



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Protocolo de sedación, anestesia y eutanasia
en juveniles de camarón blanco del Pacífico
(*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:
MARTÍNEZ HERNÁNDEZ DANIELA

ASESOR: Dr. Juan Carlos Maldonado Flores
COASESOR: Dra. Elein Hernández Trujillo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
SECRETARIA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Protocolo de sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio

_____ que presenté para obtener el título/grado de: Médica Veterinaria Zootecnista, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Daniela Martínez Hernández 316095934

Nombre y número de cuenta del egresado(a)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



UNAM
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

ATN: DR. SERGIO ARTURO OJEDA PIEDRA
Jefe del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis.**

**Protocolo de sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico
(Litopenaeus vannamei) para manejo en laboratorio**

Que presenta la pasante: **Daniela Martínez Hernández**
Con número de cuenta: **316095934** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de septiembre de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Crisóforo Mercado Márquez	
VOCAL	M.V.Z. Carlos Raúl Romero Basurto	
SECRETARIO	Dr. Juan Carlos Maldonado Flores	
1er. SUPLENTE	M. en M.V.Z. Alfonso Gabriel Ruíz García	
2do. SUPLENTE	M. en M.V.Z. Agatha Elisa Miranda Cortés	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

DEDICATORIAS

A Dios, que me ha sostenido y guiado a lo largo de este camino. Gracias por la sabiduría y el conocimiento que me has dado, por mostrarme tu amor y enseñarme que todo sucede según tu voluntad. A través de este proceso, me has enseñado que tus tiempos son perfectos y que tus planes son siempre los mejores.

A mis padres, Angélica Hernández y Ociel Martínez, por toda una vida de esfuerzos y sacrificios, porque siempre me vieron grande aun cuando era pequeña, siempre creyeron en mí y sabían que este día llegaría, gracias por haberme dado todo, por ser mi guía y acompañarme en cada paso del camino. Todo lo que soy y lo que he logrado se lo debo a ustedes. Este logro es tan suyo como mío.

A mi compañero de vida, Abraham Jaimes, por su amor incondicional que me da la fuerza para seguir adelante, por sus palabras de aliento y la fe que siempre ha tenido en mí. Gracias por ser mi copiloto para que este avionzote pueda despegar todos los días, por ser mi roca en los momentos difíciles, por siempre estar y por dejarme ser parte de tu vida y tú ser parte de la mía. No hay logro que pueda compararse con la felicidad de tenerte a mi lado. Eres y siempre serás mi mayor motivación. Te amo.

A toda mi familia y amistades, por su cariño, cuidado y comprensión. A cada uno de ustedes, que me ha acompañado en este camino hasta alcanzar la meta. Gracias por su comunicación constante y por estar al pendiente de mí. En cada paso, he sentido su presencia, este trabajo es un reflejo de todo lo que me han enseñado.

“De nada sirve el brillo del conocimiento, si no es Dios quien guía tus pasos”

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) por haber financiado el proyecto de investigación: Protocolos de sedación, anestesia y eutanasia de organismos acuáticos (peces y crustáceos) para la enseñanza práctica de las materias de las licenciaturas de la Facultad de Ciencias y la Escuela Nacional de Estudios Superiores Mérida, con clave de proyecto PE207323.

A la UNAM, por abrirme las puertas desde mi formación preparatoria y brindarme la oportunidad de crecer académicamente y como persona.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, mi alma mater, por haberme formado en sus aulas como Médica Veterinaria Zootecnista.

A la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI – SISAL) por abrirme sus puertas y hacer posible la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Carlos Maldonado Flores, por su confianza, apoyo incondicional y el conocimiento transmitido. Muchas gracias por permitirme trabajar con usted, guiarme con tanto profesionalismo y brindarme su tiempo a lo largo de este proceso.

A la Dra. Elein Hernández Trujillo, por su sabiduría, paciencia y dedicación. Muchas gracias por brindarme la oportunidad de aprender bajo su dirección, enriquecer este trabajo y por compartir su tiempo. Su ejemplo ha sido una fuente de inspiración.

Al equipo de Nutrición de la UMDI – SISAL: Dra. Gabriela Gaxiola, Dr. Martín Arenas, Dr. Álvaro Barreto y Biól. Mar. Fabiola Cob, por la confianza, tiempo y ayuda que me brindaron. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de este equipo, compartir su experiencia y por las lecciones impartidas. Las habilidades y el conocimiento que he adquirido de ustedes han sido fundamentales.

A los miembros del jurado, por su tiempo y disponibilidad durante todo el proceso de revisión. Gracias por sus comentarios y observaciones, ha sido un honor contar con su experiencia y conocimiento en este proyecto.

A mi crew de la universidad: Alexa, Dulce, David y Leo, por su amistad, apoyo y compañía a lo largo de este viaje académico. Compartir esta etapa con ustedes lo ha hecho más llevadero y significativo.

A Yemitzi y Mariana, dos personas maravillosas que tuve la fortuna de conocer durante esta travesía. Gracias por su amistad, compañía y los momentos compartidos. Su calidez, alegría y las risas compartidas hicieron mi pasantía mucho más amena.

A los animales que formaron parte de esta investigación.

Agradezco sinceramente a todas las personas que con su soporte científico y humano me han impulsado y ayudado a ser mejor.

Y principalmente, GRACIAS a Dios.

Índice

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 ANTECEDENTES	4
2.1.1 <i>Camarón blanco del Pacífico (Litopenaeus vannamei)</i>	4
2.1.1.1 <i>Clasificación taxonómica de L. vannamei</i>	5
2.1.1.2 <i>Generalidades de L. vannamei</i>	5
2.1.1.3 <i>Biología de L. vannamei</i>	6
2.1.1.4 <i>Fisiología de L. vannamei</i>	7
- <i>Sistema respiratorio:</i>	7
- <i>Sistema circulatorio:</i>	7
- <i>Sistema digestivo:</i>	8
- <i>Sistema nervioso:</i>	8
- <i>Osmorregulación:</i>	9
- <i>Termorregulación:</i>	10
2.1.2 <i>Normatividad</i>	12
2.2 ACUICULTURA EN EL MUNDO	16
2.3 ACUICULTURA EN MÉXICO	17
2.4 USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN	18
2.5 BIENESTAR ANIMAL Y LAS 3RS EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES	21
2.6 IMPORTANCIA DE BIENESTAR ANIMAL EN INVESTIGACIÓN EN LA ACUICULTURA	25
2.7 ESTRÉS EN CRUSTÁCEOS	26
2.7.1 <i>Definición de estrés</i>	26
2.7.2 <i>Fisiología del estrés</i>	26
2.7.3 <i>Clasificación del estrés, causas y consecuencias</i>	28
2.8 INDICADORES DE RESPUESTA AL AGENTE ESTRESOR EN CRUSTÁCEOS	29
2.8.1 <i>Indicador conductual</i>	29
2.8.2 <i>Indicadores bioquímicos</i>	29
2.9 PRINCIPIOS DE SEDACIÓN, ANESTESIA Y EUTANASIA EN CRUSTÁCEOS	30
2.9.1 <i>Sedación</i>	31
2.9.2 <i>Anestesia</i>	31
2.9.3 <i>Eutanasia</i>	31

2.10 MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA SEDACIÓN, ANESTESIA Y EUTANASIA EN CRUSTÁCEOS	32
2.10.1 Sales de magnesio	33
2.10.2 Hipotermia	35
2.10.3 Eugenol	37
2.10.4 Limoncillo	39
2.10.5 MS-222	41
2.10.6 Lidocaína	43
3. JUSTIFICACIÓN	45
4. OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GENERAL	46
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	46
5. HIPÓTESIS	46
6. MATERIALES Y MÉTODOS	47
6.1 UBICACIÓN	47
6.2 OBTENCIÓN DE ANIMALES	47
6.3 MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES Y ACLIMATACIÓN	47
6.4 TRATAMIENTOS	47
6.5 PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	48
6.6 FASE CONDUCTUAL	48
6.7 FASE BIOQUÍMICA	49
6.7.1 Extracción de hemolinfa	50
6.7.2 Obtención de plasma	50
6.7.3 Análisis de metabolitos	50
6.8 EUTANASIA	50
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
7. RESULTADOS	52
7.1 RESPUESTAS CONDUCTUALES	52
7.2 RESPUESTAS METABÓLICAS	53
7.2.1 Glucosa	53
7.2.2 Lactato	54
7.2.3 Proteína	55
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	62
10. RECOMENDACIONES	63
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	80

Glosario

Acuático/Acuícola: Que vive en el agua.

Acuicultura: Conjunto de actividades, técnicas y conocimientos dedicadas al cultivo y producción de especies acuáticas.

Hemocele: Cavidad no revestida de peritoneo por donde circula la hemolinfa, característica de varios invertebrados.

Hemocitos: Células de defensa presentes en la hemolinfa de los crustáceos.

Hemolinfa: Conocida como la “sangre” de los crustáceos.

Estatocistos: Es el órgano responsable del equilibrio en los crustáceos.

Muda: Proceso mediante el cual los artrópodos realizan su crecimiento.

Somitos: Se refiere a la división metamérica del cuerpo de un crustáceo, misma que esta constituida por somitos, 3 torácicos y 6 abdominales.

Salinidad: Cantidad de sales minerales disueltas en el agua.

Poiqiloterma: Incapacidad de regulación de la temperatura del organismo, por lo que sus temperatura depende del medio en el que esté.

Lista de abreviaciones

AHAW	Comisión Técnica de Salud y Bienestar de los Animales de la EFSA
ANOVA	Análisis de varianza
BA	Bienestar animal
CHH	Hormona hiperglucémica de los crustáceos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
MgCl₂	Sales de magnesio
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
SNC	Sistema Nervioso Central
UE	Unión Europea
UPS	Unidades prácticas de salinidad
AVMA	Asociación Americana de Medicina Veterinaria

Índice de cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Concentraciones y temperaturas de los tratamientos utilizados.	48
2	Etapas anestésicas en crustáceos decápodos.	49
3	Diferencia estadística de ocho tratamientos para lograr anestesia en camarones blanco del pacífico expuestos durante 30 minutos.	52
4	Promedios de glucosa de cuatro tratamientos y un grupo control.	53
5	Promedios de lactato de cuatro tratamientos y un grupo control.	54
6	Promedios de proteína de cuatro tratamientos y un grupo control.	55

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Anatomía externa del camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	6
2	Anatomía interna del camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	11
3	Respuestas fisiológicas al estrés en crustáceos decápodos.	27

Índice de gráficas

Gráfica	Título	Página
1	Respuesta conductual de ocho tratamientos para lograr anestesia en camarones blanco del pacífico expuestos durante 30 minutos.	52
2	Tendencia de la concentración de glucosa de cuatro tratamientos y un grupo control.	53
3	Tendencia de la concentración de lactato de cuatro tratamientos y un grupo control.	54
4	Tendencia de la concentración de proteína de cuatro tratamientos y un grupo control.	55

Resumen

El objetivo de este estudio fue establecer un plan de sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio utilizando sales de magnesio ($MgCl_2$) y agua fría ($4^{\circ}C$ y $18^{\circ}C$). La investigación se realizó en Sisal, Yucatán, México. Se utilizaron 150 camarones juveniles, con un peso de $15\text{ g} \pm 2\text{ g}$. Se probaron 8 tratamientos; 6 concentraciones de Sales de Magnesio y 2 temperaturas de agua fría, así como un grupo control en el que no se utilizó ningún tratamiento, únicamente se mantuvo a $28^{\circ}C$. Los animales fueron distribuidos en un diseño completamente aleatorio para todos los tratamientos. El experimento tuvo una duración de 30 días y constó de varias fases: conductual, bioquímica y eutanasia. En la fase conductual se evaluaron indicadores visuales de estrés y la etapa lograda de anestesia; En la fase bioquímica se analizaron los metabolitos glucosa, lactato y proteína. La fase de eutanasia no se llevó a cabo, debido a lo encontrado en las dos primeras etapas, que permitió definir que ningún tratamiento era correcto para el proceso de eutanasia en esta especie. La media para las respuestas conductuales evaluadas con base en el cuadro 2 (Etapas anestésicas en crustáceos decápodos) para los 8 tratamientos mencionados; 6 concentraciones de Sales de Magnesio ($MgCl_2$) (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 25 g/L, 50 g/L y 100 g/L) y 2 temperaturas de agua fría: $18^{\circ}C$ y $4^{\circ}C$, fue de 2a (Pérdida parcial del equilibrio) para todas las concentraciones de Sales de Magnesio, 3b (Movilidad reducida) para $18^{\circ}C$ y 11c (No responde a estímulos táctiles y de presión) para $4^{\circ}C$. Las medias de las respuestas metabólicas para el grupo control a $28^{\circ}C$, Sales de Magnesio a 25 g/L, Sales de Magnesio a 100 g/L, Agua fría a $18^{\circ}C$ y Agua fría a $4^{\circ}C$, siempre en ese orden. La glucosa (mg/L) fue de 0.4670b, 0.4977b, 0.9803ab, 1.1847ab y 1.4607a. El lactato (mg/ml) fue de 0.0913a, 0.1713a, 0.2510a, 0.2266a y 0.077a y no mostró diferencia ($p > 0.05$) entre tratamientos. La proteína (mg/ml) fue de 100.64a, 107.92a, 88.97a, 49.05b y 80.20ab. Se concluye que la hipotermia a $18^{\circ}C$ y $4^{\circ}C$, así como, el uso de sales de magnesio ($MgCl_2$) se descartan como métodos para la sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio ya que $MgCl_2$ no logra obtener efecto sedativo ni anestésico y la hipotermia produce respuestas metabólicas de estrés que no garantizan el bienestar animal y, por lo tanto, no garantizan que no alteren ni enmascaren los resultados en las investigaciones.

Palabras clave: *L. vannamei*, anestesia, $MgCl_2$, agua fría ($4^{\circ}C$ y $18^{\circ}C$).

1. Introducción

En las últimas décadas, la acuicultura se ha convertido en la industria de producción animal con el crecimiento más acelerado en el mundo (Kristiansen y Bracke, 2020). Entre 1990 y 2020, la producción animal en la acuicultura a nivel mundial aumentó un 609%, con un crecimiento promedio del 6,7 % anual (FAO, 2022).

La acuicultura moderna es una industria fundamentada en gran medida en la ciencia, pero aún relativamente joven, y la necesidad de más investigación en diversas áreas es evidente puesto que hemos pasado de una cultura de captura a una cultura de cultivo, lo que también plantea nuevos desafíos, así como responsabilidades éticas y legales (Kristiansen y Bracke, 2020). Del mismo modo, el compromiso con el bienestar animal es fundamental para un uso responsable de los modelos animales acuáticos (Blázquez *et al.* 2022).

A la lista de animales de laboratorio se ha agregado el uso de peces y una variedad de organismos como los invertebrados (Giridharan, 2021), cuyo uso como modelos experimentales ha ido en aumento en los últimos años, pues sus características morfofisiológicas hacen de ellos organismos únicos para abordar un sinnúmero de cuestiones científicas, lo que se ha visto respaldado con la adaptabilidad de técnicas de laboratorio y protocolos experimentales desarrollados (De Girolamo y D'Angelo, 2022).

Los resultados de la investigación con animales tienen un beneficio directo tanto en el bienestar de los humanos como en el de los propios animales, sin embargo, se debe continuar la investigación sobre la forma adecuada de manipularlos en procedimientos experimentales (Giridharan, 2021). En consecuencia, los procedimientos como sedación, anestesia y eutanasia requieren que el operador y el método estén autorizados y validado mediante la evidencia científica (Ross y Ross, 2008b).

El desarrollo de planes de sedación, anestesia y eutanasia son importantes ya que la anestesia se utiliza principalmente para inmovilizar a los animales, lo que reduce significativamente el estrés de la manipulación y facilita procesos habituales en acuicultura como la clasificación por tallas, el muestreo de individuos, la manipulación de reproductores o la toma de muestras (Cooper, 2011; Zahl *et al.* 2012; Vásquez, 2013), mientras que la sedación es comúnmente empleada para el traslado de los animales debido a que reduce la tasa metabólica, por lo tanto, también el consumo de oxígeno disminuye, y se reduce la excreción de productos metabólicos al agua, además de minimizar las posibles lesiones físicas y los efectos del estrés durante dicho traslado (Ross y Ross, 2008f; Sneddon *et al.* 2016).

Finalmente, la eutanasia es un procedimiento que se tiene que considerar para dar muerte de manera humanitaria a los animales de investigación, pero aún falta información sobre este procedimiento en animales invertebrados (Cooper, 2011; Köhler y Valentin, 2022).

Secundario a estas preocupaciones antes mencionadas y las posibles áreas de oportunidad, el presente trabajo tiene el propósito de formular un plan de sedación, anestesia y eutanasia para camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

2. Marco teórico

2.1 Antecedentes

En los últimos años han aumentado los avances en materia de bienestar animal y cada vez es más frecuente que todo procedimiento al que se someta un animal en la investigación requiera aprobación previa. No obstante, a pesar del incremento de información científica e interés por animales acuáticos aún existe desconocimiento sobre ciertos procedimientos como la inducción a la anestesia, sedación y eutanasia (Ross y Ross, 2008b; De Souza, 2022).

Es de excelencia veterinaria, ciencia de alta calidad y respeto por la bioética garantizar el bienestar en todas las prácticas y procedimientos que involucren animales, esto abarca ahora el uso de métodos anestésicos y analgésicos para invertebrados como los crustáceos decápodos que, como procedimiento rutinario de preparación antes estaba excluido (Ross y Ross, 2008b; De Souza, 2022).

La inclusión de pautas de métodos humanitarios y éticos para proteger a los animales durante su uso en la experimentación es fundamental no solo para asegurar un bienestar apropiado, sino también para conservar el apoyo de la ciudadanía al uso de animales en la investigación y educación (Blázquez *et al.* 2022).

2.1.1 Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

El cultivo de camarón ha aumentado debido a la creciente demanda de productos acuícolas en el mercado (Lara *et al.* 2015). El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es ampliamente conocido por ser uno de los más cultivados debido a los altos rendimientos que presenta, la extensión de su distribución, así como su capacidad de adaptación a factores tales como la temperatura y salinidad y además por presentar elevados precios en el mercado internacional (Díaz *et al.* 2001; Cobo y Pérez, 2018).

Hoy en día se produce más camarón por acuicultura que por captura (Lara *et al.* 2015), pues es un crustáceo que ha tenido gran éxito en su manejo bajo condiciones controladas, lo que lo ha convertido en la especie más cultivada en el mundo actualmente, en particular desde que China cambió su producción de camarón, dejando atrás las especies nativas de Asia (Gaxiola *et al.* 2006).

Al ser este organismo una de las especies más demandadas de la acuicultura y por consiguiente uno de los objetos de estudio más investigados se ha generado la necesidad de modificar y refinar los métodos y técnicas de investigación y producción (Lara *et al.* 2015).

2.1.1.1 Clasificación taxonómica de *L. vannamei*

Phylum: *Arthropoda*

Subphylum: *Crustacea*

Clase: *Malacostraca*

Orden: *Decápoda*

Suborden: *Dendobranchiata*

Superfamilia: *Penaeoidea*

Familia: *Penaeidae*

Género: *Litopenaeus*

Especie: *vannamei*

(Pérez – Farfante y Kensley, 1997).

2.1.1.2 Generalidades de *L. vannamei*

El camarón blanco del Pacífico también conocido como camarón patiblanco o por su nombre científico; *Litopenaeus vannamei*, es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico desde Sonora México, hasta Tumbes Perú y se comercializa en el mercado nacional e internacional, teniendo producción en México en los siguientes estados: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (IMIPAS, 2018).

El camarón blanco se encuentra en hábitats marinos tropicales, en aguas cuya temperatura es superior a 20°C durante el año, toleran un intervalo de salinidad entre 2 – 40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups. Los adultos habitan y se reproducen en mar abierto, mientras que las postlarvas se desplazan hacia las costas para completar la etapa juvenil y pre – adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares (Gucic, 2008; IMIPAS, 2018).

2.1.1.3 Biología de *L. vannamei*

Tiene el cuerpo alargado, dividido en cefalotórax (rostro, antena, anténulas y periópodos), abdomen (6 segmentos abdominales y pleópodos) y cola (telson y urópodos). Tiene las antenas, periópodos (patas delanteras) y urópodos (cola) pigmentados de color rojizo. Rostrum moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales (FAO, 2009; IMIPAS, 2018).

En los machos maduros, el petasma es simétrico y semi abierto, con espermátóforos complejos, que consisten en una masa espermática encapsulada por una vaina. Las hembras maduras presentan el télico abierto. Su coloración es generalmente blanca translúcida con tonos amarillos, aunque puede variar según el sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. Por lo general, las hembras crecen más rápido y alcanzan un tamaño mayor al de los machos (FAO, 2009; IMIPAS, 2018).

La Figura 1 muestra el esquema de la anatomía externa del camarón patiblanco, lo que permite una mejor comprensión de su división.

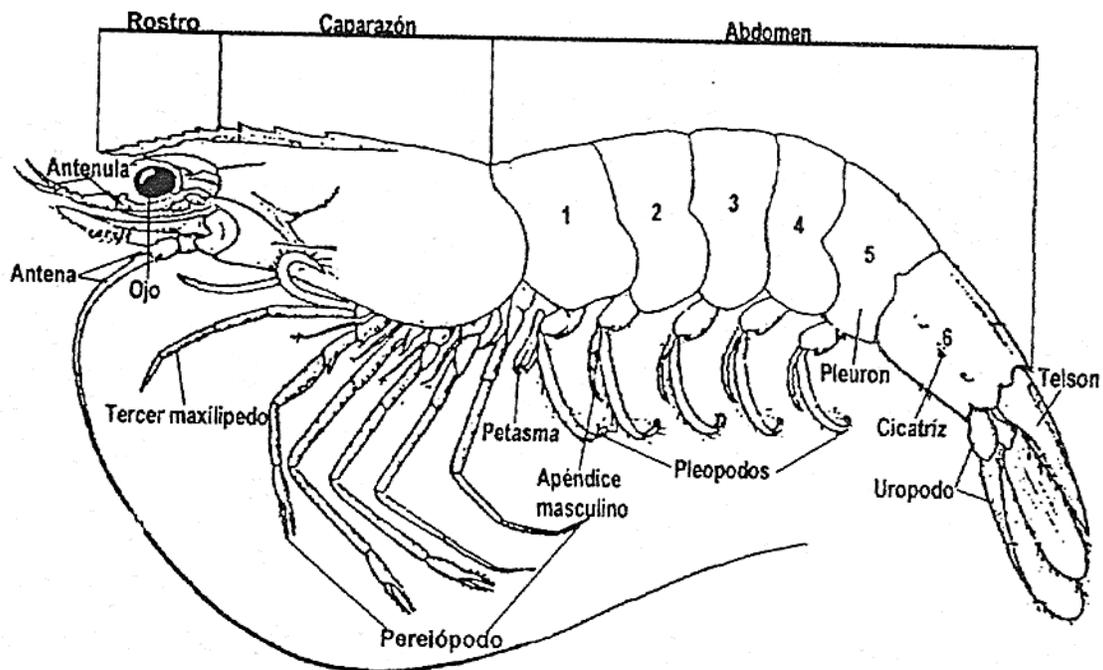


Figura 1. Anatomía externa del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (Martínez, 2002).

2.1.1.4 Fisiología de *L. vannamei*

La Figura 2 ilustra la anatomía interna del camarón patiblanco, donde se observan los sistemas digestivo, nervioso y circulatorio. Facilitando la comprensión de los procesos fisiológicos y la regulación interna del organismo.

Sistema respiratorio:

Está constituido por dos cámaras branquiales, una en cada lado de la cabeza, en la región del cefalotórax y por debajo del exoesqueleto. En general tienen de 6 a 20 pares de branquias sensibles a las variaciones de oxígeno del medio (Randall *et al.* 1998; Rajoy, 2015). Las branquias consisten en un eje central con una serie de lamelas a lo largo del mismo y cada lamela está formada por filamentos bifurcados, las branquias están recubiertas por una capa de quitina, a través de la cual se realiza la difusión de los gases (Robles, 2009).

Las cámaras branquiales se cierran exteriormente por una extensión del exoesqueleto, esta extensión es más flexible, lo que permite la circulación del agua (Rajoy, 2015). El proceso de respiración se lleva cabo en varias etapas, primero ocurre la captación de oxígeno del medio hacia el interior del organismo a través de las branquias, posteriormente el transporte de oxígeno a los tejidos por medio de la hemolinfa, y finalmente la utilización del oxígeno en las mitocondrias de las células. La captación de oxígeno (O₂) y la eliminación del dióxido de carbono (CO₂) se realizan a través de la superficie respiratoria, esto solo puede ocurrir a través de la difusión (Robles, 2009).

Sistema circulatorio:

Está compuesto por un corazón (que se encuentra en posición dorsal y posterior en el cefalotórax) y arterias que se subdividen a vasos semejantes a capilares. Uno de los vasos termina en el órgano linfóide, que es el encargado de filtrar la hemolinfa (Robles, 2009; Rajoy, 2015).

Luego de que se lleva a cabo el intercambio gaseoso, el oxígeno es transportado a través de la hemocianina contenida en la hemolinfa, dicha hemolinfa pasa por las branquias y posteriormente retorna al pericardio para llegar al corazón (por medio de tres orificios, los ostiolos, ubicados en las paredes del corazón), el cual se encarga de realizar el bombeo que facilitara el transporte de oxígeno al resto de los órganos (Robles, 2009; Rajoy, 2015).

La circulación se denomina abierta, ya que la hemolinfa circula del corazón, distribuyéndose por el cuerpo y al llegar a los tejidos se difunde por el hemocele, para posteriormente regresar al corazón pasando por las branquias, en donde se oxigena (Randall *et al.* 1998; Robles, 2009).

Sistema digestivo:

Está constituido por boca, esófago, estomago, hepatopáncreas e intestino (Ayala, 2014). Inicia en la boca, que se ubica en posición ventral, acompañada de mandíbulas (apéndices masticadores), se continua con el esófago que es corto y ancho y conecta al estómago, este último está dividido en dos cámaras: estómago cardiaco y estómago pilórico (Randall *et al.* 1998; Rajoy, 2015). El estómago cardiaco tiene un complejo de piezas quitinosas, el molinillo gástrico que tritura el alimento (acción previamente iniciada por las piezas bucales) y el estómago pilórico presiona y filtra los alimentos. Después sigue el intestino que tiene varios ciegos y desemboca en la cara ventral del telson. El hepatopáncreas es la glándula digestiva, se localiza en la región anterior del tórax, es lobulado y está formado por divertículos del intestino (Rajoy, 2015).

Sistema nervioso:

Es similar al de otros artrópodos. Es ganglionar, está conformado por un par de ganglios supra esofágicos (estos son los más grandes y funcionan como cerebro), y un cordón nervioso ventral doble con ganglios a lo largo del cuerpo hasta el abdomen (Randall *et al.* 1998; Rajoy, 2015). Estos ganglios varían en cuanto a su complejidad (Elwood *et al.* 2009).

Del par de ganglios supra esofágicos parten nervios a los órganos sensoriales (ojos, estatocistos, antenas y anténulas), también parten dos ramas que se unen en un ganglio sub esofágico, del cual parten nervios a la boca, apéndices masticadores, esófago y glándulas antenales, de este ganglio sub esofágico parte el cordón nervioso ventral doble que tiene un par de ganglios en cada somito, cada par de ganglios conecta la masa muscular con cada apéndice y el par de ganglios del sexto somito abdominal transmite a los urópodos, telson y la parte final del tracto digestivo (Rajoy, 2015).

Osmorregulación:

La mayoría de los organismos acuáticos son osmoconformadores, es decir que todos sus fluidos corporales están en equilibrio osmótico con el agua del medio en el que se encuentran (Bradley, 2008). En el caso de los crustáceos de la zona costera donde la salinidad del medio puede variar, la osmorregulación es particularmente importante (Chong, 2015).

Los crustáceos marinos respiran mediante branquias que poseen epitelios delgados y permeables por lo que tienen que permanecer en contacto con el medio acuoso exterior, la mayoría de estos animales son osmoconformadores y su hemolinfa tiene la misma concentración osmótica que el medio en el que están, aunque la composición iónica puede diferir (Bradley, 2008). Sus órganos excretores son las glándulas antenales (Randall *et al.* 1998).

La facultad de un organismo para regular en distintas salinidades (eurihalinidad) es una adaptación evolutiva de los crustáceos que les permite mantener en equilibrio la osmolalidad de la hemolinfa dentro de sus patrones de osmorregulación. Estas especies eurihalinas tienen mecanismos de adaptación que incluyen estructuras y epitelios con células especializadas que poseen un mecanismo molecular especializado para el transporte iónico (Chong, 2015).

L. vannamei es una especie osmoconformista eurihalina, es considerada un buen osmorregulador, puesto que se osmoconforma, pero puede tolerar cambios sustanciales en un amplio intervalo de salinidad (Arzola *et al.* 2008; Bradley, 2008). Puede adaptarse a aguas con baja salinidad (1 – 2%) hasta aguas con alta salinidad (40% o más). Estos animales varían su patrón de osmorregulación dependiendo de la salinidad del medio, son hiper – osmorreguladores en bajas salinidades, hipo – osmorreguladores en salinidades altas e iso – osmóticos en salinidades intermedias, teniendo un punto iso – osmótico alrededor de una salinidad de 25 – 27% (Díaz *et al.* 2001; Valdez *et al.* 2008).

Termorregulación:

La temperatura corporal es un factor universal que afecta el funcionamiento de los organismos al tener efecto sobre células, tejidos y órganos (Lagerspetz y Vainio, 2006; Ewart, 2020). Los animales tienen diferentes tipos de relaciones con la temperatura del medio ambiente en el que viven y, por consiguiente, utilizan varias estrategias para regular su temperatura corporal, así como el intercambio de calor entre ellos y el medio en el que se encuentran (Hernández, 2008; Ewart, 2020).

El término poiquiloterma proviene de *poikilos* que significa múltiple, varios o variado y se refiere a la variación de temperatura corporal que pueden tener estos organismos, dicha variación abarca un rango considerable de temperatura. A los animales poiquiloterms se les puede denominar también ectotermos, debido a que su temperatura corporal depende de las condiciones térmicas del entorno, siendo así ambos términos correctos (Monteith y Unsworth, 2013; Ewart, 2020).

Los poiquiloterms tienen menor control fisiológico de su equilibrio térmico por lo que usan estrategias conductuales como desplazamiento a zonas con temperaturas óptimas que favorezcan su homeostasis, evitando los extremos de calor y frío (Hernández, 2008; Monteith y Unsworth, 2013), además los animales poiquiloterms ahorran considerablemente energía al no gastarla en mantener el desequilibrio térmico entre ellos y el medio ambiente (Ewart, 2020).

Los crustáceos son considerados poiquiloterms acuáticos dado que su temperatura corporal varía con la del exterior, y por ello, su temperatura corporal se equipará a la del agua que los rodea. De forma natural producen metabólicamente calor interno y lo almacenan, lo que puede llevar a un aumento de la temperatura corporal respecto a la del agua, sin embargo, tienen tasas metabólicas relativamente lentas y su producción interna de calor metabólico es en cierta medida baja, además de esto, el agua absorbe dicho calor, lo que hace que la diferencia entre ambas temperaturas sea escasa (Lagerspetz y Vainio, 2006; Monteith y Unsworth, 2013; Ewart, 2020).

Ahora bien, la conductancia térmica de los crustáceos es alta, es decir, son ectotermos y por lo tanto su temperatura interior depende de la del exterior (su temperatura es baja en entornos fríos y alta en entornos cálidos) (Lagerspetz y Vainio, 2006; Ewart, 2020), por tal motivo, recurren a mecanismos de termorregulación para sobrevivir tales como el traslado a temperaturas más convenientes y adecuadas, y la capacidad de adaptación térmica (Lagerspetz y Vainio, 2006; Hernández, 2008).

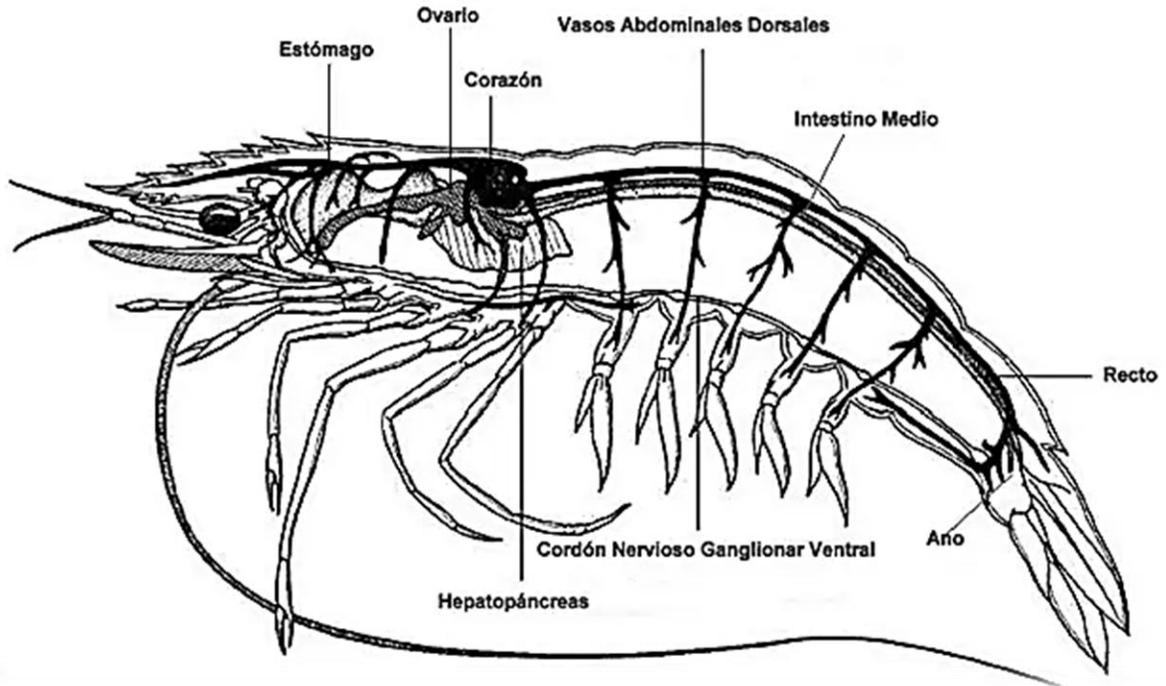


Figura 2. Anatomía interna del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (Pérez Farfante, 1969).

2.1.2 Normatividad

La creciente importancia de la acuicultura, el aumento de animales acuáticos utilizados en experimentación, la investigación sobre el bienestar animal y una mayor protección legal de los animales, en general, demandan que se requiera un marco normativo que sea una guía de acción en prácticas que involucren organismos acuáticos (Bovenkerk y Meijboom, 2020; Kristiansen y Bracke, 2020).

El bienestar de organismos acuáticos como los peces se considera en la legislación y recomendaciones internacionales desde hace varios años, por ejemplo: en la Ley de Protección Animal de Noruega (1974), la Ley de Bienestar Animal del Territorio de la Capital Australiana (1992), la Ley de Bienestar Animal de Nueva Zelanda (1999), la Ley de Protección y Cuidado de los Animales del Gobierno de Queensland (2001), el Consejo de Europa (2005) y la Ley de Bienestar Animal de Noruega (2009) (Kristiansen y Bracke, 2020).

Lo mismo que organizaciones internacionales que han incluido en sus regulaciones, estándares y certificaciones, medidas sobre el bienestar de los peces, basadas en las leyes ya mencionadas, es el caso del Código de Conducta emitido por la Federación Europea de Productores Acuícolas (FEAP por sus siglas en inglés; Federation of European Aquaculture Producers), esquemas de certificación emitidos por el Consejo de gestión de la acuicultura (ASC; Aquaculture Stewardship Council), la Alianza Mundial de Productos del Mar (GSA: Global Seafood Alliance) y su división Mejores Prácticas Acuícolas (BAP: Best Aquaculture Practices) (Kristiansen y Bracke, 2020).

Ahora bien, desde el siglo XX los animales han sido incluidos en las leyes occidentales. La Directiva de la Unión Europea que se encarga de regular el uso de animales en procedimientos experimentales científicos y con fines educativos es un ejemplo de la protección legal a los animales (Pollo y Vitale, 2019; Ponte *et al.* 2019).

La Directiva 2010/63/UE establece que cada criador, proveedor y usuario debe contar con personal suficiente y capacitado con la educación y formación adecuada sobre la realización de procedimientos en animales, diseño de proyectos y procesos, cuidado de los animales y eutanasia de los mismos, así como ser supervisado antes de realizar alguna de las actividades mencionadas y se haya corroborado la competencia necesaria, del mismo modo los estados miembros están obligados a publicar los requisitos mínimos de educación y formación para realizar las funciones mencionadas anteriormente, dicha formación incluye temas como ética, legislación, biología, etología, anestesia, analgesia, eutanasia y diseño experimental (Utne – Palm y Smith, 2020).

Esta Directiva también declara como umbral “cualquier procedimiento que pueda causar dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la inserción de una aguja hipodérmica de acuerdo con las buenas prácticas veterinarias”, cubriendo tanto procedimientos invasivos como no invasivos, por lo que las investigaciones que involucren intervenciones conductuales pueden alcanzar este umbral, estableciendo de esta forma que si un procedimiento alcanza el nivel de malestar y estrés que pueda causar la inserción de una aguja, entonces se aplicara dicha legislación (Ricceri y Vitale, 2011; Ponte *et al.* 2019).

Anteriormente las leyes y bioética no les prestaban atención a los invertebrados, y al no estar protegidos por la legislación quedaban en manos de la voluntad de los científicos que los usaban experimentalmente, sin embargo, debido al aumento de la investigación científica y el uso de invertebrados en el laboratorio, se deben empezar a considerar cada vez más (Pollo y Vitale, 2019).

A su vez, la Directiva de la Unión Europea anteriormente no consideraba a los invertebrados, pero la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés; European Food Safety Authority) solicitó que se incluyeran algunos invertebrados como lo son los cefalópodos entre los animales cuyo bienestar se debe tener en cuenta si se utilizan con fines científicos por lo que actualmente la Directiva 2010/63/UE que entró en vigor en Enero del 2013 los incluye y están protegidos legalmente en la Unión Europea en todos los Estados miembros al igual que todos los vertebrados. No obstante, ya había una norma sobre el bienestar de los cefalópodos en la legislación británica (Pollo y Vitale, 2019; Ponte *et al.* 2019).

Cabe destacar que la Comisión Técnica de Salud y Bienestar de los Animales (AHAW por sus siglas en inglés; Animal Health and Welfare) de la EFSA solicitó que se incluyeran en la Directiva de la UE los crustáceos decápodos, a pesar de ello, dicha solicitud no fue incluida en la versión final de la última Directiva (EFSA, 2005).

Mientras que en algunos países ahora están considerando en sus legislaciones (que regulan la investigación en laboratorio), la inclusión y protección del bienestar de algunos invertebrados acuáticos: Suiza regula los experimentos con cefalópodos y crustáceos decápodos, Noruega de igual forma con calamares, pulpos, crustáceos y abejas melíferas, por su lado, Australia regula el uso de cefalópodos por medio del Código del Consejo Nacional de Salud e Investigación Médica y Nueva Zelanda incluye en sus normativas al pulpo, calamar, langosta y cangrejo de río (Pollo y Vitale, 2019). Esto es un avance fundamental en la inclusión y consideración de invertebrados acuáticos en la investigación, experimentación y educación (Ponte *et al.* 2019).

Por su lado, la OMSA en 1985 publicó por primera vez el Código Sanitario para los Animales Acuáticos en el que se establecen las normas para mejorar la sanidad de los animales acuáticos (anfibios, crustáceos, peces y moluscos) en el mundo (OMSA, 2023b), y en 2008 implemento principios de bienestar animal para algunos organismos acuáticos, tal es el caso de los peces (Kristiansen y Bracke, 2020; OMSA, 2023b).

La Directiva 2010/63/UE incluye también directrices sobre el bienestar, alojamiento, cuidado, enriquecimiento ambiental, sanidad, manejo, transporte y describe los métodos aceptables de eutanasia, incluyendo animales acuáticos como los peces, pero sin mencionar a ninguna especie en específico (Utne – Palm y Smith, 2020).

En 2020 la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA: American Veterinary Medical Association) actualizó por última vez su guía con pautas para la eutanasia de los animales, esta guía está dirigida al gremio veterinario, así como al personal que realice o supervise la eutanasia de animales, también aborda la sedación y anestesia (AVMA, 2020b). La versión anterior emitida en 2013 ya incluye a los invertebrados acuáticos, pero ambas versiones son similares con respecto a estos, pues no mencionan un método en concreto como estándar, ni de ninguna especie en específico, si no que recomiendan extrapolar los métodos utilizados en peces, refiriéndose a ellos en general (AVMA, 2013; AVMA, 2020b). Siendo lo anterior un problema, ya que gran parte de la legislación actual que regula la investigación con animales hace referencia a los invertebrados acuáticos y a los peces como si fueran una sola especie (Utne – Palm y Smith, 2020).

En México se cuenta con las Normas Oficiales: NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, en la que se incluyen a los invertebrados terrestres y mamíferos marinos, pero no a otros organismos acuáticos como peces y crustáceos (DOF, 2015) y la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, en la que se aborda el perfil del personal responsable de los animales, la obtención de los animales, alojamiento, métodos de identificación, alimentación, movilización, técnicas experimentales, analgesia, anestesia y eutanasia, no obstante, no incluye organismos acuáticos (DOF, 2001).

Dado que los animales acuáticos son un grupo tan diverso de especies con necesidades, requerimientos y adaptaciones específicas, es complicado formular directrices generales, por ello existe la necesidad de aumentar los esfuerzos tanto generales como específicos para mejorar y regular la calidad de la investigación que se realiza en ellos formulando directrices específicas para cada una de las especies y posibles situaciones, al menos para las especies más utilizadas en la investigación (Utne – Palm y Smith, 2020).

Por el momento, a causa de la falta de información detallada y específica de las especies acuáticas, su uso se debe regir con la normatividad general aplicable y es por ello por lo que existe un gran potencial para perfeccionar y detallar los criterios de evaluación en las investigaciones y experimentos con estas especies (Utne – Palm y Smith, 2020), actualmente la legislación mundial se encuentra en un momento oportuno para proteger bajo la normatividad a aquellos animales que hoy en día no lo están, como los crustáceos, tanto en el área de la investigación, experimentación y educación, como en el área de la industria de producción (Giménez y Jiménez, 2019).

2.2 Acuicultura en el mundo

La acuicultura tiene un alto nivel de importancia a nivel mundial (Einarsson y Dís Óladóttir, 2021). Ha contribuido crucialmente a la seguridad alimentaria, la nutrición y la economía de cada país. Se prevé un crecimiento en su producción en los siguientes años, mismo que debe procurar la salud de los ecosistemas acuáticos, el bienestar de los animales, la biodiversidad, así como no aumentar la contaminación (FAO, 2022). En este crecimiento, se enfrentan importantes desafíos, ya que, con el aumento de la demanda de estos productos, aumentan también las exigencias (Hicks, 2016).

La acuicultura moderna sustentable tiene como retos proveer al mercado y satisfacer el incremento mundial del consumo de productos acuícolas generando productos de alta calidad y funcionales, mismos que deben estar sustentados en el manejo integral de los recursos acuícolas, su conservación, restauración y protección, considerando los factores ambientales, productivos, biológicos, culturales, sociales, económicos, tecnológicos, jurídicos, normativos e institucionales (DOF, 2007; Magallón *et al.* 2007).

Por lo tanto, la sostenibilidad y sustentabilidad se caracterizan por la implementación de acciones encaminadas al desarrollo de la acuicultura de forma equilibrada, definiendo proyectos viables económicamente, soportables por el medio ambiente, compatibles con los ecosistemas y equitativos para la sociedad (DOF, 2007; Espinós, 2011).

Dado que, la acuicultura ha crecido sin contar con suficientes conocimientos basados en la investigación científica, es crucial priorizar su desarrollo, especialmente en aquellas áreas donde el potencial de profundización sigue siendo en gran medida inexplorado (FAO, 2022), pues, si se busca optimizar los recursos acuícolas, es necesario impulsar estrategias y capacidades científico – tecnológicas, de gestión y logísticas que contribuyan a la diversificación de las especies y mejora de procesos prácticos con el propósito de garantizar el progreso sustentable y sostenible de la actividad acuícola (Magallón *et al.* 2007; Espinós, 2011).

Por ello, para atender los retos de una actividad relativamente nueva como es la acuicultura, es necesario la generación de nuevo conocimiento y su aplicación. De esta forma, es posible la transmisión del conocimiento para generar valor. Del mismo modo, incluir nuevos enfoques en el cuidado de los entornos ambientales y sociales donde se desarrolla la acuicultura, a fin de prevenir conflictos y malas prácticas (Berger, 2020).

2.3 Acuicultura en México

Actualmente de acuerdo con la FAO, México se posiciona dentro del top 10 ocupando el séptimo lugar a nivel mundial y el segundo lugar en Latinoamérica en la producción pesquera y acuícola de camarón, siendo sus principales estados productores Sinaloa, Sonora y Tamaulipas (CONAPESCA, 2024).

En el sector acuícola de nuestro país, el conocimiento se genera principalmente en las universidades y centros de investigación, por lo que dichas instituciones son parte fundamental del sistema de innovación, además de contribuir al desarrollo económico y social del país mediante la formación de capital humano, la generación de investigación básica y aplicada, la formación de un ámbito de trabajo cooperativo entre universidad, gobierno e industria y la transferencia de conocimientos (Casas *et al.* 2007).

En los Estados Unidos Mexicanos, la acuicultura ha alcanzado niveles de desarrollo que van desde la escala experimental, hasta la producción comercial. Entre las acciones que se han desarrollado para incentivar el crecimiento de la acuicultura, se incluye el mejoramiento de líneas genéticas, apoyo y desarrollo a la investigación aplicada y ordenamiento acuícola destinado a seguir impulsando el potencial acuícola nacional (SADER, 2022).

Por sus características físicas, naturales y sociales, así como su ubicación geográfica, el país cuenta con uno de los potenciales acuícolas más importantes del mundo, lo que lo coloca en una posición estratégica para que sea uno de los líderes mundiales en la producción acuícola tanto de agua dulce como marina (Rosales y Acevedo, 2012; Platas y Vilaboa, 2014). No obstante, se requiere invertir y desarrollar infraestructura, investigación científica y tecnológica, transferencia de tecnología, financiamiento y manejo del riesgo, además de políticas, leyes, normas y reglamentos que proporcionen certeza jurídica y estimulen la introducción, permanencia y ampliación en este sector. Con el soporte anterior la acuicultura mexicana estará en posibilidades de contribuir significativamente a la producción de alimentos, crecimiento económico, científico y generación de empleos que el país necesita en el corto, mediano y largo plazo (Platas y Vilaboa, 2014).

La república mexicana posee todas las condiciones necesarias y suficientes para desarrollar el potencial de la acuicultura, dicho desarrollo dependerá de la aplicación exitosa de los conocimientos generados, tecnologías eficientes, procesos de innovación, modernización y reconversión para satisfacer las demandas del sector (Platas y Vilaboa, 2014; FAO, 2024). Ya que es precisamente la utilización de las ciencias básicas y aplicadas lo que permitió que la acuicultura saltara en el tiempo miles de años en comparación con la agricultura y ganadería como actividad productiva. Sin embargo, se requiere de una estrategia de investigación científica y tecnológica en acuicultura para aumentar la productividad y competitividad del país (Platas y Vilaboa, 2014).

2.4 Uso de animales en investigación y educación

La investigación con animales es ampliamente reconocida como parte integral de la ciencia, cuyo objetivo es resolver las problemáticas que se plantean (Aller *et al.* 2000), pues la respuesta a muchas preguntas se ha obtenido a través de la ciencia (Blasco, 2011). Contribuyendo de manera decisiva al bienestar de las personas (OMSA, 2023a).

En general, muchas áreas de la ciencia se han apoyado en la experimentación animal (Aller *et al.* 2000), en disciplinas como fisiología, parasitología, virología, toxicología, farmacología, microbiología, inmunología, nutrición, entre otras, lo que ha permitido contribuir a aumentar las expectativas de vida de muchas personas a nivel mundial (Barrios *et al.* 2011).

El uso de modelos animales cuando no puedan ser sustituidos por otras técnicas alternativas es esencial para el progreso de la ciencia, ya que la experimentación animal ha contribuido a investigaciones que benefician tanto al hombre como a los animales, constituyendo un medio de aprendizaje al permitir la docencia, generación de conocimiento y el ensayo de nuevas técnicas (Aller *et al.* 2000)

Frente a los desafíos de la investigación actual, el uso de animales no puede omitirse por completo, sin embargo, se debe garantizar el trato digno de los mismos (Blázquez *et al.* 2022). Del mismo modo, la utilidad de los resultados es indispensable para justificar el uso de los animales (Jar, 2014), y su utilización siempre será regida por principios éticos, buscando la aplicación de métodos alternativos para reducir la utilización de los animales (Aller *et al.* 2000).

De acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio se define a un animal de laboratorio como todo aquel animal usado en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza (DOF, 2001). A lo largo de la historia se han utilizado diferentes modelos animales, pues su estudio en sí mismo requiere investigarlos a todos (Cardozo y Osorio, 2008). Usualmente se emplean en la investigación y docencia diversas especies de vertebrados que incluyen animales de granja (cerdos, cabras, borregos, pollos, vacas, entre otros), perros, gatos, ratas, ratones, cobayos, conejos, hámsteres, primates no humanos y animales no convencionales (Cardozo y Osorio, 2008; Cañete, 2016).

No obstante, uno de los animales cuyo uso como animal de laboratorio está aumentando en todo el mundo son los peces (Bovenkerk y Meijboom, 2020; Utne – Palm y Smith, 2020). Los peces se utilizan en diversas áreas de la investigación, por ejemplo, biología, ecología, genética, producción de vacunas, fisiopatología, etología y toxicología, además en las últimas décadas han aumentado las investigaciones relacionadas con el medio ambiente y la medicina tanto veterinaria como humana (Utne – Palm y Smith, 2020).

Asimismo, en los últimos años ha incrementado el número de estudios relacionados con la pesca, ciencia y tecnología de los alimentos, donde se utiliza una diversidad de especies acuícolas tanto en campo como en laboratorio buscando mejorar la salud de las especies a través del desarrollo de vacunas y mejoras en las condiciones ambientales, producción y manejo, estas investigaciones conllevan el beneficio humano, puesto que se busca potencializar la eficiencia de la producción, de ahí el interés como objetos de investigación y docencia (Utne – Palm y Smith, 2020).

Dentro de las especies acuícolas que se han sumado a lista de animales de laboratorio, destaca el uso de invertebrados como los crustáceos, pues, hoy en día es imposible enumerar las aportaciones que el estudio de estos animales ha aportado, pues forman parte de la vida humana como sujetos de investigación, alimento e incluso como animales de compañía. Por consiguiente, los científicos, docentes e investigadores, son muy conscientes de los avances logrados en la investigación científica con el uso de invertebrados acuáticos (Pollo y Vitale, 2019).

Es probable que el uso de organismos acuáticos como animales de investigación siga aumentando y de manera más apresurada en un futuro próximo, ya que, la acuicultura ha influenciado y se ha vuelto parte importante del enfoque de la investigación, este crecimiento implica un conjunto de dilemas éticos y científicos (Pollo y Vitale, 2019; Utne – Palm y Smith, 2020).

La sociedad hoy en día está cada vez más preocupada sobre el trato que reciben los animales en los experimentos. Este tema está ganando relevancia, y los científicos, investigadores, estudiantes y docentes van a estar en el punto de mira de los comités de ética y de los legisladores (Blasco, 2011). Tanto la legislación, como la sociedad, exigen que se aseguren las condiciones de bienestar animal, lo que hace necesario refinar los procedimientos actuales para atender dicha demanda (Jerez *et al.* 2019).

La variedad de especies que pueden ser utilizadas en experimentación requiere que se tomen en cuenta las necesidades específicas de cada una de ellas, siendo que cualquier especie del reino animal puede ser aprovechada en la ciencia, hay dos abordajes que deben implementarse: la reducción de acciones negativas que pueden producir dolor o distrés, y el aumento de las acciones positivas que mejoran el confort de los animales (Jar, 2014).

Para que los experimentos con animales cumplan con los estándares éticos, científicos y de bienestar actuales, se debe evaluar un diseño experimental de calidad en todas sus etapas, desde la planificación y ejecución hasta la interpretación de resultados y su publicación, por ello, el uso de organismos acuáticos plantea retos adicionales, debido entre otras cosas al hecho de que viven en un medio diferente al nuestro, al conocimiento inconcluso de sus necesidades de bienestar, a la percepción del estrés y al hecho de que tienden a ser tratados como si fueran una sola especie (Utne – Palm y Smith, 2020).

Agregando a lo anterior, no es posible establecer pautas generales para la investigación con especies acuáticas, por tanto, existe una necesidad urgente de orientación específica para cada una de las especies, sobre todo en temas como manejo, sedación, anestesia y eutanasia, al menos de las especies más utilizadas, al enfocarnos en la elaboración de pautas, planes y protocolos detallados para estas especies, se podrá aumentar con relativa premura la calidad de sus investigaciones y condiciones para laboratorio (Utne – Palm y Smith, 2020).

2.5 Bienestar animal y las 3Rs en investigación con animales

El término bienestar animal designa el estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en las que vive y muere (OMSA, 2023a). En la actualidad, el bienestar animal, es un tema de vital importancia a tomar en cuenta, cuya relevancia está relacionada con el trato que el hombre les proporciona a los animales en cualquier parte del mundo (Córdova *et al.* 2009).

El bienestar animal es un asunto complejo que abarca diversas dimensiones científicas, éticas, económicas, culturales, sociales, religiosas y políticas. Es un tema que está generando un interés creciente en la sociedad (OMSA, 2023a). Para identificarlo, medirlo, comprenderlo y protegerlo se requieren integrar conocimientos especializados de diversas áreas como ética, derecho, biología, etología, neurofisiología, endocrinología, inmunología, medicina veterinaria, entre otras (Huntingford y Kadri, 2008).

El Farm Animal Welfare Council (FAWC) o Comité de Bienestar de los Animales de Granja por su traducción, un órgano asesor del gobierno británico sobre asuntos relacionados con el bienestar de los animales de granja, en 1992 propuso que el bienestar animal se asegura cuando se cumplen cinco condiciones: Ausencia de hambre y sed crónicas, ausencia de incomodidad física y térmica, ausencia de dolor, enfermedades y lesiones, expresión de conductas normales y ausencia de miedo y distrés (Manteca, 2012).

Un animal goza de un buen bienestar si se encuentra sano, cómodo, bien alimentado, seguro, libre de sensaciones desagradables como dolor, miedo o distrés, y es capaz de mostrar conductas que son esenciales para su bienestar físico y mental. Lo anterior se logra cuando se previenen enfermedades, se proveen los cuidados veterinarios apropiados, así como alojamiento, manejo, nutrición, enriquecimiento ambiental, se realiza una manipulación correcta de los individuos y el sacrificio o matanza de manera humanitaria (OMSA, 2023a).

Centrarse en el bienestar de los animales además de las razones morales también aporta una gran ventaja científica, pues los animales dentro de un estudio deben estar en buenas condiciones y sin estrés, proporcionando así resultados científicamente válidos, entonces, un buen bienestar es al mismo tiempo buena ciencia (Utne – Palm y Smith, 2020).

Los científicos e investigadores a cargo de animales de laboratorio se enfrentan actualmente al desafío del uso de métodos como la sedación, anestesia y eutanasia que controlen mejor el manejo de los animales, pues tanto el estrés como los métodos en si pueden afectar los resultados de la investigación (Carbone y Austin, 2016).

De acuerdo con la normatividad y políticas como la UE, los animales bajo cuidado humano deben ser tratados y mantenidos de acuerdo con las “Cinco Libertades” emitidas por la Comisión Brambell en 1965, es decir los estados ejemplares de bienestar animal (Ponte *et al.* 2019).

Las cinco libertades se derivan fundamentalmente en relación con el bienestar de los animales de granja, por lo que, el concepto puede tener una utilidad limitada cuando se aplica a otros animales como los animales silvestres o de laboratorio, así para la evaluación de los aspectos biológicos, resulta más conveniente evaluar la capacidad adaptativa del animal (Ohl y Van der Staay, 2012).

Las cuestiones de bienestar en acuicultura radican en torno a parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua, la densidad de población, estrategias de alimentación y el transporte, no obstante, si se tomaran las cinco libertades como una medida de bienestar resultaría una posible tensión entre ellas (Bovenkerk y Meijboom, 2020).

Ahora bien, a los científicos, investigadores y académicos se les ha delegado la tarea de definir parámetros objetivos y cuantificables del estado de bienestar de un animal en condiciones específicas y proporcionar solución a los problemas identificados por la sociedad, sin embargo, no existe consenso alguno sobre como medir objetivamente el estado de bienestar de un animal y las implicaciones de cualquier manejo en sí (Ohl y Van der Staay, 2012). Lo anterior, aunado a la suposición de que no solamente se tiene conocimiento sobre lo que es el bienestar animal, sino que además se sabe cómo implementarlo y medirlo (Bovenkerk y Meijboom, 2020), cuando es notable que no es trabajo fácil encontrar avances en el bienestar de los organismos acuáticos en la investigación, pues, seguido forma parte secundaria de otras investigaciones haciendo falta trabajar específicamente en el bienestar de organismos acuáticos (Utne – Palm y Smith, 2020).

Cuantificar el bienestar de las especies acuáticas es inclusive más complejo que en otras especies, puesto que, su fisiología es diferente a la de otros organismos bien conocidos y aún se tiene poca información respecto al tema. Más aún, hay muchas especies diferentes conocidas y no conocidas y las diferencias entre ellas pueden ser considerablemente grandes, lo que plantea la cuestión sobre como medir el bienestar de cada una, evidenciando la extensión del trabajo sobre el bienestar de estos organismos (Bovenkerk y Meijboom, 2020).

Se deben explorar diversos indicadores de bienestar, ya sean parámetros internos o externos cuantificables, tales como características externas (infecciones, heridas, pérdida de escamas, erosión de las aletas, pigmentación), metabolitos (niveles de glucosa, lactato o toxinas), o indicadores de comportamiento (suspensión del consumo de alimento, pérdida o ausencia de reflejos, cambios en los patrones de actividad o del nado). Para poder utilizar dichos indicadores de bienestar e implementar nuevos se necesita el conocimiento básico sobre los parámetros normales en las especies y de esta forma poder validar los cambios presentados en ellos (Utne – Palm y Smith, 2020).

Al hacer falta información en cuanto a los indicadores de bienestar y la aplicabilidad de las cinco libertades a todos los animales, los investigadores, revistas científicas y agencias de financiamiento están adoptando algunos principios como la aplicación de las “3R” (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) a la investigación con animales (Ponte *et al.* 2019).

En los años 50’s la Federación de Universidades para el Bienestar Animal (UFAW, Universities Federation for Animal Welfare) encomendó a William Russel y Rex Burch la tarea de realizar una encuesta entre científicos e investigadores sobre experimentación con animales, quienes se enfocaron en métodos para reducir el estrés y crueldad, lo cual llevaría a mejorar el trato humanitario de los animales en la investigación. Encontraron que el estrés podía ser causado de forma directa (causado por un procedimiento) o indirecta (factores externos a la experimentación como transporte, mantenimiento, dominancia, entre otros). Finalmente, los resultados de la encuesta fueron presentados en su libro titulado “Los principios de la técnica experimental humana” que se publicó en 1959 (Russell y Burch, 1959; Utne – Palm y Smith, 2020).

En este libro describieron el concepto que se conoce mundialmente como las “Tres R de la experimentación animal” y consiste en Reemplazo, Reducción y Refinamiento: El reemplazo se refiere a técnicas alternativas que no involucren el uso de animales y que estos sean sustituidos por modelos informáticos, cultivos celulares o moléculas biológicas, la reducción se entiende como cualquier estrategia que tenga como resultado la disminución del número de animales utilizados para obtener una determinada cantidad de datos suficientes que respondan a la pregunta de investigación en cada caso y el refinamiento hace alusión a la modificación de procedimientos para minimizar el estrés y/o posible daño que se pueda causar, procurando así el bienestar animal de los animales utilizados (Russell y Burch, 1959).

La consideración del bienestar animal y el uso de las Tres R, ahora se utilizan tanto de forma específica como indirecta en la legislación actual de todo el mundo que regula la investigación con animales, siendo importante hoy en día ya que anteriormente los científicos e investigadores lo pasaban por alto al planificar sus experimentos. Además, la planificación integral de un experimento aumenta la probabilidad de éxito y el bienestar animal suma ventajas, puesto que los animales que se adaptan mejor a su entorno y experimentan un estrés mínimo, proporcionan datos más válidos (Utne – Palm y Smith, 2020).

En resumen, se deben mejorar las diferentes áreas de la investigación (adquisición, transporte, mantenimiento y manejo) para mejorar la reproductibilidad, transparencia y reducir al mínimo el estrés de la investigación, no sólo por motivos de bienestar sino porque todo en conjunto aumentará la validez de los datos recopilados, pues los resultados científicos válidos dependen de que los animales utilizados en la investigación muestren un comportamiento normal representativo de su especie, sin cambios físicos, lesiones u alteraciones causadas por factores estresantes, y todos los científicos, investigadores y docentes deberían compartir el objetivo de realizar, reproducir y comunicar solo investigaciones reproducibles y confiables (Crabbe, 2016; Utne – Palm y Smith, 2020).

2.6 Importancia de bienestar animal en investigación en la acuicultura

En los últimos años, se ha notado un aumento en trabajos sobre bienestar animal en todas las especies animales (Córdova *et al.* 2009). El uso de estos conocimientos científicos relacionados con bienestar animal debe estar enfocado a proporcionar mejor preparación y concientización del personal que está en contacto directo con los animales, ya que la buena calidad de la interacción entre los animales y las personas responsables de su manejo tiene un efecto muy importante sobre el bienestar, lo que lleva a obtener mejores resultados (Córdova *et al.* 2009; Manteca, 2012).

A partir de que se iniciaron los primeros estudios sobre el tema de bienestar animal, la Comunidad Científica Internacional, ha considerado que este tema, está íntimamente asociado a la presencia de ciertos procesos fisiológicos, especialmente aquellos relacionados al estrés en los animales (Del Campo, 2006), pues el bienestar de los animales se puede ver alterado por múltiples causas que generan estrés en los individuos y principalmente relacionadas con el manejo (Vásquez, 2013). Desde este punto de vista, las respuestas del estrés pueden generar efectos negativos sobre su estado fisiológico, comprometiendo así su bienestar (Jerez *et al.* 2019).

Actualmente a nivel mundial, la normatividad legal, los aspectos éticos, la protección del medio ambiente y el bienestar animal son de gran relevancia, por lo que en acuicultura y sus diferentes ramas de investigación se deben desarrollar prácticas de manejo que reduzcan el estrés y sus efectos potencialmente dañinos, ya que pueden provocar repercusiones no deseadas en los animales (Vásquez, 2013).

2.7 Estrés en crustáceos

Desde una perspectiva fisiológica, el bienestar animal está relacionado al concepto de estrés, en los crustáceos al igual que en otros animales, cuando la intensidad, duración y frecuencia de las situaciones estresantes, superan la capacidad de adaptación de los animales, las respuestas al estrés pueden generar efectos negativos en su estado fisiológico, comprometiendo así su bienestar (Jerez *et al.* 2019).

2.7.1 Definición de estrés

El estrés se define como el conjunto de respuestas fisiológicas que buscan restablecer el equilibrio interno de un organismo (homeostasis), tras la interferencia de estímulos intrínsecos o extrínsecos (agentes estresantes) que alteran el estado fisiológico natural (Jerez *et al.* 2019; Wuertz *et al.* 2023).

2.7.2 Fisiología del estrés

En el caso de los crustáceos es claro que su sistema nervioso central y endocrino es bastante distinto al de los vertebrados, aunque realizan funciones similares (Elwood *et al.* 2009). Por ello, aun cuando los crustáceos carecen de la complejidad del sistema endocrino de los vertebrados, poseen una respuesta fisiológica al estrés análoga a la respuesta al estrés en los vertebrados (Lorenzon, 2005; Manfrin *et al.* 2016).

La respuesta al estrés en los vertebrados desencadena una cascada de cambios hormonales que llevan a la producción de cortisol y/o corticosterona, teniendo como efectos estas hormonas la conversión de glucógeno en glucosa que puede utilizarse en una respuesta de huida o lucha, y a su vez los niveles de estas hormonas glucocorticoides a menudo sirven como indicador del estado de bienestar de los vertebrados (Elwood *et al.* 2009).

Similar que, en los vertebrados, la respuesta al estrés en los crustáceos comprende dos aspectos estrechamente interconectados, por un lado, una respuesta conductual mediada por cambios en las regulaciones del sistema nervioso y por otro lado una respuesta metabólica dirigida principalmente por un eje neuroendocrino (Fossat *et al.* 2015).

De manera que, la respuesta al estrés en crustáceos se puede explicar de la siguiente forma: en una respuesta primaria se liberan factores neuroendocrinos que a su vez inducen la respuesta secundaria al estrés, en la cual se producen cambios metabólicos (alteración de glucosa, glucógeno y lactato) para restaurar la homeostasis y finalmente la respuesta terciaria (causada por estrés crónico) en la que puede haber afectaciones en los parámetros biológicos y zootécnicos del animal, por ejemplo menor rendimiento, crecimiento disminuido, cambios de comportamiento, disminución de la resistencia a enfermedades, entre otros (Manfrin *et al.* 2016).

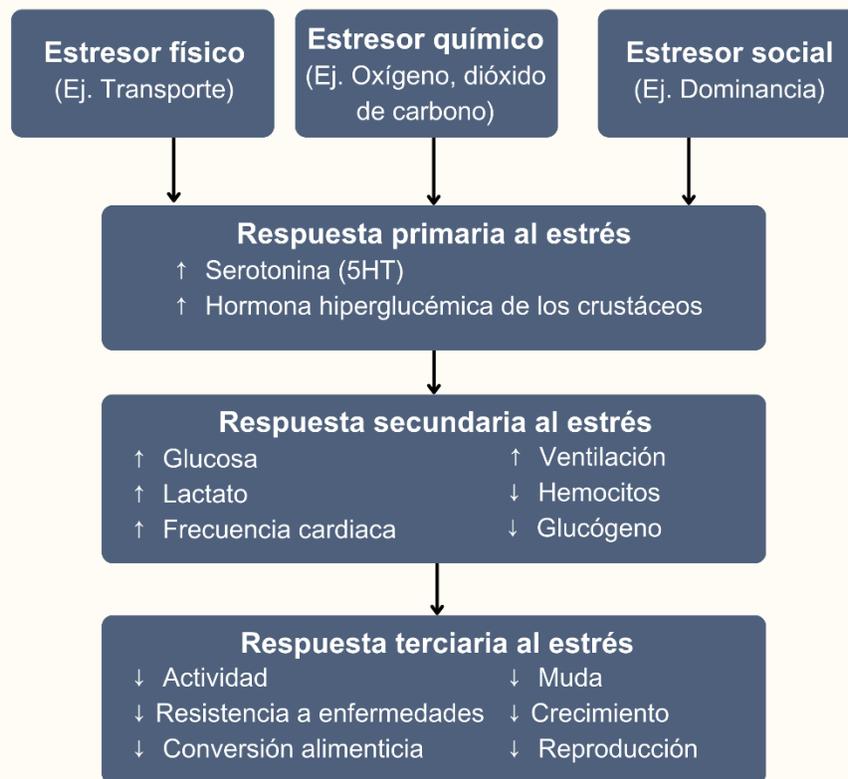


Figura 3. Respuestas fisiológicas al estrés en crustáceos decápodos (Lorenzon *et al.* 2005 y Manfrin, 2016).

2.7.3 Clasificación del estrés, causas y consecuencias

Los factores estresantes se pueden clasificar según su duración: si estos se presentan de manera prolongada ya sea repetitiva o continuamente (días, semanas), se considera que producen estrés crónico. En cambio, cuando solo se presentan brevemente y de manera puntual (minutos, horas) se considera que producen un estrés agudo (Aguilar, 2009; Boonstra, 2013).

En la práctica acuícola, la respuesta aguda es causada principalmente por perturbaciones a corto plazo, como la captura, escape, manipulación por parte de personas, manejo, biometrías, transporte, entre otros factores; mientras que el estrés crónico es causado por agentes persistentes y de larga duración, como las altas densidades de cultivo, la variación en la calidad de agua, la exposición a nuevos ambientes y la dominancia social (Auro y Ocampo, 1999; Zamora, 2012; Schreck y Tort, 2016).

Como resultado frente a los agentes estresantes o estresores, el organismo reacciona con una serie de cambios de comportamiento, bioquímicos y fisiológicos, con el propósito de compensar y/o adaptarse a la nueva situación (Zamora, 2012).

Las situaciones levemente estresantes pueden tener efectos beneficiosos o positivos (eustrés), mientras que las consecuencias a largo plazo de las exposiciones repetidas o prolongadas al estrés que inducen respuestas adaptativas también pueden tener consecuencias negativas o desadaptativas (distrés) al afectar negativamente otras funciones vitales necesarias (crecimiento, desarrollo, resistencia a las enfermedades, comportamiento y reproducción), en gran parte debido al costo energético asociado con el aumento de la respuesta al estrés (Schreck y Tort, 2016).

2.8 Indicadores de respuesta al agente estresor en crustáceos

Algunos investigadores han propuesto diferentes métodos para cuantificar las respuestas de estrés en los crustáceos (Stentiford *et al.* 2001). Por lo tanto, la evaluación del estrés en crustáceos necesita una combinación de parámetros conductuales y fisiológicos (Wuertz *et al.* 2023), ya que el organismo pone en marcha respuestas colectivas de estrés (Koscinczuk, 2014).

Por otro lado, es necesario remarcar la complejidad de evaluar desde un criterio fisiológico, pues la determinación de las respuestas frente a situaciones de estrés puede ser crucial para estimar el grado de estrés en las investigaciones en acuicultura ya que en los animales estresados sus respuestas se alteran después de intervenciones experimentales en comparación con los individuos no estresados (Ralph y Tilbrook, 2016; Jerez *et al.* 2019; Schroeder, 2022).

2.8.1 Indicador conductual

Al igual que en los mamíferos, la respuesta al estrés en los crustáceos implica una respuesta conductual que se debe a cambios en las regulaciones del sistema nervioso (Fossat *et al.* 2015), por lo que las observaciones de comportamiento son importantes (Wuertz *et al.* 2023). Si bien se han mencionado los movimientos de cola como respuesta de escape y por tanto como señal de estrés en crustáceos (Fregin y Bickmeyer, 2016), específicamente para el caso de *Litopenaeus vannamei*, únicamente se ha reportado el reflejo de huida, caracterizado por el encorvamiento del abdomen para nadar súbitamente hacia atrás, conocido como el síndrome del camarón acalambrado (Albines, 2019).

2.8.2 Indicadores bioquímicos

La respuesta metabólica al estrés en los crustáceos está controlada principalmente por un eje neuroendocrino (Fossat *et al.* 2015) que induce la liberación de la hormona hiperglucémica de los crustáceos (CHH), la cual es análoga a la hormona del estrés (cortisol) (Elwood *et al.* 2009; Wuertz *et al.* 2023). La CHH desempeña funciones en diversos procesos biológicos, sin embargo, su importancia radica especialmente en la respuesta al estrés como efector de un sistema de control homeostático (Fanjul, 2006; Xu *et al.* 2019).

La CHH actúa a través de la movilización de las reservas de glucógeno intracelular para restaurar la homeostasis, produciendo así cambios metabólicos, un efecto importante son los niveles elevados de glucosa y lactato en la hemolinfa, que pueden usarse como indicador de estrés (Elwood *et al.* 2009; Wuertz *et al.* 2023). En general, estos cambios metabólicos tienen la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de equilibrio, alterada por la exposición a agentes estresores (Carreño, 2009).

2.9 Principios de sedación, anestesia y eutanasia en crustáceos

Los animales invertebrados han desempeñado durante mucho tiempo un papel importante en la investigación (Cooper, 2011), pues los crustáceos se utilizan como modelos experimentales en una amplia gama de estudios que pueden ser invasivos y causar daño tisular (De Souza, 2022; Rotllant *et al.* 2023). Sin embargo, salvo pocas excepciones, los científicos, veterinarios y técnicos han prestado poca atención a la sedación, anestesia y eutanasia de estos organismos (Cooper, 2011).

La sedación, anestesia y eutanasia de animales acuáticos invertebrados es un tema bastante reciente y motivo de creciente preocupación (Gressler *et al.* 2021). Ahora se requiere un manejo humano y eficaz de estos organismos, ya que se han incluido en las regulaciones de bienestar en muchos países (Butler – Struben *et al.* 2018). Además, es parte fundamental de la práctica veterinaria y técnica animal monitorizar y garantizar que se protejan los aspectos de salud y bienestar animal, incluido cualquier estímulo adverso en los animales invertebrados, incluso si todavía no es un requisito legal en todo el mundo (De Souza, 2022).

Dado que existen múltiples inductores de estrés al manipular animales acuáticos, la anestesia es una estrategia necesaria durante los estudios científicos en biología y ecología, trabajos veterinarios y procedimientos de acuicultura (Gressler *et al.* 2021). Se han utilizado distintos métodos para inducir la anestesia en crustáceos con fines de investigación, manipulación y transporte (Rotllant *et al.* 2023). Dichos métodos incluyen: métodos físicos, térmicos, mecánicos, eléctricos y químicos, estos últimos abarcan sustancias sintéticas, aceites naturales y sales (De Souza, 2022; Rotllant *et al.* 2023).

Al igual que en los peces, estos animales suelen ser sometidos a anestesia por inmersión, absorbiendo el anestésico a través de las branquias (Gressler *et al.* 2021). También se utilizan habitualmente inyecciones en el cuerpo, inhalación, anestesia local e inyección intracardiaca (De Souza, 2022; Rotllant *et al.* 2023).

Por otro lado, a pesar de que se han recomendado diversos métodos (o una combinación de ellos), a menudo para una técnica o método solo se han investigado unas pocas especies y la mayoría de los métodos no se han estudiado adecuadamente en condiciones de laboratorio y algunos podrían resultar problemáticos en el contexto de los procedimientos de investigación, por lo tanto, se necesita más investigación para evaluar una gama más amplia de especies y condiciones, ya que existen diferencias sustanciales entre especies, edad, etapa de desarrollo, sexo, temperatura, pH y la salinidad, que pueden influir en la eficacia de un método elegido (Cooper, 2011; Rotllant *et al.* 2023).

2.9.1 Sedación

Puede definirse como la depresión del sistema nervioso central, resultando en somnolencia, relajación muscular y depresión de la conciencia (DOF, 2015; Seymour, 2017), que se logra con el uso de sedantes que alivian el malestar, el estrés y ansiedad del animal (Morita *et al.* 2002).

La sedación es un estado previo de la anestesia (Ross y Ross, 2008a; DOF, 2015). En términos generales, la sedación en organismos acuáticos tiene un efecto calmante, con una respuesta sensorial disminuida, pero en el que no hay una pérdida total del equilibrio (Ross y Ross, 2008a).

2.9.2 Anestesia

Este término se deriva de la palabra griega que significa insensibilidad (Kelz y Mashour, 2019). Por lo que se define como la supresión total, reversible y controlable, de la sensibilidad y la conciencia de los seres vivos sin comprometer sus funciones vitales (DOF, 2015; Seymour, 2017), logrando un estado en el que la percepción sensorial y las respuestas motoras están deprimidas (pérdida del equilibrio e inmovilidad) (Flecknell, 2016), y por tanto el organismo ya no es susceptible a los estímulos del medio exterior (Kelz y Mashour, 2019). Esto mediante la acción de métodos específicos (DOF, 2015).

2.9.3 Eutanasia

Deriva de los términos griegos eu, que significa bien, y thanatos, que significa muerte, dicho término se utiliza normalmente para describir el final de la vida de un animal en donde una buena muerte equivale a la terminación humanitaria de su vida (AVMA, 2020a). De este modo se define como el acto de inducir la muerte usando un método que ocasione una pérdida rápida e irreversible de la conciencia, seguida de paro cardiorrespiratorio, sin dolor y distrés para el animal (DOF, 2015; OMSA, 2023d).

En algunos casos es necesario terminar con la vida de los animales de forma compasiva, ya sea para poner fin a un procedimiento experimental, recoger tejidos o muestras y eliminar animales sobrantes o con el fin de aliviar el sufrimiento por lesiones o enfermedades graves e incurables (Ross y Ross, 2008a; DOF, 2015).

2.10 Métodos utilizados para la sedación, anestesia y eutanasia en crustáceos

Se recomienda la sedación y anestesia en crustáceos decápodos para disminuir el estrés causado por prácticas y manejos que conllevan las investigaciones realizadas con dichos ejemplares, tales como restricción a largo plazo, procedimientos quirúrgicos, exámenes, diagnósticos, muestreos, tratamientos y transporte. La profundidad anestésica (evaluada mediante indicadores visuales) dependerá del procedimiento a realizar, así mismo se recomienda que se lleve a cabo un método de eutanasia, garantizando una muerte sin estrés al animal (De Souza, 2022).

En este sentido, la AVMA menciona en su última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de los animales que la sobredosis de un anestésico general es una estrategia de eutanasia apropiada para invertebrados acuáticos, no obstante, dado que es complicado confirmar la muerte de la mayoría de los invertebrados (puesto que es difícil medir las constantes fisiológicas en ellos y tienen tasas metabólicas lentas que pueden dar la apariencia de muerte cuando están en un estado de latencia) se recomiendan procedimientos de eutanasia en dos pasos en los que la inducción química de la anestesia, la ausencia de respuesta a estímulos o la muerte van seguidas por un método complementario que destruya el cerebro o bien los ganglios principales ya sea físicamente (por congelación, ebullición o descortezamiento) o químicamente (por alcohol o formalina), considerando que estos últimos por sí solos no cumplen los criterios establecidos para la eutanasia (AVMA, 2020b).

De acuerdo con la clasificación para los procedimientos de eutanasia en dos pasos los métodos se clasifican en tres categorías: métodos aceptables como primer paso, métodos aceptables como segundo paso y métodos inaceptables, contemplando dentro de estos últimos a aquellos métodos que no causen una muerte rápida o que causen un traumatismo antes de la muerte en sí, estos incluyen la hipoxia secundaria a la desecación del tejido branquial, la anoxia por falta de oxigenación adecuada, la exposición a productos químicos cáusticos o lesiones traumáticas (AVMA, 2020b).

El uso de estos métodos es fundamental para procurar el bienestar animal y garantizar que el estrés no altere ni enmascare los resultados obtenidos en las investigaciones. Usualmente se usa la inmersión en baños anestésicos, inyecciones, inhalación, anestesia local y la inyección intracardiaca (De Souza, 2022). Sin embargo, el uso de métodos anestésicos en organismos acuáticos está limitado por la falta de información sobre la eficacia y los posibles efectos secundarios en varias especies de interés en la investigación y experimentación (Chatigny *et al.* 2018).

2.10.1 Sales de magnesio

El cloruro de magnesio ($MgCl_2$) es un relajante muscular que se utiliza generalmente como sedante en vertebrados (Sung *et al.* 2018) pues es viable para uso comercial y de investigación (Butt *et al.* 2008).

Es eficaz como solución saturada en agua destilada para crustáceos de agua dulce y puede diluirse con un volumen igual de agua de mar para su uso con crustáceos marinos. El proceso más habitual es añadir $MgCl_2$ al medio que contiene al animal, controlando el nivel de la dosis observando cuando el animal no responde a estímulos táctiles (Ross y Ross, 2008e). En invertebrados marinos cumple los criterios necesarios para ser considerado como un auténtico agente anestésico (Abbo *et al.* 2021). Su aceptación se debe a que se puede administrar fácilmente, no causa mortalidades, no se reporta como una sustancia tóxica para el usuario, no requiere permisos especiales para su compra (dependiendo del país), es económico, accesible, además se considera más ecológico que otras sustancias utilizadas como anestésicos (Butt *et al.* 2008; Sprecher *et al.* 2022) y se encuentra dentro de la categoría métodos aceptables como primer paso de procedimientos de eutanasia en dos pasos en invertebrados acuáticos en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA (AVMA, 2020b).

El magnesio es un antagonista del calcio, que interviene en varios procesos, como la contracción muscular, actividad neuronal, excitabilidad cardíaca y liberación de neurotransmisores. El magnesio disminuye la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular, inhibiendo así la transmisión de impulsos nerviosos causando relajación muscular. Su principal mecanismo de acción es bloquear los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) haciendo que la respuesta excitatoria disminuya, este proceso es amplificado por la acción de los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA), pues el magnesio extracelular estimula esos receptores, provocando una hiperpolarización neuronal que se traduce en la detención de la liberación de glutamato a la neurona presináptica por inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (Fawcett *et al.* 1999; Rodríguez y Beltrán, 2016).

Se ha utilizado como anestésico en varios invertebrados, como lo son: la ostra de roca de Sydney *Saccostrea glomerata* (Butt *et al.* 2008), mejillón de labios verdes *Perna canaliculus* (Azizan *et al.* 2021), cangrejo de lodo *Scylla paramamosain* (Zhu *et al.* 2023), erizos de mar *Paracentrotus lividus* (Arafa *et al.* 2007) y cefalópodos: *Octopus bimaculoides*, *Sepia officinalis* (Abbo *et al.* 2021), *Loligo vulgaris* (Sprecher *et al.* 2022), *Octopus vulgaris* (Pugliese *et al.* 2016; Di Cosmo *et al.* 2023) y *Sepia pharaonis* (Yang *et al.* 2020). En estos estudios no se han reportado efectos adversos, pese a ello, como cualquier químico, no está exento de presentar efectos no deseados (Rodríguez y Beltrán, 2016).

De este modo, es un anestésico no tóxico adecuado cuando se utiliza en concentraciones anestésicas óptimas (Arafa *et al.* 2007), por lo que su uso debería fomentarse como medio de promover el bienestar de los invertebrados en los laboratorios de investigación (Abbo *et al.* 2021). Sin embargo, pocos estudios lo han utilizado en crustáceos decápodos (Sung *et al.* 2018).

2.10.2 Hipotermia

En organismos acuáticos ectotermos la hipotermia se puede definir como una disminución aguda en la temperatura ambiente que tiene la capacidad de ocasionar un descenso rápido de la temperatura corporal, lo que resulta en una serie de respuestas fisiológicas, conductuales y de aptitud (Donaldson *et al.* 2008). Pues temperaturas bajas incrementan la capacidad de transporte de oxígeno del agua y disminuyen el consumo de oxígeno y la tasa metabólica de los organismos acuáticos (Ross y Ross, 2008d).

La disminución de la temperatura del agua se puede lograr mediante refrigeración o agregando hielo, siendo preferible la disminución gradual puesto que las rápidas disminuciones en la temperatura del agua pueden provocar un shock frío causando estrés en el animal, este choque frío ocurre cuando el animal se ha adaptado a una temperatura específica o bien a un determinado rango de temperaturas (los grados de disminución de la temperatura que se pueden aplicar dependen de la especie) y posteriormente se expone a un cambio brusco de la temperatura, produciendo así alteraciones conductuales y fisiológicas, por ejemplo en el proceso de osmorregulación de algunas especies, lo que podría suscitar desequilibrios iónicos en un periodo corto de tiempo y en algunos casos la muerte. No obstante, para efectos prácticos los científicos, investigadores y docentes prefieren la disminución rápida de la temperatura (Donaldson *et al.* 2008; Ross y Ross, 2008d).

La hipotermia es uno de los métodos más antiguos utilizados para sedar, anestesiarse y llevar a cabo la eutanasia de organismos acuáticos, en general se ha observado que es eficaz para inmovilizar, reducir la sensibilidad a los estímulos y deprimir el metabolismo, permitiendo la manipulación y el transporte. Ahora bien, se debe tener en cuenta que es probable que no se logre una adecuada anestesia con este método por lo que no es conveniente para procedimientos invasivos, además se debe considerar la relación adversa entre la hipotermia y la osmorregulación en algunas especies, lo que impide su uso en ellas, igualmente cabe recalcar que se ha notado cierta mortalidad asociada al uso de este método (Ross y Ross, 2008d).

Este método no se menciona en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA en ninguna de las categorías de la clasificación para los procedimientos de eutanasia en invertebrados acuáticos (AVMA, 2020b) y aunque este método es frecuentemente utilizado en peces y crustáceos, no hay un soporte científico ni se ha demostrado que atenúe la respuesta de estrés por manipulación (Zamora, 2012). Pues hoy en día esta línea de investigación ha estado desenfocada, siendo pocos los estudios que vinculan la fisiología de laboratorio con la práctica y datos de campo, sin embargo, durante los últimos años se ha producido un giro en la investigación y ahora el centro de atención de las investigaciones sobre hipotermia es determinar los efectos en términos de respuesta al estrés causados por dicha hipotermia en estos organismos. De modo que dichas lagunas de conocimiento existentes presentan la oportunidad para el desarrollo de preguntas de investigación en futuros experimentos (Donaldson *et al.* 2008; Reid *et al.* 2022).

2.10.3 Eugenol

El Eugenol (4-alil-2-metoxifenol) es un compuesto fenólico y es un líquido de color marrón oscuro, principal componente y obtenido mayormente del aceite de clavo, que, se extrae de las flores, tallos y hojas de *Syzygium aromaticum* y debido a su gran número de propiedades biológicas, tiene muchas aplicaciones y se ha usado por mucho tiempo en distintas áreas, por ejemplo, como anestésico desde 1929 (Ross y Ross, 2008c; Ulanowska y Olas, 2021).

Dado que la eficacia de su actividad anestésica es bien conocida se ha vuelto uno de los anestésicos más utilizados para especies acuícolas en procedimientos de investigación, lo que resulta benéfico para disminuir las respuestas a los factores estresantes durante procedimientos como la manipulación y el transporte, optimizando las respuestas bioquímicas y disminuyendo el porcentaje de mortalidad (Cooke *et al.* 2004; Tang *et al.* 2022), además se encuentra dentro de la categoría métodos aceptables como primer paso de procedimientos de eutanasia en dos pasos en invertebrados acuáticos en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA (AVMA, 2020b).

Pese a que es un anestésico de uso común en acuicultura, su mecanismo de acción no se comprende por completo, aun así, se ha indicado que afecta a los receptores de membrana, neurotransmisores y la señalización iónica (Zeng *et al.* 2024). Inhibe la actividad nerviosa de forma reversible, pues reduce la transmisión sináptica en la unión neuromuscular y bloquea la excitabilidad celular de las neuronas nociceptivas. Las inhibiciones de los canales de calcio y sodio dependientes de voltaje pueden ser la base de su mecanismo de acción (González, 2002; Park *et al.* 2009). Al deprimir el sistema nervioso, restringe el centro respiratorio provocando bradipnea y por tanto una disminución del aporte de oxígeno en la circulación (Ayala Soldado, 2014).

Una de sus características notables es que es fácilmente soluble en agua a temperaturas altas mediante agitación y a temperaturas bajas se puede preparar como una solución al 10% en etanol (Llanos y Scotto, 2010). También una de sus ventajas es que la farmacocinética mostró una rápida absorción y eliminación en invertebrados como los camarones (Tang *et al.* 2022). Si bien con el Eugenol se puede alcanzar una anestesia eficaz y controlada, una de sus desventajas es que no se recomienda para animales destinados a consumo humano por los problemas de sabor que puede causar, no obstante, está autorizado por la FDA y los productos comerciales más purificados no tienen este problema (Ross y Ross, 2008c).

A pesar de su habitual uso en la acuicultura, aún no hay muchos trabajos que muestren sus efectos en animales invertebrados. Algunos autores mencionan que es una alternativa de origen natural, ecológica, rentable, no aversiva y que no causa efectos secundarios negativos (Sorroza *et al.* 2020; Espinosa y Rosado, 2021), pero, como todo producto, su uso debe realizarse tomando en cuenta la forma de administración, dosis y tiempo de exposición, ya que puede llegar a provocar lesiones causticas o quemaduras superficiales cuando es colocado en forma directa y en altas concentraciones (González, 2002). En acuicultura se recomienda su dilución en etanol y su agitación en el agua con el objetivo de disminuir el tamaño de las gotas que puedan depositarse en las branquias y causar daños severos (Chacón *et al.* 2019).

Ahora bien, hay diversos estudios de su uso como anestésico en animales tanto vertebrados como invertebrados, sin embargo, pocos trabajos han explorado el uso de bajas y altas concentraciones para lograr la sedación y eutanasia respectivamente en organismos acuáticos (Cooke *et al.* 2004).

2.10.4 Limoncillo

El uso de productos naturales está incrementando, pues existe una tendencia en acuicultura hacia la búsqueda de productos naturales y ecológicos, que sean más respetuosos con los animales y con el medio ambiente para que se puedan utilizar de forma segura, por ello varios anestésicos a base de componentes vegetales para crustáceos decápodos son aceites esenciales (Aydin y Barbas, 2020; De Souza, 2022).

La planta *Cymbopogon citratus* es también conocida como limoncillo, es una especie de pasto y es rica en aceite esencial, después de la destilación al vapor de sus hojas secas, se obtiene un líquido de color amarillo y con un olor característico, este líquido es el aceite de limoncillo, que es usado como anestésico debido a las propiedades que le confiere su composición química (Aluyor y Oboh, 2014; Hacke *et al.* 2020).

Los aceites esenciales están constituidos por distintos compuestos en distintas concentraciones, generalmente su efecto sedante y anestésico se debe a un compuesto activo principal, aunque también puede derivarse del efecto sinérgico de sus diferentes componentes (Aydin y Barbas, 2020). Es el caso del mecanismo de acción de *Cymbopogon citratus*, que está relacionado principalmente al efecto de sus sustancias activas (citral, citronelal, citronelol, geraniol, geranial y mirceno) por sus propiedades neuroconductuales (Rojek *et al.* 2021; Cortes-Torres *et al.* 2023). Estos compuestos actúan en receptores neuronales (Sattayakhom *et al.* 2023), incluidos los receptores muscarínicos (Cortes-Torres *et al.* 2023) y GABAérgicos (Hacke *et al.* 2020).

Se han examinado diversos productos derivados de plantas utilizados como anestésicos en organismos acuáticos, aun así, se desconocen los posibles efectos secundarios de la mayoría de estos productos (Aydin y Barbas, 2020). En particular, cuando se utilizan agentes oleosos con una exposición prologada, estos pueden cubrir las branquias causando una insuficiencia respiratoria. Para ayudar a eliminar el agente anestésico de las branquias y la superficie corporal, se recomienda enjuagar a los animales rápidamente con agua limpia antes de colocarlos en el área de recuperación y evitar la sobreexposición (Matulovic y Oshiro, 2016), otros efectos adversos incluyen irritación superficial cuando se aplica directamente (Tibenda *et al.* 2022).

De igual manera, una de sus desventajas es la falta de estandarización metodológica, pues muchos de estos aceites esenciales se han probado en condiciones experimentales específicas y en un número reducido de especies acuáticas (Aydin y Barbas, 2020).

El limoncillo se ha utilizado en especies como el camarón blanco del Pacífico teniendo como resultado una anestesia eficaz, siendo así indicado para su uso en procedimientos que requieran una anestesia prolongada y evitar el estrés por manipulación en crustáceos (Becker *et al.* 2021). Sin embargo, este método no se menciona en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA en ninguna de las categorías de la clasificación para los procedimientos de eutanasia en invertebrados acuáticos (AVMA, 2020b) y aunque se ha demostrado el efecto anestésico del aceite de limoncillo, se necesita la realización de investigación adicional para la estandarización de este método anestésico, además de evaluar sus efectos en otras especies de interés en la investigación (Aydin y Barbas, 2020).

2.10.5 MS-222

El Metanosulfonato de tricaína conocido como MS-222 (3-aminobenzoato de etilo metanosulfónico) es un anestésico de tipo éster que se utiliza comúnmente en un amplio margen de concentraciones para la anestesia y eutanasia de especies acuáticas. Es un anestésico autorizado en países como Estados Unidos, Canadá y el Reino Unido (Carter *et al.* 2011; Vázquez *et al.* 2013; Gressler *et al.* 2021).

El MS-222 es un polvo ácido, blanco, cristalino y fácilmente soluble en agua, pudiéndose disolver tanto en agua dulce como salada, generalmente se expende como polvo, pero se pueden preparar soluciones madre que son estables si se mantienen en recipientes oscuros, cerrados y a temperaturas bajas, estas soluciones conservan su eficacia hasta por 3 meses, aunque con el tiempo cambiarán de color y perderán su potencia. Por otro lado, no se tiene el conocimiento de que sea tóxico para los humanos en las concentraciones utilizadas más aún los operadores deben adoptar medidas de precaución como el uso de guantes, gafas y el lavado inmediato en caso de derrame sobre la piel (Ross y Ross, 2008c).

Su fórmula química es $C_9H_{11}NO_2$, tiene una cadena lateral sulfonada, lo que lo hace naturalmente ácido (Weber, 2011). Debido a la acidez que provoca en el agua se tiene que mezclar con soluciones amortiguadoras, como imidazol, hidrogenofosfato de sodio, hidróxido de sodio o el más utilizado bicarbonato de sodio (Popovic *et al.* 2012).

Aunque su mecanismo de acción aún no se comprende por completo, se ha referido que actúa bloqueando los canales de sodio dependientes de voltaje, impidiendo el desarrollo de los potenciales de acción (Dos Santos, 2018; Leyden *et al.* 2022) y, por lo tanto, inhibiendo las respuestas motoras y sensoriales (Ramlochansingh *et al.* 2014).

Este anestésico sintético se utiliza ampliamente en diferentes especies acuáticas para inmovilizarlas o transportarlas (Carter *et al.* 2011). Es absorbido y metabolizado a través de las branquias y excretado a través de la orina (Weber, 2011), se elimina del organismo en 24 horas y el tiempo de espera requerido por la FDA para los animales destinados a consumo humano es de 21 días, a pesar de ello, se han encontrado diversas consecuencias fisiológicas relacionadas con su uso, por ejemplo, hipoxia, hipercapnia, hiperglucemia, cambios en los electrolitos, alteraciones hormonales, colesterol y lactato (Ross y Ross, 2008c). Estos efectos secundarios perjudiciales hacen que sea importante considerar su administración como anestésico en animales acuáticos (Ayala Soldado, 2014) y no se menciona en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA en ninguna de las categorías de la clasificación para los procedimientos de eutanasia en invertebrados acuáticos (AVMA, 2020b).

Actualmente se ha puesto a prueba en diferentes especies de peces y crustáceos obteniendo resultados variables, por lo tanto, su eficacia no está relacionada con la taxonomía ni con el hábitat, inclusive dentro de un mismo grupo taxonómico la respuesta varía notablemente entre especies (Rotllant *et al.* 2023).

A pesar de que es uno de los anestésicos más utilizados mundialmente para los poiquiloterms no se han estudiado las aplicaciones prácticas, por lo que se presentan oportunidades de posibles investigaciones a futuro para analizar a profundidad cuestiones como su preparación, almacenamiento, uso como sedante, reducción del estrés y respuestas de estrés desencadenadas, toxicidad, márgenes de seguridad, tiempos de inducción, inmersión y recuperación en las distintas especies acuáticas, logrando de esta manera una comprensión adecuada y una utilización óptima tanto desde una perspectiva científica como práctica (Popovic *et al.* 2012).

2.10.6 Lidocaína

También conocida como lignocaína o xilocaína, (2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil) acetamida) (Lemke y Dawson, 2000; Ross y Ross, 2008c) es un aminoamida derivado del ácido acético (Bonet, 2011). Es un polvo cristalino, blanco, sin olor, insoluble en agua, pero muy soluble en etanol al 96% y en cloruro de metileno (Caicedo-Gutiérrez y Pérez-Agudelo, 2018; Velázquez *et al.* 2023).

Es razonablemente barata, fácil de obtener, segura para los humanos y considerablemente utilizada en la práctica médica veterinaria (Lemke y Dawson, 2000; Ross y Ross, 2008c). Actualmente aprobada por la FDA como analgésico no invasivo, con mínima absorción sistémica y excelente perfil de seguridad (Calderón, 2014). Tiene un inicio de acción intermedio de 10 a 15 minutos y una duración intermedia de 60 a 120 minutos (Bonet, 2011; Lemke y Dawson, 2000), pese a ello en camarones blancos adultos (*L. vannamei*) se ha reportado un inicio de acción de 3 min y una duración de 18 a 21 minutos (Guzmán-Sáenz *et al.* 2010).

Su mecanismo de acción es bloquear de forma reversible la generación y conducción del impulso nervioso al impedir la propagación de los potenciales de acción en las membranas neuronales mediante la inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje, reduciendo así la entrada de Na⁺ al espacio intracelular, lo que da lugar a la disminución de la sensibilidad, recuperando la función nerviosa al finalizar el efecto analgésico (Lemke y Dawson, 2000; Bonet, 2011). Aunque su función principal es impedir la conducción nerviosa, (Velázquez *et al.* 2023) no se limita exclusivamente a la parálisis sensitiva, también posee la capacidad de promover la parálisis motora (Caicedo-Gutiérrez y Pérez-Agudelo, 2018).

En organismos acuáticos la lidocaína ingresa a través de las branquias y actúa directamente sobre el SNC en lugar de actual localmente cuando se utiliza en baño de inmersión, sin embargo, se puede aplicar también vía infiltración para producir analgesia local e inmovilización (Chatigny *et al.* 2018; Gressler *et al.* 2021).

Se ha probado que es adecuado para crustáceos, pues se han realizado estudios con camarones y cangrejos con distintas concentraciones en baño de inmersión, vía tópica e inyección intratorácica obteniendo como resultado la analgesia e inmovilización en *L. vannamei* y *M. americanum* mediante baño de inmersión y vía tópica, descartando así el uso de la inyección intratorácica como forma adecuada de aplicación, y se demostró que las concentraciones más altas tienen un tiempo de inducción menor, es decir que la concentración influye en el tiempo para lograr la inmovilización y el efecto analgésico (Rotllant *et al.* 2023). No obstante, este método no se menciona en la última actualización de la guía con pautas para la eutanasia de la AVMA en ninguna de las categorías de la clasificación para los procedimientos de eutanasia en invertebrados acuáticos (AVMA, 2020b).

A pesar de que su uso se ha expandido en la práctica veterinaria y hay una baja incidencia de efectos indeseables, no está exento de ellos, pues pueden presentarse complicaciones respiratorias y circulatorias (Velázquez *et al.* 2023)

3. Justificación

El uso de modelos animales en la investigación ha contribuido a los avances científicos en muchos campos como lo es el estudio acuático (Brown *et al.* 2018; Blázquez *et al.* 2022). La OMSA reconoce el papel esencial del uso de animales vivos en la investigación y la educación ya que aportan una labor importante a la hora de buscar nuevos hallazgos (Vieira, 2017; OMSA, 2023c).

Las regulaciones, estándares y directivas de bienestar sostienen la incorporación del principio de las 3Rs como base general para que un experimento con animales sea éticamente aceptable (Vieira, 2017; Brown *et al.* 2018; Blázquez *et al.* 2022). Del mismo modo la OMSA enfatiza la importancia del uso de las 3Rs y la responsabilidad ética de garantizar el bienestar de los animales en la mayor medida posible (Brown *et al.* 2018; OMSA, 2023c).

El principio de las 3Rs tiene como objetivo reemplazar (no hacer uso de animales), reducir (el número de animales utilizados) y refinar (modificar cualquier condición de alojamiento, cría o cuidado con el fin de prevenir, aliviar o minimizar el posible dolor, distrés, malestar, angustia, sufrimiento, cambios fisiológicos o daños duraderos, mejorando y protegiendo el bienestar animal (Vieira, 2017; Blázquez *et al.* 2022; OMSA, 2023c).

Debido al amplio uso de invertebrados en la investigación, desarrollar cambios de manejo será beneficioso y proporcionará mejores condiciones de bienestar (Carere y Mather, 2019). Además de reducir variables indeseables en la investigación, ocasionadas por el dolor y el distrés en los animales que pudieran dificultar la interpretación de los resultados (Barrios *et al.* 2011). Por esta razón esta investigación está dirigida a establecer un plan de sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Establecer un plan de sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio utilizando sales de magnesio ($MgCl_2$) y agua fría (4°C y 18°C).

4.2 Objetivos particulares

- Establecer el tiempo con efecto de sedación, anestesia y eutanasia de $MgCl_2$ (agente sintético) en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) para manejo en laboratorio a través de indicadores conductuales y respuestas metabólicas.
- Establecer el tiempo con efecto de sedación, anestesia y eutanasia de agua fría (4°C y 18°C) en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) para manejo en laboratorio a través de indicadores conductuales y respuestas metabólicas.

5. Hipótesis

Si utilizamos un adecuado plan de sedación, anestesia y eutanasia, entonces, se reducirá el estrés generado en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) durante el manejo en laboratorio.

6. Materiales y métodos

6.1 Ubicación

El estudio se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizada en Puerto de Abrigo S/N, CP. 97356, Sisal, Yucatán, México. El área está situada a una latitud de 21.163981 norte y longitud de 90.047734 oeste, el clima es cálido subhúmedo con lluvias regulares en verano. Las precipitaciones son de 300 a 600 mm anuales y la temperatura media anual es de 25,6 °C (DIGAOHM).

6.2 Obtención de animales

Se utilizaron 150 camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, con un peso de 15 g \pm 2 g con un origen de la empresa LA MARCA, los cuales obtienen las larvas de AquaPacific S.A de C.V.

6.3 Mantenimiento de los animales y aclimatación

Los animales fueron distribuidos en un diseño completamente al azar para su aclimatación en lotes de 5 organismos por tina en 16 tinajas con capacidad de 100 litros y flujo continuo contando con un filtro de lecho profundo y aireación continua, salinidad de 35 ups y una temperatura promedio de 28°C. Las tinajas fueron cubiertas con malla plástica (luz de malla 5 mm) para evitar el escape de los animales. Fueron alimentados con una tasa de alimentación de 10% de su biomasa en 3 raciones al día, a las 8:00, 13:00 y 19:00 hrs. El alimento que se utilizó fue un producto comercial de engorda de la marca Pedregal Silver Cup.

Antes de comenzar las mediciones, todos los animales estuvieron en dichas condiciones durante 7 días. Posteriormente se dio inicio al experimento, el cual tuvo una duración de 30 días.

6.4 Tratamientos

Se utilizaron ocho tratamientos en total y el grupo control en el que no se utilizó ningún tratamiento. Para los grupos experimentales se utilizaron dos tratamientos diferentes, uno con sales de magnesio ($MgCl_2$) y otro con agua fría, cada uno en distintas concentraciones y temperaturas respectivamente, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones y temperaturas de los tratamientos utilizados.

Tratamientos	Concentraciones y temperaturas					
Sales de magnesio (MgCl ₂) (g/L)	2.5	5	10	25	50	100
Agua fría (°C)	18	4				
Control (°C)	28					

6.5 Preparación de los tratamientos

En cada una de las fases el procedimiento para la preparación de los tratamientos fue la siguiente:

Para las concentraciones de 2.5 g/L, 5 g/L y 10 g/L de sales de magnesio (MgCl₂) la preparación del acuario fue la siguiente: pesaje del reactivo, disolución en 200 ml de agua marina (con las mismas características que el agua de las tinajas de mantenimiento) a temperatura ambiente y 300 rpm durante 5 minutos, posteriormente disolución en el acuario mediante oxigenación durante 5 minutos.

Para las concentraciones de 25 g/L, 50 g/L y 100 g/L de sales de magnesio (MgCl₂) la metodología fue la siguiente: pesaje del reactivo, disolución en 1 litro de agua marina a temperatura ambiente, durante 30 segundos manualmente y a 300 rpm durante 10 minutos, posteriormente disolución en el acuario mediante oxigenación durante 5 minutos.

En el caso de las temperaturas para agua fría se colocó agua marina en un contenedor con bloques de hielo aislados hasta obtener la temperatura deseada, una vez obtenida se colocó en el acuario. Para el grupo control se colocó agua marina con las mismas condiciones que las tinajas de mantenimiento y no se realizó modificación alguna.

6.6 Fase conductual

En esta fase cada tratamiento (cada concentración y temperatura) tuvo 3 repeticiones. Cada repetición consistió en un animal colocado en un acuario con capacidad de 12 litros, utilizado al 50% de su capacidad con el tratamiento correspondiente en cada caso. Doce horas antes de comenzar las observaciones conductuales se suspendió la alimentación y en cada una de ellas se aclimato al animal durante 10 minutos a partir de su llegada al laboratorio.

Posterior a la aclimatación del animal se colocó al camarón en el acuario y se comenzó la observación de la conducta presentada realizando las anotaciones para cada minuto de acuerdo con el Cuadro 2. La exposición al tratamiento fue de 30 minutos, excepto en el caso de agua fría a 4°C donde se expusieron durante 30 segundos.

La observación y anotaciones correspondientes se llevaron a cabo por un solo observador, quien debido a la naturaleza del experimento no fue posible que estuviera ciego a los tratamientos, pues dichos tratamientos exhibían características específicas tales como turbidez y coloración del agua en el caso de los tratamientos con MgCl₂ y empañamiento del acuario en los tratamientos con agua fría.

Cuadro 2. Etapas anestésicas en crustáceos decápodos (Adaptado de De Souza, 2022).

ETAPAS	Valor asignado	Comportamiento
No anestesiado	1	Comportamiento normal, alerta, responsivo
ETAPA 1 (Sedación)	2	Pérdida parcial del equilibrio
	3	Movilidad reducida
	4	Sensible a estímulos visuales
ETAPA 2 (Anestesia inicial)	5	Pérdida de equilibrio
	6	Falta de retirada de extremidades
	7	Las antenas se retiran lentamente
	8	Respuesta débil a los estímulos táctiles
	9	Pérdida del comportamiento de defensa
ETAPA 3 (Anestesia quirúrgica)	10	Inconsciencia
	11	No responde a los estímulos táctiles y de presión
	12	Inmovilidad (Incluyendo extremidades y antenas)
ETAPA 4 (Depresión del SN)	13	Continua inmóvil y sin responder a estímulos táctiles y de presión
	14	Muerte

6.7 Fase bioquímica

Una vez terminada la fase conductual se seleccionaron los tratamientos que tuvieron menos indicadores visuales de estrés, así como mejor estado anestésico y se procedió a la fase bioquímica de los mismos. Los tratamientos seleccionados fueron 25 g/L, 100 g/L de sales de magnesio, 18°C y 4°C de agua fría, así como un grupo control. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones y cada repetición consistió en un animal en estadio C de muda del que se obtuvo la hemolinfa para ser analizada.

Antes del muestreo los camarones permanecieron en ayuno por 12 horas con el propósito de evitar la interferencia del alimento en los parámetros medidos. Una vez transcurrido el tiempo, el procedimiento fue similar a la fase conductual. En cada toma de muestra se aclimato al animal durante 10 minutos a partir de su llegada al laboratorio, luego se colocó en un acuario con capacidad de 12 litros, utilizado al 50% de su capacidad con el tratamiento correspondiente en cada caso. La exposición fue de 10 minutos, excepto en el caso de agua fría a 4°C donde se expusieron durante 30 segundos.

6.7.1 Extracción de hemolinfa

Para tomar la muestra los animales fueron suavemente extraídos del acuario y colocados en una toalla secante con el objetivo de eliminar el exceso de agua y evitar su contacto con la hemolinfa. Posteriormente se extrajeron 200 μ L de hemolinfa por camarón. La hemolinfa se extrajo por punción en el seno ventrolateral del abdomen, con una jeringa hipodérmica desechable de 1 ml con aguja de 25G x 16 mm, previamente enjuagada con una solución anticoagulante para camarón SIC – EDTA preparada de acuerdo con Montalvo *et al.* (2022).

6.7.2 Obtención de plasma

La hemolinfa extraída fue colocada en tubos Eppendorf de 1.5 ml previamente llenados con solución anticoagulante SIC – EDTA en proporción 1:2 (hemolinfa: anticoagulante), posteriormente se centrifugó a 10, 000 rpm a 4°C por 15 minutos en una centrifuga (Eppendorf AG 5F428), una vez terminado el proceso de centrifugación se retiró el sobrenadante (plasma + SIC – EDTA) eliminando así el paquete celular.

6.7.3 Análisis de metabolitos

Se analizaron los metabolitos glucosa, lactato y proteína. Para la evaluación de glucosa y lactato se utilizaron kits comerciales, en el caso de la glucosa se utilizó el kit GLUCOSE PAP SL, siguiendo las instrucciones del fabricante (ELITechGroup) y para lactato se utilizó el kit Lactate (Liquid), Reagent set, de la marca (POINTE SCIENTIFIC, INC), adaptando las mediciones de cada metabolito a las microplacas utilizadas. La evaluación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976) y albúmina bovina como estándar. La absorbancia fue registrada en un lector de microplacas (BIO – RAD Benchmark Plus) y la concentración de cada metabolito fue calculada usando una curva de calibración.

6.8 Eutanasia

La fase de eutanasia no se llevó a cabo, ya que una vez obtenidos los indicadores de la fase bioquímica se descartaron los métodos utilizados como posibles métodos de eutanasia debido a que no cumplen con el estado anestésico o bien generan estrés en los organismos, siendo de esta manera no viables para el proceso de eutanasia en esta especie.

Posterior a la toma de muestras, los animales involucrados en este estudio fueron utilizados en investigaciones adicionales, con propósitos distintos a los abordados en esta tesis. Dichas investigaciones fueron llevadas a cabo por otros equipos de investigación dentro de la misma institución. Estos procedimientos complementarios no intervinieron en los resultados obtenidos para el presente estudio.

6.9 Análisis estadístico

El diseño utilizado fue un completamente al azar (DCA). El análisis estadístico de los datos se realizó en el programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software), con el procedimiento GLM (Modelo Lineal Generalizado). Los resultados se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de los siguientes indicadores: conductuales y bioquímicos (glucosa, lactato y proteína) para determinar diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos.

La prueba de comparación de medias que se realizó fue Duncan.

7. Resultados

7.1 Respuestas conductuales

En el cuadro 3 se presentan los valores promedios obtenidos de las respuestas conductuales de los ocho tratamientos utilizados para lograr el estado de anestesia con base en el cuadro 2.

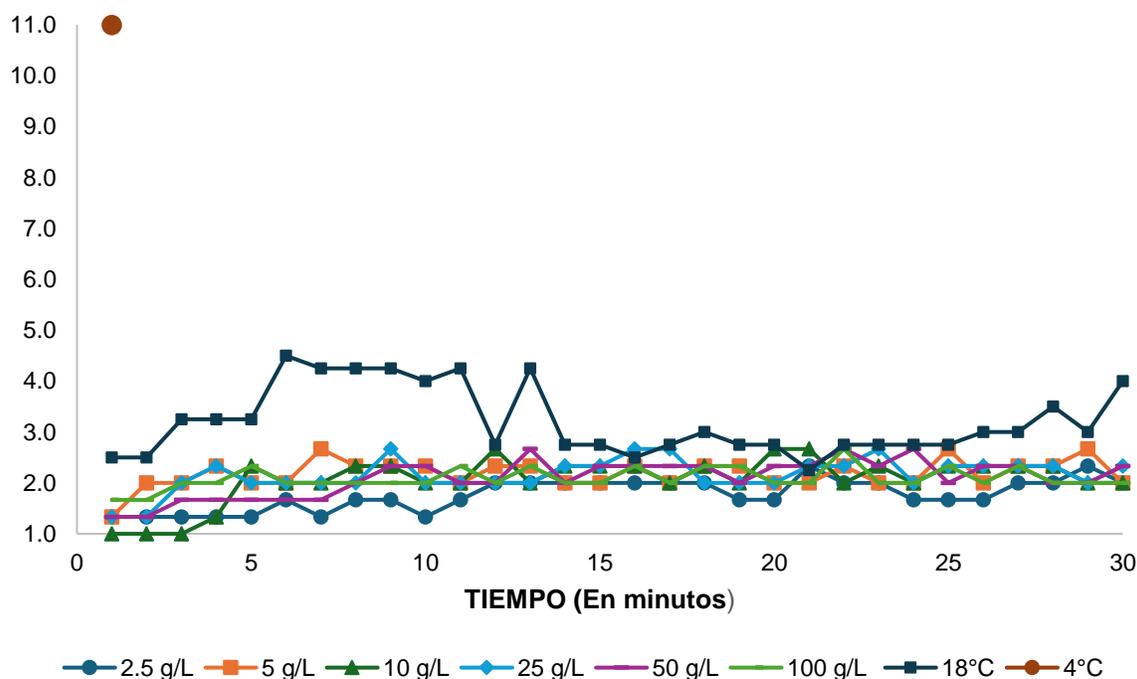
Cuadro 3. Diferencia estadística de ocho tratamientos para lograr anestesia en camarones blanco del pacífico expuestos durante 30 minutos.

TRATAMIENTOS	Sales de Magnesio (MgCl ₂) en g/L						Temperatura en °C	
	2.5	5	10	25	50	100	18°C	4°C
Promedio de respuesta conductual	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^b	11 ^{c*}

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, mientras que letras iguales indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa.

*Nota: En el caso de 4°C la exposición fue de 30 segundos.

COMPORTAMIENTO (Valor asignado)



Gráfica 1. Respuesta conductual de ocho tratamientos para lograr anestesia en camarones blanco del pacífico expuestos durante 30 minutos.

*Nota: En el caso de 4°C la exposición fue de 30 segundos.

7.2 Respuestas metabólicas

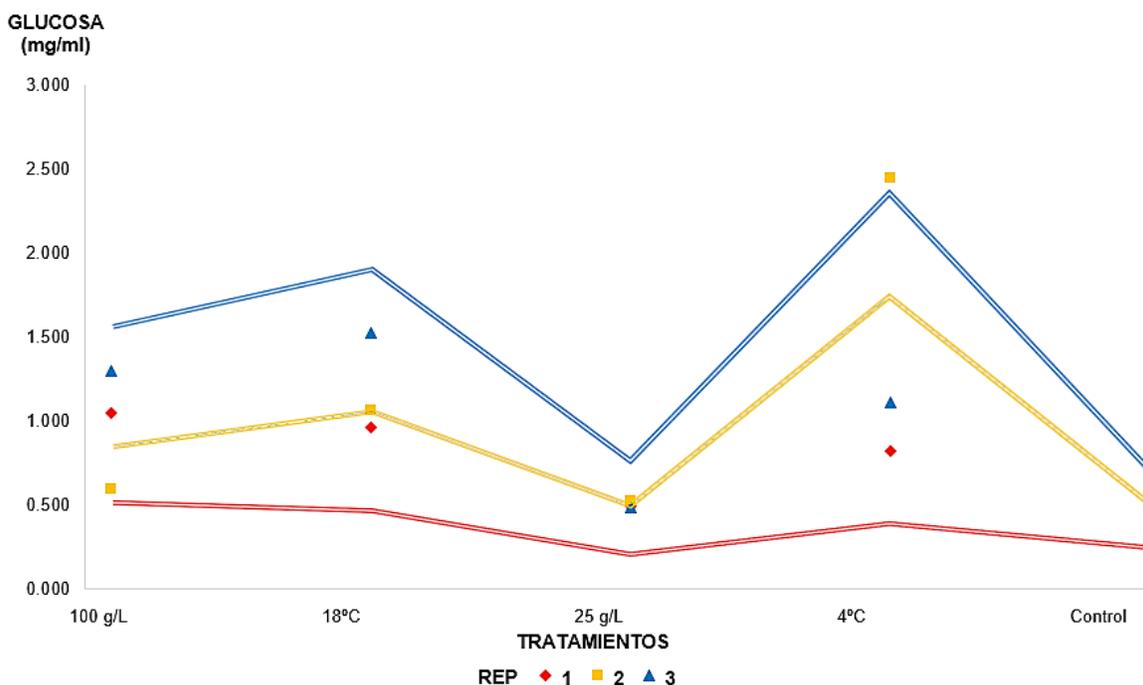
7.2.1 Glucosa

De los 5 grupos evaluados, el grupo control a 28°C y sales de magnesio a una concentración de 25 g/L mostraron una concentración menor de glucosa, mientras que el grupo expuesto a 4°C fue el que mayor concentración de glucosa mostró. No se mostró diferencia ($p > 0.05$) entre los grupos de 100 g/L de sales de magnesio y 18°C respecto a los demás.

Cuadro 4. Promedios de glucosa de cuatro tratamientos y un grupo control.

TRATAMIENTOS	Grupo control a 28°C	MgCl ₂ en g/L		Temperatura en °C	
		25	100	18°C	4°C
Glucosa en mg/ml	0.4670 ^b	0.4977 ^b	0.9803 ^{ab}	1.1847 ^{ab}	1.4607 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, mientras que letras iguales indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 2. Tendencia de la concentración de glucosa de cuatro tratamientos y un grupo control.

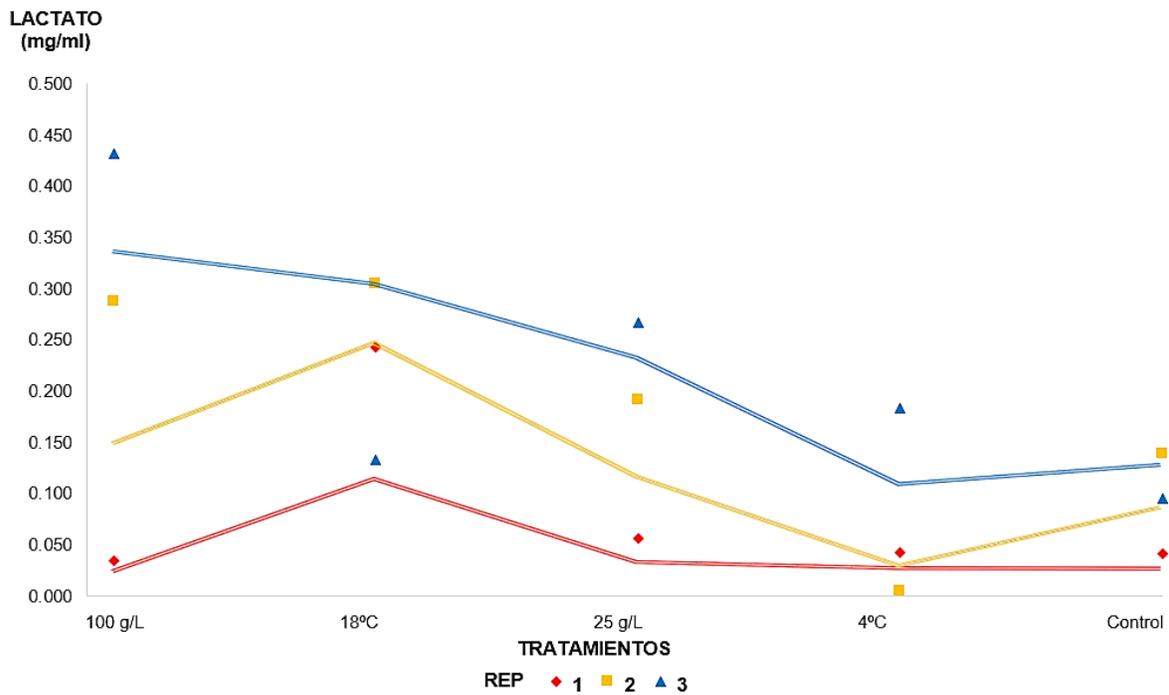
7.2.2 Lactato

En el caso de lactato no se mostró diferencia ($p > 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 5. Promedios de lactato de cuatro tratamientos y un grupo control.

TRATAMIENTOS	Grupo control a 28°C	MgCl ₂ en g/L		Temperatura en °C	
		25	100	18°C	4°C
Lactato en mg/ml	0.0913 ^a	0.1713 ^a	0.2510 ^a	0.2266 ^a	0.077 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, mientras que letras iguales indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 3. Tendencia de la concentración de lactato de cuatro tratamientos y un grupo control.

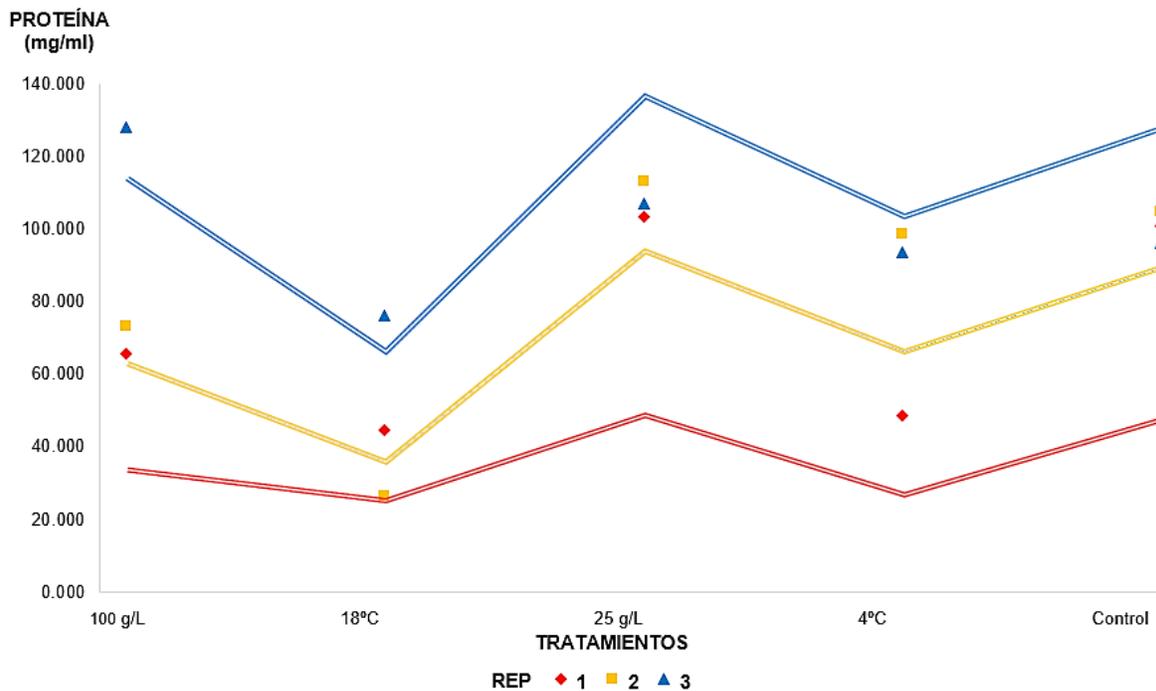
7.2.3 Proteína

El grupo expuesto a 18°C mostró menor concentración de proteína, mientras que el grupo control y los grupos expuestos a 25 g/L y 100 g/L de sales de magnesio mostraron una mayor concentración de proteína y una diferencia ($p < 0.05$) con respecto al grupo de 18°C. El grupo expuesto a 4°C no mostró diferencia ($p > 0.05$) con respecto a los demás grupos.

Cuadro 6. Promedios de proteína de cuatro tratamientos y un grupo control.

TRATAMIENTOS	Grupo control a 28°C	MgCl ₂ en g/L		Temperatura en °C	
		25	100	18°C	4°C
Proteína en mg/ml	100.64 ^a	107.92 ^a	88.97 ^a	49.05 ^b	80.20 ^{ab}

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, mientras que letras iguales indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 4. Tendencia de la concentración de proteína de cuatro tratamientos y un grupo control.

8. Discusión

Las concentraciones de sales de magnesio ($MgCl_2$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre ellas, puesto que ninguna logró inducir el estado de anestesia, esto coincide con lo reportado por McRae *et al.* (1999) quienes mencionaron una falta de eficacia similar en el cangrejo de río (*Cherax destructor*) y con Fregin y Bickmeyer (2016) quienes estudiaron la propagación de señales en el sistema nervioso de crustáceos sometidos a diferentes planes de anestesia, encontrando que la exposición a $MgCl_2$ no logró producir anestesia en ninguna de las especies estudiadas incluso después de una hora.

Por otro lado, de acuerdo a las respuestas conductuales, la hipotermia a $4^\circ C$ logró inducir la anestesia en los primeros 30 segundos de exposición, lo cual coincide con el estudio de McRae *et al.* (1999) quienes indujeron anestesia en el cangrejo de río *C. destructor* al exponerlo a baño de inmersión en agua fría a una temperatura de $0^\circ C$ y con el trabajo de Premarathna *et al.* (2016) quienes evaluaron la eficacia de diferentes métodos anestésicos en cangrejos adultos (*Portunus sanguinolentus*) encontrando que la hipotermia causó un estado anestésico en todos los cangrejos a los pocos segundos de ser expuestos a temperaturas de $0^\circ C$.

Sin embargo, no coincide con otros trabajos como el de Fregin y Bickmeyer (2016) quienes indicaron que con la hipotermia a $0^\circ C$ no se observó anestesia en términos de ausencia de respuesta a la estimulación mecánica y eléctrica después de 60 minutos de exposición pues únicamente se logró una reducción de las respuestas neuronales pero la transducción de señales aún era detectable después de 1 hora de hipotermia tanto en langostas juveniles y adultas como en cangrejos de río.

No obstante, Weineck *et al.* (2018) reportaron que la hipotermia entre $0^\circ C$ y $4^\circ C$ indujo la anestesia en cuestión de segundos en el cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) y el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) pero tardo más tiempo para el cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), también analizaron la respuesta neuronal y cardiaca encontrando que la respuesta neuronal se redujo más rápidamente en los camarones *L. vannamei* mientras que los cangrejos *C. sapidus* mantuvieron un circuito neuronal, así como reflejos del músculo cardíaco y esquelético durante el mismo tiempo en que los camarones y cangrejos de río *P. clarkii* no respondían, pues la capacidad de respuesta de los cangrejos de río y camarones a los estímulos sensoriales se detuvo después de unos pocos segundos de ser expuestos al frío cuando su frecuencia cardiaca había disminuido sustancialmente, por lo tanto la exposición al frío puede inmovilizar a los cangrejos *C. sapidus* pero los circuitos neuronales siguen funcionando, en cambio en los camarones y cangrejos de río las respuestas neuronales están ausentes utilizando el mismo procedimiento.

A pesar de que la hipotermia ha sido utilizada como un método anestésico en crustáceos, aún persisten lagunas de información en torno a su eficacia, ya que algunos autores mencionan haber logrado anestesia, por ejemplo: McRae *et al.* (1999) en el cangrejo de río *C. destructor*, Premarathna *et al.* (2016) en cangrejos adultos *Portunus sanguinolentus* y Weineck *et al.* (2018) en el cangrejo de río *Procambarus clarkii* y el camarón blanco (*L. vannamei*), mientras que otros autores sostienen que los efectos observados corresponden a una disminución de la tasa metabólica (Ross y Ross, 2008d), sin evidencias claras de pérdida total de la percepción sensorial (Fregin y Bickmeyer, 2016; Weineck *et al.* 2018) y atenuación de la respuesta de estrés (Zamora, 2012). Esta diferencia de resultados pone de manifiesto la necesidad de estudios adicionales que clarifiquen el mecanismo y los efectos específicos de la hipotermia en organismos acuáticos (Donaldson *et al.* 2008).

A su vez, otros autores han señalado la eficacia de distintos métodos anestésicos en crustáceos, por ejemplo, con agentes sintéticos, Perrot *et al.* (2021) probaron MS-222 en *Gammarus pulex* concluyendo que a 600 mg/L induce sedación y anestesia, sin efectos secundarios y con una tasa de supervivencia del 100% a los 6 días posteriores a la anestesia. Guzmán-Sáenz *et al.* (2010) pusieron a prueba en baño de inmersión halotano a dosis de 0.5 – 2.5 ml/L e hidrocloreuro de lidocaína a dosis de 400 – 800 mg/L, notificando su eficacia para la sedación y anestesia en *L. vannamei* con tiempos de inducción y recuperación variables dependiendo de la dosis utilizada.

Asimismo, se ha informado la eficacia de aceites esenciales: De Souza *et al.* (2023) utilizaron aceite esencial de albahaca *Ocimum gratissimum* con etanol como vehículo para *Macrobrachium rosenbergii*, teniendo como resultado la sedación en 2 – 2.5 min, anestesia en 3.5 – 4 min, recuperación completa en 16 min y tasas de supervivencia del 100% con una concentración de 400 µL/L. Becker *et al.* (2021) sugirieron las concentraciones de 750 µL/L de *Lippia alba* y 100 µL/L de *Ocimum gratissimum* para el camarón rosado *Farfantepenaeus paulensis*, mientras que para el camarón blanco *L. vannamei* recomendaron las concentraciones de 150, 300 y 500 µL/L de *Cymbopogon citratus* y 200 µL/L de *Origanum majorana* para su uso en procedimientos que requieran un tiempo prolongado de anestesia y evitar el estrés durante la manipulación. Li *et al.* (2018a) demostraron que el mentol a concentraciones de 300 – 500 mg/L es eficaz, rápido y seguro como anestésico en *Palaemonetes sinensis* para todas las tallas de camarón en temperaturas inferiores a 12°C, no así en temperaturas superiores a 24°C donde se ha observado una elevada mortalidad. Parodi *et al.* (2012) indicaron la eficacia de *A. triphylla* y *L. alba* para la anestesia de *L. vannamei* en concentraciones de 300 y 750 µL/L para subadultos y 300 y 500 µL/L para postlarvas, respectivamente, sin observar mortalidad con ningún anestésico en ninguna de las concentraciones.

De igual forma, se ha corroborado la utilización de Eugenol en diferentes especies: Soltani *et al.* (2004) evaluaron su uso en *Penaeus semisulcatus* y expusieron que es un anestésico eficaz en un intervalo entre 100 y 150 mg/L. Coyle *et al.* (2005) informaron que el producto comercial Aqui-S® y el Eugenol aplicados a 100 mg/L son tratamientos anestésicos adecuados para el langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Parodi *et al.* (2012) comprobaron que las concentraciones de eugenol a 200 µL/L para subadultos y 175 µL/L para postlarvas son eficaces para la anestesia de estas etapas de *L. vannamei* y no se observó mortalidad. Li *et al.* (2018b) encontraron que la dosis segura de Eugenol que produjo una anestesia adecuada y aseguró una supervivencia mayor al 80% después de 5 días de recuperación en el camarón chino *Palaemonetes sinensis* fue de 200 µL/L. Saydmohammed y Pal (2009) experimentaron con una combinación de eugenol y mentol en adultos de *M. rosenbergii* y verificaron que la formulación anestésica combinada es segura para anestésiar y mitigar el estrés de la manipulación, sugiriendo dosis de 200 – 400 µL/L para lograr anestesia en menos de 30 minutos, una recuperación promedio de 21 minutos y eliminación completa de los residuos anestésicos en tejidos en 24 horas.

Pese a lo expuesto por diversos autores sobre el uso de anestésicos en crustáceos, también sugieren realizar más investigaciones (Donaldson *et al.* 2008; Reid *et al.* 2022) así como estudios preliminares antes de aplicar estos métodos en nuevas especies, con el fin de evaluar su eficacia y seguridad. Es importante que estos estudios consideren factores como otras condiciones ambientales, salinidad, temperatura, pH, oxigenación, etapas de desarrollo de las especies y los procesos a realizar, ya que dichos factores podrían influir en los resultados obtenidos y el bienestar de los organismos (Parodi *et al.* 2012; Li *et al.* 2018a; Li *et al.* 2018b).

En cuanto a las respuestas metabólicas, la cantidad de glucosa obtenida en la hemolinfa fue mayor en todos los tratamientos con respecto al grupo control, teniendo el mayor incremento con los tratamientos de hipotermia a 18°C y 4°C, similar a lo mencionado por Zamora (2012) quien obtuvo niveles de glucosa en hemolinfa 24% mayores en los camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a hipotermia con respecto a los que no fueron expuestos a hipotermia y coincide también con Kuo y Yang (1999) quienes observaron elevaciones marcadas de glucosa en hemolinfa en langostinos *Macrobrachium rosenbergii*, cuando se expusieron a temperaturas más bajas cercanas a su límite letal con respecto a los controles a 28°C, considerando por tanto la hiperglucemia como una respuesta de estrés en crustáceos, tal como menciona Fanjul (2006).

El lactato obtenido en la hemolinfa fue menor con respecto al grupo control en el tratamiento de hipotermia a 4°C, pero mayor en los demás tratamientos con respecto al grupo control, a pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, incluido el grupo control, esto mismo fue observado por Carreño (2009) que reporto no haber encontrado ninguna variación significativa en la concentración de lactato en hemolinfa en camarones *L. vannamei* sometidos a pruebas de estrés térmico a 32°C y 35°C con respecto al grupo control a 28°C, sugiriendo que la falta de variación en los niveles de lactato en pruebas de estrés térmico se debe a que el metabolismo anaerobio no logra ser activado y por tanto, el lactato es un indicador menos sensible a estrés agudo por cambios en la temperatura. Lo mismo que Racotta y Palacios (1998) quienes encontraron que los niveles de lactato en *L. vannamei* no presentan un incremento significativo como respuesta de estrés por muestreo repetitivo y sugirieron que los valores de glucosa son un indicador de estrés más sensible que los valores de lactato.

La cantidad de proteína en la hemolinfa fue similar entre los tratamientos, pero teniendo una disminución del 51% en el tratamiento de hipotermia a 18°C y una disminución del 20% en el tratamiento de hipotermia a 4°C con respecto al grupo control, esto coincide con otros trabajos, como el de Carreño (2009) quien indico que hubo una disminución significativa en los niveles de proteínas totales en hemolinfa como respuesta al estrés frente a la hipertermia a 32°C y 35°C en camarones *L. vannamei* respecto a su grupo control, estos resultados señalan que la respuesta frente al estrés térmico es suficiente para aumentar el consumo de proteínas utilizándolas como una fuente alternativa que permita satisfacer la demanda energética del animal y proponen que los niveles de proteínas totales pueden representar indicadores sensibles de respuesta al estrés o con Chen *et al.* (1994) quienes documentaron que los niveles de proteína en hemolinfa disminuyeron en *Penaeus monodon* expuestos a condiciones de estrés por baja salinidad y altos niveles de amonio, lo que concuerda con el trabajo de Mercier *et al.* (2006) quienes encontraron concentraciones de proteínas totales en hemolinfa significativamente menores en *L. vannamei* expuestos a un estrés constante inducido por la manipulación diaria durante 4 semanas.

También coincide con Pascual *et al.* (2003) y Sánchez *et al.* (2001) quienes expusieron a *Litopenaeus setiferus* a diferentes temperaturas para examinar el efecto del estrés en la respuesta fisiológica, utilizando variables metabólicas como indicadores del estrés y obteniendo una reducción en los valores de proteínas en hemolinfa en comparación con los camarones de referencia en cada caso.

Los resultados obtenidos se correlacionan directamente con el metabolismo de los camarones peneidos ya que el estrés ocasiona cambios metabólicos con el objetivo de producir la energía necesaria para mantener su homeostasis (Ulaje, 2020). Recapitulando, en este estudio se obtuvo lo siguiente: una cantidad de glucosa mayor en todos los tratamientos con respecto al control, teniendo las mayores elevaciones en los grupos a 18°C y 4°C, un incremento en los niveles de lactato en todos los tratamientos con respecto al grupo control, a excepción del grupo expuesto a 4°C donde la cantidad de lactato fue menor y una disminución de proteína en todos los tratamientos con respecto al control, excepto en el grupo expuesto a 25 g/L de MgCl₂, teniendo las mayores disminuciones en los grupos a 18°C y 4°C.

Lo anterior se atribuye a que en organismos ectotermos la temperatura es un factor que modifica los procesos metabólicos, causando respuestas fisiológicas con necesidades energéticas distintas (Logan y Somero, 2010; Schulte, 2015). Al haber temperaturas más bajas se incrementa la capacidad de transporte de oxígeno del agua y disminuyen el consumo de oxígeno y la tasa metabólica de los organismos acuáticos (Ross y Ross, 2008d). La importancia del oxígeno radica en que regula los ciclos metabólicos (Breitburg *et al.* 2018) y a nivel fisiológico interviene en la demanda de energía, alterando principalmente las tasas de respiración (Ulaje, 2015).

Esta disminución en el consumo de oxígeno provoca que los organismos regulen su balance energético a través de modificaciones en el metabolismo de proteínas y carbohidratos (Ulaje, 2015) para obtener energía a partir de moléculas energéticas diferentes (Logan y Somero, 2010).

En camarones peneidos se han utilizado los cambios observados en proteínas y carbohidratos para evaluar el efecto del estrés (Ulaje, 2020). Con la disminución del consumo de oxígeno por estrés o descenso de la temperatura, el metabolismo aeróbico no puede tolerar la demanda de energía y se activa el metabolismo anaeróbico compensatorio (Pörtner, 2010). Así, aunque el uso de carbohidratos en camarones es limitado, debido a que carecen de sitios de almacenamiento y capacidad enzimática para su procesamiento, durante situaciones de estrés estos organismos recurren a ellos para generar energía (Rosas *et al.* 2000; Racotta *et al.* 2002), metabolizando la glucosa a lactato, aumentando la cantidad de ambos metabolitos en la hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998; Ulaje, 2015).

Por otra parte, las proteínas son la fuente primaria de energía para crustáceos, si bien funcionan como moléculas estructurales y catalizadores biológicos, los camarones peneidos están adaptados para utilizarlas como su principal fuente de energía (Rosas *et al.* 2000), de ahí que haya una reducción de los niveles de proteínas totales en hemolinfa asociada a la utilización de las mismas como un mecanismo de compensación frente al estrés (Pascual *et al.* 2003; Ulaje, 2015).

Estos resultados indican que los métodos utilizados como anestésicos generan estrés en juveniles de camarón blanco, por lo que no garantizan el bienestar animal y, por ende, pueden dificultar la interpretación de los resultados en distintas practicas experimentales (Barrios *et al.* 2011; Utne – Palm y Smith, 2020).

9. Conclusiones

El uso de sales de magnesio ($MgCl_2$) se descarta como método para la sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio ya que no logra sedar ni anestesiarse, aún en altas concentraciones, teniendo por tanto un costo elevado y al mismo tiempo, las cantidades utilizadas son impracticables. Dicha falta de eficacia de $MgCl_2$ se atribuye a la capacidad de osmorregulación que tiene esta especie.

La hipotermia a $18^\circ C$ y $4^\circ C$ se descartan como métodos para la sedación, anestesia y eutanasia en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) para manejo en laboratorio debido a que las respuestas metabólicas de estrés no garantizan el bienestar animal y, por tanto, no garantizan que no alteren ni enmascaren los resultados en distintas prácticas experimentales. Estas respuestas metabólicas de estrés están directamente relacionadas con la disminución del consumo de oxígeno, lo que genera un cambio en el metabolismo del organismo.

Diversos autores han reportado el uso eficaz de agentes sintéticos y naturales para la sedación y anestesia de diferentes crustáceos, así como la falta de profundización de dichos agentes en otras especies, considerando factores que puedan afectar los resultados obtenidos y el bienestar de los organismos como salinidad, temperatura, pH, oxigenación, condiciones ambientales, etapas de desarrollo y los procedimientos a realizar.

Las reacciones metabólicas como respuesta al agente estresor en crustáceos tienen la finalidad de producir la energía necesaria para reestablecer la homeostasis del organismo, dentro de estas respuestas de estrés en crustáceos se encuentran las variaciones en las concentraciones de glucosa, lactato y proteína en hemolinfa, que han sido evaluadas con el objetivo de monitorear el efecto de estrés en los camarones frente a diversos estímulos.

Los estudios existentes acerca de sedación, anestesia y eutanasia en camarones han sido realizados en su mayoría enfocados hacia la producción y hacia los camarones destinados a consumo humano. Sin embargo, hacen falta más estudios con los objetivos de evaluar métodos para la sedación, anestesia y eutanasia en el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) en sus distintas etapas para manejo en laboratorio y conocer las respuestas metabólicas que tienen dichos métodos frente a distintas prácticas experimentales pudiendo de esta forma causar el menor estrés posible al animal garantizando el bienestar animal y la calidad de los resultados de las investigaciones.

10. Recomendaciones

De acuerdo con lo encontrado en este estudio y en concordancia con lo mencionado por otros autores, sobre diversos aspectos, como: la escasez de información sobre la eficacia y los posibles efectos secundarios de los métodos anestésicos en organismos acuáticos (Chatigny *et al.* 2018), la falta de estandarización metodológica, el uso de condiciones experimentales específicas, el reducido número de especies acuáticas que se han utilizado en experimentos sobre sedación, anestesia y eutanasia (Cooke *et al.* 2004; Sung *et al.* 2018; Aydin y Barbas, 2020), la variabilidad de resultados que se han obtenido inclusive dentro de un mismo grupo taxonómico (Rotllant *et al.* 2023), así como la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan aclarar los mecanismos subyacentes de los métodos anestésicos (Donaldson *et al.* 2008; Reid *et al.* 2022) y profundizar en indicadores más precisos de bienestar como hormonas involucradas y las tasas de respiración (Ulaje, 2015; Utne – Palm y Smith, 2020). Se hacen las siguientes recomendaciones:

Ampliar la investigación utilizando una mayor cantidad de animales, diferentes especies de camarón o condiciones diferentes que permitan corroborar lo encontrado en el presente trabajo.

Complementar el estudio con otros análisis de laboratorio como la respirometría para conocer el metabolismo aeróbico y la bioenergética del animal al ser expuesto a estos tratamientos.

Por último, se recomienda extender la investigación evaluando otros indicadores como la hormona CHH y hormonas relacionadas para establecer si existe alguna relación entre dichos indicadores y la exposición a estos tratamientos.

11. Referencias bibliográficas

1. Abbo, L., Himebaugh, N., DeMelo, L., Hanlon, R. y Crook, R. (2021). Anesthetic Efficacy of Magnesium Chloride and Ethyl Alcohol in Temperate Octopus and Cuttlefish Species. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Vol 60. Núm 5. pp 556 – 567.
2. Aguilar, V. (2009). EFECTO DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRÉS POR ALTA DENSIDAD, LA PRODUCCIÓN DE PGE₂ Y LA RESPUESTA INMUNE DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
3. Albines, K. (2019). EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSTLARVAL DE CAMARÓN *Macrobrachium rosenbergii* (de Man 1989) PRODUCIDO EN ECLOSERÍAS COMERCIALES MEDIANTE PRUEBAS DE ESTRÉS. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina.
4. Aller, M., Rodríguez, J. y Rodríguez, G. (2000). Normas éticas para el cuidado y utilización de los animales de experimentación. *Cirugía Española*. Vol 67. Núm 1.
5. Aluyor, E. y Oboh, I. (2014). PRESERVATIVES | Traditional Preservatives – Vegetable Oils. En Batt, C. y Tortorello, M. (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. (pp 137 – 140). 2ª ed. Academic Press.
6. Arafa, S., Sadok, S. y Abed, A. (2007). Assessment of magnesium chloride as an anaesthetic for adult sea urchins (*Paracentrotus lividus*): incidence on mortality and spawning. *Aquaculture Research*. Vol 38. Núm 15. pp 1673 – 1678.
7. Arzola, J., Flores, L., Izabal, A. y Gutiérrez, Y. (2008). Crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un estanque rústico a baja salinidad. *AquaTIC*. Núm 28. pp 8 – 15.
8. Auró, A. y Ocampo, L. (1999). Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*. Vol 30. Núm 4. pp 337 – 344.
9. AVMA. (2013). Part III—Methods of Euthanasia by Species and Environment. En: AVMA. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. (pp 43 – 84). AVMA.
10. AVMA. (2020a). Parte I. Introduction and General Comments. En: AVMA. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. (pp 4 – 21). AVMA.
11. AVMA. (2020b). Part III—Methods of Euthanasia by Species and Environment. En: AVMA. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. (pp 56 – 121). AVMA.

12. Ayala, E. (2014). EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HARINA DE LANGOSTILLA (*Pleuroncodes planipes*) EN EL ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA EN EL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
13. Ayala Soldado, N. (2014). ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE LOS ANESTÉSICOS METANOSULFONATO DE TRICAÍNA (MS-222) Y EUGENOL, PARA SU USO EN EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO EXPERIMENTAL. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba.
14. Aydin, B. y Barbas, L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*. Vol 520.
15. Azizan, A., Alfaro, A., Young, T. y Venter, L. (2021). Beyond relaxed: magnesium chloride anaesthesia alters the circulatory metabolome of a marine mollusc (*Perna canaliculus*). *Metabolomics*. Vol 17. Núm 3.
16. Barrios, E., Espinoza, M., Leal, U., Ruiz, N., Pinto, V. y Jurado, B. (2011). Bioética y el empleo de animales de experimentación en investigación. *Salus*. Vol 15. No 2. pp 28 – 34.
17. Becker, A., Vaz, L., De Oliveira, L., Wasielesky, W., Heinzmann, B. y Baldisserotto, B. (2021). Anesthetic potential of different essential oils for two shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Crustacea). *Ciência Rural*. Vol 51. Núm 12.
18. Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*. Vol 1. Núm 1.
19. Blasco, A. (2011). ÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL. Ediciones Akal. Madrid, España.
20. Blázquez, M., Rotllant, G. y Villanueva, R. (2022). Capítulo 3.6. Bienestar animal en ciencias marinas. En: Pelegrí, J., Gili, J. y Martínez, M. (eds) El océano que queremos: ciencia oceánica inclusiva y transformadora. (pp. 108 – 110). Instituto de Ciencias del Mar, CSIC. Barcelona, España.
21. Bonet, R. (2011). Anestésicos locales. *Offarm*. Vol 30. Núm 5. pp 42 – 47.
22. Boonstra, R. (2013). Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*. Vol 27. Núm 1. pp 11 – 23.
23. Bovenkerk, B. y Meijboom, F. (2020). Ethics and the Welfare of Fish. En: Kristiansen, T., Fernö, A., Pavlidis, M. y Van de Vis, H. (eds) The Welfare of Fish. *Animal Welfare*. (pp 19 – 42) Vol 20. Springer.
24. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol 72. Núm 1 – 2. pp 248 – 254.
25. Bradley, T. (2008). Capítulo 5. Osmoconformers. En Bradley, T. *Animal Osmoregulation*. (pp 59 – 71). Oxford University Press.

26. Breitburg, D., Levin, L., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F., Conley, D., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G., Limburg, K., Montes, I., Naqvi, S., Pitcher, G., Rabalais, N., Roman, M., Rose, K., Seibel, B., Telszewski, M., Yasuhara, M. y Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal Waters. *Science*. Vol 359. Núm 6371.
27. Brown, M., Symonowicz, C., Medina, L., Bratcher, N., Buckmaster, C., Klein, H., Anderson, L. (2018). Capítulo 2. Culture of Care: Organizational Responsibilities. En: Weichbrod, R., Thompson, G. y Norton, J. (eds) *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing*. (pp 11 – 25). 2ª ed. CRC Press.
28. Butler – Struben, H., Brophy, S., Johnson, N. y Crook, R. (2018). In Vivo Recording of Neural and Behavioral Correlates of Anesthesia Induction, Reversal, and Euthanasia in Cephalopod Molluscs. *Frontiers in Physiology*. Vol 9. Núm 109.
29. Butt, D., O'Connor, S., Kuchel, R., O'Connor, W. y Raftos, D. (2008). Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). Vol 275. Núm 1 – 4. pp 342 – 346.
30. Caicedo-Gutiérrez, L. y Pérez-Agudelo, J. (2018). La lidocaína en terapéutica veterinaria: posibles nuevos usos desde la perspectiva farmacocinética y farmacodinámica. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*. Vol 12. Núm 2. pp 82 – 90.
31. Calderón, E. (2014). Capítulo LIV. Lidocaína. En: Torres, L., Neira, F., Ortega, J. y Echeverría, M (eds). *ACTUALIZACIONES DE ANESTESIOLOGÍA, REANIMACIÓN Y TRATAMIENTO DEL DOLOR*. (pp 280 – 283). Asociación Andaluza Extremeña de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor. Cádiz. España.
32. Cañete, R. (2016). Animales utilizados en experimentación, necesidad de su protección. *Revista Médica Electrónica*. Vol 38. Núm 4. pp 612 – 616.
33. Carbone, L. y Austin, J. (2016). Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *Plos One*. Vol 11. Núm 5.
34. Cardozo, C. y Osorio, A. (2008). Ética en investigación con animales: Una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. *Revista Latinoamericana de Bioética*. Vol 8. Núm 2. pp 46 – 71.
35. Carere, C. y Mather, J. (2019). Why Invertebrate Welfare? En Carere, C., Mather, J. (eds) *The Welfare of Invertebrate Animals*. *Animal Welfare*. (pp 1 – 5). Vol 18. Springer.
36. Carreño, A. (2009). Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

37. Carter, K., Woodley, C. y Brown, R. (2011). A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol 21. pp 51 – 59.
38. Casas, R., Dettmer, J., Celis, L. y Hernández, C. (2007). Redes y flujos de conocimiento en la acuicultura mexicana. *Redes*. Vol 13. Núm 26. pp 111 – 144.
39. Chacón, J., Carvajal, M., Pauletto, S. y Herrera, A. (2019). Concentración y tiempo máximo de exposición de juveniles de pargo manchado *Lutjanus guttatus* al eugenol *Syzygium aromaticum*. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*. Vol 11. Núm 1. pp 9 – 25.
40. Chatigny, F., Creighton, C., Stevens, E. (2018). Intramuscular infiltration of a local anesthetic, lidocaine, does not result in adverse behavioural side effects in rainbow trout. *Scientific Reports*. Vol 8. Núm 1.
41. Chen, J., Chen, C. y Cheng, S. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Marine Ecology Progress Series*. Vol 110. Núm 1. pp 85 – 94.
42. Chong, J. (2015). ONTOGENIA DE LA CAPACIDAD OSMORREGULADORA DEL CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Baja California.
43. Cobo, R. y Pérez, L. (2018). Aspectos generales del cultivo y la genética del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*. Vol 35. Núm 1. pp 18 – 23.
44. CONAPESCA. (2024). Se posiciona México como el segundo mejor productor de camarón en Latinoamérica. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.
45. Cooke, S., Suski, C., Ostrand, K., Tufts, B. y Wahl, D. (2004). Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*. Vol 239. Núm 1 – 4. pp 509 – 529.
46. Cooper, J. (2011). Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of Invertebrates. *ILAR Journal*. Vol 52. Núm 2. pp 196 – 204.
47. Córdova, A., Ruiz, C., Saltijeral, J., Xolalpa, V., Cortés, S., Méndez, M., Huerta, R., Córdova, M., Córdova, C. y Guerra, E. (2009). Importancia del bienestar animal en las unidades de producción animal en México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol 10. Núm 12.

48. Cortes-Torres, A., López-Castillo, G., Marín-Torres, J., Portillo-Reyes, R., Luna, F., Baca, B., Sandoval-Ramírez, J. y Carrasco-Carballo, A. (2023). *Cymbopogon citratus* Essential Oil: Extraction, GC–MS, Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity, and In Silico Molecular Docking for Protein Targets Related to CNS. *Current Issues in Molecular Biology*. Vol 45. Núm 6. pp 5164 – 5179.
49. Coyle, S., Dasgupta, S., Tidwell, J., Beavers, T., Bright, L. y Yasharian, D. (2005). Comparative Efficacy of Anesthetics for the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol 36. Núm 3. pp 282 – 290.
50. Crabbe, J. (2016). Reproducibility of Experiments with Laboratory Animals: What Should We Do Now? *Alcoholism Clinical And Experimental Research*. Vol 40. Núm 11. pp 2305 – 2308.
51. De Girolamo, P. y D'Angelo, L. (2022). Fish as model systems. En D'Angelo, L. y De Girolamo, P. (eds) *Laboratory Fish in Biomedical Research. Biology, Husbandry and Reserach Applications for zebrafish, medaka, killifish, cavefish, stickleback, goldfish and Danionella translucida* (pp XIX – XXIV). Academic Press.
52. De Souza, C. (2022). Anaesthesia of decapod crustaceans. *Veterinary and Animal Science*. Vol 16.
53. De Souza, C., Dos Santos, G., Becker, A., Heinzmann, B., Caron, B., Baldisserotto, B. y Ballester, E. (2023). Anaesthetic effect of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) essential oil on the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, De Man 1879) exposed to different water pHs. *Aquaculture International*. Vol 32. Núm 2. pp 1493 – 1505.
54. Del Campo, M. (2006). Bienestar animal. ¿un tema de moda? *Revista INIA*. Núm 9.
55. Di Cosmo, A., Maselli, V., Cirillo, E., Norcia, M., De Zoysa, H., Polese, G. y Winlow, W. (2023). The Use of Isoflurane and Adjunctive Magnesium Chloride Provides Fast, Effective Anaesthetization of *Octopus vulgaris*. *Animals*. Vol 13. Núm 22.
56. Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. y Re, A. (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. Vol 34. Núm 2. pp 93 – 104.
57. DIGAOHM. Dirección General Adjunta de Oceanografía, Hidrografía y Meteorología. EL SISAL, YUCATÁN. Fecha de consulta: 16-02-24 <https://digaohm.semarn.gob.mx/cuestionarios/cnarioSisal.pdf>
58. DOF. (2001). NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ciudad de México. DOF.

59. DOF. (2007). LEY GENERAL DE PESCA Y ACUACULTURA SUSTENTABLES. Ciudad de México. DOF.
60. DOF. (2015). NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Ciudad de México. DOF.
61. Donaldson, M., Cooke, S., Patterson, D. y Macdonald, J. (2008). Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology*. Vol 73. Núm 7. pp 1491 – 1530.
62. Dos Santos, N. (2018). EFEITOS DO ANESTÉSICO TRICAÍNA METANOSULFONATO SOBRE O ESTRESSE E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*). Tesina de grado. Universidad Federal de Rio Grande do Sul.
63. EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to the aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. *EFSA Journal*. Vol 3. Núm 12.
64. Einarsson, A. y Dís Óladóttir, A. (2021). Capítulo 2. Fishing and fish farming. En Einarsson, A. y Dís Óladóttir, A. *Fisheries and Aquaculture. The food Security of the Future* (pp 21 – 50). Academic Press.
65. Elwood, R., Barr, S. y Patterson, L. (2009). Pain and stress in crustaceans? *Applied Animal Behaviour Science*. Vol 118. Núm 3 – 4. pp 128 – 136.
66. Espinós, F. (2011). Capítulo 1. Introducción: Necesidad de la diversificación para realizar una acuicultura sostenible. En: Schmitd, G. y Espinós, F. *Diversificación en acuicultura: Una herramienta para la sostenibilidad*. (pp 9 – 14). Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Madrid, España.
67. Espinosa, R. y Rosado, A. (2021). Los aceites esenciales herbales como anestésicos en peces cebras (*Danio rerio*). *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*. Vol 21. Núm 41. pp 113 – 130.
68. Ewart, S. (2020). Capítulo 53. Thermoregulation. En Klein, B. (eds). *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*. (pp 596 – 607). 6ª ed. Elsevier.
69. Fanjul, M. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. Vol 142. Núm 3 – 4. pp 390 – 400.
70. FAO. (2009). *Penaeus vannamei*. Cultured aquatic species fact sheets. Roma, FAO.
71. FAO. (2022). EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO.
72. FAO. (2024). Pesca y acuicultura. Vista general del sector acuático nacional. México. Roma, FAO.
73. Fawcett, W., Haxby, E. y Male, D. (1999). Magnesium: physiology and pharmacology. *British Journal of Anaesthesia*. Vol 83. Núm 2. pp 302 – 320.

74. Flecknell, P. (2016). Glossary. En: Flecknell, P. Laboratory Animal Anaesthesia. 4ª ed. (pp XVII – XVIII). Academic Press.
75. Fossat, P., Bacqué – Cazenave, J., De Deurwaerdère, P., Cattaert, D. y Delbecq, J. (2015). Serotonin, but not dopamine, controls the stress response and anxiety-like behavior in the crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of Experimental Biology. Vol 218. Núm 17. pp 2745 – 2752.
76. Fregin, T. y Bickmeyer, U. (2016). Electrophysiological Investigation of Different Methods of Anesthesia in Lobster and Crayfish. PLOS ONE. Vol 11. Núm 9.
77. Gaxiola, G., Brito, A., Maldonado, C., Jiménez, L., Guzmán, E., Arena, L., Brito, R., Soto, L. y Cuzón, G. (2006). Nutrición y domesticación de *Litopenaeus vannamei*. En Cruz, E., Ricque, D., Tapia, M., Nieto, M., Villareal, D., Puello, A. y García, A. (eds) Avances en Nutrición Acuícola VIII (pp 139 – 162). VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
78. Giménez, M. y Jiménez, I. (2019). La Directiva 2010/63/UE y los cefalópodos. A propósito del Real Decreto 1386/2018. Derecho Animal. Forum of Animal Law Studies. Vol 10. Núm 3. pp 97 – 103.
79. Giridharan, N. (2021). Capítulo 1. Laboratory Animals in India: Past, Present, and Future. En Nagarajan, P., Gudde, R. y Srinivasan, R. (eds) Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices (pp 3 – 22). Springer.
80. González, R. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Revista Cubana de Estomatología. Vol 39. Núm 2. pp 139 – 156.
81. Gressler, L., Heinzmann, B. y Baldisserotto, B. (2021). Capítulo 8. Analgesia, anesthesia, and euthanasia of aquatic animals. En Kibenge, F., Baldisserotto, B. y Sie – Maen, R. (eds) Aquaculture Pharmacology. (pp 297 – 346). Academic Press.
82. Gucic, M. (2008). DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* DE ALIMENTOS COMERCIALES Y EXPERIMENTALES PARA CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) CULTIVADO A DIFERENTES SALINIDADES. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
83. Guzmán-Sáenz, F., González-Alanis, P., Sanchez, J., Gutierrez, G., Aguirre, G., Perez, R. (2010). Uso de diferentes fármacos para anestésiar camarones *Litopenaeus vannamei* Boone en prácticas de acuicultura. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. Vol 11. Núm 3. pp 1 – 9.
84. Hacke, A., Miyoshi, E., Marques, J. y Pereira, R. (2020). Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Ethnopharmacology. Vol 260.

85. Hernández, P. (2008). EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA DEL LANGOSTINO *Macrobrachium occidentale* Y DEL ACOCIL *Cherax quadricarinatus*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
86. Hicks, D. (2016). Seafood safety and quality: The consumer's role. *Foods*. 5(4), 71.
87. Huntingford, F. y Kadri, S. (2008). Capítulo 2. Welfare and Fish. En Branson, E. (ed) *Fish Welfare* (pp 19 – 31). Blackwell Publishing.
88. IMIPAS. (2018). Acuicultura Camarón blanco del Pacífico. Instituto Mexicano de Investigación en Pesca y Acuicultura Sustentables. México.
89. Jar, A. (2014). Bienestar animal y el uso de animales en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol 46. Núm 2. pp 77 – 79.
90. Jerez, I., Ruiz, I. y Mancera, J. (2019). Bienestar Animal en la Acuicultura de Peces: Atenuación del Estrés a través de la Dieta y, mediante el Empleo de Anestésicos durante el Transporte. *Derecho animal*. Vol 10. Núm 4. pp 85 – 92.
91. Kelz, M. y Mashour, G. (2019). The Biology of General Anesthesia from Paramecium to Primate. *Current Biology*. Vol 29. Núm 22. pp R1199 – R1210.
92. Köhler, A. y Valentin, A. (2022). Capítulo 6. Analgesia, anesthesia, and euthanasia in zebrafish. En D'Angelo, L. y De Girolamo, P. (eds) *Laboratory Fish in Biomedical Research. Biology, Husbandry and Reserach Applications for zebrafish, medaka, killifish, cavefish, stickleback, goldfish and Danionella translucida* (pp 119 – 137). Academic Press.
93. Koscinczuk, P. (2014). Ambiente, adaptación y estrés. *Revista veterinaria*. Vol 25. Núm 1. pp 67 – 76.
94. Kristiansen, T. y Bracke. (2020). Capítulo 1. A Brief Look into the Origins of Fish Welfare Science. En Kristiansen, T., Fernö, A., Pavlidis, M. y Van de Vis, H. (eds) *The Welfare of Fish. Animal Welfare* (pp 1 – 17). Vol 20. Springer.
95. Kuo, C. y Yang, Y. (1999). Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Comparative Physiology B*. Vol 169. Núm 1. pp 49 – 54.
96. Lagerspetz, K. y Vainio, L. (2006). Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews*. Vol 81. Núm 2. pp 237 – 258.
97. Lara, C., Espinosa, A., Rivera, M., Astorga, K., Acedo, E. y Bermúdez, M. (2015). Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *Revista AquaTIC*. Núm 43. pp 1 – 13.
98. Lemke, K., y Dawson, S. (2000). Local and Regional Anesthesia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol 30. Núm 4. pp 839 – 857.

99. Leyden, C., Brüggemann, T., Debinski, F., Simacek, C., Dehmelt, F. y Arrenberg, A. (2022). Efficacy of Tricaine (MS-222) and Hypothermia as Anesthetic Agents for Blocking Sensorimotor Responses in Larval Zebrafish. *Frontiers in Veterinary Science*. Vol 9.
100. Li, Y., Liang, S., She, Q., Han, Z., Li, Y. y Li, X. (2018a). Influence of temperature and size on menthol anaesthesia in Chinese grass shrimp *Palaemonetes sinensis* (Sollaud, 1911). *Aquaculture Research*. Vol 49. Núm 6. pp 2091 – 2098.
101. Li, Y., She, Q., Han, Z., Sun, N. y Li, X. (2018b). Anaesthetic Effects of Eugenol on Grass Shrimp (*Palaemonetes sinensis*) of Different Sizes at Different Concentrations and Temperatures. *Scientific Reports*. Vol 8. Núm 11007.
102. Llanos, C. y Scotto, C. (2010). Eugenol como anestésico para labores de manipulación de *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: poeciliidae). *The Biologist* (Lima). Vol 8. Núm 2. pp 179 – 188.
103. Logan, C. y Somero, G. (2010). Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Vol 299. Núm 3. pp R843 – R852.
104. Lorenzon, S. (2005). Hyperglycemic stress response in Crustacea. *Invertebrate Survival Journal*. Vol 2. Núm 2. pp 132 – 141.
105. Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P., Mettullo, R. y Ferrero, E. (2005). Role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress response. *Journal of Experimental Biology*. Vol 208. Núm 17. pp 3341 – 3347.
106. Magallón, F., Villareal, H., Arcos, F., Avilés, S., Civera, R., Cruz, P., González, A., Gracia, V., Hernández, A., Hernández, J., Ibarra, A., Lechuga, C., Mazón, J., Muhlia, A., Naranjo, J., Pérez, R., Porchas, M., Portillo, G. y Pérez, J. (2007). Orientaciones estratégicas para el desarrollo sustentable de la acuicultura en México. Publicaciones especiales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. CIBNOR. Cámara de Diputados. LX Legislatura.
107. Manfrin, C., Pallavicini, A., Battistella, S., Lorenzon, S. y Giulianini, P. (2016). Capítulo 8. Crustacean Immunity: The Modulation of Stress Responses. En Ballarin, L. y Cammarata, M. (eds) *Lessons in Immunity. From Single-Cell Organisms to Mammals*. (pp 107 – 116). Academic Press.
108. Manteca, X. (2012). Capítulo VIII. Bienestar animal. En Del Castillo, S., Ruíz, A., Hernández, J., Gasa, J. (eds) *Manual de Buenas Prácticas de Producción Porcina. Lineamientos generales para el pequeño y mediano productor de cerdos*. Red Porcina Iberoamericana. pp 97-111.
109. Martínez, L. (2002). *Camaronicultura: Avances y Tendencias*. AGT Editor.

110. Matulovic, F. y Oshiro, L. (2016). Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Revista Acadêmica Ciência Animal. Vol 14. pp 57 – 68.
111. McRae, T., Horsley, K. y McKenzie, B. (1999). Evaluation of anaesthetic agents for crayfish. Freshwater Crayfish. Vol 12. pp 221 – 232.
112. Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, A., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R. y Racotta, I. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture. Vol 258. Núm 1 – 4. pp 633 – 640.
113. Montalvo, G., Campos, S., Arenas, M., Barreto, A., Escalante, K., Cuzón, G. y Gaxiola, G. (2022). Inmune gene expresión and antioxidant response to vitamin E enriched diets for males *Litopenaeus vannamei* breeder (Boone, 1931). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. Vol 268.
114. Monteith, J. y Unsworth, M. (2013). Capítulo 14. Steady – State Heat Balance: II (Animals). En Monteith, J. y Unsworth, M. Principles of Environmental Physics. Plans, Animals, and the Atmosphere. (pp 249 – 272). 4ª ed. Academic Press.
115. Morita, T., Tsuneto, S. y Shima, Y. (2002). Definition of Sedation for Symptom Relief: A Systematic Literature Review and a Proposal of Operational Criteria. Journal of Pain and Symptom Management. Vol 24. Núm 4. pp 447 – 453.
116. Ohl, F. y Van der Staay, F. (2012). Animal welfare: At the interface between science and society. The Veterinary Journal. Vol 192. Núm 1. pp 13 – 19.
117. OMSA. (2023a). Capítulo 7.1 Introducción a las recomendaciones para el bienestar de los animales. En: OMSA. Acceso en línea al Código Sanitario para los Animales Terrestres. OMSA. Organización Mundial de Sanidad Animal.
118. OMSA. (2023b). Capítulo 7.1. Introducción a las recomendaciones para el bienestar de los peces de cultivo. En: OMSA. Acceso en línea al Código Sanitario para los Animales Acuáticos. OMSA. Organización Mundial de Sanidad Animal.
119. OMSA. (2023c). Capítulo 7.8. Utilización de animales en la investigación y educación. En: OMSA. Acceso en línea al Código Sanitario para los Animales Terrestres. OMSA. Organización Mundial de Sanidad Animal.
120. OMSA. (2023d). Glosario. En: OMSA. Acceso en línea al Código Sanitario para los Animales Terrestres. OMSA. Organización Mundial de Sanidad Animal.

121. Park, C., Kim, K., Jung, S., Kim, M., Ahn, D., Hong, S., Kim, J. y Oh, S. (2009). Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *PAIN*. Vol 144. Núm 1 – 2. pp 84 – 94.
122. Parodi, T., Cunha, M., Heldwein, C., De Souza, D., Clivea, A., De O García, L., Wasielesky, W., Monserrat, J., Schmidt, D., Carón, B., Heinzmann, B. y Baldisserotto, B. (2012). The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. Vol 155. Núm 3. pp 462 – 468.
123. Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. y Rosas, C. (2003). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. Vol 218. Núm 1 – 4. pp 637 – 650.
124. Pérez Farfante, I. (1969). Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fishery Bulletin*. Vol 67. pp 461 – 591.
125. Pérez – Farfante, I. y Kensley, B. (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle*. Vol 175. pp 1 – 233.
126. Perrot, M., Balourdet, A. y Musset, O. (2021). Optimization of anesthetic procedure in crustaceans: Evidence for sedative and analgesic-like effect of MS-222 using a semi-automated device for exposure to noxious stimulus. *Aquatic Toxicology*. Vol 240.
127. Platas, D. y Vilaboa, J. (2014). LA ACUACULTURA MEXICANA: POTENCIALIDAD, RETOS Y ÁREAS DE OPORTUNIDAD. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Vol 35.
128. Pollo, S., Vitale, A. (2019). Capítulo 2. Invertebrates and Humans: Science, Ethics, and Policy. En: Carere, C. y Mather, J. (eds) *The Welfare of Invertebrate Animals. Animal Welfare*, (pp 7 – 22). Vol 18. Springer.
129. Ponte, G., Andrews, P., Galligioni, V., Pereira, J., Fiorito, G. (2019). Capítulo 9. Cephalopod Welfare, Biological and Regulatory Aspects: An EU Experience. En: Carere, C. y Mather, J. (eds) *The Welfare of Invertebrate Animals. Animal Welfare*. (pp 209 – 228). Vol 18. Springer
130. Popovic, N., Strunjak – Perovic, I., Coz – Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Berovic, A. y Klobucar, R. (2012). Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology*. Vol 28. Núm 4. pp 553 – 564.
131. Pörtner, H. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*. Vol 213. Núm 6. pp 881 – 893.

132. Premarathna, A., Pathirana, I., Rajapakse, J. y Pathirana, E. (2016). Evaluation of Efficacy of Selected Anesthetic Agents on Blood-Spotted Crab (*Portunus sanguinolentus*). *Journal of Shellfish Research*. Vol 35. Núm 1. pp 237 – 240.
133. Pugliese, C., Mazza, R., Andrews, P., Cerra, M., Fiorito, G. y Gattuso, A. (2016). Effect of Different Formulations of Magnesium Chloride Used As Anesthetic Agents on the Performance of the Isolated Heart of *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Physiology*. Vol 7. Núm 610.
134. Racotta, I. y Palacios, E. (1998). Haemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol 29. Núm 3. pp 351 – 356.
135. Racotta, I., Palacios, E. y Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. Vol 35. Núm 4. pp 269 – 275.
136. Rajoy, C. (2015). CULTIVO DE CRUSTÁCEOS. Tesis de maestría. Universidad Europea Miguel de Cervantes.
137. Ralp, C. y Tilbrook, A. (2016). The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *Journal of Animal Science*. Vol 94. Núm 2. pp 457 – 470.
138. Ramlochansingh, C., Branoner, F., Chagnaud, B. y Straka, H. (2014). Efficacy of Tricaine Methanesulfonate (MS-222) as an Anesthetic Agent for Blocking Sensory-Motor Responses in *Xenopus laevis* Tadpoles. *PLOS ONE*. Vol 9. Núm 7.
139. Randall, D., Burggren, W. y French, K. (1998). FISIOLÓGÍA ANIMAL. MECANISMOS Y ADAPTACIONES. 4ª ed. McGraw – Hill Interamericana.
140. Reid, C., Patrick, P., Rytwinski, T., Taylor, J., Willmore, W., Reesor, B. y Cooke, S. (2022). An updated review of cold shock and cold stress in fish. *Journal of Fish Biology*. Vol 100. Núm 5. pp 1102 – 1137.
141. Ricceri, L y Vitale, A. (2011). The law through the eye of a needle: How and when to apply the new European Directive on animals used in research. *EMBO reports*. Vol 12. Núm 7. pp 637 – 640.
142. Robles, A. (2009). ESTUDIO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA PORCIÓN CATALÍTICA DEL COMPLEJO MITOCONDRIAL F_0F_1 ATP-SINTASA DEL CAMARÓN *Penaeus vannamei*: caracterización del ADNc y evaluación del efecto de la hipoxia en la expresión génica de ambas subunidades. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

143. Rodríguez, P. y Beltrán, M. (2016). Aproximación a la farmacología del sulfato de magnesio desde la perspectiva obstétrica. *MedUNAB*. Vol 19. Núm 1. pp 25 – 32.
144. Rojek, K., Serefko, A., Poleszak, E., Szopa, A., Wróbel, A., Guz, M., Xiao, J. y Skalicka-Woźniak. (2021). Neurobehavioral properties of *Cymbopogon* essential oils and its components. *Phytochemistry Reviews*. Vol 21. Núm 2. pp 327 – 338.
145. Rosales, S. y Acevedo, V. (2012). Reflexiones para el diseño de una política acuícola exitosa en México. *Región y sociedad*. Vol 24. Núm 54. pp 63 – 96.
146. Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Van Wormhoudt, A. (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol 249. Núm 2. pp 181 – 198.
147. Ross, L. y Ross, B. (2008a). Capítulo 4. The Nature of Anaesthesia, Sedation and Analgesia. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 40 – 51). Blackwell Publishing.
148. Ross, L. y Ross, B. (2008b). Capítulo 6. Anaesthesia and Legislation. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 57 – 63). Blackwell Publishing.
149. Ross, L. y Ross, B. (2008c). Capítulo 8. Anaesthesia of Fish: I. Inhalation Anaesthesia. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 57 – 63). Blackwell Publishing.
150. Ross, L. y Ross, B. (2008d). Capítulo 11. Anaesthesia of Fish: IV. Non-Chemical Methods. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 57 – 63). Blackwell Publishing.
151. Ross, L. y Ross, B. (2008e). Capítulo 12. Anaesthesia of Aquatic Invertebrates. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 167 – 178). Blackwell Publishing.
152. Ross, L. y Ross, B. (2008f). Capítulo 14. Transportation and Anaesthesia. En: Ross, L. y Ross, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3ª ed. (pp 191 – 208). Blackwell Publishing.
153. Rotllant, G., Llonch, P., García, J., Chic, O., Flecknell, P. y Sneddon, L. (2023). Methods to Induce Analgesia and Anesthesia in Crustaceans: A Supportive Decision Tool. *Biology*. Vol 12. Núm 3. pp 387.
154. Russell, W. y Burch, R. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*. Universities Federation for Animal Welfare.
155. SADER. (2022). *Acuicultura en México*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México.

156. Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. y Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Vol 198. Núm 1 – 2. pp 13 – 28.
157. Sattayakhom, A., Wichit, S. y Koomhin, P. (2023). The Effects of Essential Oils on the Nervous System: A Scoping Review. *Molecules*. Vol 28. Núm 9. pp 3771.
158. Saydmohammed, M. y Pal, A. (2009). Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. Vol 298. Núm 1 – 2. pp 162 – 167.
159. Schreck, C. y Tort, L. (2016). Capítulo 1. The Concept of Stress in Fish. En Schreck, C., Tort, L., Farrell, A. y Brauner, C. (eds) *Biology of Stress in Fish: Fish Physiology* (pp 1 – 34). Vol 35. Academic Press.
160. Schroeder, P. (2022). Capítulo 5. The welfare of zebrafish. En D'Angelo, L. y De Girolamo, P. (eds) *Laboratory Fish in Biomedical Research. Biology, Husbandry and Reserach Applications for zebrafish, medaka, killifish, cavefish, stickleback, goldfish and Danionella translucida* (pp 101 – 117). Academic Press.
161. Schulte, P. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*. Vol 218. Núm 12. pp 1856 – 1866.
162. Seymour, T. (2017). Capítulo 1. Terms and definitions. En: Pacharinsak, C. y Smith, J. (eds) *Handbook of laboratory animal anesthesia and pain management: rodents*. (pp 1 – 2). CRC Press.
163. Sneddon, L., Wolfenden, D. y Thomson, J. (2016). Capítulo 12. Stress Management and Welfare. En Schreck, C., Tort, L., Farrell, A. y Brauner, C. (eds) *Biology of Stress in Fish: Fish Physiology* (pp 463 – 539). Vol 35. Academic Press.
164. Soltani, M., Marmari, G. y Mehrabi, M. (2004). Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. *Aquaculture International*. Vol 12. Núm 4 – 5. pp 457 – 466.
165. Sorroza, L., Ajila, C. y SantaCruz, R. (2020). Uso de un anestésico artesanal para la manipulación de peces (*Andinocara rivulatus*). Vol 41. Núm 49. pp 267 – 273.
166. Sprecher, M., Sprecher, S. y Spadavecchia, C. (2022). A pilot investigation of the efficacy and safety of magnesium chloride and ethanol as anesthetics in *Loligo vulgaris* embryos. *Frontiers in Physiology*. Vol 13.

167. Stentiford, G., Chang, E., Chang, S. y Neil, D. (2001). Carbohydrate Dynamics and the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH): Effects of Parasitic Infection in Norway Lobsters (*Nephrops norvegicus*). *General and Comparative Endocrinology*. Vol 121. Núm 1. pp 13 – 22.
168. Sung, T., You, H., Cho, C., Choi, H., Kim, Y., Shin, Y. y Yang, H. (2018). Effects of magnesium chloride on rocuronium-induced neuromuscular blockade and sugammadex reversal in an isolated rat phrenic nerve–hemidiaphragm preparation. *European Journal of Anaesthesiology*. Vol 35. Núm 3. pp 193 – 199.
169. Tang, Y., Zhang, H., Yang, G., Fang, C., Kong, C., Tian, L. y Huang, X. (2022). Pharmacokinetics studies of eugenol in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after immersion bath. *BMC Veterinary Research*. Vol 18. Núm 122.
170. Tibenda, J., Yi, Q., Wang, X. y Zhao, Q. (2022). Review of phytomedicine, phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology, and pharmacological activities of Cymbopogon genus. *Frontiers in Pharmacology*. Vol 13.
171. Ulaje, S. (2015). RELACIÓN ENTRE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, CONTENIDO BIOQUÍMICO Y EXPRESIÓN DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) ANTE CAMBIOS AGUDOS Y CRÓNICOS DE HIPERTERMIA E HIPOXIA. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
172. Ulaje, S. (2020). Expresión de genes de rutas metabólicas involucradas en la respuesta a estrés por hipertermia e hipoxia a corto y largo plazo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
173. Ulanowska, M. y Olas, B. (2021). Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol 22. Núm 7.
174. Utne-Palm, A. y Smith, A. (2020). Fish as Laboratory Animals. En: Kristiansen, T., Fernö, A., Pavlidis, M. y Van de Vis, H. (eds) *The Welfare of Fish. Animal Welfare*. (pp 375 – 400). Vol 20. Springer.
175. Valdez, G., Díaz, F., Re, A. y Sierra, E. (2008). Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*. Vol 18. Núm 2. pp 105 – 115.
176. Vásquez, L. (2013). Bienestar animal en Piscicultura. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola*. Vol 7. Núm. 7.
177. Vásquez, G., Castro, T., Hernández, A., Castro, J. y De Lara, R. (2013). Comparación del efecto anestésico del aceite de clavo, solución salina y solución coloidal en juveniles de *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). *Archivos de medicina veterinaria*. Vol 45. Núm 1. pp 59 – 66.

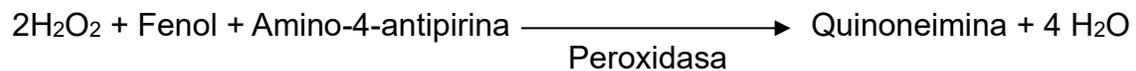
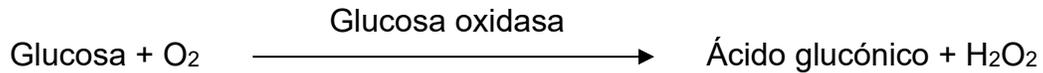
178. Velázquez, A., Alcántara, L., Cordero, V., Benítez, A. y Fuentes, N. (2023). Lidocaína: Anestésico local. Revisión bibliográfica. Revista de Medicina e Investigación UAEMéx. Vol 11. Núm 2. pp 71 – 76.
179. Vieira, C. (2017). Capítulo 3.1. The 3Rs and Good Scientific Practice. En: Röcklinsberg, H., Gjerris, M. y Olsson, I. Animal Ethics in Animal Research (pp. 15–40). Cambridge: Cambridge University Press.
180. Weber, E. (2011). Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? Veterinary Clinics Of North America Exotic Animal Practice. Vol 14. Núm 1. pp 21 – 32.
181. Weineck, K., Ray, A., Fleckenstein, L., Medley, M., Dzublik, N., Piana, E. y Cooper, R. (2018). Physiological Changes as a Measure of Crustacean Welfare under Different Standardized Stunning Techniques: Cooling and Electroshock. Animals. Vol 8. Núm 9.
182. Wuertz, S., Bierbach, D. y Bögner, M. (2023). Welfare of Decapod Crustaceans with Special Emphasis on Stress Physiology. Aquaculture Research. Vol 2023. pp 1 – 17.
183. Xu, L., Luqing, P., Zhang, X. y Wei, C. (2019). Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on regulation of hemocyte intracellular signaling pathways and phagocytosis in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. Vol 93. pp 559 – 566.
184. Yang, H., Zhao, Y., Weiwei, S., Ye, Y., Wang, C., Mu, C. y Li, R. (2020). Evaluation of the efficacy of potential anesthetic agents on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) juveniles. Aquaculture Reports. Vol 18.
185. Zahl, I., Samuelsen, O. y Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish Physiology and Biochemistry. Vol 38. Núm 1. pp 201 – 218.
186. Zamora, S. (2012). EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y ESTATUS ENERGÉTICO DEL CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*, POR EFECTO DE DISTINTOS PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN CULTIVO INTENSIVO. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
187. Zeng, X., Zheng, X., Wu, J., Dong, H. y Zhang, J. (2024). Assessment of the molecular mechanism fish using eugenol as anesthesia based on network pharmacology. Fish Physiology and Biochemistry.
188. Zhu, L., Qi, S., Shi, C., Chen, S., Ye, Y., Wang, C., Mu, C., Li, R., Wu, Q., Wang, X. y Zhou, Y. (2023). Optimizing Anesthetic Practices for Mud Crab: A Comparative Study of Clove Oil, MS-222, Ethanol, and Magnesium Chloride. Antioxidants. Vol 12. Núm 12.

Anexos

Anexo 1: KIT GLUCOSE PAP SL

El kit GLUCOSE PAP SL del fabricante ELITechGroup es un reactivo para el ayaladiagnóstico in vitro de la determinación cuantitativa de glucosa en muestras de suero y plasma de seres vivos.

Su principio se basa en la siguiente reacción enzimática.



Anexo 2: KIT LACTATE (LIQUID), REAGENT SET

El Kit (Liquid), Reagent set, de la marca (POINTE SCIENTIFIC, INC), se utiliza para el diagnóstico in vitro de la determinación cuantitativa de lactato en plasma humano.

Su principio se basa en la siguiente reacción enzimática.

