

F. Rocha <sup>1,2</sup>, R. Fernández-Gago <sup>1,2</sup>, L. Mantilla-Aldana <sup>1,2</sup>

1- ECIMAT, Estación de Ciencias Mariñas de Toralla (Universidade de Vigo), Illa de Toralla s/n, 36331 Vigo.  
2- Departamento de Ecología y Biología Animal, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, España.

## ABSTRACT

Trials were performed with ethanol in order to test their effect as anaesthetic in *Octopus vulgaris* paralarvae. Ethanol was an effective anaesthetic with limited toxic or stressing effect only at high concentrations (4%). Anesthetized specimens show relaxed musculature, non-active chromatophores and normal respiratory processes. Specimens' recovery after anesthesia is good and no adverse effects were observed after.

## INTRODUCCIÓN

El uso de anestésicos en la experimentación con cefalópodos para una correcta manipulación, bajo una adecuada conducta ética evitando su sufrimiento, es un aspecto obligatorio desde la aprobación de la directiva de la UE 2010/63/EU. En la cual se incluye, por primera vez, a todos los cefalópodos vivos (Andrews et al., 2013). Varios han sido los anestésicos utilizados en estos moluscos (principalmente cloruro de magnesio, aceite de clavo y etanol), sobre todo para realizar experimentos fisiológicos o para el transporte de especies (Messenger et al., 1985; Mooney et al., 2010; Estefanell, 2010; Gleadall, 2013; Polese et al., 2014). Sin embargo, las investigaciones realizadas sobre el uso y el efecto de los anestésicos en los cefalópodos se han centrado en especímenes adultos y juveniles, pero no en las paralarvas, existiendo un gran desconocimiento sobre este tema en los estadios larvarios. En este trabajo se analizó el uso del etanol como anestésico para la sedación de paralarvas del pulpo común, *O. vulgaris* Cuvier, 1797. Así mismo, se evaluó su efecto sobre las paralarvas y su eficacia a la hora de realizar mediciones y estudios sobre individuos vivos de la especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos de 5 paralarvas de *O. vulgaris* de 3 días de vida fueron sometidas al efecto del etanol. El procedimiento consistió en extraer, individualmente mediante sifonado, los ejemplares del tanque de cultivo y depositarlos en un frasco con 40 mL de agua de mar. Posteriormente se agregó etanol al 96%, evitando que caiga directamente sobre las paralarvas, hasta percibir la detención de su natación, momento en el que se establece el inicio de los efectos sedantes. Las concentraciones finales del etanol utilizadas en los grupos fueron de 0,50%, 1%, 2% y 3%. Los individuos fueron mantenidos bajo sedación durante 5 minutos, fotografiados, filmados y medidos con una lupa binocular (Nikon SMZ 1500). Pasado el tiempo de sedación, los ejemplares se traspasaron a un frasco con 100 mL de agua de mar filtrada a temperatura ambiente, donde se registró su tiempo de recuperación, anotando el inicio de la funcionalidad de cromatóforos, natación libre y respuesta a un estímulo externo (Flujo de agua con pipeta). Para determinar el efecto del etanol como anestésico se siguieron los criterios utilizados por Andrews et al. (2013) y Gleadall (2013) para detectar efectos tóxicos, dolor, sufrimiento y angustia en cefalópodos: irritación en piel y ojos, cambios anormales en coloración y textura de la piel, contracción y postura corporal. Además se observó la aparición de respuestas conductuales indicadoras de estrés, como la liberación de tinta, tanto al aplicar el anestésico como durante su recuperación después de la anestesia.

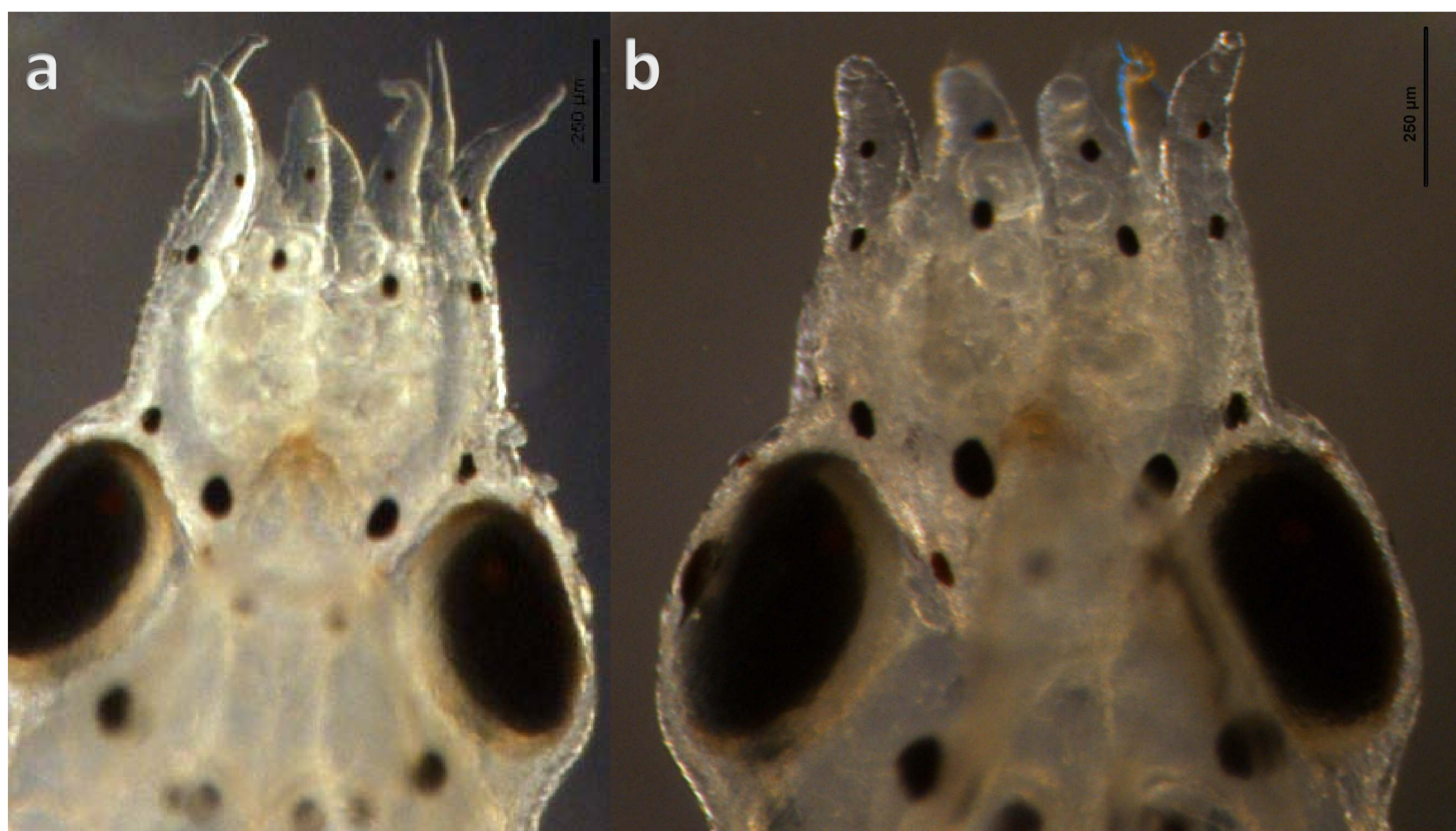


Figura 1. Paralarvas anestesiadas con etanol. a) Brazos bien extendidos sin efectos negativos por el etanol; b) Brazos contraídos por el efecto del exceso de etanol.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El uso de etanol como anestésico demostró ser método muy eficiente para la sedación de las paralarvas de *O. vulgaris*. En todos los casos, las paralarvas fueron anestesiadas sin observarse en ellas signos de efectos tóxicos o de dolor. Con la correcta aplicación del etanol y considerando las concentraciones utilizadas en este experimento, los ejemplares no mostraron cambios significativos de coloración o contracción muscular, ni irritación de piel y ojos (Figura 1). Sólo cuando la concentración de etanol fue alta (2 y 3%) se observaron signos de estrés durante la recuperación, determinados por la liberación de tinta en las paralarvas al comenzar a nadar (Tabla 1). También se observaron signos de estrés cuando, al nadar, la paralarva atravesaba una zona donde se agregaba una gota de etanol, reflejado en una reacción de escape, liberación de tinta y contracción del cuerpo. Sin embargo, estos efectos no se observaron si el etanol era aplicado correctamente y en dosis menores. Los ejemplares se recuperaron normalmente después de la sedación y no se observaron efectos posteriores en el cultivo.



Figura 2. Paralarvas de 3 días anestesiadas con etanol.

Tabla 1. Observaciones obtenidas durante el proceso de anestesiado y recuperación. Los tiempos de observación son referidos al porcentaje de los individuos analizados. T: Tiempo, Seg: segundos, N/E: No existente.

Concentración Etanol (%)	OBSERVACIONES DURANTE SEDACIÓN					OBSERVACIONES DURANTE RECUPERACIÓN			
	Cromatóforos	Ventilación	Natación	Brazos	Actividad cardíaca	T Recuperación (Seg)		Cromatóforos activos (seg)	Expulsión tinta (%)
						60%	100%		
0	Activos	Normal	Errática	Activos	Normal	0	0	0	0
0,5	Activos	Disminución	Errática	No activos	Normal	41	0	32	0
1	No activos tras 2 min	Disminución	N/E	No activos	Disminución	66	87	76,5	0
2	No activos	No existente	N/E	No activos	Muy disminuida	250	355	241,5	30
3	No activos	No existente	N/E	Contracción	Muy disminuida	417,25	625,5	453	50

## CONCLUSIONES

En conclusión, el uso de etanol como anestésico es un método muy eficaz para el estudio de las paralarvas de pulpos. Suministrado correctamente no parece producir efectos nocivos, estrés, dolor o sufrimiento en las paralarvas analizadas, permitiendo el estudio de los animales bajo condiciones controladas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a los fondos del proyecto OCTOWELF (AGL2013-49101-C2-1-R). Sin la ayuda de Damián Costas y Manuel Garci este trabajo no habría sido posible.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, P.L.R., A.S. Darmaillacq, N. Dennison, I.G. Gleadall, P. Hawkins, J.B. Messenger, D. Osorio, V.J. Smith y J.A. Smith. 2013. The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anaesthesia, analgesia and humane killing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447: 46-64.
- Estefanell, J.; Socorro, J.; Afonso, J. M.; Roo, J.; Fernández Palacios, H. y Izquierdo M.S. 2010. Evaluation of two anaesthetic agents and the passive integrated transponder tagging system in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797). *Aquaculture Research*, 42: 399-406.
- Gleadall, I.G. 2013. The effects of prospective anaesthetic substances on cephalopods: Summary of original data and brief review of studies over the last two decades. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447: 23-30.
- Messenger, J.B., M. Nixon y K.P. Ryan. 1985. Magnesium chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82C(1): 203-205.
- Mooney, T.A., W-J. Lee y R.T. Hanlon. 2010. Long-duration anaesthetization of squid (*Doryteuthis pealeii*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 43(4): 297-303.
- Polese, G., W. Winlow y A. Di Cosmo. 2014. Dose-dependent effects of the clinical anesthetic isoflurane on *Octopus vulgaris*: A contribution to Cephalopod welfare. *Journal of Aquatic Animal Health*, 26: 285-294.

