



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS

**“RESPUESTA METABOLICA EN EL ABULÓN AZUL  
(*Haliotis fulgens*): RITMO CIRCADIANO Y EFECTO DE TRES  
ANESTESICOS.”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**PRESENTA:**

**Oc. OSCAR ALEJANDRO CHACON AGUIRRE**

**Ensenada, B.C., México.**

**Agosto del 2001**

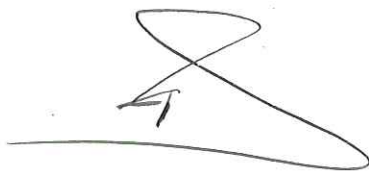
**“RESPUESTA METABOLICA EN EL ABULON AZUL  
(*Haliotis fulgens*): RITMO CIRCADIANO Y EFECTO DE TRES  
ANESTESICOS”.**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN OCEANOGRAFIA COSTERA  
PRESENTA:**

**Oc. OSCAR ALEJANDRO CHACON AGUIRRE**

**APROBADA POR:**

  
PRESIDENTE DEL JURADO  
Dr. Zaul García Esquivel



SINODAL PROPIETARIO  
Dr. Armando Shimada Miyasaka

  
SINODAL PROPIETARIO  
Dra. María Teresa Viana Castrillon

  
SINODAL PROPIETARIO  
Dr. Carlos Vázquez Pelaez

## DEDICATORIA:

Esta tesis se la dedico a las dos personas mas importantes de mi vida:

Katia y Karenina

Porque sin ellas, este logro no tendría sentido.  
Porque sin ellas, este esfuerzo hubiera sido en vano.  
Porque con ellas, lo he logrado.....

LAS AMO.

## AGRADECIMIENTOS:

A la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por la educación e infraestructura brindada durante mis estudios para la culminación de mi trabajo de tesis y obtención del grado de Maestro en Ciencias.

A CONACYT, por otorgarme la beca de excelencia que facilitó mi educación superior.

A mi director de tesis, el Dr. Zaul García Esquivel, por su enseñanza, apoyo y amistad durante la obtención de este grado, que deseo se prolongue por siempre.

A la Dra. María Teresa Viana Castrillon, por su asesoramiento, apoyo tecnológico y económico durante mi obtención del grado de Maestro en Ciencias, dentro del proyecto CONACYT No. G28119B, "Fisiología Digestiva y Metabolismo Nutricional de Abulón (*Haliotis fulgens*) cultivado", del cual es responsable.

A mis sinodales, Dr. Armando Shimada y Dr. Carlos Vazquez, por sus acertados comentarios y consejos que mejoraron mi trabajo de tesis.

A Investigadores, técnicos y alumnos pertenecientes al grupo "Feed Haliotis" del I.I.O. (Tere, Zaul, Roberto, Marco, Eduardo, Alfredo, Laura, Jessica, Julieta, Zac, Silvia, Rosalba y Alfonso), por toda la ayuda científica, técnica, física, emocional, etc., que se me brindó sin interés a cada momento durante todo el tiempo que pertenecí a dicho grupo.

A todos los investigadores, maestros, técnicos y secretarías de la F.C.M. y del I.I.O., que en algún momento de mis estudios tuve la necesidad de pedirles su ayuda o asesoramiento, y de los cuales nunca recibí un NO como respuesta.

A mis futuros compadres, Gerardo y Varinka, por todo lo que han sido durante esta última etapa de mi vida.

A los "Crudaceos fundadores" (Alfredo, Roberto flaco, Roberto gordo, Oscar y Abelardo) y todos los egresados de la generación XLV de Oceanólogos (Los Crudaceos), por su ejemplo de lucha y amistad, que me regalaron durante los últimos 8 años.

A todos los amigos que coseché durante estos últimos tres años, con los cuales compartí aulas, fiestas, problemas, etc, y que aun después de conocerme, siguen siendo mis amigos (Rulo, Nancy, Rene, Rogelio, Jorge, Zac, Fabián, Clarisa, Dago, Israel, Adrián, Pancho, etc.).

A la familia Maymes, por brindarme un hogar, su apoyo y amistad durante estos años de estudio.

A mis suegros, Carmen y Jorge, por su cariño y apoyo, que me han hecho sentirme como su hijo.

A mis padres, por seguir confiando en mí y por todo el apoyo y amor que siempre me han dado....los AMO.

A mis hermanos, que siempre han estado a mi lado, aunque a la distancia, como los mejores amigos del mundo, y especialmente a mis compadres Mayo y Zuly por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas, siempre dando mas de lo que deberían dar.

Por ultimo, a mi hermosa esposa Katia y a mi bella hija Karenina, por aguantar y seguir queriendo al enojon, antipático, distraído, sangrón y enfadoso esposo y padre, que han tenido durante estos últimos 3 años.

## RESUMEN

En el presente trabajo se cuantificó la respuesta metabólica de abulones juveniles *Haliotis fulgens*, sometidos a condiciones normales de alimentación, inanición y a tres diferentes anestésicos (4% w/v sulfato de magnesio; 0.1 % v/v fenoxietanol, FE; 0.01 % w/v benzocaína, BZ). Los resultados obtenidos muestran que juveniles del abulón azul alimentados y bajo inanición presentaron un ritmo circadiano en su metabolismo, con incrementos nocturnos de hasta 22% (alimentados) y 48% (inanición) por arriba del metabolismo observado durante el día. Lo anterior sugiere que las variaciones metabólicas circadianas pueden ser influenciadas fuertemente por la intensidad de luz y/o el fotoperíodo. Se observó que los abulones reducen significativamente su metabolismo al estar bajo la influencia de los anestésicos (62%, 18% y 34% para el SM, FE y BZ respectivamente). Solo el FE y BZ produjeron un anestesiado sincrónico dentro de un intervalo de tiempo de 10 min. Las concentraciones utilizadas de los tres anestésicos fueron adecuadas para lograr desprender del sustrato a abulones con tallas entre 24-45 mm., sin embargo se sugieren concentraciones mayores del SM para lograr un anestesiado más sincrónico. Bajo criterios visuales de recuperación, el 50% de los abulones se incorporaron dentro de los primeros 40 min post-anestesia, y el 100% en las 2 primeras horas. No obstante, los tres anestésicos provocaron un estrés significativo en el metabolismo de los abulones durante las primeras 8 hr. post-anestesia. La tasa metabólica retornó a valores normales (control) después de ese período. Ninguno de los anestésicos provocaron mortalidades después de 4 semanas, pero se recomiendan observaciones adicionales para probar el efecto a largo plazo en la tasa de consumo alimenticio, crecimiento y mortalidad.

# INDICE

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUCCION .....                                            | 1  |
| II. ANTECEDENTES .....                                           | 3  |
| III. OBJETIVOS .....                                             | 8  |
| IV. MATERIAL Y METODOS                                           |    |
| CONDICIONES GENERALES .....                                      | 9  |
| TRANSPORTE Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS<br>EXPERIMENTALES ..... | 9  |
| RESPUESTAS METABOLICAS                                           |    |
| Ritmo Circadiano .....                                           | 12 |
| Efecto de los anestésicos .....                                  | 13 |
| MEDICIONES                                                       |    |
| Respiración .....                                                | 15 |
| Criterios visuales de recuperación post-anestesia .....          | 17 |
| Talla y peso .....                                               | 17 |
| Mortalidad .....                                                 | 17 |
| ANALISIS ESTADISTICOS .....                                      | 18 |
| V. RESULTADOS                                                    |    |
| RESPUESTAS METABOLICAS                                           |    |
| Ritmo Circadiano                                                 |    |
| Organismos alimentados .....                                     | 19 |
| Organismos bajo inanición .....                                  | 19 |
| Efecto de los anestésicos                                        |    |
| Respuesta metabólica durante el proceso de anestesiado ....      | 23 |
| Comparativo a las 3 hr. post-anestesia: SM y FE .....            | 23 |
| Comparativo post-anestesia: SM, FE y BZ .....                    | 26 |
| Efecto de la edad en la respuesta al SM, FE y BZ .....           | 26 |

## CRITERIOS VISUALES DE RECUPERACION POST-ANESTESIA

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| Velocidad de acción de los anestésicos .....   | 30 |
| Tiempo de recuperación a los anestésicos ..... | 31 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| VI. DISCUSION ..... | 33 |
|---------------------|----|

|                         |    |
|-------------------------|----|
| VII. CONCLUSIONES ..... | 38 |
|-------------------------|----|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| VIII. RECOMENDACIONES ..... | 39 |
|-----------------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| IX. BIBLIOGRAFIA ..... | 40 |
|------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Cuadro sinóptico de los diferentes experimentos realizados con el abulón *H. fulgens*. para valorar su respuesta metabólica ..... 10
- Fig. 2.** Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones (35-45 mm) alimentados a lo largo de un periodo de 50 horas. .... 20
- Fig. 3.** Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones con 11 días y 67 días de inanición. .... 21
- Fig. 4.** Cambios temporales en la tasa metabólica, peso húmedo total y porcentaje de sobrevivencia de juveniles de abulón sometidos a inanición. .... 22
- Fig. 5.** Respuesta metabólica de abulones (35-45 mm) antes, durante y 3 hr posteriores al proceso de anestesiado con sulfato de magnesio, Fenoxietanol y Benzocaína..... 24
- Fig. 6.** Cambios comparativos en la concentración de oxígeno dentro de las cámaras blanco de reactivo en períodos de 10 min. antes, durante y después del suministro de los anestésicos sulfato de magnesio, fenoxietanol y benzocaína ..... 25
- Fig. 7.** Respuesta metabólica de abulones (30-40 mm) después de a 3 horas de haber sido anestesiados con Fenoxietanol y Sulfato de magnesio, con respecto a sus controles ..... 27
- Fig. 8.** Respuesta metabólica de abulones después de 3 hrs., 5 hrs., 8 hrs. y 15 hrs., del proceso de anestesiado con Sulfato de magnesio, Fenoxietanol y Benzocaína, con respecto a sus controles..... 28

**Fig. 9.** Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones de 24-29 mm y de 35-45 mm, que fueron anestesiados con Sulfato de magnesio, Fenoxietanol y Benzocaína, a lo largo de 50 hrs. con respecto a sus controles ..... 29

**Fig. 10.** Velocidad de recuperación de los abulones anestesiados con Sulfato de magnesio, Fenoxietanol y Benzocaína en distintos experimentos ..... 32

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabla I.</b> Composición porcentual (en base seca) de la dieta suministrada a los abulones durante las etapas de mantenimiento y experimentación .....                              | <b>11</b> |
| <b>Tabla II.</b> Resumen de los experimentos que se llevaron a cabo con juveniles de <i>H. fulgens</i> para evaluar el metabolismo durante un ciclo circadiano .....                   | <b>12</b> |
| <b>Tabla III.</b> Detalles de los experimentos que se llevaron a cabo con juveniles de <i>H. fulgens</i> , para valorar la influencia de los anestésicos sobre el metabolismo .....    | <b>14</b> |
| <b>Tabla IV.</b> Intervalo de tiempo en el que el 100% de los abulones utilizados en los diferentes experimentos, eran desprendidos de las superficies, producto del anestesiado ..... | <b>30</b> |
| <b>Tabla V.</b> Comportamiento general de los juveniles de <i>H. fulgens</i> durante el proceso de anestesiado .....                                                                   | <b>31</b> |

## I. INTRODUCCION

La producción natural de abulón en Baja California ha permanecido por debajo de las 600 toneladas anuales desde el colapso de esa pesquería en los años ochentas (Guzmán del Proo, 1994). Debido a su importancia como recurso pesquero y a su alto precio en el mercado internacional, los esfuerzos para desarrollar cultivos rentables de haliótidos ha ido en aumento a nivel mundial (Viana, com. pers.; I.I.O.-UABC). El costo en el mercado del abulón cultivado a alcanzado precios de hasta de \$5.00 US dls. por organismo (aprox. 75 g y 7.5 cm, US. Abalone, California), y entre \$176.00 - 211.00 US dls. por Kg de músculo (The Abalone Farm, California). En Baja California existe actualmente una producción comercial de juveniles de *H. fulgens* por parte de las empresas Abulones Cultivados S.A. de C.V. y BC Abalone S.A. de C.V., ambas localizadas en el Ejido Eréndira.

El abulón se distingue por su alta capacidad para adherirse al sustrato al sentir algún factor de estrés, tanto en condiciones naturales como de cultivo (White et al., 1996), y una vez afianzados es casi imposible desprenderlos sin asistencia mecánica (Ebert y Houk, 1984). Este comportamiento tiene implicaciones en el manejo de granjas de cultivo, ya que el abulón comúnmente debe ser desprendido de los recipientes de cultivo para realizar valoraciones periódicas tales como sorteo de tamaños, ajuste de densidades, transporte, etc.. El desprendido mecánico puede dañar al organismo y eventualmente matarlo, debido a que este grupo no presenta mecanismos de coagulación, aumentando así la probabilidad de muerte por sangrado o por infección bacteriana (White et al., 1996). Con el objeto de evitar este problema se han implementado varias técnicas para desprender los abulones. Estas incluyen el aumento de la temperatura del agua de mar (Harris et al., 1997; Harris et al., 1999b), desecación temporal (Hahn, 1989), y la utilización de compuestos químicos con efecto anestésico.

En el abulón se han utilizado como anestésicos al  $\text{CO}_2$  (Arroyo y García, 2000), carbonato etílico, hidrato de cloro, barbitol, ácido dietil carbónico, alcohol etílico (Hahn, 1989), aceite de brotes de clavo (Aquí-S) (Stone and Testin, 1999; Edwards et al., 2000), salsa Tabasco, aceite de clavo (Edwards et al., 2000), cloruro de potasio (Hahn, 1989;

Edwards et al., 2000), EDTA, hidrocloreuro de procaína (White et al., 1996), MS-222, nembutal, fenoxitol propileno (Aquilina y Roberts, 2000), benzocaína (Hahn, 1989; Edwards et al. 2000; Aquilina y Roberts, 2000), sulfato de magnesio (Hahn, 1989; White et al., 1996) y fenoxietanol (White et al., 1996; Edwards et al., 2000). Los últimos tres anestésicos han probado ser efectivos en el proceso de anestesiado de abulones (Hahn, 1989; White et al., 1996; Aquilina y Roberts, 2000).

El método tradicionalmente utilizado para medir la efectividad de los anestésicos en los abulones es mediante la evaluación de su actividad motora y la velocidad de recuperación a niveles "normales", después del proceso de anestesiado (Hahn, 1989; White et al., 1996). No obstante, las secuelas a corto y mediano plazo no pueden ser identificadas con este método. Una alternativa es la medición de la tasa metabólica (o respiración) de los organismos, la cual es altamente sensible a cualquier cambio ambiental o factor de estrés físico-químico, incluyendo temperatura (Newell, 1973; Paul y Paul, 1998), concentración de oxígeno en el agua (Hahn, 1989; Harris et al., 1998b; Harris et al., 1999b), concentración de nitritos y amonio (Harris et al., 1997; Harris et al., 1998a; Harris et al., 1998b), o variaciones en el pH (Harris et al., 1999a).

Con el fin de probar si las observaciones visuales corresponden a medidas cuantitativas de recuperación post-anestesia, en el presente estudio se evaluó el efecto temporal del sulfato de magnesio, la benzocaína y fenoxietanol como anestésicos en juveniles del abulón azul. Estos tres anestésicos se han empleado durante la manipulación, intervención quirúrgica y transporte de otros moluscos como el calamar *Sepioteuthis sepioidea* (García Franco, 1992); la escalopa *Pecten fumatus* (Heasman et al., 1995), el ostión *Ostrea edulis* (Culloty y Mulcahy, 1992), *Pinctada maxima* (Norton et al., 1996), *Pinctada albina* (Mills et al., 1997), el mejillón *Elliptio complanata* (Lellis y Plerhoples, 1997), así como en otros moluscos de agua dulce (Araujo et al., 1995) y peces (Barton 1981; Yamamitsu y Itazawa, 1988; Gilderhus, 1991; Mattson y Ripple, 1989; Allen, 1988; Fredricks et al., 1993; Meinertz et al., 1996; Olsen y Ringoe, 1999; Clark, 2000).

## II. ANTECEDENTES

### Anestésicos

#### Sitios de acción

El sitio de acción de los anestésicos es el sistema nervioso de los organismos. La transmisión de información entre células nerviosas (neuronas) ocurre mediante la suma de complejos eventos físico-químicos conocidos como impulso nervioso o potencial de acción (Rawn, 1989). Éstos eventos están representados en parte por cambios en la permeabilidad de la membrana a los iones de sodio y potasio, lo cual genera gradientes electroquímicos a lo largo de esta. Las células nerviosas son excitables debido a que sus membranas contienen canales (poros) iónico sensibles al voltaje de  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{++}$ . La despolarización de la membrana ocurre cuando los cationes fluyen predominantemente hacia el interior de la membrana, haciendo su interior menos negativo. Asimismo, un flujo dominante de cationes hacia el exterior produce un gradiente más negativo en el interior, con la consecuente hiperpolarización de la membrana. Normalmente la membrana neuronal en reposo de vertebrados se encuentra polarizada a  $-70 \text{ mV}$  (Rawn, 1989). En estudios realizados sobre el axón gigante del calamar, se concluyó que la despolarización de la membrana causada por la intrusión de  $\text{Na}^+$  es seguida por una repolarización causada por la salida de iones  $\text{K}^+$ . Asimismo, la apertura de canales de  $\text{Ca}^{++}$  en el axón es facilitada por la presencia de neurotransmisores, como acetilcolina, el cual comúnmente se localiza en las uniones neuromusculares de vertebrados y los ganglios de gasterópodos (Tauc, 1966). Otras moléculas que funcionan como neurotransmisores son la dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina, GABA, glutamato y glicina (Rawn, 1989; Alberts et al., 1983). El flujo de iones  $\text{Ca}^{++}$  hacia el interior de las terminales axónicas normalmente se traduce en cambios conformacionales de las proteínas localizadas en la membrana post-sináptica de la célula muscular, lo cual permite el flujo de cationes ( $\text{Na}^+$ ) y la consecuente despolarización de membrana en la célula muscular (Rawn, 1989). La disfunción de las neuronas debido a la influencia de anestésicos también se refleja en una reducción del metabolismo corporal, ya que éste es

reducido como consecuencia del colapso nervioso debido a la interrupción de los impulsos entre las células nerviosas, provocado por esas sustancias (White, 1998; Norton et al., 1996; Teo y Chen, 1993; Kaiser y Vine, 1998; Murdoch y Greene, 1982; DeTolla et al., 1996, etc).

#### Acción del Sulfato de Magnesio, Fenoxietanol y Benzocaína

El Sulfato de Magnesio (**SM**) es un laxante utilizado en humanos, el cual también puede producir relajamiento de músculos y tendones (Fingl, 1982). Se utiliza también en la prevención de convulsiones, debido a que bloquea la transmisión neuromuscular, disminuyendo aparentemente la cantidad de acetil-colina liberada durante el impulso nervioso, por lo que también puede servir como agente anti-inflamatorio y anestésico general (AHFS, 1996). El **SM** deprime el sistema nervioso central, provocando la pérdida de reflejos y la reducción o parálisis respiratoria (White, 1998).

El Fenoxietanol (**FE**), aparte de ser utilizado en la industria de los cosméticos y en pinturas, es también usado como anestésico tópico y como bactericida (Dictionary of organic compounds, 1983; The Merk index, 1989; The Condensed Chemical Dictionary, 1966). La farmacocinética de este compuesto no está bien investigada (Mattson y Ripple, 1989), pero se sabe que disminuye la corriente del ion receptor-mediador NMDA (N-metil-d-aspartato) en las membranas nerviosas, neurotransmisor parecido al glutamato (Musshoff et al., 1999).

La Benzocaína (**BZ**) es un anestésico poco soluble y de uso tópico en humanos, aunque también es utilizado eficientemente como método de eutanasia en peces y anfibios (DeTolla et al., 1996). La **BZ** es pH-independiente y se absorbe lentamente hasta bloquear la conducción nerviosa. Actúa sobre cualquier parte del sistema nervioso y sobre cualquier tipo de fibra nerviosa. Su principal sitio de acción es la membrana celular, impidiendo o disminuyendo la permeabilidad de ésta a los iones de sodio mediante una ligera despolarización. Es decir, estabiliza la membrana neuronal inhibiendo el flujo rápido de los iones encargados de iniciar la conducción de los impulsos (Murdoch y Greene, 1982; White, 1998). En experimentos con el nervio

ciático de ranas se ha demostrado que el sitio activo de los anestésicos locales como la benzocaína, está íntimamente ligado a la región del canal de la membrana, donde la naturaleza del ion permeable puede alterar la interacción del anestésico con el canal de sodio (Lilley y Robbins, 1998).

### Métodos de Evaluación del Efecto de Anestésicos

Hasta ahora los métodos tradicionales para evaluar el efecto de los anestésicos y tiempo de recuperación en organismos marinos han sido esencialmente visuales. En peces, se ha medido el tiempo que tardan en perder y recuperar el movimiento respiratorio, movimiento locomotriz o habilidad de nado, funciones hidrostáticas, facilidad de manejo, equilibrio, respuesta a luz o tacto y mortalidad (Sehdev et al., 1963; Gilderhus, 1989; Gilderhus y Marking, 1987; McErlean y Kennedy, 1968; Meinertz et al., 1996; Mattson y Ripley, 1989). En bivalvos, típicamente se registra su capacidad de cerrar sus valvas, respuesta al tacto, flacidez del manto, reacción a estímulos externos, respuesta al manejo y mortalidad (Culloty y Mulcahy, 1992; Heasman et al., 1995; Norton et al., 1996; Mills et al., 1997). En el abulón, se ha evaluado su capacidad de adherencia al sustrato, relajamiento muscular, movimiento y mortalidad (Hahn, 1989; White et al., 1996; Aquilina y Roberts, 2000). Sin embargo, no hay reportes de criterios metabólicos que indiquen el estado de los organismos y en particular en abulones, durante y después del proceso de anestesiado.

### **Metabolismo**

La tasa de consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) es considerada como una medida indirecta y sensible del metabolismo de un organismo, el cual varía según su estado fisiológico. La tasa metabólica está influenciada por muchos factores, entre los que se incluyen agentes externos como temperatura, fotoperíodo, concentración de oxígeno y disponibilidad de alimento, así como factores intrínsecos como el sexo, edad, nivel de actividad, ritmos endógenos, etc. (Newell, 1973; Fitch, 1975; Hahn, 1989; Harris et al., 1997; Harris et al., 1998a; Harris et al., 1998b; Harris et al., 1999a). Dependiendo del nivel de actividad de un organismo, la tasa metabólica puede representar una medida del

metabolismo basal o estándar (estado de reposo o inanición moderada), metabolismo de actividad (máxima actividad, medida bajo condiciones forzadas) y metabolismo de rutina (Lucas, 1996). Este último está vagamente definido y representa la respuesta metabólica de un organismo bajo condiciones "normales" de actividad (Bayne, 1983, Lucas, 1996).

Debido a su fototactismo negativo (Ebert y Houk, 1984, *H. rufescens*), el abulón concentra principalmente su actividad motora (Donovan y Carefoot, 1998, *H. kamtschatkana*) y de alimentación (Barkai y Griffiths, 1987, *H. midae*) en los periodos nocturnos. Es durante ese período cuando se han reportado las más altas tasas metabólicas (Peck et al., 1987, *H. tuberculata*; Uki y Kikuchi, 1975, *H. discus hannai*). El abulón parece comportarse como oxirregulador parcial (Jan y Chang, 1983, *H. diversicolor*), ya que su tasa metabólica se mantiene estable aún a niveles de oxígeno del 80% de saturación (Harris et al., 1999b, *H. laevigata*). A concentraciones menores se ha observado la presencia de manchas en las células mucosas de las branquias, al igual que necrosis en el epitelio de éstas (Harris et al., 1998b), mientras que una exposición prolongada a concentraciones por encima del nivel de saturación les provoca aeroembolia (Elston, 1983; Hahn, 1989).

### **Ritmos circadianos**

El metabolismo de los organismos bajo condiciones normales presenta variaciones durante el transcurso del día (Newell, 1973; Fitch, 1974), y algunas de estas pueden ser cíclicas (Hahn, 1989). Los ritmos metabólicos circadianos se presentan aproximadamente cada 24h y representan una respuesta endógena a estímulos externos. La temperatura, intensidad de luz/fotoperíodo, y la disponibilidad de alimento se encuentran entre los principales factores responsables de la sincronía de esos ritmos (Hader y Tevini, 1987; Fuentes-Pardo et al., 1997; Uki y Kikuchi, 1975). Además del metabolismo, se han observado ritmos endógenos en otras funciones fisiológicas, tales como la temperatura corporal, producción de hormonas, etc. (Hernandez-Falcon y Ramon, 1998). En organismos marinos, se han reportado no solamente ritmos circadianos, sino también ritmos mareales (Gray y Hodgson, 1999), y lunares (Thurman,

1998) entre otros. En el abulón, la presencia de ritmos circadianos se reportaron desde 1975 (Uki y Kikuchi), en donde su actividad, alimentación y metabolismo coinciden con el fotoperíodo (Ebert y Houk, 1984; Donovan y Carefoot, 1998; Barkai y Griffiths, 1987; Peck et al., 1987).

Es evidente que el metabolismo es muy sensible a factores externos e internos que afectan el comportamiento normal del organismo. Las mediciones temporales de la tasa metabólica permite no solamente identificar esas variaciones, sino cuantificar su magnitud y duración. En este trabajo se identificó y midió la magnitud de las variaciones diurnas en el metabolismo de abulones juveniles *Haliotis fulgens*, y las alteraciones metabólicas provocadas por **SM**, **FE** y **BZ** como agentes anestésicos.

### III. OBJETIVOS:

1. Cuantificar las variaciones metabólicas de los abulones dentro de un ciclo día/noche.
2. Determinar el efecto temporal de los anestésicos sulfato de magnesio, fenoxietanol y benzocaína, sobre el metabolismo de los abulones juveniles *Haliotis fulgens*, y compararlo con las criterios visuales de recuperación.

#### **IV. MATERIALES Y METODOS**

##### **Condiciones generales:**

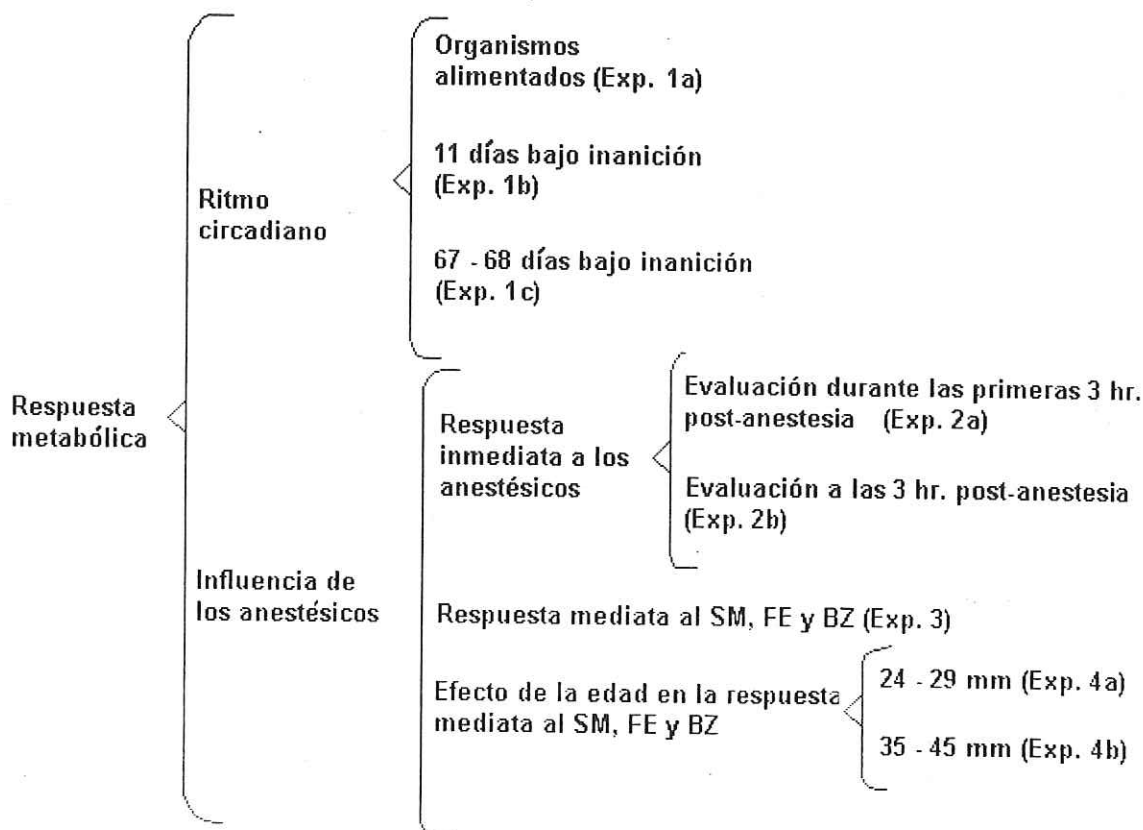
En el presente trabajo se llevaron a cabo 6 experimentos con organismos provenientes de la granja abulonera BC Abalone S.A. de C.V., localizada en el Ejido Eréndira, B.C.. Los experimentos fueron de dos tipos (Fig. 1):

1. Series de tiempo para identificar la presencia de ritmos endógenos en el metabolismo de organismos alimentados (Exps. 1a) y bajo inanición. Estos últimos se llevaron a cabo con organismos de 11 días (Exp. 1b) o 67 días de inanición (Exp. 1c).
2. Experimentos (Exps. 2 – 4) para probar el efecto del sulfato de magnesio (SM), fenoxietanol (FE) y benzocaína como anestésicos en juveniles de abulón.

En los experimentos del tipo 2 se realizaron series de tiempo durante las tres primeras horas de aplicación de los anestésicos (Exp. 2a) o en las subsecuentes 50 h (Exps. 4a y 4b), utilizando un mismo grupo de organismos en cada caso. En contraste, para los experimentos 2b y 3 se utilizaron grupos de organismos independientes en cada período de medición. Estas mediciones se realizaron a las 3h post-anestesia (Exp. 2b) o a las 3, 5, 8 y 15 h post-anestesia (Exp. 3).

##### **Transporte y Mantenimiento de Organismos Experimentales**

Un total de 400 organismos de 15 meses de edad (desove del 11/09/1998) y con tallas entre 2.8-3.8 mm., fueron transportados dentro de hieleras cerradas al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Con el fin de mantener una atmósfera húmeda durante el transporte, los organismos se colocaron entre hojas del alga *Macrocystis sp.* y sobre tela de yute húmeda colocada encima de barras de hielo seco.



**Fig. 1.** Cuadro sinóptico de los diferentes experimentos realizados con el abulón *H. fulgens*, para valorar su respuesta metabólica.

Al llegar al laboratorio, los abulones fueron transferidos a 15 cubetas de plástico de un volumen de 4 L (15 abulones por cubeta), y a 3 canastas de 30 x 38 x 20 cm (L x W x H) (175 abulones). Tanto las cubetas como las canastas con abulones se colocaron dentro de una charola de fibra de vidrio de 2.5 x 0.8 x 0.15 m (L x W x H), y fueron provistas de aireación y flujo de agua de mar filtrada (10 $\mu$ , 34 psu.). Con una sola excepción (Exp. 2, 19  $\pm$  °C), la temperatura del agua se mantuvo constante a lo largo de los experimentos (23  $\pm$  1 °C), mediante un calentador de inmersión (CLEPCO, 1000 watts) colocado en un reservorio que descargaba en las unidades experimentales.

Los organismos fueron alimentados en las cubetas y canastas con una dieta balanceada formulada para abulón por la Dra. Ma. Teresa Viana, investigadora del I.I.O. (Tabla II). El alimento se suministraba diariamente durante la noche y se retiraba por la

mañana (12 hr.), durante la limpieza. Todo el sistema estuvo cubierto con mallas de sombra (70% de sombreado), hasta una intensidad aproximada de  $2 \times 10^{-15} \mu\text{E seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$  (Irradiómetro Biospherical Instruments Inc. QSL-100). En todos los casos se mantuvo un fotoperíodo de 12:12 luz:oscuridad.

Para el Exp. 4a se utilizaron abulones de 24-29 mm, donados en mayo del 2000 por el Dr. Searcy Bernal, investigador del I.I.O.. Los organismos tenían una edad aproximada de 1 año y fueron alimentados con la misma dieta descrita anteriormente, a temperatura entre 15 °C y 18 °C. Cuatro semanas antes del experimento, esos organismos fueron trasladados al sistema experimental descrito arriba.

**Tabla I.** Composición porcentual (en base seca) de la dieta suministrada a los abulones durante las etapas de mantenimiento y experimentación.

| INGREDIENTES        | % EN DIETA |
|---------------------|------------|
| Harina de pescado   | 30         |
| Harina de alfalfa   | 15         |
| Harina de maíz      | 12         |
| Harina de soya      | 10         |
| Almidón modificado  | 10         |
| Almidón de maíz     | 9.25       |
| Ensilaje de atun    | 2          |
| Vitaminas           | 1.3        |
| Vitamina C (Stay-C) | 0.4        |
| Minerales           | 3.3        |
| Metionina           | 0.23       |
| Benzoato de sodio   | 0.23       |
| Cloruro de colina   | 0.11       |
| BTH                 | 0.086      |
| Gelatina            | 6          |
| TOTAL               | 100%       |

## Respuestas Metabólicas

### Ritmo Circadiano

Para identificar el ritmo circadiano se realizaron tres series de tiempo (Tabla II). En la primera (Exp. 1a) se utilizaron organismos alimentados, cuyo metabolismo fué medido a lo largo de 50 h, con incubaciones discretas de 1h de duración y frecuencia aproximada de 1.5h (Tabla II). Para el segundo (1b) y tercer experimentos (1c) se utilizaron organismos con 11 días (1b) o 67 días de inanición con el fin de comprobar si el ritmo circadiano era influenciado por la disponibilidad de alimento. Las series de tiempo se llevaron a cabo de la misma forma que en el experimento 1a, excepto que la frecuencia de medición fué distinta y se anestesiaron los organismos con fenoxietanol para poder transferirlos a las cámaras de incubación (Tabla II). Los cambios en la tasa metabólica de los organismos sometidos a inanición, así como el porcentaje de mortalidad también fueron monitoreados en forma discreta en distintos momentos a lo largo de todo el período de inanición (0 a 74 días), con frecuencias de 5 a 10 días. Dichas mediciones solo se hicieron una vez por día y a una misma hora (12h).

**Tabla II.** Resumen de los experimentos que se llevaron a cabo con juveniles de *H. fulgens* para evaluar el metabolismo durante un ciclo circadiano.

| EXP. | TALLA<br>(mm) | FREC. DE MEDICION Y<br>DURACION TOTAL | CARACTERISTICAS        |
|------|---------------|---------------------------------------|------------------------|
| 1a   | 35-45         | 1.5hr x 50 hr                         | ALIMENTADOS            |
| 1b   | 25-40         | irregular x 12 hr                     | 11 DÍAS INANICIÓN Y FE |
| 1c   | 25-40         | irregular x 50 hr                     | 67 DÍAS INANICIÓN Y FE |

En el Exp. (1a) se seleccionaron aleatoriamente 24 abulones y se repartieron en 8 cámaras respirométricas (3 organismos por cámara), donde permanecieron durante 24 hr. bajo condiciones de flujo abierto y sin alimento. Adicionalmente se pusieron 4 cámaras control (sin organismos). Antes de iniciar la primera medición de consumo de

oxígeno, se les realizó una limpieza mediante sifoneo para eliminar las heces producidas. Posteriormente las cámaras fueron selladas y se introdujeron los electrodos. La medición de consumo de oxígeno se inició una vez que se cerró el flujo de agua en las cámaras. Aproximadamente cada 1.5 hr. (durante 50h) se reabría el flujo para renovar el agua (3 - 5 volúmenes de recambio) y reiniciar una nueva incubación. Al final del experimento se pesaron y midieron todos los organismos experimentales. Durante las mediciones se mantuvo el fotoperíodo de 12:12 cubriendo completamente el perímetro de la charola experimental con mallas de sombra ( $2 \times 10^{-15} \mu\text{E seg}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ), y durante la noche con plástico negro hasta obtener una oscuridad casi total. Las tasas metabólicas promedio, tanto de la condición de luz como de oscuridad, se obtuvieron promediando las mediciones asociadas a dichos períodos. El mismo protocolo descrito anteriormente se aplicó para los organismos bajo inanición (Exps. 1b y 1c), excepto que el número de réplicas (cámaras) se redujo a tres, con igual número de cámaras control (sin abulones).

#### Efecto de los Anestésicos

Se realizaron un total de 5 experimentos para cuantificar la respuesta metabólica de los abulones a los anestésicos **SM**, **FE** y **BZ**. Las mediciones se hicieron en series de tiempo o en forma puntual, dependiendo del experimento (Tabla III).

Los anestésicos empleados fueron sulfato de magnesio (**SM**, SIGMA M-7506) a una concentración final del 4% w/v (Hahn, 1989), fenoxietanol (**FE**, SIGMA P-1126) al 0.1% v/v (Edwards et al., 2000) y benzocaína (**BZ**, SIGMA E-1501) al 0.01% v/v. La **BZ** fué preparada disolviéndola previamente en alcohol etílico (96%), a una concentración del 10% w/v (Hahn, 1989). Las soluciones finales se prepararon en agua de mar filtrada ( $5\mu\text{m}$ ) inmediatamente antes del tratamiento de los abulones.

El proceso de anestesiado para los exps. (2b – 4b) consistió en lo siguiente: a) los abulones fueron primero desprendidos de las canastas de mantenimiento con ayuda de una espátula, e inmediatamente se transfirieron a cubetas de 4 L. las cuales contenían aproximadamente 1 L de agua de mar; b) una vez que los abulones se adhirieron nuevamente a las cubetas, se aplicó el anestésico y se registró el tiempo de respuesta de los organismos. Se consideraron anestesiados aquellos organismos que fueron

desprendidos con facilidad de la superficie de la cubeta al empujarlos suavemente con los dedos, o cuando éstos se desprendieron solos de la superficie. Cada organismo experimental fué transferido a su respectiva cámara de incubación conforme mostraba signos de anestesiado. Una vez que se terminaron de transferir todos los organismos, se cortó el flujo de las cámaras y se procedió a medir el consumo de oxígeno, durante un período de 1.5 a 2 h.

Para el Exp. 2b se corrieron simultáneamente 3 tratamientos (**SM, FE y control**) y un blanco sin abulones. Se utilizaron 3 réplicas (cámaras) por tratamiento (3 organismos por réplica), excepto en las cámaras sin abulones que se corrieron por duplicado. En el experimento 3 se corrieron simultáneamente tres tratamientos (**SM, FE, BZ**), utilizando tres réplicas por tratamiento (3 organismos por cámara) y 2 réplicas control. Al final de las incubaciones se corrieron controles sin organismos (blancos) para corregir por el consumo de oxígeno asociado al electrodo y/o los microorganismos presentes en las cámaras. En este experimento las evaluaciones temporales se hicieron en forma independiente, utilizando distintos grupos de abulones para cada periodo de evaluación (3, 5, 8 y 15 horas post-anestesia). Cada incubación duró 1.5h

**Tabla III.** Detalles de los experimentos que se llevaron a cabo con juveniles de *H. fulgens*, para valorar la influencia de los anestésicos sobre el metabolismo.

| EXP. | TALLA<br>(mm) | FREC. DE MEDICION Y<br>DURACION TOTAL | TRATAMIENTO |
|------|---------------|---------------------------------------|-------------|
| 2a   | 35-45         | Contínuo x 4h                         | SM, FE Y BZ |
| 2b   | 30-40         | Puntual, 3 hr                         | SM Y FE     |
| 3    | 30-40         | Puntual, 3, 5, 8, 15 h                | SM, FE Y BZ |
| 4a   | 24-29         | 8hr x 50 h                            | SM, FE Y BZ |
| 4b   | 35-45         | 8hr x 50 h                            | SM, FE Y BZ |

SM= Sulfato de magnesio. FE= Fenoxietanol. BZ= Benzocaína.

Los experimentos 4a y 4b se corrieron con el fin de probar si la edad de los abulones influía sobre el comportamiento circadiano. Los experimentos iniciaron en distintas fechas y tuvieron una duración de 50h cada uno. Durante ese tiempo se realizaron 7 mediciones discretas de consumo de oxígeno, con duraciones de 1.5h cada una. La primer medición se llevó a cabo aproximadamente 3h después de haber aplicado el anestésico, y posteriormente cada 8 h hasta terminar el experimento (Tabla III). Las incubaciones se realizaron simultáneamente en organismos previamente anestesiados con **SM**, **FE** y **BZ**, utilizando tres réplicas por tratamiento y dos réplicas control (abulones sin anestésico). Al final de las incubaciones se corrieron controles sin organismos.

En el experimento 2a los abulones se anestesiaron dentro a las cámaras respirométricas. Debido a que el objetivo de este experimento fue cuantificar con detalle la respuesta metabólica de los organismos durante y después del proceso de anestesiado, en todos los casos se utilizó un tiempo fijo de tratamiento de 10 min (**FE**, **BZ**) o 20 min (**SM**). Estos períodos fueron seleccionados con base al tiempo promedio de respuesta al anestésico observado en distintos experimentos (ver Anexo 1). La tasa metabólica de los organismos experimentales se monitoreó en forma continua antes, durante y después de la aplicación de los anestésicos. Al final del período de aplicación de los anestésicos, estos se eliminaron de las cámaras mediante recambios completos (6 a 8 volúmenes) del agua de incubación. Cada anestésico se evaluó en forma independiente en distintos días, utilizando simultáneamente 4 réplicas del tratamiento (3 organismos por cámara), 3 réplicas control (abulones, sin anestésico), y 3 réplicas consideradas como blanco de reactivo (agua de mar con anestésico).

## **Mediciones**

### Respiración

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron con dos oxímetros polarográficos Strathkelvin de 6 canales cada uno. Antes de cada experimento, los 12 electrodos fueron calibrados simultáneamente en agua de mar filtrada (5 $\mu$ m) y saturada con oxígeno por medio de aireación. La calibración al 0% de oxígeno fué realizada en

una solución de agua de mar y sulfito de sodio al 5%, mientras que la calibración al 100% se llevó a cabo 15 min. después de saturar el agua de mar con aireación fina.

Los cambios en la concentración de oxígeno (% de saturación) dentro de las cámaras se monitoreó cada 30 segundos en tiempo real, por medio de un programa de computación del mismo oxímetro. Se tuvo especial cuidado de que la concentración total de oxígeno en las cámaras no disminuyera por debajo del 80%. Al final de las incubaciones se calcularon las tasas (pendientes) de consumo de oxígeno (%O<sub>2</sub>/min) para cada una de las cámaras, mediante regresiones lineales. La tasa de consumo de oxígeno (tasa metabólica) de los organismos incubados se estimó con la siguiente ecuación:

$$V_{O_{2e}} = \frac{(m * C_s * 60 \text{ min})}{(100\% * 1h * n)} \quad (1)$$

Donde:

$V_{O_{2e}}$  = Tasa metabólica del organismo experimental ( $\mu\text{L O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ).

$m$  = pendiente del consumo de O<sub>2</sub> en la cámara (%O<sub>2</sub>/min)

$C_s$  = Cantidad total de O<sub>2</sub> en la cámara al 100% de saturación ( $\mu\text{L O}_2$ ).

$n$  = Numero de organismos dentro de la cámara.

La concentración de oxígeno al 100% de saturación se obtuvo utilizando las tablas de solubilidad de O<sub>2</sub> reportados por Green y Carritt (1967), tomando en cuenta la temperatura y salinidad del agua a una atmósfera de presión. A cada cámara se le restó el consumo promedio de oxígeno obtenido en las cámaras sin abulones. Debido a la diferencia de peso de los distintos grupos de abulones (2.2 a 11.7 g peso húmedo), la tasa metabólica calculada en (1) se estandarizó a 4.5 g. por medio de la siguiente ecuación alométrica (Bayne y Newell, 1983):

$$V_{O_{2s}} = V_{O_{2e}} * (W_s / W_e)^{0.72} \quad (2)$$

Donde:

$Vo_{2s}$  = Tasa metabólica de un animal estándar de 4.5 g ( $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ).

$Vo_{2e}$  = Tasa metabólica del organismo experimental ( $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ).

$Ws$  = Peso del organismo estándar (4.5 g).

$We$  = Peso del organismo experimental (g).

0.72 = Exponente de la ecuación alométrica que relaciona el peso húmedo y la tasa metabólica para el abulón *H. fulgens* (Peck et al., 1987).

#### Criterios Visuales de Recuperación Post-anestesia

Los abulones anestesiados fueron colocados dentro de las cámaras respirométricas en forma invertida (pie hacia arriba). El tiempo que tardaban los abulones en incorporarse o voltearse a su posición original fue registrado, y se consideró como un criterio visual de recuperación post-anestesia (White et al., 1996).

#### Talla y peso

El peso húmedo y talla de los abulones se midieron después de las incubaciones en las cámaras respirométricas (Exp. 1a y 2a) o antes de introducirlos a las cámaras (resto de los experimentos). Se registró individualmente la longitud máxima de la concha con un vernier electrónico digital (MAX-CAL  $\pm 0.03$  mm). El peso húmedo de los abulones se registró en una báscula portátil (AND SV-200  $\pm 0.01$ g) después de quitar el exceso de agua a los abulones con una toalla.

#### Mortalidad

La mortalidad post-anestesia se evaluó durante las primeras 2 - 4 semanas en los Exp. 2a, 2b, 3, 4a y 4b, introduciendo a los abulones en cubetas de 4 L con flujo de aire y agua constantes, separados por tratamiento. La mortalidad debida a la inanición, en el Exp. 1b, se identificaron por su falta de adherencia a las paredes del recipiente y la falta de respuesta a estímulos mecánicos (presión) sobre la masa muscular.

### **Análisis estadístico.**

Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía en los Exps. 1 a-c para probar el efecto del tiempo sobre la tasa metabólica de los organismos. También se usó un ANOVA de una vía en los Exps. 2a, 2b y 3 para probar el efecto de los anestésicos (SM, FE y BZ) sobre el metabolismo de los abulones.

En los Exp. 4a y 4b se empleó un ANOVA de 2 vías para probar el efecto de los anestésicos y el tiempo, sobre el metabolismo de los abulones.

Cuando el ANOVA produjo diferencias significativas, se empleó el método de comparaciones múltiples de medias LSD de Fisher's para cada factor.

Antes de los ANOVAS, se probó la normalidad por medio del método Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas por medio del método de Levene's. Todos los resultados estadísticos se consideraron significativos a un nivel de  $\alpha < 0.05$ .

## V. RESULTADOS:

### *Respuestas Metabólicas*

#### **Ritmo circadiano**

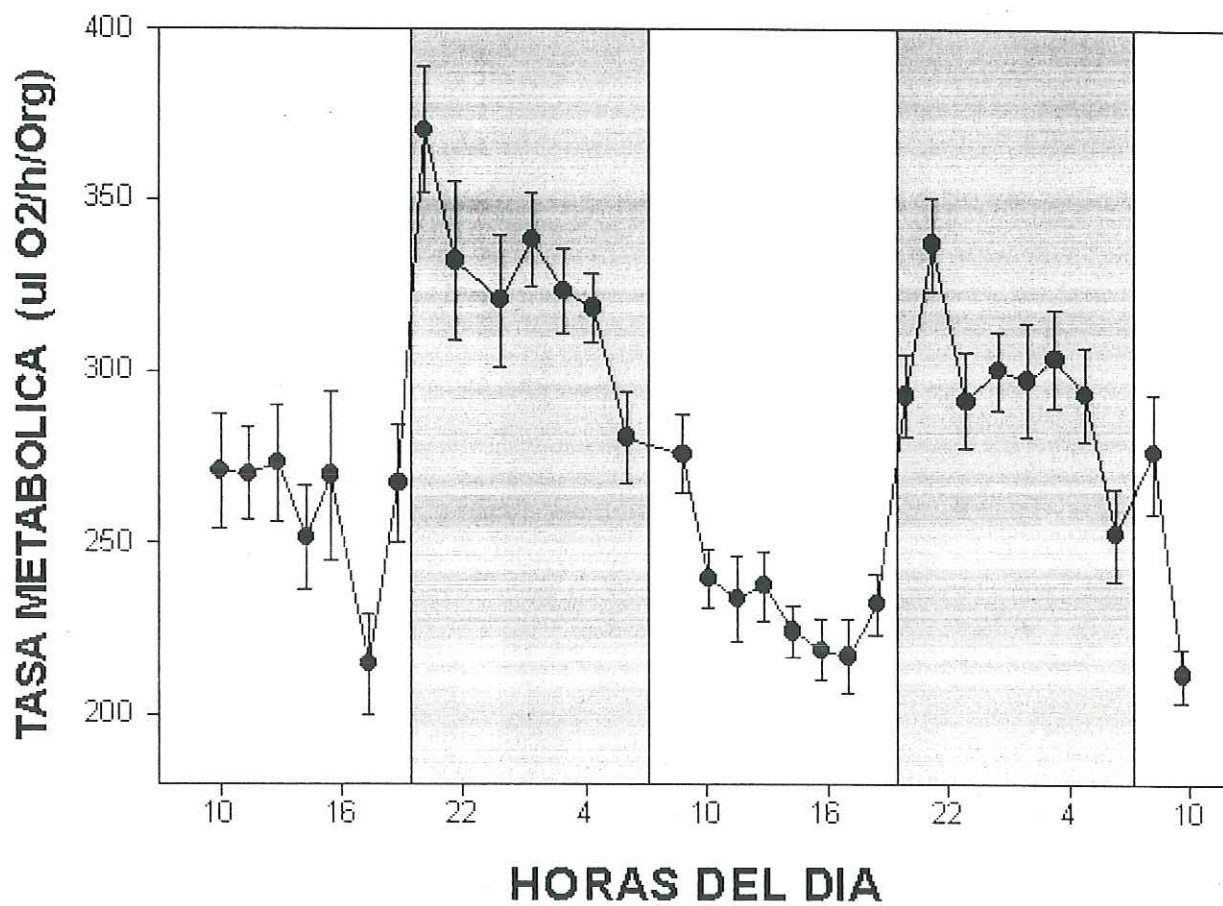
##### Organismos alimentados (Exp. 1a)

Se observó la presencia de un ritmo circadiano en el metabolismo de los abulones (Fig. 2), con diferencias significativas en función del tiempo (ANOVA,  $P = 0.001$ ). La tasa metabólica aumentó rápidamente durante el día hasta alcanzar valores asintóticos máximos durante las horas nocturnas (22:00 a 4:00 h) y mínimos durante el día (10:00 a 16:00 h). La tasa de respiración nocturna fue hasta un 22.4% o 31.2% mayor que los valores promedio observados durante el primer ( $267 \pm 6.8 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ) y segundo períodos de iluminación ( $226.4 \pm 4.4 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ). Los picos observados a las 20:00 h y 8:00 h de ambos días, corresponden al momento en que se colocó y quitó el plástico negro que se usó para regular el fotoperíodo.

##### Organismos bajo inanición (Exps. 1b y 1c)

El metabolismo de los abulones bajo inanición, también presentó un ritmo circadiano similar al descrito para los organismos alimentados, con incrementos significativos (ANOVA,  $P = 0.001$ ) en la tasa promedio de respiración nocturna de hasta un 48% con respecto al día (Fig. 3). Aun cuando la tasa metabólica basal disminuyó hasta un 50% en los organismos con 67 días de inanición, el ciclo circadiano siguió presentándose en estos abulones (Fig. 3).

En general, los juveniles de *H. fulgens* sometidos a inanición mantuvieron una tendencia a disminuir linealmente su metabolismo basal conforme aumentó el período de inanición (Fig. 4a), disminuyendo desde  $162 \pm 6 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$  (día 0) hasta  $69 \pm 1.8 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$  (día 74). La disminución del metabolismo también fue acompañada por una reducción lineal del peso húmedo (Fig. 4b). El porcentaje de sobrevivencia se mantuvo por encima del 90% durante los primeros 60 días de inanición, pero disminuyó abruptamente hasta un 15% en los subsecuentes 30 días (Fig. 4c).



**Fig. 2.** Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones (35-45 mm) alimentados a lo largo de un periodo de 50 horas. Las regiones sombreadas indican los periodos nocturnos. Las barras verticales indican el error estándar.

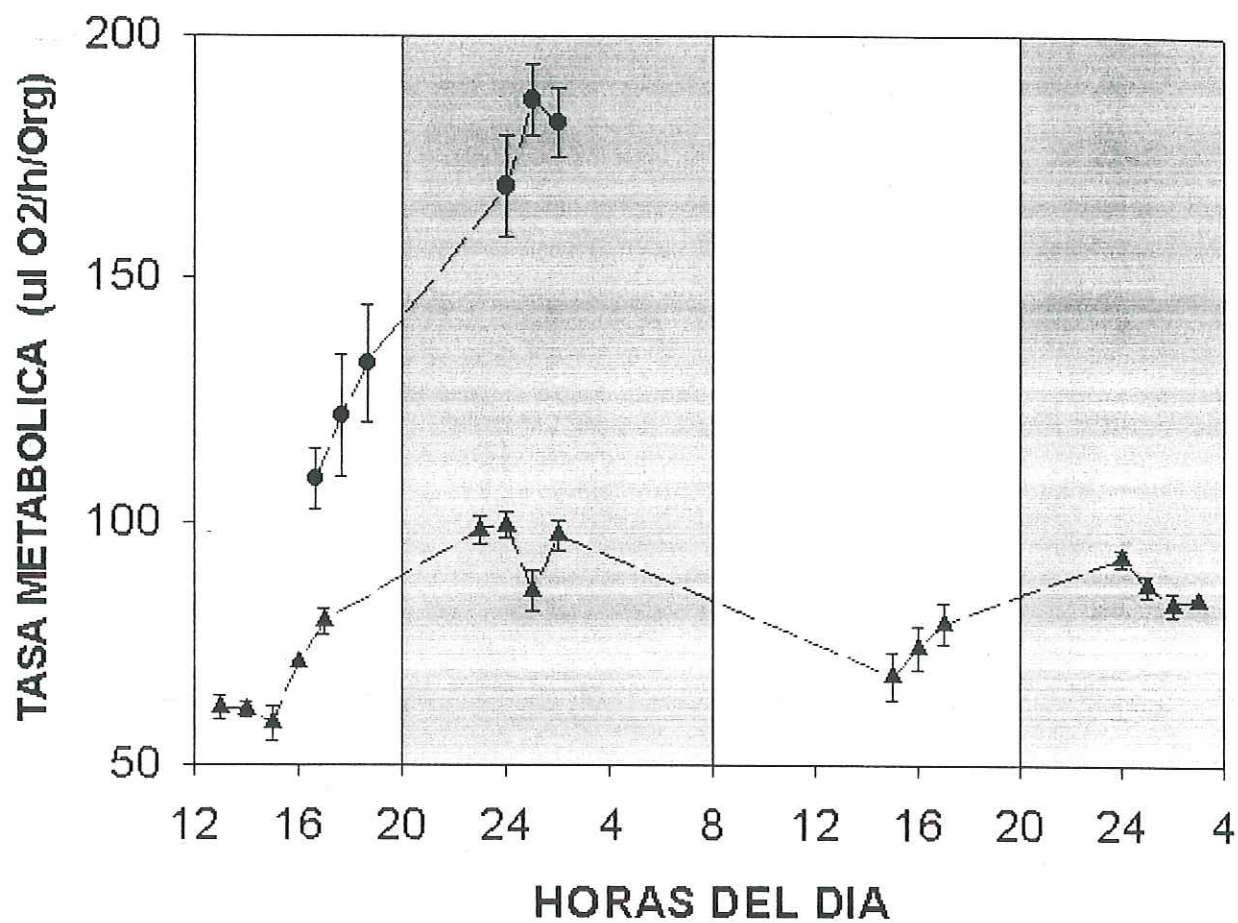
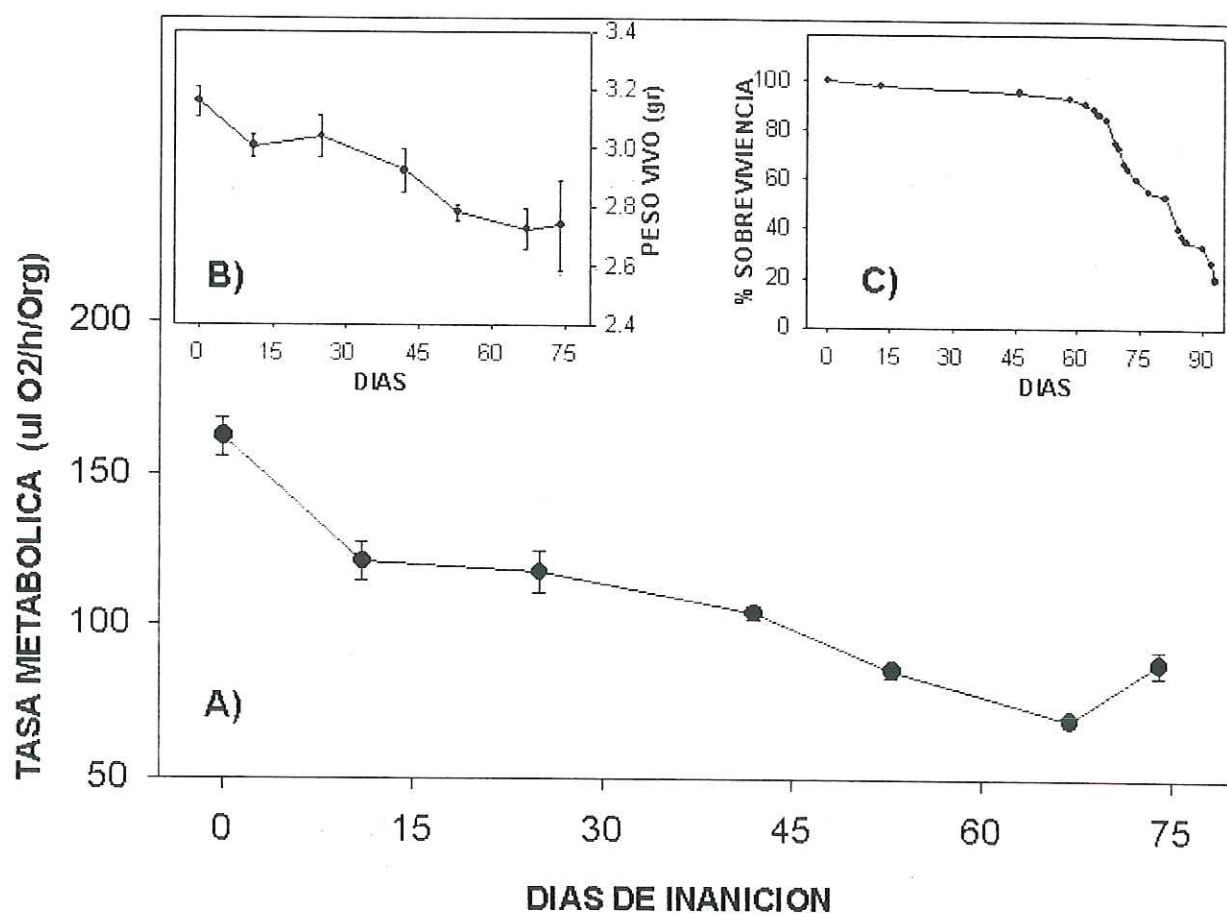


Fig. 3. Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones con 11 días (●) y 67 días (▲) de inanición. Las barras verticales indican el error estándar.



**Fig. 4.** Cambios temporales en la tasa metabólica (A), peso húmedo total (B) y porcentaje de sobrevivencia (C) de juveniles de abulón sometidos a inanición. Las barras verticales indican el error estándar.

## Efecto de los anestésicos

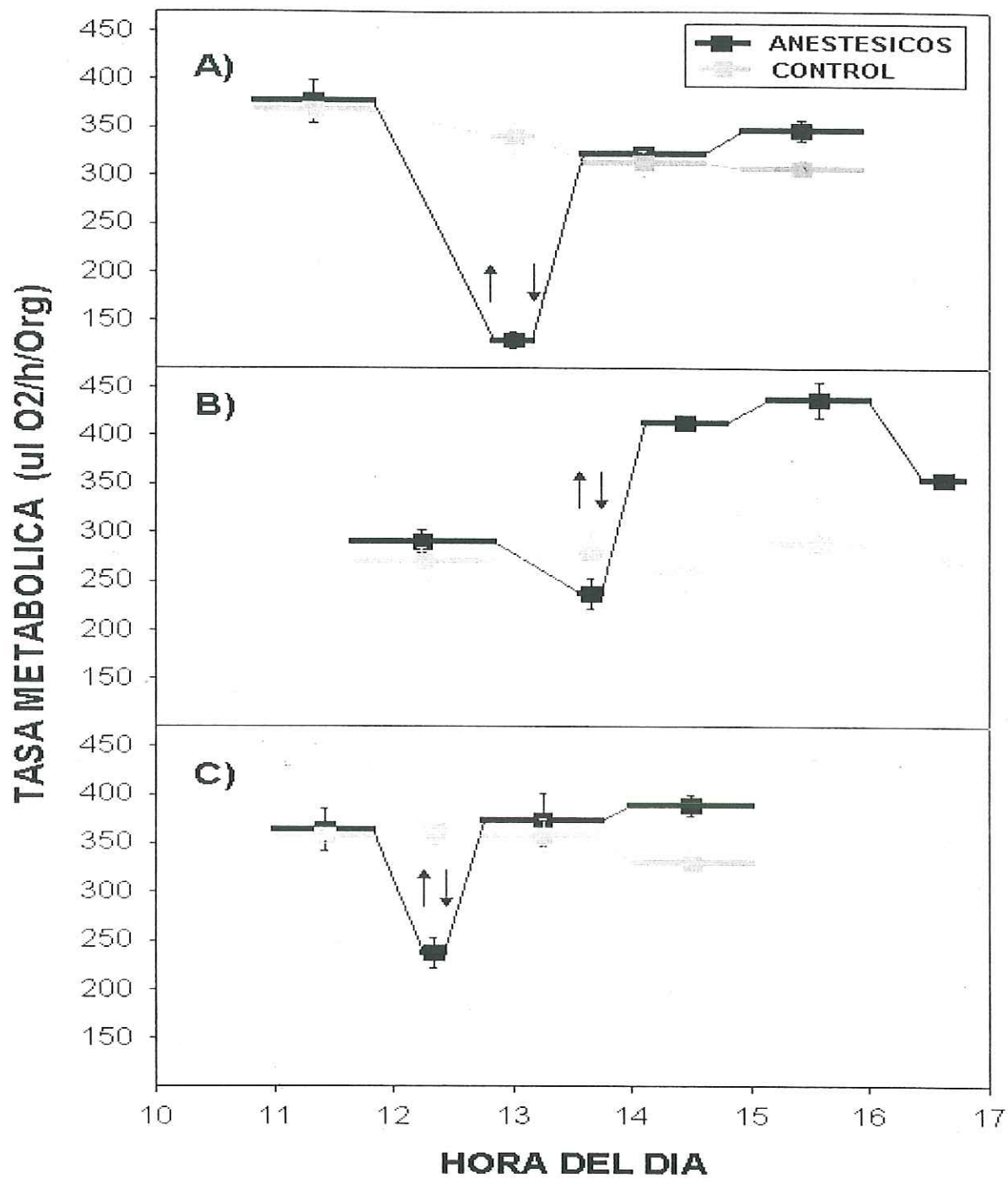
### Respuesta metabólica durante el proceso de anestesiado (Exp. 2a)

La tasa metabólica de los abulones se redujo significativamente durante el tiempo que estuvieron en contacto con los anestésicos, alcanzando valores de hasta un 18% (**FE**, ANOVA  $P = 0.1$ ), 34% (**BZ**, ANOVA  $P = 0.002$ ) o 65% (**SM**, ANOVA,  $P = 0.001$ ) menores que los valores pre-anestesia (Fig. 5 a-c). No obstante, los abulones restablecieron su metabolismo (**SM**,  $377.2 \pm 22.2 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ) o lo incrementaron por encima de los valores iniciales (**FE** y **BZ**, Fig. 5 b,c) una vez que los anestésicos se eliminaron de las cámaras respirométricas. La tasa metabólica de los abulones post-anestesia aumentó significativamente en todos los tratamientos (Fig. 5 a-c) por encima de los valores control durante el período final de incubación (2 a 3h). Las máximas diferencias se presentaron en el tratamiento con **FE** (ANOVA,  $P = 0.003$ ), seguido por la **BZ** (ANOVA,  $P = 0.03$ ) y **SM** (ANOVA,  $P = 0.04$ ).

El consumo de oxígeno en las cámaras blanco de reactivo (sin organismos) fue de  $22 \pm 3 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{L}$ , previo a la adición de los anestésicos. Una vez adicionados, el consumo de oxígeno se aumentó sustancialmente, lo cual se reflejó en una disminución de la concentración de oxígeno (% de saturación) en las cámaras, desde un 100% hasta el 99.7%, 98.6% y 93.8% (**SM**, **FE** y **BZ** respectivamente) en solo 10 min. de medición (Fig. 6). Estadísticamente esa disminución solo fue significativa en las cámaras con **FE** y **BZ** (ANOVA,  $P < 0.05$ ). El consumo promedio de  $\text{O}_2$  en las cámaras con **BZ** representó un 54.3% ( $330.4 \pm 18.7 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{L}$ ) de la tasa total promedio de consumo de  $\text{O}_2$  registrada en las cámaras con abulones ( $608.3 \pm 37.5 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{L}$ ). En el caso del **FE**, el consumo del blanco de reactivo solo representó un 12.8% ( $75.5 \pm 7 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{L}$ ) y el **SM** un 10.2% ( $32.15 \pm 1.6 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{L}$ ) del total que existió en las cámaras con abulones.

### Comparativo a las 3 hr. Post-anestesia: **SM** y **FE** (Exp. 2b)

Debido a que el experimento anterior se corrió en forma independiente para cada anestésico, en el presente experimento se realizó una corrida simultánea para comparar el efecto de dos anestésicos (**FE** y **SM**) sobre el metabolismo de los abulones a las 3h



**Fig. 5.** Respuesta metabólica de abulones (35-45 mm) antes, durante y 3 hr posteriores al proceso de anestesiado con sulfato de magnesio (A), Fenoxietanol (B) y Benzocaína (C). El intervalo de medición (barra horizontal) se muestra con el promedio de la tasa metabólica (símbolo) y su error estándar (barra vertical). Las flechas indican el momento en que se suministro (↑) o eliminó el anestésico (↓) de las cámaras de incubación.

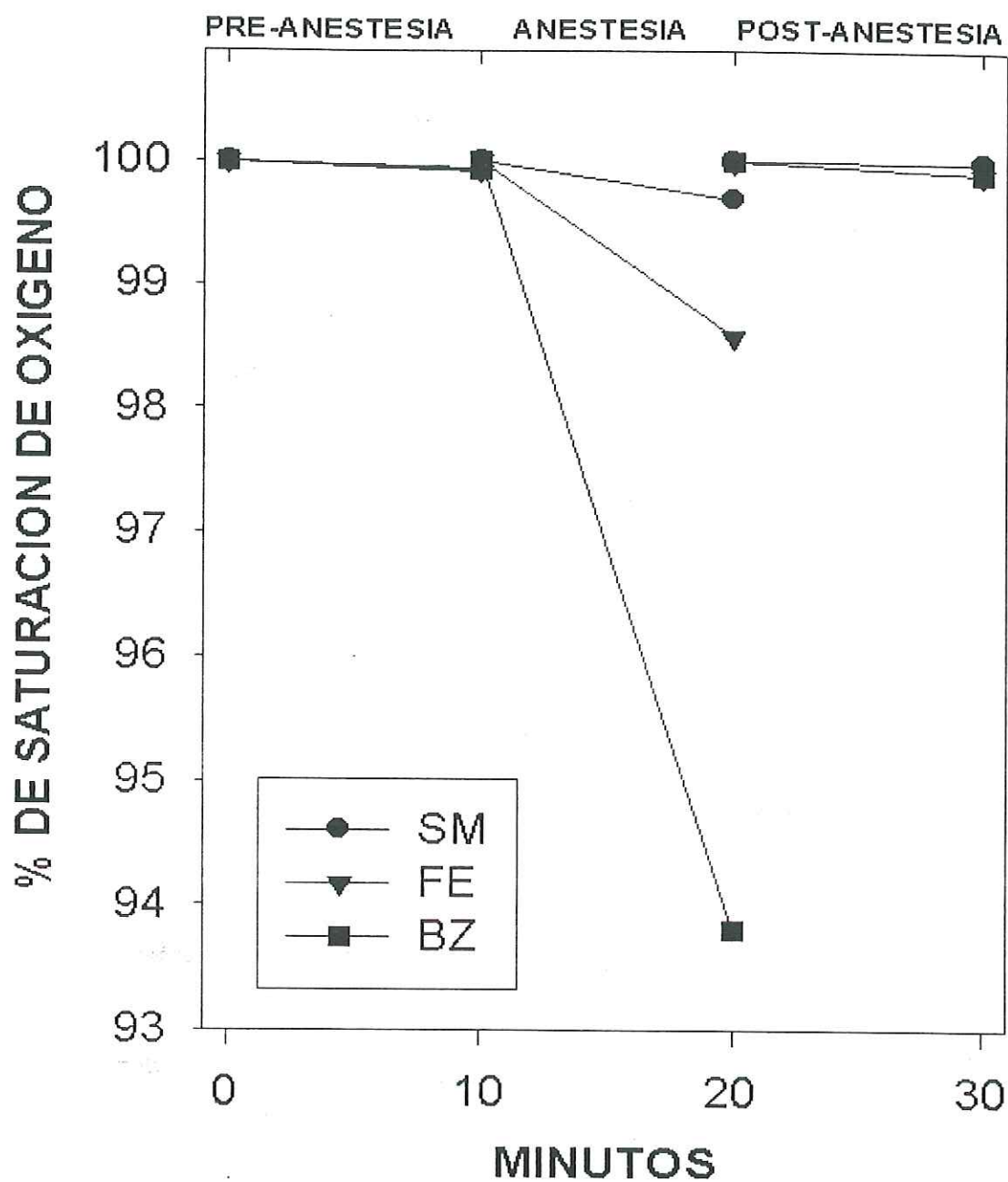


Fig. 6. Cambios comparativos en la concentración de oxígeno dentro de las cámaras blanco de reactivo en periodos de 10 min. antes, durante y después del suministro de los anestésicos sulfato de magnesio (SM), fenoxietanol (FE) y benzocaína (BZ). Las flechas indican el momento en que se suministro (↑) o elimino el anestésico (↓) de las cámaras de incubación.

post-anestesia. Ambos anestésicos provocaron un aumento de la tasa metabólica de los abulones significativamente mayor (ANOVA,  $P = 0.002$ ) que la del grupo control ( $215.5 \pm 3.6 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ). La tasa metabólica de los abulones sometidos al **FE** y **SM** aumentó hasta un 31.4% y 16.5% con respecto al control (LSD,  $P < 0.05$ ) (Fig. 7).

#### Comparativo Post-anestesia: SM, FE y BZ (Exp. 3)

No se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $P = 0.2$ ) entre el metabolismo de los abulones tratados con los anestésicos y el control ( $312 \pm 64 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ) después de 3 hr. post-anestesia. Sin embargo se observó una tendencia de mayor consumo de oxígeno con respecto al control, de acuerdo al siguiente orden, el **SM**, **FE** y **BZ** (Fig. 8a).

A las 5 hr. post-anestesia, el metabolismo de los abulones expuestos a los tres anestésicos, fue significativamente mayor (ANOVA,  $P = 0.02$ ) que el de los controles ( $272.5 \pm 5.5 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{Org}$ ). Los organismos sometidos al **SM** presentaron 49% mayor tasa metabólica que los controles, mientras que el y **BZ** mostraron valores del 55.6% y 34.5% (respectivamente) mas altos que el control (LSD,  $P < 0.05$ ) (Fig. 8 b). No se detectaron diferencias estadísticas en la tasa metabólica de los tratamientos a las 8h post-anestesia (ANOVA,  $P = 0.1$ ) o a las 15h (ANOVA,  $P = 0.1$ ), a pesar de que los valores promedio de los abulones anestesiados tendió a ser mayor que el de los abulones control (Fig. 8 c,d).

#### Efecto de la edad en la respuesta al SM, FE y BZ (Exp. 4a y 4b)

En ambos experimentos se observó la presencia de un ritmo circadiano en el metabolismo de los abulones, independientemente de la edad o la presencia de anestésicos (Fig. 9).

En ambos experimentos se encontraron diferencias significativas por efecto del tiempo (ANOVA,  $P=0.001$ ). Sin embargo, no se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos a cada hora de evaluación (ANOVA,  $P > 0.8$ ). A pesar de lo anterior, la magnitud del de la tasa metabólica tendió a ser mayor en los tratamientos con anestesia que en los controles durante las primeras 8h post-anestesia (Fig. 9 a,b).

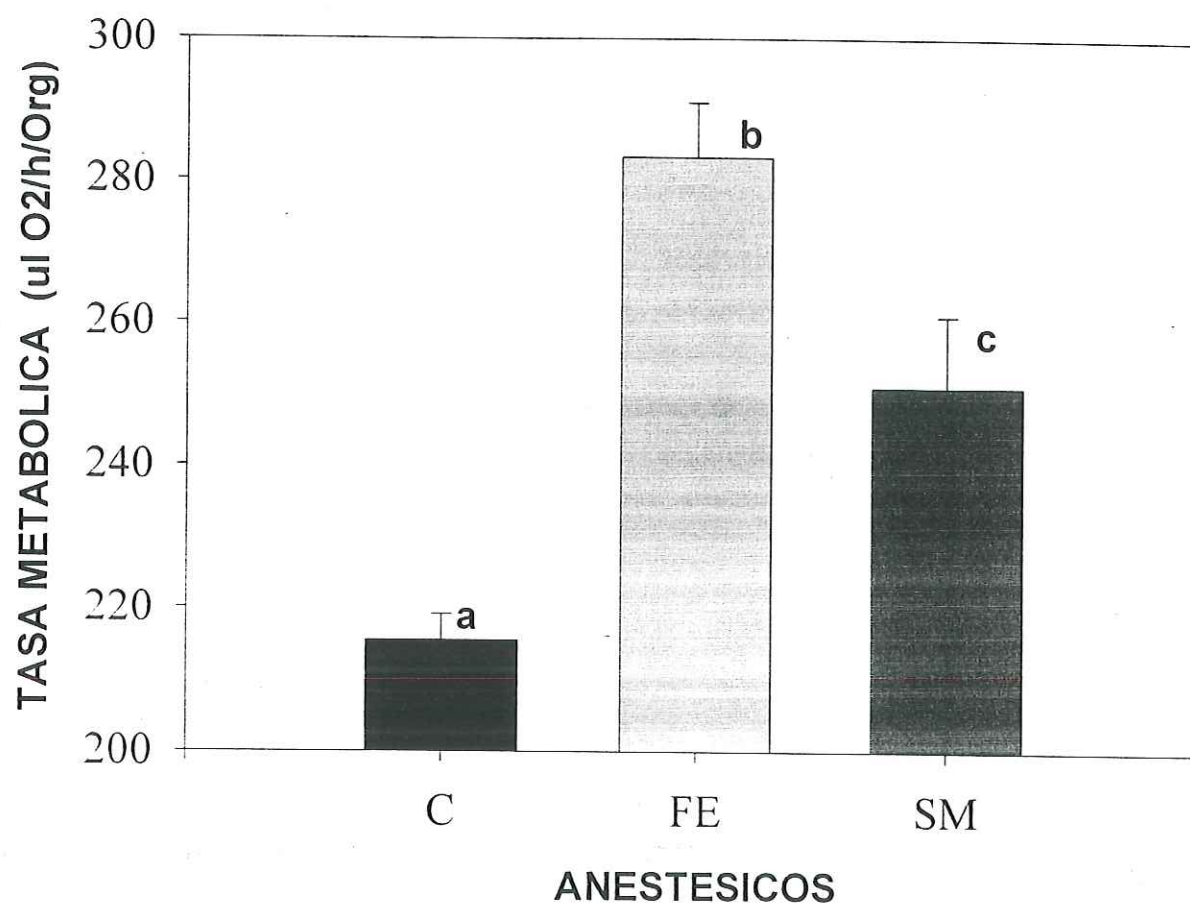
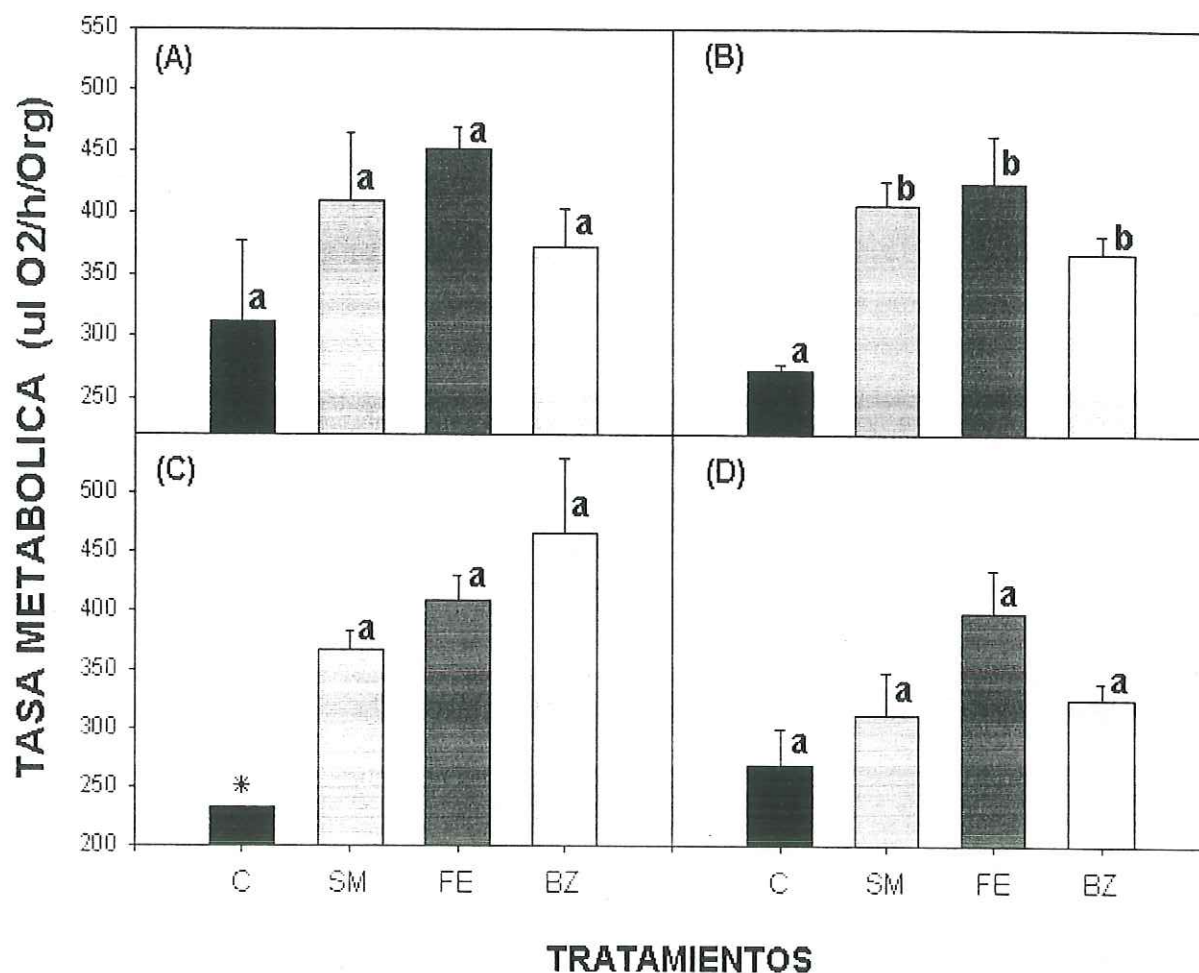


Fig. 7. Respuesta metabólica de abulones (30-40 mm) después de a 3 horas. C = control (sin anestesia); FE = Fenoxietanol; SM = Sulfato de magnesio. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas entre tratamientos.



**Fig. 8.** Respuesta metabólica de abulones después de 3 hrs. (A), 5 hrs. (B), 8 hrs. (C) y 15 hrs. (D), del proceso de anestesiado con Sulfato de magnesio (SM), Fenoxietanol (FE) y Benzocaína (BZ), con respecto a sus controles (C). Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas en las barras indican diferencias significativas entre tratamientos. (\*) No se comparó por falta de replicación. Exp. 3.

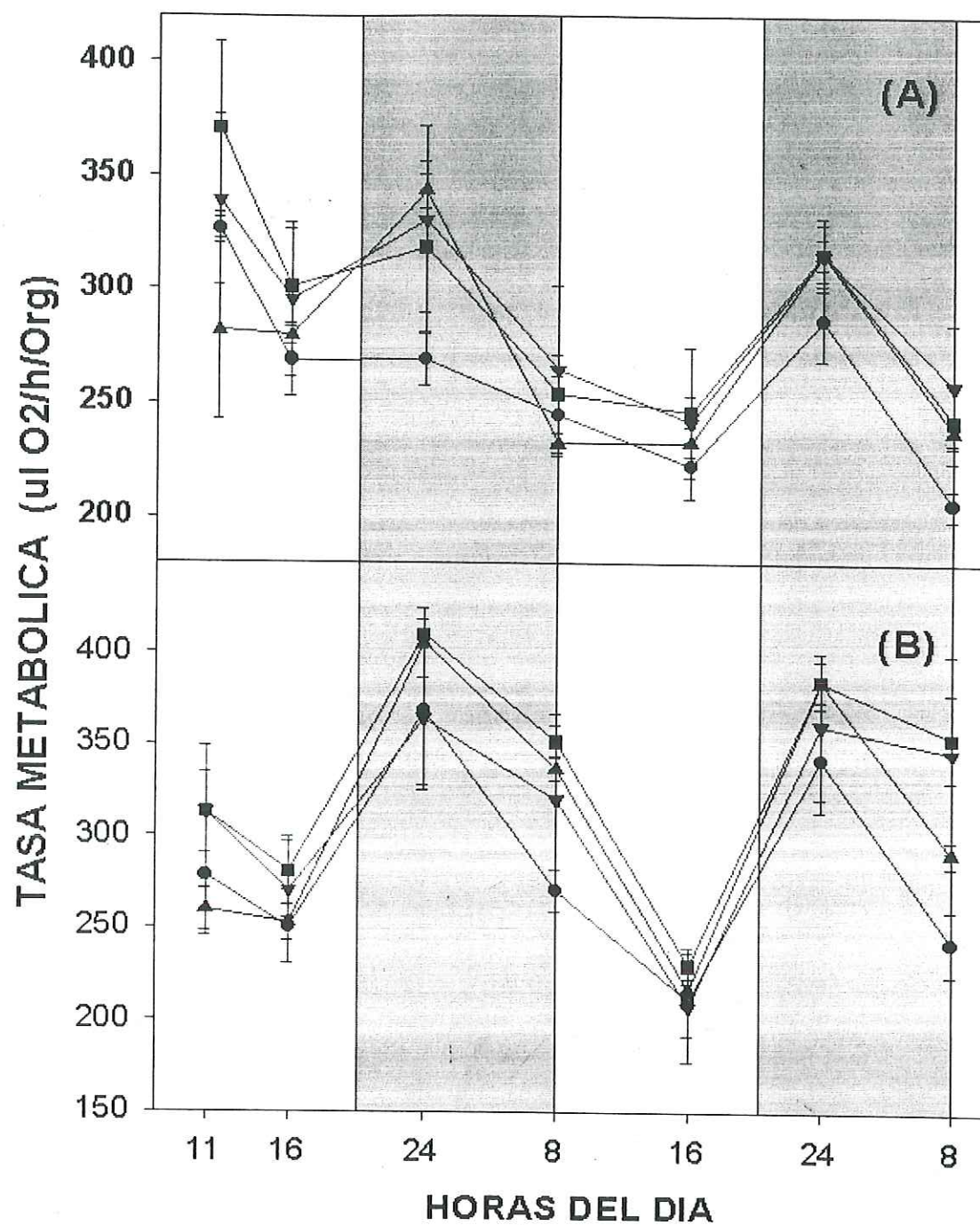


Fig. 9. Cambios temporales en la tasa metabólica promedio de abulones de 24-29 mm (A) y de 35-45 mm (B), que fueron anestesiados con Sulfato de magnesio (•), Fenoxietanol (▼) y Benzocaína (■), a lo largo de 50 hrs. con respecto a sus controles (▲). Las barras verticales indican el error estándar.

Asimismo, el ritmo circadiano en los abulones mas pequeños sometidos a anestesia (Fig. 9a) tendió a ser menos marcado que en los controles durante las primeras 32h post-anestesia. Estas diferencias no se presentaron claramente en las horas subsecuentes ni en los organismos mas grandes (Fig. 9b).

### Criterios Visuales de Recuperación Post-anestesia

#### Velocidad del acción de los anestésicos

Comparativamente el **SM** actuó mas lenta y asincrónicamente que los otros dos anestésicos. Considerando todo el conjunto de experimentos, los abulones de mayor talla sometidos al **SM** se anestesiaron después de 2 a 18.5 min, mientras que los de menor talla (Exp. 4b) respondieron al anestésico después de 5 a 28 min (Tabla IV). En contraste, los organismos sometidos al **FE** y **BZ** se anestesiaron dentro de los primeros 2 a 10 min., excepto en el Exp. 4a con la **BZ**, donde el efecto se observó hasta 13.4 min. (Tabla IV).

**Tabla IV.** Intervalo de tiempo en el que el 100% de los abulones utilizados en los diferentes experimentos, eran desprendidos de las superficies, producto del anestesiado.

| EXPERIMENTO | INTERVALO DE ANESTESIADO (min) |                    |      |      |
|-------------|--------------------------------|--------------------|------|------|
|             | TRATAMIENTO                    | NUMERO DE ABULONES | MIN  | MAX  |
| EXP. 2a     | SM                             | 12                 |      |      |
|             | FE                             | 12                 | 6    | 10   |
|             | BZ                             | 12                 | 2    | 8    |
| EXP. 3      | SM                             | 36                 | 2    | 18.5 |
|             | FE                             | 36                 | 2    | 5    |
|             | BZ                             | 36                 | 2    | 7.5  |
| EXP. 4a     | SM                             | 9                  | 5.5  | 16.7 |
|             | FE                             | 9                  | 2.5  | 7.97 |
|             | BZ                             | 9                  | 3.02 | 6.92 |
| EXP. 4b     | SM                             | 9                  | 4.98 | 28   |
|             | FE                             | 9                  | 4.58 | 9.17 |
|             | BZ                             | 9                  | 6.47 | 13.4 |

Los organismos sometidos al **SM** típicamente presentaron una flacidez marcada durante el período de tratamiento, ya que su concha podía ser desplazada hacia los lados

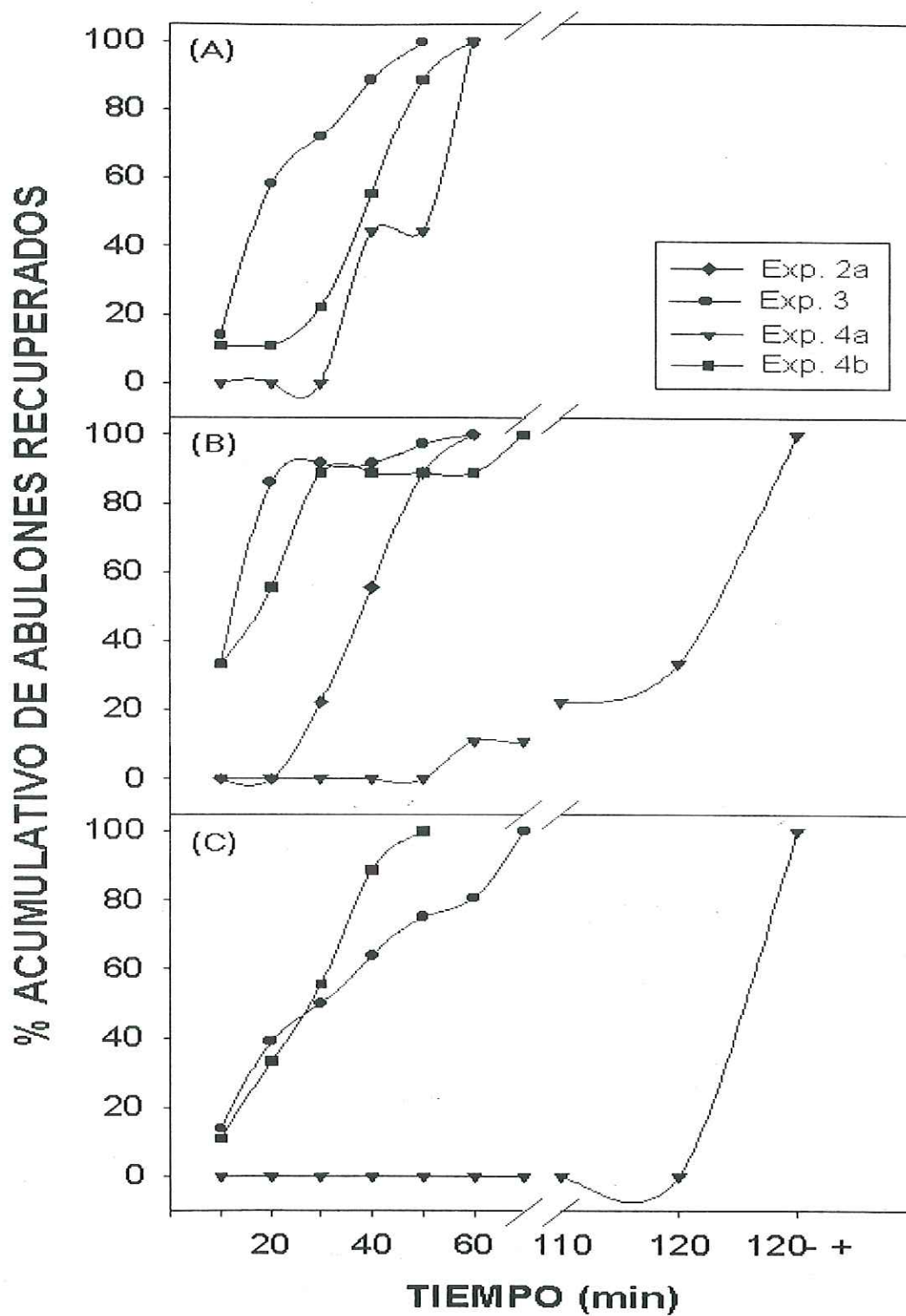
fácilmente con los dedos. En contraste, los abulones sometidos al **FE** mostraron la expulsión del manto fuera de la concha y contracciones o movimientos bruscos hacia los lados, fenómeno indicador del momento en el que los abulones se desprendían del sustrato (Tabla V). La mayoría de los abulones sometidos a la **BZ** mostraron una elevación de la concha separándola del manto, mientras que otros organismos presentaron movimientos suaves hacia los lados y contracción del manto y tentáculos. No se detectó mortalidad post-anestesia (Tabla V).

**Tabla V.** Comportamiento general de los juveniles de *H. fulgens* durante el proceso de anestesiado.

| QUIMICOS<br>CONDICIONES                          | SULFATO DE<br>MAGNESIO                         | FENOXIETANOL                                                       | BENZOCAINA                                                      |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| CONCENTRACION                                    | 40 g/L                                         | 1 ml/L                                                             | 0.1 g/L                                                         |
| TEMPERATURA                                      | 23±1°C                                         | 23±1°C                                                             | 23±1°C                                                          |
| CONDICION<br>DURANTE LA<br>ANESTESIA             | SIN MOVIMIENTO. ADHESION<br>DEBIL AL SUSTRATO. | CONTRACCIONES O MOV.<br>LATERALES BRUSCOS.<br>EXPULSION DEL MANTO. | LEVANTAMIENTO DE LA<br>CONCHA. MOVIMIENTOS<br>LATERALES SUAVES. |
|                                                  | ANESTESIADO ASINCRONICO                        | ANESTESIADO SINCRONICO                                             | ANESTESIADO SINCRONICO                                          |
| CONDICION<br>DESPUES DEL<br>EFECTO<br>ANESTESICO | CUERPO FLACIDO                                 | CUERPO RIGIDO Y<br>CONTRAIDO HACIA LA<br>CONCHA.                   | CUERPO RIGIDO Y<br>CONTRAIDO HACIA LA<br>CONCHA                 |
| MORTALIDAD<br>POST-<br>ANESTESIA                 | NO PRESENTÓ<br>MORTALIDAD                      | NO PRESENTÓ<br>MORTALIDAD                                          | NO PRESENTÓ<br>MORTALIDAD                                       |

#### Tiempo de recuperación a los anestésicos

El tiempo de recuperación post-anestesia varió entre experimentos y anestésicos (Fig. 10 a-c). La recuperación se identificó por los movimientos vigorosos de las antenas y tentáculos de los abulones y los esfuerzos de incorporarse, concluyendo con la incorporación final de éstos hacia su posición normal. El 50% de los organismos lograron recuperarse del tratamiento **SM** entre los 18 y 38 min. post-anestesia (Fig. 10a), mientras que el intervalo de recuperación fué de 10 a 38 min para **FE** (Fig. 10b) y de 28 a 30 min para **BZ** (Fig. 10c). La recuperación fue mucho mas lenta en organismos pequeños (Exp. 4a) sometidos al **FE** y **BZ** (Fig. 10 b-c).



**Fig. 10.** Velocidad de recuperación de los abulones anestesiados con SM (A), FE (B) y BZ (C) en distintos experimentos (Exp. 2a (♦), Exp. 3 (•), Exp. 4a (▼) y Exp. 4b (■)).

## VI. DICUSIONES:

### Ritmo circadiano

Los abulones juveniles *Haliotis fulgens* presentaron un ritmo circadiano en su tasa metabólica. Las mayores tasas metabólicas registradas durante el primer día de incubación (Exp. 1a, 4 a,b) probablemente se debieron al efecto residual del alimento remanente en el estómago, lo que provocaría un mayor gasto asociado a la digestión y absorción del alimento (efecto térmico del alimento, ET). Estudios recientes llevados a cabo en este laboratorio mostraron que el ET puede permanecer hasta por 36 o 48h en organismos alimentados con alta proteína (Garcia-Esquivel, com. pers.; I.I.O.-UABC). También es conocido que la eliminación completa de heces en abulones puede ocurrir en períodos de entre 18 hr. y 7 días (Wee et al., 1992; Maguire et al., 1993; Britz et al., 1996; Mai et al., 1998). Un ritmo circadiano similar al descrito en este trabajo fue reportado para juveniles del abulón *H. discus hannai* por Uki y Kikuchi (1975). También *H. kamtschatkana* presentó mayor actividad motriz durante los períodos nocturnos (Donovan y Carefoot, 1998), lo cual sugiere que este comportamiento es típico del género *Haliotis*. No obstante, la magnitud de la respuesta parece no ser similar en todos los casos. En este sentido, Peck et al. (1987) no encontraron diferencias estadísticas entre las tasas metabólicas del abulón *H. tuberculata* obtenidas entre el día y la noche, aunque por la noche las tasas metabólicas fueron 10% mayores a las obtenidas durante el día. La falta de detalles experimentales en ese trabajo limita una discusión comparativa con el presente estudio.

La presencia del ritmo circadiano en organismos con 11 y 67 días de inanición sugiere que el mayor consumo de alimento típicamente observado en abulones durante los períodos nocturnos (Uki y Kikuchi, 1975; Barkai y Griffiths, 1987), no fué un factor determinante para que se presentara el ritmo circadiano en *H. fulgens*, mas bien, el fotoperíodo y/o la intensidad de luz podrían estar jugando un papel mas importante en el control del ciclo. Se sabe que los abulones tienden a aumentar su sensibilidad a la luz (fototactismo negativo) con el aumento de la edad (Ebert y Houk, 1984). Asimismo, Jan y Chang (1981) reportaron la ausencia de ritmo circadiano en el abulón *Haliotis*

*diversicolor supertexta* bajo condiciones de iluminación constante, lo cual sugiere un papel importante de la luz como factor determinante del ciclo circadiano en abulones u otros moluscos. En este sentido, Watabe (1983) reportó un ritmo circadiano en la reparación y crecimiento de la concha de los bivalvos *P. Martensii* y *Helisoma duryi*, los cuales fueron mayores en oscuridad continua que en iluminación constante o en fotoperíodo de 12:12 luz:oscuridad.

El ciclo circadiano en la tasa metabólica de *H. fulgens* presentó un patrón de respuesta similar al de otras variables fisiológicas. Se ha sugerido por ejemplo, que los parámetros alimenticios de algunos gasterópodos como *A. californica*, siguen un ritmo endógeno, donde su consumo alimenticio es menor durante los períodos de luz, en un ciclo de 12-12 hr. de iluminación, y cuyo ritmo persiste aún bajo oscuridad constante (Kohn, 1983). La falta de manipulación del fotoperíodo y/o la intensidad de luz en el presente trabajo no permite dilucidar el grado de contribución de esos factores al ritmo circadiano metabólico de *H. fulgens*, pero es claro que su costo de actividad se incrementa durante la noche aún bajo condiciones de inanición prolongada (Fig. 3).

#### **Efecto de los Anestésicos.**

Las concentraciones utilizadas del **BZ** y **FE** en este trabajo fueron adecuadas para anestésiar de manera sincrónica a los juveniles de *H. fulgens*, y son consistentes con las concentraciones sugeridas por White et al. (1996) y Hahn (1989) para abulones. No obstante, la respuesta al **SM** fué mas heterogénea y lenta (Tabla IV), lo cual pudo deberse a que la concentración utilizada de ese compuesto (4% w/v) no fué la óptima. Lo anterior coincide con lo reportado por Hahn (1989), quien observó que el **SM** a una concentración similar a la empleada en este trabajo (5%) tuvo poco efecto en juveniles de *H. gigantea*. Además, este mismo autor encontró una tendencia de períodos mayores de recuperación cuando los juveniles fueron expuestos al **SM** durante periodos más largos. White et al. (1996) con una concentración del 6% encontraron un tiempo promedio de anestesiado de  $18.5 \pm 8.9$  min en *H. midae*, y sugirieron concentraciones entre 14-18% para abulones 20 a 50 mm.

En el Exp. 2a se observó claramente que los abulones sometidos a los tres anestésicos (**SM**, **FE** y **BZ**) redujeron su metabolismo rápidamente, tal como se ha reportado en otras especies (White, 1998; Norton et al., 1996; Teo y Chen, 1993; Kaiser y Vine, 1998; Murdoch y Greene, 1982; DeTolla et al., 1996, Ferreira et al., 1984). Sin embargo, las mediciones de consumo de oxígeno coincidieron solo parcialmente con los criterios visuales de recuperación a corto plazo. Así, el efecto sedante de los anestésicos aparentemente se perdió después de introducir los bulones al agua sin anestésico (Fig. 5 a-c), pero las mediciones de consumo de  $O_2$  indicaron que la tasa metabólica permaneció por encima de los valores control, aún después de 8h post-anestesia (Figs. 5 – 9). Debido a que los tres anestésicos utilizados, actúan directamente sobre las células nerviosas (White, 1998; Musshoff et al., 1999; Lilley y Robbins, 1998), y son rápidamente metabolizados o eliminados del organismo (Hahn, 1989; Mattson y Rippe, 1989; Imamura-Kojima et al., 1987; Meinertz et al., 1996; Clark, 1999; Allen, 1988), se puede suponer que el incremento post-anestesia en las tasa metabólicas de los abulones fué producido por estrés, más que por la presencia residual esos compuestos en el tejido de los abulones. En este sentido, Fredricks et al. (1993) encontraron que la trucha *Oncorhynchus mykiss* redujo el latido cardíaco y la presión sanguínea durante la anestesia con **FE**, pero durante el período de recuperación la presión aórtica aumentó sobre su tasa normal durante un tiempo prolongado. Asimismo, los residuos de **BZ** se reportaron altos en la trucha *Salmo gairdneri* y en el robalo *Micropterus salmoides* inmediatamente después del anestesiado, pero las concentraciones disminuyeron rápidamente cuando los peces fueron puestos en agua corriente (Allen, 1988). Imamura-Kojima et al. (1987) también reportó que en la trucha es capaz de eliminar el **FE** durante los primeros 30 min. post-anestesia.

Un punto importante a comentar es lo ocurrido en las cámaras que se usaron como blanco de reactivo (Fig. 6). Los anestésicos disminuyeron considerablemente la concentración de oxígeno en las cámaras, lo cual pudo deberse a una alteración en el funcionamiento del electrodo o la membrana (efecto no real del consumo de oxígeno) o a una reducción real del oxígeno por parte de los anestésicos. En relación esto último, se sabe que compuestos como el sulfito de sodio (Strathkelvin Instruments, Glasgow,

Irlanda), ditionita ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , Walker, 1987) o reductores fuertes como hidróxido de sodio o ascorbato de sodio (UNISENSE Microsensors A/S, Dinamarca) pueden consumir el oxígeno disuelto que se encuentra en el agua, reduciéndolo a otros compuestos. No obstante, la forma en que pudieran actuar cualquiera de los anestésicos probados en el presente trabajo se desconoce y requiere de un análisis electroquímico adicional. Lo que sí queda claro es que la presencia de los anestésicos fueron asimilados por los abulones, los cuales respondieron en forma inmediata reduciendo el consumo de oxígenos en las cámaras, aún en presencia de los anestésicos (Fig. 5 a-c).

### Recuperación Post-anestesia

Los periodos visuales de recuperación post-anestesia ( $< 1$  h) hallados en el presente estudio coinciden con lo reportado por otros autores. Por ejemplo en el abulón *H. midae* se reportaron los mismos periodos de recuperación para el **FE** (White et al., 1996) que en este trabajo (Fig. 10), lo cual refuerza la idea de que este anestésico se metaboliza y elimina rápidamente por los abulones. Asimismo, con **SM** se encontró un tiempo de recuperación similar al reportado para las escalopas *Pecten fumatus* (Heasman et al, 1995) y en el abulón *H. gigantea* y *H. midae* (Hahn, 1989; White et al., 1996). La recuperación post-anestesia con **BZ** solo se ha reportado en algunas especies de peces (Mattson y Ripple, 1989). El comportamiento de los abulones durante el proceso de anestesiado también coincide con lo reportado en otras especies, por lo que es de suponer que la forma de acción de dichos compuestos es similar entre especies. Con el **FE**, se observaron contracciones durante el anestesiado, y aunque su farmacocinética no está bien investigada (Mattson y Ripple, 1989), se han reportado la presencia de convulsiones en algunas especies de peces, como en el bacalao (*Gadus morhua*) (Mattson y Ripple, 1989); en la trucha (*salmo gairdneri*) (Gilderhus y Marking, 1987; Takashima et al., 1983), salmón (Bell, 1964; Sehdev et al., 1963) y en la carpa (*Cyprinus carpio*) (Yamamitsu y Itazawa, 1988). La **BZ** aparte de provocar la pérdida del reflejo al tacto, les provocó a los abulones una contracción muscular. Observaciones similares se obtuvieron en el abulón *H. Iris* por Aquilina y Roberts (2000), en donde después del anestesiado, los abulones continuaban fuertemente contraídos.

En conclusión, este trabajo se realizó con el objetivo de averiguar si el empleo de anestésicos tenía repercusiones fisiológicas y podían influir en el manejo de los abulones juveniles. A corto plazo ( $< 8$  h), la utilización de éstos anestésicos si presentó alteraciones metabólicas sobre los abulones, ya que después de haber sido anestesiados, su tasa respiratoria aumentó por encima del control. El **FE** fue el que redujo en menor proporción la tasa metabólica de los abulones durante el proceso de anestesiado, pero el que mayor alteración post-anestesia presentó durante la mayoría de los experimentos. Los resultados indican que el uso de cualquiera de éstos tres anestésicos no presenta mayores problemas a mediano plazo (días), ya que los abulones tienden a recuperar su ritmo metabólico normal en un periodo menor de 36 hr. Sin embargo es necesario la realización de experimentos a largo plazo, para averiguar si éstos anestésicos afectan otras variables fisiológicas críticas para la acuicultura, tales el consumo, crecimiento y sobrevivencia. En este sentido, Edwards et al. (2000), encontraron una disminución significativa en el crecimiento de *H. laevis* y *H. rubra* con respecto al control después de 6 semanas post-anestesia con **FE** y **BZ**.

## VII. CONCLUSIONES

El metabolismo de abulones juveniles *Haliotis fulgens* de tallas entre 24-45 mm., presentó un ritmo circadiano.

Las concentraciones de los tres anestésicos (**SM**, 4%; **FE**, 0.1% y **BZ**, 0.01%) fueron efectivas en abulones de 24-45 mm. Sin embargo, solo el **FE** y **BZ** anestesiaron al 100% de los abulones, en un tiempo de 10 min.

Los anestésicos **SM**, **FE** y **BZ**, reducen el metabolismo de los abulones (35-45mm) hasta un 65%, 18% y 34% respectivamente, durante el periodo en el que se encuentran en contacto directo con éstos anestésicos.

El tiempo en que el 50% de los abulones anestesiados con **SM**, **FE** y **BZ**, tardan en recuperarse, de acuerdo a valoraciones con criterios visuales, fué de 10 a 40 min.

Las alteraciones metabólicas post-anestesia, son significativas durante las primeras 8h, tendiendo a disminuir después de 24 h post-anestesia.

Los anestésicos (**SM**, **FE** y **BZ**) son recomendables para el manejo de abulones a gran o pequeña escala, pero no se recomiendan cuando se realicen estudios metabólicos.

## VIII. RECOMENDACIONES

Realizar valoraciones metabólicas periódicas con temperatura controlada a lo largo de más de 50 hr.. bajo la misma condición de iluminación y/o oscuridad, tanto alimentados como bajo inanición no crítica, para tratar de identificar cuanto influyen estos factores exógenos sobre el ritmo circadiano.

Realizar mediciones del efecto post-anestesia, en el crecimiento y sobrevivencia de los abulones anestesiados con **SM**, **FE** y **BZ**, por más de 12 semanas, para valorar si éstos anestésicos tienen efectos negativos a largo plazo, tanto en sobrevivencia como en crecimiento.

Realizar estudios en tejidos y hemolinfa de los abulones, para evaluar la permanencia de éstos anestésicos (**SM**, **FE** y **BZ**) dentro de los organismos y tratar de elucidar las vías de eliminación de éstos, al igual que estudios neurológicos, para entender como éstos anestésicos actúan a nivel celular en los abulones.

Realizar estudios de costo-beneficio de éstos anestésicos, de acuerdo a las concentraciones necesarias para anestesiarse a los abulones y al precio de éstos anestésicos en el mercado, para recomendar su aplicabilidad en sistemas acuaculturales comerciales.

Realizar valoraciones de las alteraciones metabólicas provocadas por otros anestésicos o formas de anestesiarse, aparte de los utilizados en este trabajo, para tratar de encontrar el método con mejores resultados, fácil aplicación y mejor precio.

## IX. BIBLIOGRAFIA:

- AHFS 96. Drug information. American Hospital Formulary Service 1996.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. And Watson J. 1983. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. P- 1145.
- Allen J. 1988. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. Progressive Fish-Culturist. 50(1): 59-60.
- Aquilina B. and Roberts R. 2000. A method for inducing muscle relaxation in the abalone, *Haliotis iris*. Aquaculture. 190: 403-408.
- Araujo R., Remon J., Moreno D. and Ramos. 1995. Relaxing techniques for freshwater molluscs: Trials for evaluation of different methods. Malacologia. 36(1-2): 29-41.
- Arroyo J. and Garcia M. 2000. Variación de la longitud y peso de la semilla abulón rojo (*Haliotis rufescens*) causada por combinaciones de algas utilizadas como dietas. XII Congreso Nacional de Oceanografía. 22-26/05/2000. Huatulco, Oax., México.
- Barkai R. and Griffiths C. 1987. Consumption, absorption efficiency, respiration and excretion in the South African abalone *Haliotis midae*. (En:) The Benguela and Comparable Ecosystems. Payne A., Gulland J. and Brink K. (Eds). S. Afr. J. Mar. Sci. 5: 523-529.
- Barton B. 1981 Time-dose responses of juvenile rainbow trout to 2-Phenoxyethanol. Prog. Fish-Cult. 43(4): 223.
- Bayne B. 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. The Mollusca.. Development. Vol. 3. Academic Press, Inc. P- 299-343.
- Bayne B. and Newell R. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. The Mollusca., Vol. 4. Academic Press, Inc. P- 407-515.
- Bell G. 1964. A guide to the properties, characteristics, and uses of some general Anaesthetics for fish. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin No. 148.
- Britz P., Hecht T. and Knauer J. 1996. Gastric evacuation time and digestive enzyme activity in abalone *Haliotis midae* fed a formulated diet. S. Afr. Mar. Sci. 17: 297-303.

- Clark K. 2000. Temperature and Species Comparisons of Benzocaine Pharmacokinetics, Metabolism and Physiologically Based Pharmacokinetic Model Within Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, and Yellow Perch, *Perca flavescens*. Dissertation Abstracts International Part B: Science and Engineering. 60(8). P-3880.
- Culloty S. and Mulcahy M. 1992. An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). Aquaculture. 107: 249-252.
- DeTolla L. Et al., 1996. Guideline for the care and use of fish in reasearch. ILAR Journal (National Reaserch Council, USA., Institute of Laboratory Animal Resources). 37(4): 159-172.
- Dictionary of organic compounds. 1983. Chapman and Hall. 5<sup>ta</sup> Ed. Primer suplemento. P-796.
- Donovan D. And Carefoot T. 1998. Effect oc activity on energy allocation in the northern abalone *Haliotis kamtschatkana* (Jonas). J. Shellfish Res. 17(3): 729-736.
- Ebert and Houk., 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. Aquaculture, 39: 375-392.
- Edwards S., Burke C., Hindrum and Johns D. 2000. Recovery and growth effects of anaesthetic and mechanical removal on greenlip (*Haliotis laevigata*) and balcklip (*Haliotis rubra*) abalone. 4<sup>th</sup> International Abalone Symposium. University of Cape Town.
- Elston R. 1983. Histopathology of oxygen intoxication in the juvenile red abalone, *Haliotis refescens* Swainson. J. Fish. Dis. 6: 101-110.
- Ferreira J., Schoonbee H. and Smit G. 1984. The use of benzocaine-hydrochloride as an aid in the transport of fish. Aquaculture. 42(2): 169-174.
- Fingl E. 1982. Anestesicos locales. (En:) Las bases farmacologicas de la terapeutica. (Eds: ) Goodman A., Goodman L. Y Gilman A. P-1756.
- Fitch D. 1975. Oxigen consumption in the prosobranch snail *Viviparus contectoides* (Mollusca: Gastropoda). Effects of weight and activity. Comp. Biochem. Physiol. 51A: 815-820.
- Fredricks K., Gingerich W. and Fater D. 1993. Comparative cardiovascular effects of four fishery anesthetics in spinally transected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology. 104C(3): 477-483.

- Fuentes-Pardo B. y Solorzano-Garcia S. and De La O-Martinez A. 1997. Effects of complete and skeleton photoperiods on the circadian rhythm of the electroretinogram of the crayfish. *Biological Rhythm Research*. 28(SUPPL.): 69-84.
- Garcia-Franco. M. 1992. Anaesthetics for the squid *Sepioteuthis sepioidea* (Mollusca: Cephalopoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 103C(1): 121-123.
- Gilderhus P. 1989. Efficacy of Benzocaine as an anesthetic for Salmonid fishes. *North American of Fisheries Management*. 9: 150-153.
- Gilderhus P. and Marking L. 1987. Comparative Efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American of Fisheries Management*. 7: 288-292.
- Gilderhus P. 1991. Benzocaine as an anesthetic for Striped bass. *The Progressive fish-culturist*. 53: 105-107.
- Gray D. and Hodgson A. 1999. Endogenous rhythms of locomotor activity in the high-shore limpet. *Helcion pectunculus* (Patellogastropoda). *Animal Behaviour*. 57 (2): 387-391.
- Guzman del Proo. 1994. Biología, ecología y dinámica de población del abulón (*Haliotis spp*) de Baja California Mexico. Tesis Doctoral. IPN. Mexico. P- 189.
- Hader D. y Tevini M. 1987. *General Photobiology*. Pergamon Press. P-323.
- Hahn K. 1989. Biotic and abiotic factors affecting the culture of abalone. (En:) *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*. Hahn K. (Ed.). CRC Press. Boca Raton, FL, pp. 113-134.
- Harris J., Maguire G., Edwards S. and Hindrum S. 1997. Effect of nitrite on growth and oxygen consumption for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. *J. Shellfish Res.* 16(2): 395-401.
- Harris J., Maguire G., Edwards S. and Hindrum S. 1998a. Effect of ammonia on the growth rate and oxygen consumption of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. *Aquaculture*. 160: 259-272.
- Harris J., Maguire G. and Handler J. 1998b. Effects of chronic exposure of greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan, to high ammonia, nitrite, and low dissolved oxygen concentrations on gill and kidney structure. *J. Shellfish Res.* 17(3): 683-687.

- Harris J., Maguire G., Edwards S. and Hindrum S. 1999a. Effect of pH on growth rate, oxygen consumption rate, and histopathology of gill and kidney tissue for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan and blacklip abalone, *Haliotis rubra* Leach. J. Shellfish Res. 18(2): 611-619.
- Harris J., Maguire G., Edwards S. and Johns D. 1999b. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture. 174: 265-274.
- Heasman M., O'Connor W. and Frazer A. 1995. Induction of anaesthesia in the commercial scallop, *Pecten fumatus* Reeve. Aquaculture. 131: 231-238.
- Hernandez-Falcon J. and Ramon F. 1998. The circadian rhythm of cardiac frequency in crayfish: A multioscillator system?. Biological Rhythm Research. 29(5): 464-470.
- Imamura-Kojima H., Takashima F. And Yoshida T. 1987. Absorption, distribution and excretion of 2-phenoxyethanol in rainbow trout. Jap. Soc. Sci. Fish. 53(8): 1339-1342.
- Jan R. and Chang K. 1981. A study of diurnal periodicity in oxygen consumption of the small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* Lishke). Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica. 20: 83-85.
- Jan R. and Chang K. 1983. The oxygen consumption by Formosan abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* Lishke. during decline of ambient oxygen. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica. 22:43-48.
- Kohn A. 1983. Feeding of gastopods. (En: ) The Mollusca. (Eds: ) Saleuddin and Wilbur. Vol. 5. Physiology Part 2.
- Lellis W. and Plerhoples. 1997. Development of anesthetics for the mussel *Elliptio complanata*. Annual Meeting of the National Shellfisheries Association, Fort Walton Beach, FL (USA), 20-24.
- Lilley S. and Robbins J. 1998. The action of local anaesthetics on the compound action potential is altered by the nature of the permeant ion in frog nerve. Neuroscience Letters. 252(1): 41-44.
- Lucas, A., 1996. Bioenergetics of organisms: Concepts. Bioenergetics of aquatic animals. Taylor & Francis. Pp. 40-64.
- Kaiser H. and Vine N. 1998. The effect of 2-phenoxyethanol and transport packing density on the post-transport survival rate and metabolic activity in the goldfish, *Carassius auratus*. Aquarium Sciences and Conservation. 2(1): 1-7.

- Maguire G., Wee K. and Hindrum S. 1993. Digestibility studies. The "ins" and "outs" of abalone guts. *Austasia Aquaculture*. 7(1): 42-49.
- Mai K., He G. and Xu W. 1998. Studies on postprandial changes of digestive status and free amino acids in the viscera of *Haliotis discus hannai* Ino. *J. Shellfish Res.* 17(3): 717-722.
- Mattson N. and Riple T. 1989. Metomidate, a better anesthetic for Cod (*Gadus morhua*) in comparison with Benzocaine, MS-222, Chlorobutanol, and Phenoxyethanol. *Aquaculture*. 83: 89-94.
- McErlean A. and Kennedy V. 1968. Comparison of some anesthetic properties of Benzocaine and MS-222. *Transactions of the American Fisheries Society*. 97(4): 496-498.
- Meinertz J., Stehly G. and Gingerich W. 1996. Pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. *Aquaculture*. 148(1): 39-48.
- Mills D., Tlili A. and Norton J. 1997. Large-scale anesthesia of the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* Jameson. *J. Shellfish Res.* 16(2): 573-574.
- Murdoch R. Y Green N. 1982. Anestésicos locales. (En:) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Eds: ) Goodman A., Goodman L. Y Gilman A. P-1756.
- Musshoff U., Madeja M., Binding N., Witting U. and Speckmann E. 1999. Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. *Archives of Toxicology*. 73(1): 55-59.
- Newell R. 1973. Factors affecting the respiration of intertidal invertebrates. *Amer. Zool.* 13: 513-528.
- Norton J., Dashorst M., Lansky T. and Mayer R. 1996. An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. *Aquaculture*. 144: 39-52.
- Olsen R. and Ringoe E. 1999. Title Dominance hierarchy formation in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): nutrient digestibility of subordinate and dominant fish. *Aquaculture Research*. 30(9): 667-671.
- Paul A. and Paul J. 1998. Respiration rate and tolerance of pinto abalone *Haliotis kamtschatkana*. *J. Shellfish Res.* 17(3): 743-745.
- Peck L., Culley M. and Helm M. 1987. A laboratory energy budget for the ormer *Haliotis tuberculata* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106: 103-123.

- Rawns J. 1989. Biochemistry. Neil Patterson Publishers. USA.
- Sehdev H., McBride J. and Fagerlund U. 1963. 2-Phenoxyethanol as a general anaesthetic for Sockeye Salmon. J. Fish. Res. Bd. Canada. 20(6): 1435-1440.
- Stone D. and Tostin N. 1999. Clove bud oil a big yawn for silver perch. Fish. N.S.W. 2(4): 19.
- Takashima Y., Wan Z., Kasai H. and Asakawa O. 1983. Sustained anesthesia with 2-phenoxyethanol in yearling rainbow trout. J. Tokyo Univ. Fish. 69(2): 93-96.
- Tauc L. 1966. Physiology of the nervous system. (En: ) Physiology of Mollusca. (Eds:) Wilbur K. And Yonge C. Academic Press.
- Teo Leng-Hong and Chen Ti-Wen. 1993 A study of metabolic rates of *Poecilia reticulata* Peters under different conditions. Aquacult. Fish. Manage. 24(1): 109-117.
- The condensed chemical dictionary. 1966. Reinhold Publishing Corporation. 7<sup>ma</sup> Ed. P-1044.
- The Merk Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 1989. Merk y Co., Inc. 11<sup>va</sup> Ed.
- Thurman C. 1998. Locomotor rhythms in the fiddler crab, *Uca subcylindrica*. Biological Rhythm Research. 29 (2): 179-196.
- Uki N. and Kikuchi S. 1975. Oxygen consumption of the abalone, *Haliotis discus hannai* in relation to body size and temperature. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 35. 75.
- Watabe N. 1983. Shell repair. The Mollusca. (Eds: ) Saleuddin and Wilbur. Vol. 4. Physiology Part I. Academic Press. P: 289-316.
- Wee K., Maguire G. and Hindrum S. 1992. Methodology for digestibility studies with abalone I. Preliminary studies on feeding and defaecatory behavior of black abalone, *Haliotis rubra*, fed natural and artificial diets. P: 192-196. In: G.L. Allan and W. Dall (Eds.). Proceedings of Aquaculture Nutrition Workshop, April 15-17, 1991, at NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander, Australia.
- White H., Hecht T. and Porgieter B. 1996. The effect of four anaesthetics on *Haliotis midae* and their suitability for application in commercial abalone culture. Aquaculture. 140: 145-151.

White. 1998. Manual de farmacos en anestesia. McGraw-Hill. Interamericana. P-352.

Yamamitsu S. and Itazawa Y. 1988. Effects of an anesthetic 2-phenoxyethanol on the heart rate, ECG and respiration in carp. Jap. Soc. Sci. Fish. 54(10): 1737-1746.