de experimentación en crustáceos decápodos

### Módulo 4 – Bienestar de crustáceos

Ponente: **Guiomar Rotllant**

En primer lugar, indicar que no hay ninguna **legislación** específica ni de aturdimiento ni sacrificio para la experimentación en laboratorio como la publicada en Europa para peces y cefalópodos (EU 2010).

En segundo lugar, todas las regulaciones y directivas de bienestar se basan en el principio de las **3Rs** que tiene como objetivo reducir, refinar y, en última instancia, reemplazar el uso de animales que se utilizan con fines científicos (Blázquez et al. 2022). Este principio que sienta las bases para la utilización de técnicas humanitarias en investigación también debería aplicarse a los crustáceos. La reducción implica que en un procedimiento experimental se utilizará el mínimo número de animales necesario para obtener resultados reproducibles y estadísticamente fiables. El refinamiento consiste en la modificación de cualquier condición de alojamiento, cría o cuidado durante la vida de un animal con el fin de minimizar el posible dolor, angustia, sufrimiento o cambios fisiológicos, mejorando su bienestar. El reemplazo incluye el uso de métodos que no involucran el uso de animales vivos. Este reemplazo puede lograrse mediante la utilización de técnicas alternativas como es el caso de los sistemas *in vitro* (tejidos y células), los sistemas *in chimico* (macromoléculas sintéticas), los sistemas *in silico* (modelos informáticos) y la prometedora bioimpresión 3D.

Cuando la investigación con animales vivos es imprescindible, los investigadores que usamos como especie objetivo crustáceos decápodos los aturdimos en hielo durante 20 minutos aproximadamente variando este tiempo según las especies y su tamaño. Después de este aturdimiento podemos proceder a realizar la operación necesaria durante unos 10 minutos y al regresarlos a su temperatura de cultivo recuperan la actividad. En el caso en que se quiera proceder a muestrear diversos tejidos se extraerá el cerebro tan pronto como sea posible.

### **Bibliografía**

Blázquez, M., Rotllant, G., Villanueva, R. 2022. Bienestar animal en ciencias marinas. En: Pelegrí J.L., Gili J.M., Martínez de Albéniz M.V. (eds.), El océano que queremos: ciencia oceánica inclusiva y transformadora. Institut de Ciències del Mar, CSIC. Barcelona. pp. 108-110.

EU, 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. L276, 33-79.