



FACULTADE DE BIOLOXÍA  
Departamento de Fisioloxía  
(Laboratorio de Fisioloxía Animal)  
Instituto de Acuicultura

**EFEECTO DEL ESTRÉS Y DE LA ANESTESIA SOBRE  
INDICADORES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE ESTRÉS Y  
SOBRE LOS NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS  
CEREBRALES EN EL LENGUADO *Solea senegalensis* (KAUP 1858)**

Tesis doctoral

Robilson Antonio Weber

Santiago de Compostela · 2009



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Facultad de Biología  
Departamento de Fisiología  
(Laboratorio de Fisiología Animal)  
Instituto de Acuicultura

**EFECTO DEL ESTRÉS Y DE LA ANESTESIA SOBRE INDICADORES  
PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE ESTRÉS Y SOBRE LOS  
NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS CEREBRALES EN EL  
LENGUADO *Solea senegalensis* KAUP, 1858**

Tesis doctoral presentada por  
*Robilson Antonio Weber*  
Santiago de Compostela · 2009



El Dr. Manuel Alejo Aldegunde Villar, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Biología y el Dr. Oscar García Martín, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “EFECTO DEL ESTRÉS Y DE LA ANESTESIA SOBRE INDICADORES PRIMARIOS Y SECUNDARIOS DE ESTRÉS Y SOBRE LOS NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS CEREBRALES EN EL LENGUADO *Solea senegalensis* KAUP, 1858”, presentada por D. Robilson Antonio Weber para la obtención del grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y que hallándose concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela a 9 de febrero de 2009.

Dr. Manuel Alejo Aldegunde Villar

Dr. Oscar García Martín



La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral para iberoamericanos de la Universidad de Santiago de Compostela, y al Instituto de Acuicultura (Unidad de Control de Moluscos).

Hasta el presente momento, esta tesis doctoral ha generado las siguientes publicaciones:

**Weber, R. A., J. B. Peleteiro, L. O. García Martín, M. Aldegunde.** 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, 288: 147-150.

**Weber, R. A., J. J. Pérez-Maceira, J. B. Peleteiro, O. García Martín, M. Aldegunde.** 2008. Effect of the anesthetics clove oil and MS-222 on blood and plasma indicators of stress in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: S17.

**Weber, R. A., J. J. Pérez-Maceira, J. B. Peleteiro, O. García Martín, M. Aldegunde.** 2008. Physiological stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) induced by acute exposure to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: S17.

**Weber, R. A., J. B. Peleteiro, O. Chereguini, L. O. García Martín, M. Aldegunde.** 2007. Evaluación de la eficacia del 2-fenoxietanol como anestésico en el lenguado (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). En: Tomo II, XI Congreso Nacional de Acuicultura. Editado por A. C. Eiroa, A. G. Díaz, C. P. Acosta. (ISBN: 978-84-616-9085-0). Vigo, España. pp. 1419-1422.

**Weber, R. A., O. García Martín, M. Aldegunde.** 2009. El estrés en peces y su efecto sobre el crecimiento y la reproducción. En: Enfermedades y patologías de peces. Editado por J. L. Barja y col. Editora Fundación Oesa, España, 48 pags. (En imprenta)



## Agradecimientos

---

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas las personas y organismos que me han ayudado en el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar a mis directores, Prof. Dr. Manuel Aldegunde Villar, por su inestimable ayuda, optimismo y dedicación, y al Prof. Dr. Oscar García Martín, por su generosidad y apoyo recibido desde el principio, colocando a mi disposición todos los recursos necesarios para poder desarrollar este trabajo.

Al Prof. Dr. Santo Zacarias Gomes y al Dr. Moacir Bertoldi, por la amistad y confianza que habéis depositado en mí y al empeño para que pudiera venir a España.

A la Profa. Dra. Lucimar Pontara Perez de Moura, por la amistad y el estímulo.

A los Dres. María Tereza Dinis, Luís Conceição y Claudia Aragão del Centro de Ciencias Marinas (CCMAR) de la Universidad del Algarve (Portugal), por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y adquirir nuevos conocimientos.

Al Dr. Gustavo Hernández Córdoba de la Unidad de Control de Moluscos (UCM) del Instituto de Acuicultura (USC), por la enseñanza recibida durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. José Benito Peleteiro del Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía (IEO), que nos brindó la oportunidad de disponer de los lenguados necesarios para la realización de los experimentos, y también a la Téc. Dña. Gloria Cordeiro Pinto, por la manutención, cuidado y ayudas en la captura de los animales.

Al amigo y compañero Jorge P. Pérez-Maceira, por su inestimable y desinteresada ayuda en múltiples aspectos del desarrollo del trabajo. ¡Gracias por echarme esa mano!

A mis cuñados Artur Vitório Scarton y María Esther Caballero, siempre preocupados por “si todo iba bien”, y en especial por su amistad.

A mi mujer Antonia, por su optimismo y apoyo incondicional en los momentos más difíciles, y por su empeño en ayudarme a terminar esta ardua tarea. A mis hijos “Tita” y “Joãozinho” que supieron comprender y adaptarse a los momentos difíciles.

A mi madre...

A todos que me han conducido hasta aquí...

¡GRACIAS!





---

1. Introducción	
1.1. El lenguado <i>Solea senegalensis</i> KAUP, 1858	3
El cultivo del lenguado <i>Solea senegalensis</i>	3
1.2. El estrés en peces	5
Agentes causantes de estrés	7
Respuestas fisiológicas al estrés	7
Respuestas al estrés a nivel celular	9
Eje hipotálamo-simpático-células cromafines	10
Eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HHI)	11
Crecimiento y estrés	13
Reproducción y estrés	16
Efectos del estrés y/o cortisol sobre el hipotálamo e hipófisis	17
Efectos del estrés y/o cortisol sobre los esteroides gonadales	18
Efectos del estrés y/o cortisol sobre la vitelogénesis	20
Efectos del estrés y/o cortisol sobre la calidad de los gametos y progenie	21
Efectos del estrés sobre los neurotransmisores monoaminérgicos	22
1.3. Anestésicos y Acuicultura	22
El aceite de clavo	24
El 2-Fenoxietanol	24
El MS-222	25
El metomidato	25
1.4. Diagnóstico y evaluación del estrés	26
1.5. Aminas biógenas cerebrales	27
Las catecolaminas: dopamina y noradrenalina	27
La serotonina	30
2. Objetivos	35
3. Material y métodos	
3.1. Animales de experimentación	39
3.2. Anestésicos y reactivos utilizados	40
3.3. Obtención de las muestras	
Extracción de la sangre y obtención del plasma	40
Extracción del cerebro	41
3.4. Determinaciones analíticas	
Análisis de la glucosa	42
Análisis del lactato	43
Análisis de la hemoglobina	44
Cuantificación del hematocrito	46
Análisis del cortisol	46
3.5. Análisis de aminas biógenas cerebrales	
Procesado de las muestras destinadas a la cuantificación de aminas.	49
Determinación cromatográfica de los niveles de aminas	49
3.6. Análisis estadístico	52

---

4. Diseño experimental	
4.1. Definición de los estadios de anestesia, inducción y recuperación, en el lenguado	57
4.2. Determinación de los tiempos de inducción y recuperación en lenguados anestesiados con diferentes dosis de anestésicos	58
4.3. Estudio para evaluar la profundidad de la anestesia en el estadio II	58
4.4. Estudio de los efectos de los diferentes agentes anestésicos sobre diversos indicadores sanguíneos y plasmáticos de estrés	59
4.5. Evaluación del efecto antiestrés de los diferentes anestésicos frente a un estrés agudo (exposición al aire) en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	61
4.6. Evaluación del efecto antiestrés de los diferentes anestésicos frente a un estrés agudo (persecución) en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	62
4.7. Estudio del efecto del estrés (exposición al aire) sobre los niveles cerebrales de neurotransmisores: Efecto de los anestésicos	63
4.8. Estudio del efecto del estrés (persecución) sobre los niveles cerebrales de neurotransmisores: Efecto de los anestésicos	63
4.9. Efectos de la exposición al amoníaco sobre parámetros hematológicos, plasmáticos, y sobre los niveles de los neurotransmisores cerebrales en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	64
5. Resultados	
5.1. Definición los estadios de anestesia, inducción y recuperación, en el lenguado	69
5.2. Determinación de los tiempos de inducción y de recuperación en lenguados anestesiados con diferentes dosis de anestésicos	69
5.3. Estudio para evaluar la profundidad de la anestesia en el estadio II	71
5.4. Estudio de los efectos de los diferentes agentes anestésicos sobre diversos indicadores sanguíneos y plasmáticos de estrés	
2-Fenoxietanol	73
Aceite de clavo	75
MS-222	78
Metomidato	80
5.4.1. Estudio comparado de los efectos de los cuatro anestésicos sobre los parámetros hematológicos y plasmáticos: una visión global	82
5.5. Evaluación del efecto antiestrés de los diferentes anestésicos frente a un estrés agudo (exposición al aire) en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	
2-Fenoxietanol	84
Aceite de clavo	87
MS-222	89
Metomidato	91
5.6. Evaluación del efecto antiestrés de los diferentes anestésicos frente a un estrés agudo (persecución) en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	

---

2-Fenoxietanol	93
Aceite de clavo	95
MS-222	97
Metomidato	99
5.7. Estudio del efecto del estrés (exposición al aire) sobre los niveles cerebrales de neurotransmisores: Efecto de los anestésicos	
2-Fenoxietanol	101
Aceite de clavo	109
MS-222	117
Metomidato	125
5.8. Estudio del efecto del estrés (persecución) sobre los niveles cerebrales de neurotransmisores: Efecto de los anestésicos	
2-Fenoxietanol	133
Aceite de clavo	142
MS-222	150
Metomidato	158
5.9. Efectos de la exposición al amoníaco sobre parámetros hematológicos, plasmáticos, y sobre los niveles de los neurotransmisores cerebrales en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	166
6. Discusión	
Caracterización de los estadios de anestesia, inducción y recuperación, en el lenguado	179
Eficacia anestésica	179
Evaluación de la profundidad anestésica en el estadio II	182
Agentes anestésicos e índices de estrés	184
Estudio de la capacidad antiestrés de los anestésicos frente a un estrés agudo (exposición al aire y persecución) en juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	189
Estudio de los efectos de un estrés agudo sobre la actividad de los sistemas monoaminérgicos cerebrales en juveniles de <i>Solea senegalensis</i> : efecto del pretratamiento con anestésicos	194
Exposición al amoníaco	200
7. Conclusiones	209
8. Bibliografía	213



## Abreviaturas

---

11-KT: 11-cetotestosterona	HPLC-EC: cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica
17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP: 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one	HRPO: enzima peroxidasa de rábano
2-Fe: 2-fenoxietanol	HSP30: proteína de choque térmico 30 kDa
4-AF: 4-aminofenazona	HSP60: proteína de choque térmico 60 kDa
5HIAA: ácido 5-hidroxindol-3-acético	HSP70: proteína de choque térmico 70 kDa
5HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina	HSP90: proteína de choque térmico 90 kDa
5HTP: 5-hidroxitriptófano	HSPs: proteínas de choque térmico (estrés calórico)
8-OH-DPAT: ( $\pm$ )-8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina	Ht: hematocrito
A: clavo: aceite de clavo	IGF: factor de crecimiento similar a la insulina
A: adrenalina	IGFBPs: proteínas transportadoras del factor de crecimiento insulínico
AADC (L-AADC): enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa	IT: isotocina
Ach: acetilcolina	K: pendiente
ACTH: hormona adrenocorticotrófica	kDa: kiloDalton
Anest.: anestésico	kg: kilogramo
ANS: ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico	L: litro
ANOVA: análisis de la varianza	Lac: lactato
APROMAR: Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España	LC <sub>50</sub> /48 h: concentración letal 50% a las 48 horas
ATP: adenosin trifosfato	LC <sub>50</sub> : concentración letal 50%.
ATPasa: enzima que hidroliza el ATP	L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina
AVT: arginina vasotocina	LH: hormona luteinizante
BBB: barrera hematoencefálica	LO: enzima lactato oxidasa
BSA: seroalbumina bovina	m: metro
CCK: colecistoquinina	M: Molar
Cl <sup>-</sup> : ion cloro	MAO: enzima monoamina oxidasa
cm: centímetro	MCH: hormona concentradora de melanina
COMT: enzima catecol-O-metiltransferasa	Met.: metomidato
CRH: hormona liberadora de corticotrofina	mg: miligramo
Cu <sup>+2</sup> : ion cobre	MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
D $\beta$ H: dopamina $\beta$ -hidroxilasa	mL: mililitro
DA: dopamina	mm: milímetro
dL: decilitro	MPF: factor promotor de la maduración
DMSO: dimetilsulfóxido	mRNA: ácido ribonucleico mensajero
DNA: ácido desoxiribonucleico	MS-222: tricafina
DOMA: ácido 3,4-dihidroxi mandélico	mV: milivoltio
DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético	N: Normalidad
E <sub>2</sub> : 17 $\beta$ -estradiol	n: número de animales
EDTA: ácido etilendiamin-tetracético	NA (NE): noradrenalina
EIA: enzimo-inmuno-ensayo	Na <sup>+2</sup> : ion sodio
ELISA: inmunoanálisis por adsorción ligada a enzimas	NET: proteína transportadora de noradrenalina
EU: Unión Europea	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : ion amonio
FDA: órgano del gobierno americano encargado de controlar los fármacos y los alimentos	NH <sub>3</sub> : amoniaco
FSH: hormona estimuladora del folículo	NMDA: ácido N-metil-D-aspartico
g: gramo	NPO: núcleo preóptico
GABA: ácido $\gamma$ -aminobutírico	NPY: neuropéptido Y
GH: hormona del crecimiento	NT: neurotransmisor
GHRH: Hormona liberadora de la hormona del crecimiento	°C: grado Celsius
Glu: glucosa	ODS-2: Octadecilsilice
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofina	p/v: peso/volumen
GOD: enzima glucosa oxidasa	P: nivel de significación observado en el test
GRAS: generalmente considerado seguro	PBS-Tween 20: Tampón salino fosfato + polisorbato 20
GtH: gonadotrofina	PEPCK: enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa
h: hora	pg: picogramo
Hb: hemoglobina	pH: escala de medición del grado de acidez/basicidad
HHI: hipotálamo-hipófisis-interrenal	PIPES: piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)
	PO <sub>2</sub> : presión de oxígeno
	POD: enzima peroxidasa

## Abreviaturas

---

PRL: prolactina  
RD: Real Decreto  
RIA: Radioinmunoensayo  
RNA: ácido ribonucleico  
s: segundo  
SBP: proteína ligadora de los esteroides sexuales  
P450 SCC: enzima de ruptura de la cadena lateral del  
colesterol  
SEM: error estándar de la media  
SERT: proteína transportadora de serotonina  
SL: somatolactina  
SNC: sistema nervioso central  
SRIF: factor inhibidor de la liberación de la somatotropina  
(somatostatina)  
 $\beta$ -END:  $\beta$ -endorfina  
T: testosterona  
T3: triyodotironina  
T4: tiroxina  
TH: enzima tirosina hidroxilasa  
Tm: toneladas métricas  
TMB: tetrametilbenzidina  
TRH: hormona liberadora de la tirotrófina  
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano  
TrpOH: enzima triptófano hidroxilasa  
Tryp: triptófano  
TSH: hormona estimulante de la tiroides  
Tyr: tirosina  
U/L: unidades por litro  
v/v: volumen/volumen  
VIP: polipéptido intestinal vasoactivo  
 $\alpha$ -MSH: hormona estimuladora de los melanocitos

# 1. Introducción





La acuicultura se puede definir como el cultivo de organismos acuáticos, donde se emplean técnicas con el objetivo de hacer más eficiente su producción. La acuicultura, se remonta a tiempos remotos, tiene una historia de unos 4.000 años. La primera referencia escrita sobre producción de peces continentales en España data del año 1129 cuando, por iniciativa del arzobispo Gelmírez, se construyó un criadero de peces en Galicia. No obstante, la acuicultura piscícola industrial inició su desarrollo en 1961 (FAO, 2005).

Durante los últimos años la producción de peces marinos ha experimentado un crecimiento importante, que se debe fundamentalmente a la dorada *Sparus aurata* y a la lubina *Dicentrarchus labrax* (FAO, 2005). El lenguado (*Solea senegalensis*) representa una especie de gran interés para la acuicultura, dado el alto valor comercial que alcanza entre las especies marinas. Ha sido considerado un potencial candidato para la acuicultura en Europa desde los años de 1990 (Engrola et al., 2007). En 2007 la producción de lenguado en España ascendió a 60 Tm, lo que proporcionó una facturación de 645.000 euros (comercialización en primera venta) (Apromar, 2008).

### **1.1. EL LENGUADO *Solea senegalensis* KAUP, 1858**

El lenguado es un pez teleosteo perteneciente al orden Pleuronectiformes, familia Soleidae, género *Solea*, especie *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Esta familia engloba un grupo de 89 especies (Nelson, 1994). El lenguado es un pez plano de cuerpo asimétrico, de forma oval alargada comprimida, con un lado ciego y con los dos ojos en el lado derecho. La membrana interrredial de la aleta pectoral del lado de los ojos es de color negro (Figura 1). Esta es la principal característica que lo distingue del lenguado común (*Solea solea*), el cual presenta un punto compacto negro grande en el lado posterior de esta aleta (Desoutter, 1990; Arellano y Sarasquete, 2005).

El lenguado es una especie predominantemente litoral, encontrada en el atlántico desde el golfo de Vizcaya hasta las costas del Senegal, y también en las costas del mediterráneo occidental. Es una especie bentónica, que vive en fondos arenosos o fangosos de la costa y lagos salobres. Se alimenta de pequeños crustáceos, poliquetos y moluscos bivalvos (Desoutter, 1990; Arellano y Sarasquete, 2005).

#### **El cultivo del lenguado *Solea senegalensis***

Bajo condiciones naturales, con proporciones de sexo 1:1 a 1:2 (machos: hembras), se han registrado puestas naturales desde febrero a mayo, y desde octubre a diciembre, con una fecundidad media en torno a los 28.000 huevos por puesta y kilo de ejemplar hembra (Anguis y Cañavate, 2005). En estos periodos las hembras no desovan todos los días (Dinis et al., 1999), dado que la puesta es

discontinua durante el ciclo reproductivo (Rodríguez, 1984). Se ha demostrado que la temperatura ejerce un importante papel sobre el control de la reproducción de *Solea senegalensis*. Así, en un trabajo reciente, se ha puesto de manifiesto la relación existente entre las variaciones de la temperatura, el inicio del desarrollo gonadal y la producción de esteroides sexuales (García-Lopez et al., 2006). El inicio del desove normalmente está relacionado con un aumento de la temperatura del agua durante la primavera (Dinis et al., 1999). Dinis et al. (1999) y Anguis y Cañavate (2005) obtuvieron las mejores tasas de fecundidad con temperaturas entre 16 y 22 °C.



**Figura 1.** Vista de un ejemplar de lenguado (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) utilizado en el presente trabajo de investigación.

Una vez fertilizados los oocitos (los huevos tienen la capacidad de flotar), su incubación normalmente se realiza utilizando tanques cilindro-cónicos (Conceição et al., 2007) con una media de 2000 huevos  $L^{-1}$  (Anguis y Cañavate, 2005). El tamaño de los huevos ejerce una importante influencia sobre el tamaño de las larvas al nacer, que presentarán variaciones entre los 2,2 a 2,8 mm (Dinis et al., 1999). Después de la eclosión, las larvas son almacenadas en tanques con una densidad media de 60 a 100 larvas  $L^{-1}$  (Dinis et al., 1999; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999). Los estadios pré-metamórficos se caracterizan por presentar unas elevadas tasas de crecimiento y una gran resistencia a las condiciones de cultivo. A los 12 días de la eclosión, la metamorfosis está fuertemente acelerada y las larvas empiezan a dejar su estilo de vida pelágico (Conceição et al., 2007); prácticamente la totalidad de la población larvaria es capaz de efectuar la metamorfosis hacia los 20 - 21 días de edad (Fernández-Díaz et al., 2001). Sobre este periodo de tiempo (18 - 21 días después de la eclosión) y ya con las larvas bentónicas (Ribeiro et al., 1999), estas son transferidas a tanques de fondo plano (Dinis et al., 1999) con una densidad de 3000 individuos/ $m^2$  hasta que finalice el destete (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Conceição et al., 2007). La edad para el destete (retirada del alimento vivo) difiere entre los autores y las más utilizadas están comprendidas entre los 50 y 60 días desde la eclosión (Cañavate, 2007). A partir de este momento los lenguados serán alimentados con dietas inertes. En

general se aplican dos estrategias alimentarias para adaptar el lenguado a dicha dieta: i) un destete repentino, se cambia repentinamente a una dieta inerte, o ii) un destete en co-alimentación con metanauplios de artemia, donde la cantidad relativa de artemia y dieta inerte se cambian gradualmente de manera inversa hasta conseguir una dieta inerte al 100% (Conceição et al., 2007). A partir de este momento entramos en la fase de engorde del *Solea senegalensis*, que utilizando una alimentación a base de pienso permite alcanzar ejemplares con peso medio de 456 g en un año de cultivo (Dinis et al., 1999; Olmedo et al., 2003; Rodríguez y Souto, 2003).

## 1.2. EL ESTRÉS EN PECES

El mantenimiento del estado de equilibrio fisiológico (homeostasis) es fundamental para la supervivencia de un organismo. No obstante, la estabilidad de este equilibrio se encuentra amenazada continuamente tanto por perturbaciones intrínsecas al propio organismo como por variaciones provenientes del medioambiente (Lacoste, 2001). Fue Selye, en 1936, quien introdujo el término estrés (*stress*) para referirse al estado en el cual se encuentra un organismo cuando tiene que hacer frente a perturbaciones que amenazan su homeostasis. Para evitar ambigüedades en la terminología, se utilizarán los términos factor de estrés o agente estresante (*stressor*) para definir las perturbaciones que se aplican a un organismo, y la respuesta al estrés (*stress response*) para definir al amplio conjunto de las respuestas necesarias para mantener o restablecer la homeostasis. De este modo, se puede definir el estrés como un estado de desequilibrio fisiológico provocado por un agente estresante, que pone en marcha las respuestas de estrés (Lacoste, 2001). Por tanto, el estrés es la condición en la que el equilibrio dinámico del organismo animal, la homeostasis, es perturbado o amenazado como consecuencia de la acción de estímulos externos o internos, los denominados agentes estresantes (Chrousos y Gold, 1992).

Dependiendo de su intensidad y duración el estrés puede clasificarse en agudo y crónico: i) el estrés agudo o letal se produce como respuesta a perturbaciones de corta duración, como por ejemplo cambios radicales en los factores ambientales, y ii) el estrés crónico o subletal, es la consecuencia de exposiciones continuas o periódicas a bajos niveles de agentes causantes de estrés (Ocampo y Camberos, 1999). No obstante, no todos los estímulos estresantes son perjudiciales para el animal, si no todo lo contrario. En muchos casos estímulos estresantes, como pueden ser el hambre y/o la sed, son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y por tanto de la supervivencia (Breazile, 1988). Según este autor se pueden identificar tres grados de estrés (factores de estrés): i) el euestrés, se asocia a los estímulos que no son perjudiciales y que inician respuestas beneficiosas para el animal, necesarias para mantener su homeostasis, ii) el neutralestés, se asocia a estímulos que no son dañinos por si mismos y que inician una serie de respuestas neutras, ni dañinas ni beneficiosas para el animal. Son estímulos que dan origen a

respuestas fisiológicas o bioquímicas situadas dentro de los límites normales de variación, y iii) el disestrés, se asocia a estímulos que pueden ser o no ser dañinos por sí mismos, pero que llegan a producir respuestas que alteran el equilibrio fisiológico o el comportamiento del animal. Las respuestas a este tipo de estímulos tienen la capacidad de producir alteraciones endocrinológicas, neurológicas y patológicas en órganos y tejidos, contribuyendo a los procesos patogénicos de las enfermedades. La amplificación (intensidad y duración) de los estímulos identificados como eustrés, puede llevar a convertirlos en estímulos identificados como disestrés.

Tanto en la naturaleza como en condiciones artificiales, como puede ser la acuicultura, los peces están continuamente expuestos y sometidos a múltiples agentes estresantes. Concretamente en la acuicultura, donde se trata de reproducir artificialmente las condiciones de la naturaleza, los cambios fisiológicos que ocurren en respuesta a las nuevas condiciones pueden provocar estrés y como consecuencia una disminución en el rendimiento del animal. Por esta razón, el estrés es uno de los problemas más importantes que afectan a la producción piscícola, dado que en la acuicultura intensiva son muchas las prácticas o factores que pueden ocasionarlo: la manipulación, selección, transporte y vacunación (Strange et al., 1977; Pickering et al., 1982; Thomas y Robertson, 1991; Iwama et al., 2004a), el ambiente (Smart, 1981; Pickering, 1993; Roche y Bogé, 1996), la densidad del cultivo/confinamiento (Vijayan y Leatherland, 1990; Montero et al., 1999; Binuramesh et al., 2005). El estrés provocado por estas prácticas o por otros factores, induce una serie de respuestas fisiológicas en los peces, que normalmente involucran a todos los niveles de la organización animal, y que son colectivamente llamadas respuestas integradas del estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Generalmente el estrés no va a ocasionar la muerte del pez, pero sí va a incidir negativamente en diferentes aspectos de su biología como el crecimiento, la reproducción o el sistema inmunitario (Sánchez-Muros y Gómez-Milán, 2001).

De un modo general, las respuestas de los peces al estrés son similares a las observadas en los mamíferos (Barton e Iwama, 1991). No obstante, en los peces existen aspectos diferenciales como pueden ser el tiempo de las respuestas y/o la influencia de parámetros medioambientales como la temperatura (Flores Quintana, 2002).

De un modo resumido, los mecanismos a través de los cuales los agentes estresantes inducen una respuesta están mediados fundamentalmente por la activación del sistema simpático-células cromafines y del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HHI), con la consiguiente liberación de las hormonas, catecolaminas y cortisol, respectivamente.

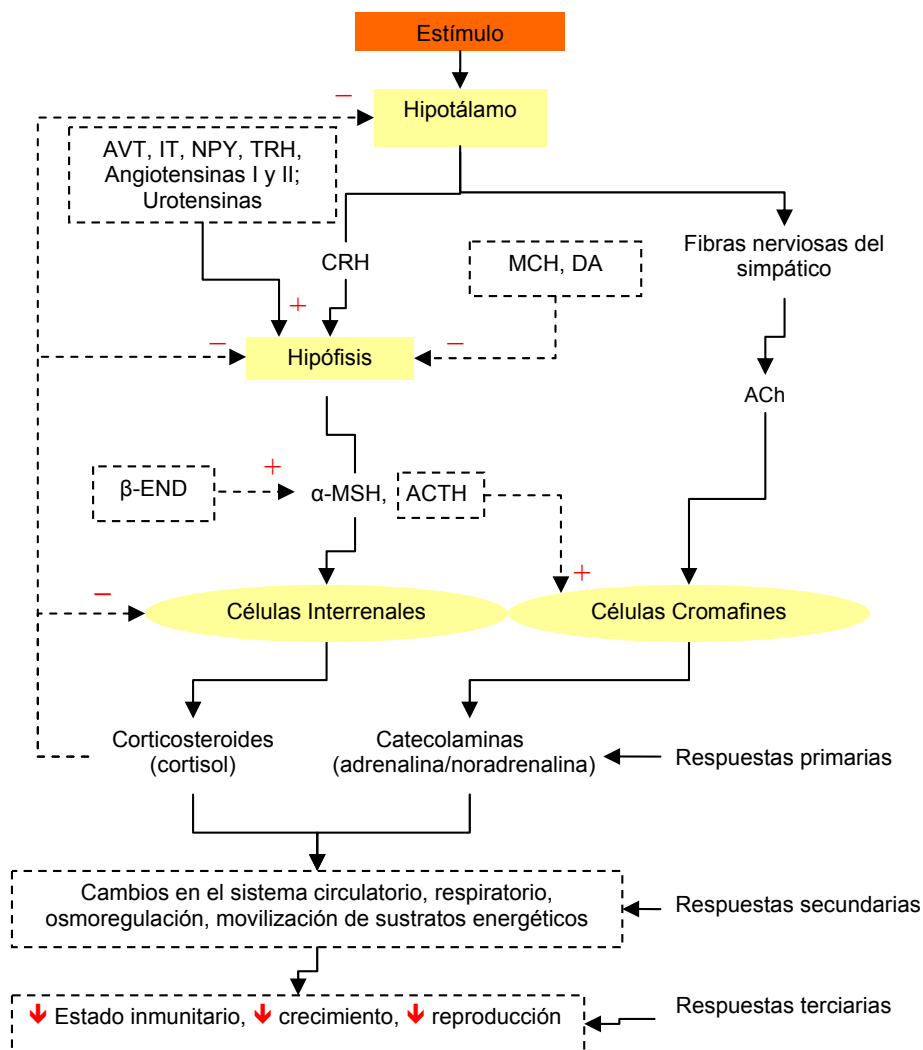
### **Agentes causantes de estrés**

Los distintos tipos de agentes causantes de estrés a los que pueden estar sometidos los peces en su medio natural se podrían resumir en los siguientes apartados: i) agentes estresantes físicos que inciden directamente sobre los peces. Los más importantes son la temperatura, la concentración de oxígeno y el pH del agua, ii) los estresantes sociales, como la migración o el cortejo reproductivo, iii) los agentes estresantes físicos que no implican contacto, como la visión, el sonido, o sustancias químicas provenientes del agente estresante (ej. un depredador) y iv) las señales de alarma que proceden de peces estresados (por agentes estresantes de tipo i o ii). Por ejemplo, se sabe que diversas sustancias de alarma producidas por un pez en respuesta a la presencia de un depredador, actúan sobre conoespecíficos que no perciben directamente a dicho depredador (Moreira y Volpato, 2004).

No obstante, cuando hablamos de animales en cultivo, es conveniente redefinir ligeramente esta amplia relación de agentes causantes de estrés que son inherentes a la propia biología y medioambiente del animal, y así también cabe citar a: i) las condiciones de cultivo no adecuadas, tanto en el aspecto de las características físico-químicas del agua, como en el ambiente biológico (densidad, relaciones sociales, etc.), ii) la calidad de las aguas desde el punto de vista de la presencia de contaminantes, iii) el manejo y manipulación de los animales que tienen lugar en las múltiples prácticas del cultivo y iv) Una alimentación inadecuada (Sánchez-Muros y Gómez-Milán, 2001).

### **Respuestas fisiológicas al estrés**

Una vez que los estímulos estresantes han comprometido la homeostasis del animal, éste reacciona con una serie de respuestas de adaptación que le permitirán enfrentarse a las alteraciones de su equilibrio interno y así poder mantener o recuperar su homeostasis. Si esto no fuera posible tendría lugar una inadaptación que comprometería su rendimiento y supervivencia. Este conjunto de respuestas presentan una serie de características comunes: transcurren de un modo secuencial y están reguladas conjuntamente por el sistema nervioso y el sistema endocrino (Schreck et al., 2001). La activación inicial de estos dos sistemas da lugar a la liberación de las hormonas del estrés (las catecolaminas y el cortisol), que actuarán para atenuar los efectos del mismo. Por conveniencia las respuestas al estrés han sido clasificadas en primarias, secundarias y terciarias (Mazeaud et al., 1977; Wedemeyer et al., 1981,1990) (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama con los principales componentes neuroendocrinos de las respuestas integradas de estrés. Acetilcolina (ACh), hormona liberadora de corticotrofina (CRH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH), neuropéptido Y (NPY), hormona concentradora de melanina (MCH), dopamina (DA), hormona liberadora de la tirotrófina (TRH), hormona estimuladora de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH), arginina vasotocina (AVT), isotocina (IT),  $\beta$ -endorfina ( $\beta$ -END), afecta negativamente ( $\downarrow$ ), estímulo negativo ( $-$ ), estímulo positivo ( $+$ ).

Las respuestas primarias o de alarma implican inicialmente la percepción de un estímulo estresante. Son de naturaleza neuroendocrina y conllevan la liberación de las catecolaminas y glucocorticoides (cortisol) a la circulación (Wendelaar Bonga, 1997; Reid et al., 1998; Barton, 2002). Dentro de las respuestas primarias hay una primera fase de actuación inmediata con la activación del eje sistema nervioso simpático-células cromafines y la liberación de catecolaminas. La segunda fase es más retardada y se asocia con la activación del eje hipotálamo-

hipófisis-interrenal (HHI) y la liberación de cortisol desde las células interrenales (Donaldson, 1981; Sumpter, 1997; Schreck et al., 2001).

Las respuestas secundarias son la consecuencia directa de la liberación de las catecolaminas y el cortisol, reflejando las alteraciones inducidas por estas hormonas en los diferentes órganos del pez. Los cambios promovidos por estas hormonas se podrían resumir en dos aspectos fundamentales: i) en los cambios que tienen lugar en el sistema circulatorio, respiratorio y en la osmorregulación, y ii) en la movilización de los sustratos energéticos. Además de estas alteraciones también tienen lugar cambios en la secreción de diversas hormonas (hipofisarias y tiroideas) y en la actividad de diversos sistemas de neurotransmisión cerebral, como el serotoninérgico y el dopaminérgico (Mazeaud y Mazeaud, 1981; Mommsen et al., 1999; FSBI, 2002; Barton, 2002).

Las respuestas terciarias surgen como una consecuencia de mantener crónicamente los cambios que tienen lugar durante las respuestas secundarias. Cuando la acción de algunos agentes estresantes es prolongada o repetitiva (situación que puede tener lugar en los cultivos intensivos) existe una constante perturbación de la homeostasis. Esta perturbación es la que finalmente puede producir una disminución del rendimiento animal que afecta negativamente a la reproducción, al crecimiento y al estado inmunitario, pudiendo llegar a disminuir sus probabilidades de supervivencia. Estas respuestas terciarias se reflejan tanto a nivel individual como de la población (Wedemeyer et al., 1990; Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

Finalmente indicar, que no se puede hablar de respuestas uniformes y estereotipadas, dado que diferentes tipos de estrés pueden generar diferentes respuestas, muchas veces no comparables. Además hay que tener en cuenta que el sistema nervioso central (SNC) puede responder de diferentes maneras, incluso frente a un mismo tipo de estímulo, dependiendo de las condiciones ambientales, el estado nutricional, la etapa de desarrollo o el estado reproductivo en el que se encuentra el animal (Flores Quintana, 2002; Guerriero y Ciarcia, 2006).

### **Respuestas al estrés a nivel celular**

Además de las respuestas fisiológicas al estrés ya indicadas, también se producen respuestas a nivel celular. Una característica común de estas respuestas es el incremento en la síntesis de algunas proteínas, denominadas proteínas de estrés. Entre ellas se encuentran las metalotioneínas, las proteínas hemo-oxigenadas, las proteínas de fase aguda (*acute phase protein*) y las proteínas de choque térmico HSPs (*heat shock proteins*), siendo estas últimas las más estudiadas. En los peces las HSPs ya se expresan desde los primeros estadios larvales del desarrollo, aunque su capacidad de inducción puede variar de acuerdo con la especie, tejido, estadio de desarrollo, el tipo de proteína HSP, las



condiciones de cultivo, la estación y el factor de estrés (Deane y Woo, 2003; Iwama et al., 2004b; Solé et al., 2004).

Algunas HSPs pueden ser inducidas por el estrés, y estas responden a una gran variedad de factores. Así por ejemplo, se ha observado que en los peces expuestos a una hipertermia se incrementan los niveles de las diferentes familias de proteínas HSPs (Iwama et al., 2004b). Estos incrementos mejoraran la termotolerancia a posteriores exposiciones a temperaturas elevadas (Thomas, 1990), protegiendo de este modo a los animales contra las consecuencias citotóxicas de la desnaturalización (Zarate y Bradley, 2003). También, se sabe que una amplia variedad de factores estresantes abióticos (estrés osmótico, metales pesados, efluentes industriales, pesticidas e hidrocarburos aromáticos) y bióticos (presencia de depredadores y exposición a organismos patógenos) pueden inducir un incremento en la expresión de las proteínas de choque térmico (Iwama et al., 1998; Feder y Hofmann, 1999; Basu et al., 2002). Por esta razón se ha sugerido que estas proteínas podrían ser usadas como biomarcadores de estrés ambiental en peces (Iwama et al., 1999). No obstante, existen trabajos que no permiten generalizar esta posibilidad. Se ha observado que diferentes tipos de estrés ligados al cultivo de peces, como el estrés de manipulación en *Oncorhynchus mykiss* (Vijayan et al., 1997b; Washburn et al., 2002) o la exposición a anestésicos, formalina, hipoxia, hiperoxia, estrés de captura, estrés de aglomeración, ayuno o estrés por disminución de temperatura en *Salmo salar* (Zarate y Bradley, 2003), no afectan a la expresión de las HSP60, HSP70, HSP90 musculares, branquiales, hepáticas y del corazón, o de las HSP30, HSP70, HSP90 branquiales, respectivamente. Igualmente se ha observado que en el *Trematurus bernacchii*, un teleosteo estenotérmico antártico, el estrés térmico no fue capaz de inducir las HSP70 (Hofmann et al., 2000). En resumen se puede indicar que hasta el momento no existen suficientes datos que nos permitan generalizar el uso de HSPs como marcadores de estrés en los peces (Feder y Hofmann, 1999; Iwama et al., 2004b).

### **Eje hipotálamo-simpático-células cromafines**

En los peces, al igual que en los mamíferos, la secreción de las catecolaminas hacia la circulación sanguínea es una respuesta inmediata al estrés agudo (Reid et al., 1998), de modo que el incremento de sus niveles en sangre tiene lugar muy rápidamente (Mazeaud y Mazeaud, 1981), mucho más que para el cortisol (Barton e Iwama, 1991; Barton, 2002). Situaciones de estrés como pueden ser la hipoxia, manipulación, captura, transporte o estrés térmico provocan un rápido incremento de las catecolaminas en la sangre (Mazeaud et al., 1977). Su acción hiperglucemiante tendrá como misión la de preparar al organismo frente a un aumento de la demanda energética, que será necesaria para el mantenimiento de las funciones vitales. Para ello incrementará la movilización de la glucosa, a través de la estimulación de la glucógenolisis y de la gluconeogénesis, desde sus depósitos de reserva hepáticos (Iwama et al., 2004a).

En los peces teleósteos las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) se sintetizan en el tejido cromafín que se encuentra disperso, en grupos celulares o individualmente, en la zona cefálica del riñón (Perry et al., 1991; Reid et al., 1996,1998), particularmente revistiendo las paredes de los principales vasos (Mazeaud y Mazeaud, 1981). Su liberación desde las células cromafines se encuentra bajo el control del sistema nervioso simpático, estando por tanto inervadas estas células por fibras colinérgicas preganglionares. Su estimulación induce la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh), que al actuar sobre los receptores colinérgicos (nicotínicos y muscarínicos) presentes en la membrana de las células cromafines inducen la liberación de las catecolaminas a la sangre (Mazeaud y Mazeaud, 1981; Perry et al., 1991). No obstante en la trucha arco iris, tanto la ACTH, como la serotonina (5HT) y otros mediadores también pueden estar implicados en el control de la secreción de catecolaminas (Reid et al., 1998; Tubio et al., 2002).

En el hígado de diferentes especies de peces se ha demostrado que el efecto hiperglucémico de las catecolaminas es el resultado final de su acción sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, aunque hay estudios que señalan también la presencia de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos mediando su acción (Wendelaar Bonga, 1997). Durante el estrés crónico el papel de las catecolaminas en la homeostasis de la glucosa no parece ser tan evidente, y en este caso, el incremento de los niveles de glucosa parece ser dependiente de la acción del cortisol (Pankhurst y Van der Kraak, 1997).

### **Eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HHI)**

La activación del eje HHI forma parte integral de las respuestas primarias al estrés en peces. Frente a un estímulo estresante agudo los niveles plasmáticos de la ACTH se incrementan en pocos minutos, provocando una rápida elevación de los niveles circulantes del cortisol, que persisten durante horas. Sus niveles basales se suelen recuperar hacia las 24 horas. Por el contrario, cuando un pez es sometido a un estrés crónico los niveles del cortisol permanecen elevados durante días o semanas, aunque bajo condiciones de estrés muy continuado los niveles del cortisol pueden llegar a retornar hacia valores normales.

El eje HHI es quien controla la secreción del cortisol desde las células interrenales (Donaldson, 1981), células que se encuentran dispersas en la región cefálica del riñón en estrecha proximidad con las células cromafines (Reid et al., 1996). La regulación de la secreción del cortisol comienza con la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de la corticotrofina (CRH) que controla mayoritariamente la secreción hipofisaria de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Una vez que la ACTH es liberada hacia el torrente sanguíneo llega hasta las células interrenales donde su principal función va a ser la de controlar la síntesis y secreción del cortisol (Mommsen et al., 1999). No obstante, en el control de la secreción hipofisaria de la ACTH también pueden intervenir otras

substancias. Por un lado la arginina vasotocina (AVT), la isotocina (IT), las angiotensinas I y II, las urotensinas y el neuropeptido Y (NPY) con una modulación positiva (Fryer, 1989; Pierson et al., 1996; Kelsall y Balment, 1998; Gilchrist et al., 2000). Por otro lado encontramos la hormona concentradora de la melanina (MCH) (Green et al., 1991; Gilchrist et al., 2001) y la dopamina (DA) (Olivereau et al., 1988; Flik et al., 2006) con una modulación negativa. También se ha indicado que un ligero bloqueo dopaminérgico de las células productoras de ACTH es fundamental en el papel estimulador de la CRH (Flik et al., 2006).

En los teleósteos el control de la secreción del cortisol es aún más complejo dado que, a parte del control hipofisario por parte de la ACTH, la hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) también estimula su secreción. Además en ambos casos la  $\beta$ -endorfina puede actuar como un factor potenciador de sus acciones. A su vez, la secreción hipofisaria de la  $\alpha$ -MSH se encuentra bajo un doble control hipotalámico: i) positivo por parte de la TRH, el NPY y la CRH, y ii) negativo por parte de la MCH y de altas concentraciones de DA (Wendelaar Bonga, 1997; Sumpter, 1997).

Por último, el cortisol circulante, el corticosteroide más abundante y activo en la sangre de los peces (Van der Boon et al., 1991; Guerriero y Ciarcia, 2006), puede actuar sobre el hipotálamo, la hipófisis o la propia glándula interrenal. A través de una retroalimentación negativa, el cortisol circulante puede modular la secreción de la ACTH y de la  $\alpha$ -MSH, y consecuentemente su síntesis y secreción (Van der Boon et al., 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999). Existen estudios que demuestran que a nivel hipotalámico el cortisol reduce los niveles del mRNA de la CRH en *Carassius auratus* (Bernier et al., 1999, 2004), y de la CRH y del mRNA del NPY en *Oncorhynchus mykiss* (Doyon et al., 2006).

Entre un 30 y un 55% del cortisol secretado a la sangre desde el tejido interrenal se encuentra ligado reversiblemente a una glucoproteína ( $\alpha$ -globulina) plasmática, siendo sólo la fracción libre del cortisol la que es fisiológicamente activa. De este modo, las alteraciones de la concentración de estas  $\alpha$ -globulinas pueden controlar indirectamente la concentración del cortisol libre en sangre. Además la unión a dicha glucoproteína protege al cortisol de su inactivación en el hígado (Van der Boon et al., 1991; Mommsen et al., 1999). Una vez que el cortisol libre penetra en las células diana se une a un receptor nuclear. A continuación el complejo cortisol-receptor se unirá a una diana molecular del DNA, modulando la transcripción génica de RNA mensajeros específicos. La inducción de esta síntesis de RNAs mensajeros tiene como consecuencia la síntesis de muchas clases de enzimas, que finalmente determinarán el efecto de la hormona (Van der Boon et al., 1991). En los peces, el hígado, las branquias, y el intestino, son importantes tejidos diana sobre los que va a actuar el cortisol. En circunstancias de estrés crónico con unos niveles elevados de cortisol durante días o semanas, se detectaron variaciones de los mecanismos de aclaramiento

plasmático y una disminución del número de receptores para el cortisol (Pickering, 1990).

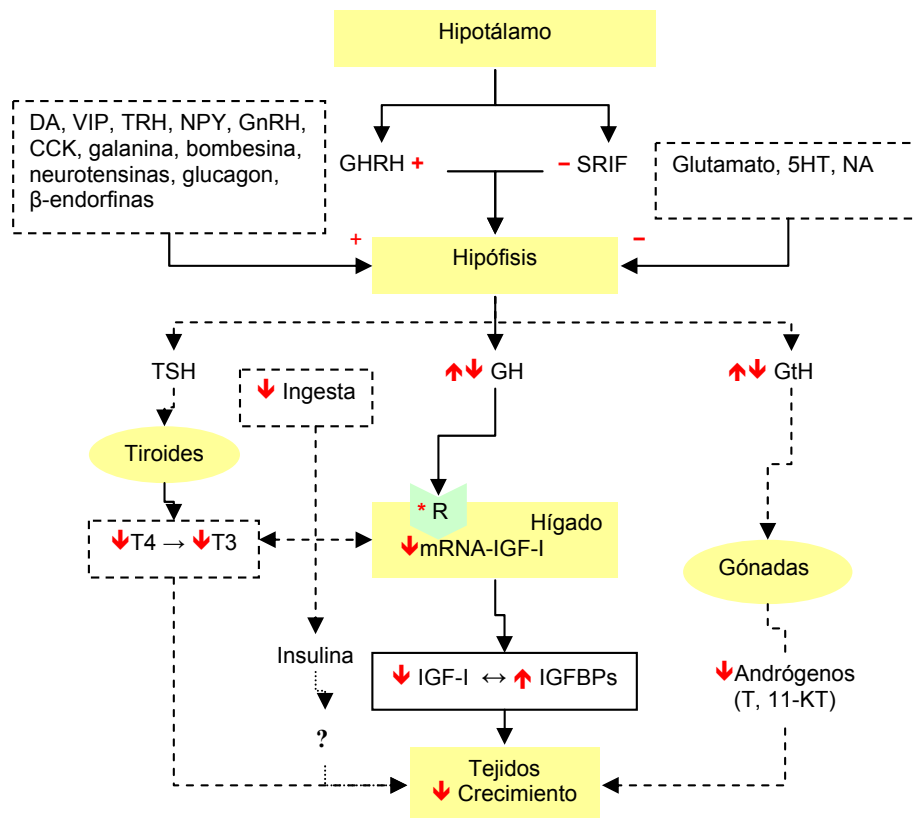
La magnitud de la liberación del cortisol puede variar ampliamente dependiendo de diversas circunstancias, como pueden ser: el tipo de estrés (Donaldson, 1981), la especie (Pickering y Pottinger, 1989), el ritmo diario (Spieler, 1979), la estación y/o el grado de madurez sexual (Pickering y Christie, 1981). En cualquier caso, la estima de sus niveles plasmáticos es uno de los indicadores de estrés más ampliamente utilizados en los peces (Mommsen et al., 1999).

En los peces se puede decir que el cortisol opera generalmente como una hormona hiperglicémica. Para ello, estimula la movilización de los aminoácidos plasmáticos (inhibe la síntesis y estimula el catabolismo de las proteínas) y su conversión a glucosa a través de la gluconeogénesis. En algunas circunstancias también se puede hacer uso del lactato y del glicerol como sustratos gluconeogénicos (Van der Boon et al., 1991; Mommsen et al., 1999). El cortisol incrementa la tasa gluconeogénica hepática al estimular la actividad de las enzimas claves como la glucosa 6-fosfatasa, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la fructosa 1,6 bisfosfatasa. No obstante, la exposición a niveles elevados de cortisol no siempre se traduce en una hiperglucemia, dado que también se han detectado casos en los que puede disminuir o no producir ningún efecto sobre los niveles de la glucosa plasmática y del glucógeno hepático (Mommsen et al., 1999; De Boeck et al., 2001). Según ciertos autores la ausencia de efectos sobre la glucemia podría ser el resultado de su elevada utilización (Mommsen et al., 1999); mientras que para otros autores los efectos hiperglicémicos del cortisol podrían justificarse por su baja utilización en los tejidos periféricos (Van der Boon et al., 1991).

### **Crecimiento y estrés**

En los peces una de las consecuencias típicas del estrés es la reducción de la tasa del crecimiento. Se sabe que cuando la acción del estímulo estresante es duradera y supera la capacidad de adaptación del animal, la energía disponible para el crecimiento deriva casi en su totalidad hacia la restauración del equilibrio homeostático (Pickering, 1990; Pankhurst y Van der Kraak, 1997).

La regulación del crecimiento somático y de los fenómenos metabólicos asociados, se encuentra bajo el control de múltiples sistemas endocrinos (Sumpter, 1992). En los peces las hormonas que influyen en el crecimiento se pueden dividir en dos grandes grupos, el de las hormonas anabólicas (la GH -hormona del crecimiento-, los esteroides gonadales, las hormonas tiroideas y la insulina) y el de las hormonas catabólicas (el cortisol y las catecolaminas) (Pickering, 1990; Pankhurst y Van der Kraak, 1997) (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama simplificado del eje endocrino regulador del crecimiento en el que se ubican los posibles niveles de acción supresora del cortisol. Serotonina (5HT), noradrenalina (NA), hormona del crecimiento (GH), somatostatina (SRIF), Hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), gonadotropina (GtH), tiroxina (T4), triyodotironina (T3), testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT), proteínas transportadoras del factor de crecimiento insulínico (IGFBPs), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), dopamina (DA), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de tirotrófina (TRH), neuropeptido Y (NPY), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), colecistoquinina (CCK), estímulo negativo (-), estímulo positivo (+), disminución (↓) y aumento (↑) de los niveles, receptor de la hormona del crecimiento (R), disminución de la sensibilidad de los receptores de la hormona del crecimiento (\*).

La hormona del crecimiento (GH) es sintetizada en las células somatotropas de la adenohipófisis (Mommson, 2001; Björnsson et al., 2002) y su regulación se encuentra bajo un control estimulador por parte de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y de uno inhibitor por parte de la somatostatina (SRIF) (Pankhurst y Van der Kraak, 1997; Björnsson et al., 2002). No obstante, además de este control, la liberación de la GH también se encuentra bajo la acción moduladora mediada por numerosos factores estimulantes como la

DA, galanina, bombesina, neurotensinas, glucagon,  $\beta$ -endorfinas, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de tirotrófina (TRH), el neuropeptido Y (NPY), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la colecistoquinina (CCK), o inhibidores como el glutamato, serotonina o la noradrenalina (Janz y Weber, 2000; Flores Quintana, 2002). Una vez liberada, la función primaria de la GH es la de promover el crecimiento somático directa o indirectamente. Mayoritariamente su efecto lo ejerce de un modo indirecto al estimular la síntesis hepática de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I o IGF-II) y su liberación hacia los tejidos, donde promoverán el crecimiento y la diferenciación celular (Duan, 1997; Janz y Weber, 2000; Mommsen, 2001; Arsenault et al., 2004).

En peces sometidos a diferentes situaciones de estrés existe una clara alteración de los niveles de la GH. En condiciones de estrés agudo se han indicado tanto aumentos en *Carassius auratus* y *Oncorhynchus mykiss* (Cook y Peter, 1984; Takahashi et al., 1991), como disminuciones en *Oncorhynchus mykiss* y *Oreochromis niloticus*, de los niveles circulantes de GH (Pickering, 1990; Pickering et al., 1991; Farbridge y Leatherland, 1992; Auperin et al., 1997). Con respecto a unas condiciones de estrés crónico la respuesta más común parece ser un incremento de los niveles de la GH (Pickering, 1990; Pickering et al., 1991). Cuando se relacionan estos dos parámetros, estrés y GH, con la tasa de crecimiento, existe bastante uniformidad en los resultados. Así se ha observado que tanto en *Oncorhynchus mykiss* como en *Salmo salar* sometidos a condiciones de estrés, agudo o crónico, se encontraron niveles elevados de la GH plasmática y una disminución en la tasa de crecimiento (Pickering et al., 1991; McCormick et al., 1998).

Parece evidente que parte del efecto inhibitor del estrés sobre el crecimiento esta mediado a través de la acción del cortisol sobre el eje GH-IGF. Se ha observado que el cortisol disminuye la expresión hepática del mRNA-IGF-I y de los niveles plasmáticos de la IGF-I, lo que parece indicar que el cortisol ejerce una acción desensibilizadora de los receptores hepáticos de la GH (Thissen et al., 1994, 1999; Kajimura et al., 2003; Pierce et al., 2005). Además de estos efectos directos del cortisol, hay que considerar un posible efecto secundario mediado por la inhibición de la ingesta, dado que tanto la caída de los niveles del IGF-I como la de la tasa de crecimiento se han relacionado con una inhibición de ésta (Moriyama et al., 1994; Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999; Aas-Hansen et al., 2003). Aunque en los últimos años surgieron algunos trabajos que contradicen la relación negativa entre estrés e ingesta (Bernier et al., 2004; Liebert y Schreck, 2006), la inhibición de la ingesta es una de las respuestas más típicas de los peces sometidos a condiciones de estrés (Wendelaar Bonga, 1997; Schreck et al., 1997).

Entre las otras hormonas anabólicas sobre las que puede actuar el estrés y/o el cortisol para inhibir el crecimiento citaremos inicialmente las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Estas hormonas modulan positivamente la

secreción de GH y la respuesta celular a los IGFs (Sumpter, 1992), por lo que las modificaciones de sus niveles circulantes pueden alterar el crecimiento (Pickering, 1990, 1993; Pankhurst y Van der Kraak, 1997). De un modo general se ha observado que el estrés o el tratamiento con cortisol disminuyen los niveles de T4 y/o T3 en diferentes especies de peces (Brown et al., 1984; Redding et al., 1986; Brown et al., 1989; Vijayan y Leatherland, 1989; Vijayan et al., 1990; Brown et al., 1991). El origen de parte de estos efectos puede ser el hecho de que el cortisol aumenta la actividad de los mecanismos de eliminación plasmática de la T3 (Brown et al., 1991). No obstante y dado que el ayuno disminuye la producción de hormonas tiroideas (Higgs et al., 1982), la disminución de sus niveles también podría ser, en parte, consecuencia de la inhibición de la ingesta inducida por el estrés. Las otras hormonas anabólicas a tratar son los esteroides gonadales, fundamentalmente los andrógenos (testosterona y 11-cetotestosterona), que tienen un potente efecto promotor del crecimiento principalmente durante la fase inicial de la maduración sexual (Pickering, 1990; Sumpter, 1992; Wendelaar Bonga, 1997). Este efecto positivo de los andrógenos es suprimido como consecuencia del efecto inhibitor del estrés sobre la reproducción (Pankhurst y Van der Kraak, 1997). Finalmente, también se ha indicado que la acción inhibitor del cortisol sobre el crecimiento puede ser consecuencia de sus efectos sobre los niveles plasmáticos de metabolitos que pueden actuar en el cerebro como señales inhibitoras de la ingesta, como pueden ser el incremento de los niveles de aminoácidos o de glucosa (Gregory y Wood, 1999). No obstante, estudios más recientes parecen eliminar la opción de la glucosa (Ruibal et al., 2002; Soengas y Aldegunde, 2004).

En resumen se puede indicar que la inhibición del crecimiento que se observa en condiciones de estrés es consecuencia de las acciones del cortisol en diferentes niveles. Por un lado una acción directa actuando sobre el eje GH-IGF, y por el otro, sus acciones indirectas al actuar sobre otras hormonas (tiroideas y andrógenos) promotoras del crecimiento y sobre el control de la ingesta.

## **Reproducción y estrés**

La disfunción de la reproducción es un problema común a las diferentes especies de peces sometidas a cualquier tipo de estrés. Se sabe que este puede desajustar el balance hormonal necesario para un funcionamiento correcto de la función reproductiva. Así por ejemplo, en hembras se ha comprobado la existencia de un retardo en la maduración ovocitaria, una vitelogénesis incompleta, una inhibición de la ovulación y puesta y/o una atresia folicular acelerada. En los machos también se han observado alteraciones en la reproducción tales como retardos en el desarrollo espermatogénico, inhibición de la espermiación y la presencia de esperma de baja densidad (Pankhurst y Van der Kraak, 1997; Pottinger, 1999; Zohar y Mylonas, 2001; Goos y Consten, 2002; Castranova et al., 2005). Tales efectos y su intensidad pueden variar dependiendo de la especie, del estado de maduración gonadal y de los diferentes grados de tolerancia al estrés (Schreck et al., 2001).

A pesar de la gran variedad de estrategias reproductivas de los peces y de que los conocimientos actuales surgen de los estudios desarrollados sobre unas pocas especies, todos los datos apuntan de un modo general a que la regulación hormonal de la reproducción sigue el esquema observado en otros vertebrados (Figura 4). De este modo, todos los cambios gonadales asociados a los ciclos reproductivos de los peces dependen de la acción coordinada de varias hormonas que se encuentran bajo el control del eje cerebro-hipófisis-gónadas. En un nivel superior, la reproducción se encuentra bajo un control doble: uno dominante y estimulador ejercido por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y otro inhibidor ejercido por la dopamina (DA). A su vez las gonadotropinas hipofisarias GtH-I (vitelogénica) y la GtH-II (maduracional) son las que controlan directamente la función testicular y ovárica, a nivel del desarrollo gametogénico y de la síntesis y secreción de los esteroides gonadales. Finalmente, los esteroides gonadales son capaces de regular el eje reproductivo mediante un proceso de retroalimentación negativa sobre la propia gónada, el hipotálamo y/o la hipófisis.

Actualmente se sabe que el efecto inhibidor del estrés sobre la reproducción es consecuencia de su acción sobre el funcionamiento del eje cerebro-hipófisis-gónadas. No obstante aún no están claramente definidos los niveles del eje reproductivo (hipotálamo, hipófisis o gónadas) sobre los que el estrés ejerce su efecto supresor. Aunque, al igual que en el caso del crecimiento, el cortisol también va a ser el factor principal que mediará la acción inhibidora del estrés, actuando, en este caso, de un modo negativo en prácticamente todos los niveles del eje neuroendocrino que controla la reproducción.

### **Efectos del estrés y/o cortisol sobre el hipotálamo e hipófisis**

Tal y como se ha indicado, tanto la GnRH como la DA juegan un papel primordial en la regulación de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. No obstante, solo existen algunos trabajos que, directa o indirectamente, relacionan la supresión de la síntesis y/o liberación de la GnRH con los efectos del estrés sobre la reproducción. Así se ha observado que la implantación crónica de cortisol disminuye los niveles de la GnRH hipotalámica en la carpa (*Cyprinus carpio*) (Consten et al., 2001; Goos y Consten, 2002) y que las alteraciones del estatus social, inductoras de estrés, modifican la expresión de la GnRH en machos y en hembras de *Astatotilapia burtoni* (White et al., 2002; Parikh et al., 2006). Una acción más directa se ha comprobado en la dorada (*Sparus aurata*) donde se ha demostrado que el bloqueo de la maduración ovocitaria y de la ovulación por el estrés, está asociado a la inhibición de la liberación de la GnRH (Zohar et al., 1995; Zohar y Mylonas, 2001). Esta inhibición podría estar mediada por diversos neuromoduladores (AVP, ACTH, opioides y CRH) (Flores Quintana, 2002), o neurotransmisores como la dopamina (Lepage et al., 2000; Øverli et al., 2001, 2005) y la serotonina (Mancebo et al., 2005), que se sabe controlan su liberación y están alterados durante el estrés.



A un nivel inferior, tanto una exposición crónica al estrés como tratamientos con cortisol, también pueden alterar la reproducción al disminuir los niveles de la GtH hipofisaria y/o plasmática. No obstante, hay que indicar que los trabajos que han estudiado los efectos del estrés sobre los niveles de las gonadotrofinas hipofisarias o plasmáticas han dado lugar a resultados diferentes dependiendo de múltiples variables. De un modo general, parece ser que la consecuencia de un estrés prolongado, en *Catostomus commersoni* (Stacey et al., 1984) y en la trucha arco iris (Zohar, 1980), es la caída de los niveles plasmáticos de la GtH. Sin embargo en hembras de trucha arco iris sexualmente maduras no parece ser que el estrés crónico altere los niveles plasmáticos de la GtH maduracional (Pankhurst y Van der Kraak, 2000). Por el contrario, el efecto del estrés agudo en machos de la trucha marrón (*Salmo trutta*) es un incremento de los niveles plasmáticos de la GtH (Pickering et al., 1987; Sumpter et al., 1987). Con respecto a los tratamientos con cortisol, los resultados coinciden de un modo general con lo observado después de un estrés prolongado. Tanto en la trucha marrón, como en la trucha arco iris y en la carpa, los tratamientos con cortisol inducen una caída de los niveles de la GtH hipofisaria y plasmática (Carragher et al., 1989; Consten et al., 2002) y de su secreción desde la hipófisis (Carragher y Sumpter, 1990a,1990b; Consten et al., 2001).

### **Efectos del estrés y/o cortisol sobre los esteroides gonadales**

La actividad de las gónadas femeninas está controlada principalmente por las gonadotrofinas hipofisarias (GtHs), que al actuar sobre las células de la teca inician el proceso de síntesis de las hormonas esteroideas. Durante el crecimiento ovocitario (vitelogénesis) es cuando se encuentran los niveles plasmáticos más elevados del  $17\beta$ -estradiol, la hormona encargada de inducir la síntesis hepática de la vitelogenina. La regulación de la síntesis y secreción de esta hormona esteroidea está bajo control de la GtH-I (FSH), que inicia su producción al activar la síntesis de testosterona en las células de la teca. Posteriormente esta difunde a las células de la granulosa donde es convertida a  $17\beta$ -estradiol. Finalizada la vitelogénesis los ovocitos entran en la etapa final de maduración, previa a la ovulación y puesta. Esta fase también está controlada por una gonadotrofina hipofisaria, la GtH-II (LH). Esta hormona activa la síntesis tecal de la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, que al difundir a las células de la granulosa es convertida, en la mayoría de los peces estudiados, en la  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -DP). Este esteroide actuará directamente sobre la membrana ovocitaria como factor promotor de la maduración (MPF), que finalmente desencadenará la cascada de eventos que darán lugar a la ruptura de la vesícula germinal (maduración ovocitaria) (Nagahama, 1987).

La regulación de la función testicular no está tan bien definida, pero se sabe que las gonadotrofinas hipofisarias al actuar sobre receptores situados en las células de Leydig y de Sértoli, regulan tanto la esteroidogénesis como la espermatogénesis (Schulz et al., 2001). En primer lugar parece ser que ambas

GtHs tienen la misma potencia esteroideogénica, fundamentalmente al inicio de la espermatogénesis y durante el crecimiento testicular rápido (Planas y Swanson, 1995). De un modo general se ha asociado a la GtH I con el control de la espermatogénesis, por medio de la activación de la síntesis de andrógenos (mayoritariamente la 11-cetotestosterona y testosterona) por las células de Leydig y de las funciones de las células de Sertoli. Por otra parte la GtH-II (LH) se ha asociado al control de la maduración del esperma. Este último proceso está muy probablemente mediado por la síntesis de la  $17\alpha,20\beta$ -DP a partir de la 11-cetotestosterona (11-KT) en el esperma (Nagahama, 1987; Miura et al., 1996; Sakai et al., 1996; Schulz et al., 2001; Schulz y Miura, 2002).

En la mayoría de las especies de peces estudiadas hay prácticamente unanimidad al indicar que tanto el estrés como el cortisol, inducen una caída de los niveles plasmáticos de andrógenos y estrógenos. Se ha comprobado que el estrés, agudo o crónico, en machos de la trucha marrón y arco iris (Pickering et al., 1987; Sumpter et al., 1987; Carragher et al., 1989; Campbell et al., 1994), del *Catostomus commersonii* (Van der Kraak et al., 1992), del *Acanthopagrus butcheri* (Haddy y Pankhurst, 1999), o del *Morone saxatilis* (Castranova et al., 2005), produce una caída de los niveles circulantes de testosterona (T) y 11-KT. En hembras de la trucha marrón y arco iris (Campbell et al., 1994; Pottinger y Carrick, 2000), del *Acanthopagrus butcheri* (Haddy y Pankhurst, 1999), del *Pagrus auratus* (Carragher y Pankhurst, 1991; Cleary et al., 2000) y del *Chelidonichthys kumu* (Clearwater, 1992; Clearwater y Pankhurst, 1997) se ha observado una caída de los niveles del estradiol y de la testosterona. No obstante también se ha observado que en algunas circunstancias el estrés no tiene ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de esteroides, como en el caso de hembras de la trucha arco iris y marrón (Campbell et al., 1994), o en el caso del *Acanthochromis polyacanthus* durante el verano (Pankhurst, 2001). Los efectos de la administración de cortisol sobre los niveles de esteroides circulantes son similares a los del estrés. Se han determinado caídas de los niveles de T y 11-KT en machos de la carpa (*Cyprinus carpio*) (Consten et al., 2001), de la trucha marrón y arco iris (Carragher et al., 1989) y de los niveles de T en *Oreochromis mossambicus* (Foo y Lam, 1993). Aunque también hay trabajos, en machos maduros de trucha arco iris y marrón, que indican la ausencia de un efecto del cortisol sobre los niveles de 11-KT (Carragher et al., 1989). En hembras de trucha arco iris también se han observado caídas de los niveles de T y estradiol (Pankhurst y Van der Kraak, 2000).

Se ha planteado la hipótesis de que la caída de los niveles circulantes de estradiol es consecuencia de la presencia crónica de unos niveles plasmáticos elevados de cortisol, el cual al desplazar al estradiol de su unión con las proteínas plasmáticas que se unen a los esteroides sexuales (SBP), facilitaría su metabolización y eliminación (Hobby et al., 2000).

## Efectos del estrés y/o cortisol sobre la vitelogenesis

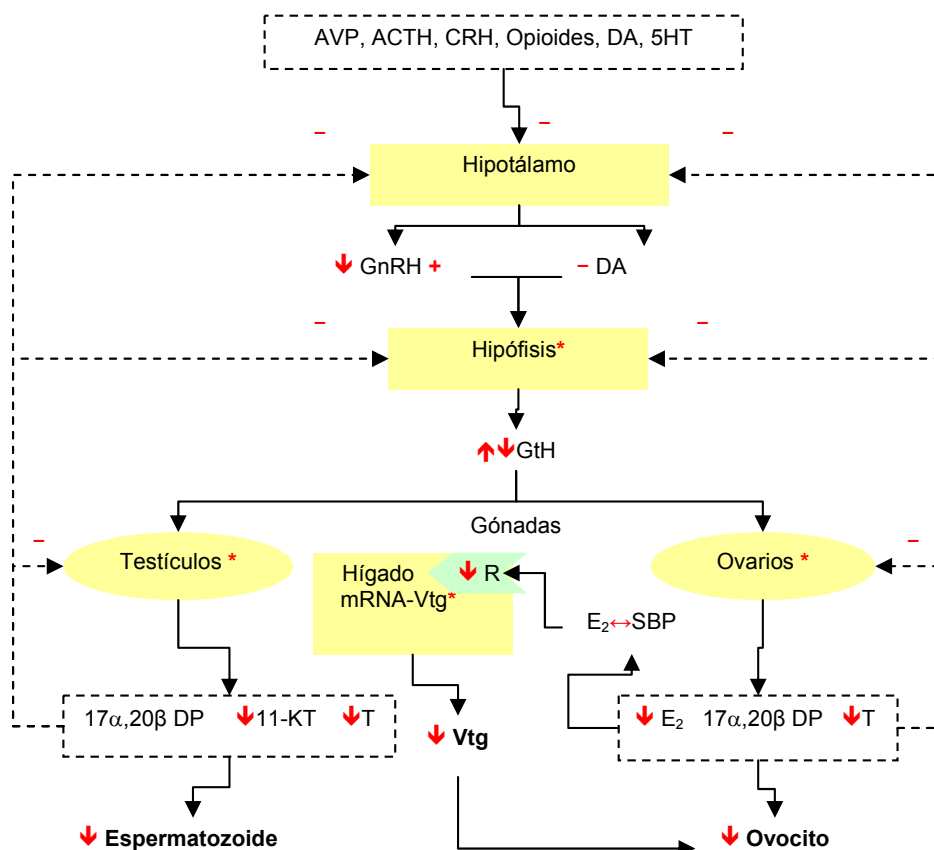
Durante la vitelogenesis tiene lugar el crecimiento ovocitario como consecuencia de la entrada de la vitelogenina (Vtg) procedente del hígado. Su síntesis se encuentra controlada hormonalmente por medio del  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (Nagahama, 1987; Tyler et al., 1988a, 1988b; Tyler y Sumpter, 1996; Wendelaar Bonga, 1997), de modo que cualquier disminución en sus niveles puede provocar una disminución en el tamaño de los ovocitos (Tyler et al., 1996).

Se sabe que el estrés y/o cortisol pueden actuar negativamente sobre la reproducción alterando la vitelogenesis (Pottinger, 1999; Lethimonier et al., 2000, 2002). Hembras de trucha marrón sometidas a un estrés de confinamiento presentaron una clara disminución en los niveles de la Vtg circulante (Campbell et al., 1994). Igualmente, la exposición de hembras maduras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a un estrés por acidificación del medio (pH 4,5) durante 20 días provocó una caída de los niveles de Vtg. No obstante tanto en la trucha arco iris como en la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) también se observó que la exposición a un medio ácido durante la reproducción no afectaba a la vitelogenesis (Tam et al., 1987, 1990; Roy et al., 1990). Con respecto a los tratamientos con cortisol también se han detectado cambios en los niveles plasmáticos de la Vtg. Hembras maduras de trucha marrón y trucha arco iris implantadas con él, presentaron una disminución en los niveles de  $E_2$  y de Vtg. No obstante en hembras inmaduras de estas mismas especies, el cortisol sólo provocó una disminución de la Vtg pero no del  $E_2$  (Carragher et al., 1989; Pottinger et al., 1991). En el *Pimephales promelas* y en el pez gato (*Heteropneustes fossilis*) el aumento del cortisol plasmático no provocó ningún aumento en los niveles circulantes de Vtg, pero sí fue capaz de potenciar la acción inductora del estradiol ( $17\alpha$ -ethinylestradiol y  $17\beta$ -estradiol) sobre la síntesis de Vtg (Sundararaj et al., 1982; Brodeur et al., 2005).

Se han planteado dos posibles mecanismos a través de los cuales el estrés podría suprimir la vitelogenesis a nivel local: i) por una acción del cortisol a nivel transcripcional, dado que se ha observado una reducción de la expresión del gen de la vitelogenina en hepatocitos de la trucha arco iris (Pottinger y Pickering, 1990; Lethimonier et al., 2000) y ii) por una acción a nivel pos-transcripcional, dado que estudios en el *Salvelinus alpinus*, el cortisol fue capaz de reducir los niveles de Vtg sin alterar los del mRNA de la Vtg (Berg et al., 2004). Además también se ha indicado que el cortisol tiene la capacidad de disminuir la expresión génica del receptor de estrógenos en los hepatocitos de la trucha arco iris (Pottinger y Pickering, 1990; Lethimonier et al., 2000).

En resumen se puede indicar que los efectos negativos del estrés sobre la reproducción también están mediados por los efectos del cortisol, en mayor o menor medida, en diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gonadas. Aunque cada vez son mayores las evidencias de su actuación a nivel hipotalámico

(GnRH) e hipofisario (GTHs), sus acciones sobre los esteroides circulantes son evidentes.



**Figura 4.** Diagrama simplificado del eje endocrino regulador de la reproducción en peces en el que se ubican los posibles niveles de acción supresora del cortisol. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); Arginina vasopresina (AVP); Serotonina (5HT); Dopamina (DA); Gonadotropina (GtH); hormona liberadora de corticotrofina (CRH); hormona adrenocorticotrófica (ACTH);  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$  DP), 11-cetotestosterona (11-KT); Testosterona (T); Receptores hepáticos de  $E_2$  (R); Proteínas plasmáticas ligadoras de esteroides (SBP); Vitelogenina (Vtg); Niveles donde el estrés y/o cortisol actúan sobre el eje reproductivo (\*), estímulo negativo (-), estímulo positivo (+), disminución (↓) y aumento (↑) de los niveles.

### Efectos del estrés y/o cortisol sobre la calidad de los gametos y progenie

Además de los efectos del estrés y/o cortisol sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, también hay que tomar en consideración las consecuencias finales de estos efectos sobre la calidad de los gametos y progenie, como pueden ser: i) la reducción en el tamaño de los ovocitos en hembras y la disminución de la cantidad de esperma en los machos (Campbell et al., 1992; Pankhurst y Van der

Kraak, 1997; Schreck et al., 2001) y ii) la disminución en la calidad de las larvas, con una baja tasa de supervivencia y una gran proporción de larvas anormales, que finalmente da lugar a una disminución en la producción de juveniles viables (Campbell et al., 1992; Morgan et al., 1999). En cualquier caso, la severidad de estos efectos está muy relacionada con múltiples variables como pueden ser: la edad y tamaño del pez, la intensidad y duración del estímulo estresante y el estadio de desarrollo gonadal sobre cual incide el estrés (Schreck et al., 2001). Así se ha visto que la aplicación de ciertos estímulos estresantes, en función de la intensidad y del estadio de maduración del pez, pueden adelantar la ovulación (Ayson, 1989; Contreras-Sánchez et al., 1998), provocar un retraso de la misma (Campbell et al., 1992), o provocar una atresia y la consiguiente reabsorción (Billard et al., 1981; Clearwater y Pankhurst, 1997; Schreck et al., 2001).

### **Efectos del estrés sobre los neurotransmisores monoaminérgicos**

Se ha visto en mamíferos, que durante el estrés, se activan los sistemas serotoninérgicos, colinérgicos y catecolaminérgicos (Winberg y Nilsson, 1993). En los peces parece ocurrir lo mismo, especialmente en el caso de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico. Estos incrementos de actividad se reflejan en incrementos en los niveles cerebrales de los metabolitos 5HIAA y DOPAC y de las relaciones 5HIAA/5HT y DOPAC/DA (Øverli et al., 2001; Lepage et al., 2002). Estos cambios, además de tener efectos reguladores en los sistemas neuroendocrinos, parecen estar implicados en los cambios de comportamiento de los peces cuando se enfrentan al estrés (Øverli et al., 2005).

## **1.3. ANESTÉSICOS Y ACUICULTURA**

Los anestésicos son agentes físicos o químicos, que con el aumento del tiempo de exposición o de la concentración, primero sedan el animal y después causan la pérdida progresiva de la movilidad, equilibrio y conciencia, para finalmente bloquear las acciones reflejas (Summerfelt y Smith, 1990).

El uso de la anestesia en peces es deseable y/o imprescindible en muchas ocasiones como puede ser en el caso de intervenciones quirúrgicas, permitiendo una mayor duración de los procedimientos quirúrgicos y evitando el dolor e incomodidad para el animal (Bastos-Ramos et al., 1998). Durante el transporte, en la pesca y acuicultura, reduciendo la actividad de los peces y así disminuyendo el consumo de oxígeno y el estrés (Marking y Meyer, 1985; Summerfelt y Smith, 1990). Finalmente, el uso de una sobredosis también puede ser utilizado como medio ético para provocar la eutanasia en peces (Brown, 1992; Kreinberg, 2000). Por otra parte, tal y como se ha comentado previamente, en la acuicultura el estrés puede tener un fuerte impacto negativo aumentando la susceptibilidad a las enfermedades, inhibiendo el crecimiento y afectando negativamente la reproducción. Por esto, el uso de los anestésicos durante las típicas

manipulaciones de rutina (durante los pesajes, mediciones, marcaciones, selección de reproductores, vacunación y muestreo) se hace necesario, no solo para evitar y reducir los daños físicos, sino también para minimizar el estrés (Cho y Heath, 2000).

La elección de un anestésico no depende solo de consideraciones tales como: la disponibilidad, costo, facilidad de uso, la seguridad del manipulador o la naturaleza del trabajo (Cho y Heath, 2000; Pirhonen y Schreck, 2003), sino también de su eficacia. En acuicultura, la eficacia de un anestésico viene definida por su capacidad de inmovilizar al pez, permitiendo su manipulación para llevar a cabo los trabajos de rutina específicos del cultivo (Gilderhus y Marking, 1987; Burka et al., 1997). La eficacia depende de factores biológicos (especie, tamaño, peso o estadio de desarrollo reproductivo) y ambientales (temperatura, pH y salinidad del agua) (Burka et al., 1997; Ross y Ross, 1999); todos ellos deben ser considerados antes de hacer uso de un agente anestésico.

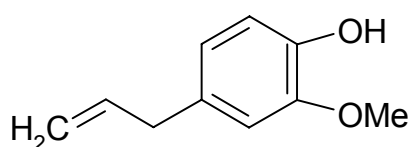
En relación con lo comentado en el párrafo anterior, Marking y Meyer (1985) describieron una serie de características que debería cumplir el anestésico ideal: i) tener un tiempo de inducción menor de 15 min, preferiblemente menor de 3 min, ii) un corto tiempo de recuperación, 5 min o menos, iii) no ser tóxico para el pez, con gran margen de seguridad, iv) ser de fácil manipulación y no ser peligroso para el manipulador durante su uso normal, v) no tener efecto permanente sobre la fisiología y comportamiento del pez, vi) ser rápidamente metabolizado y excretado, no dejando residuos y no requiriendo tiempo de espera para el consumo, vii) que no produzca efectos acumulativos, o problemas debido a repetidas exposiciones y viii) que sea barato.

Actualmente existe un considerable número de anestésicos disponible para su uso, tanto para la acuicultura como para la investigación. Las revisiones sobre anestésicos en peces (Summerfelt y Smith, 1990; Brown, 1992; Burka et al., 1997; Ross y Ross, 1999; Kreinberg, 2000) nos informan sobre la variedad de opciones y frecuentemente sobre otros datos tales como su toxicidad, dosis y características físicas y químicas. Los de uso más habitual, según García-Gómez et al. (2002) y Coyle et al. (2004) son el MS-222, 2-fenoxietanol, metomidato, benzocaína, quinaldina, clorobutanol, Aqui-S<sup>®</sup> y aceite de clavo. En este trabajo nos centraremos en cuatro de los más utilizados, que se describirán con más profundidad a continuación.

No obstante, conviene indicar que si lo que se busca es minimizar el estrés, además de la elección correcta del anestésico, es conveniente tomar en consideración una serie de pautas antes de hacer uso del mismo: i) es recomendable que los peces sean mantenidos en ayunas 24 h antes de ser sometidos a la manipulación y anestesia, ii) el nivel de agua en los tanques de cultivo debe ser reducido para facilitar la captura de los mismos y iii) los niveles de oxígeno deben ser siempre adecuados.

## El aceite de clavo

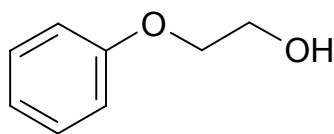
El aceite de clavo es una sustancia natural obtenida por destilación de las partes herbáceas del árbol del clavo (*Eugenia aromatica* o *Eugenia caryophyllata*) (Mylonas et al., 2005). Su principal componente activo (70 a 90 %) es el eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) (Ross y Ross, 1999; Guenette et al., 2006) (Figura 5). Diversos trabajos confirman su eficacia como anestésico en diferentes especies de peces (Anderson et al., 1997; Keene et al., 1998; Walsh y Pease, 2002; Iversen et al., 2003; Woolsey et al., 2004; King et al., 2005; Mylonas et al., 2005; Hajek et al., 2006). Su mecanismo de acción aún está bajo investigación, aunque podría estar relacionado con la afinidad del eugenol por los receptores GABA y NMDA (Wie et al., 1997, Aoshima y Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003). Curiosamente, esta sustancia al poder ser utilizada como aditivo alimentario la hace muy interesante dado que se puede usar con una cierta tranquilidad por los manipuladores, y no requiere periodos de espera después de su exposición a los peces antes de que estos lleguen al consumo humano (Cho y Heath, 2000; García-Gómez et al., 2002).



**Figura 5.** Estructura química del Eugenol. Su peso molecular es de 164,20 g mol<sup>-1</sup>. Es el principal componente del aceite de clavo, que se presenta comercialmente en forma líquida oleosa de color amarillo pálido. Es muy poco soluble en agua y soluble en solventes orgánicos.

## El 2-Fenoxietanol

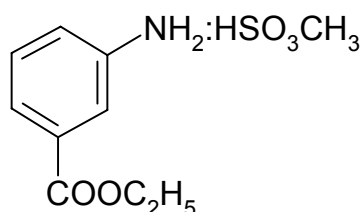
El 2-fenoxietanol (Figura 6) es uno de los agentes anestésicos más ampliamente utilizados en las investigaciones y en los cultivos de peces (Pucéat et al., 1989; Hseu et al., 1998). Es un agente anestésico que actúa en los peces como un anestésico general (Burka et al., 1997) cuyo principio activo es el etileno glicol monofenil éter (Velisek et al., 2007). Su mecanismo de acción no es bien conocido, aunque podría estar relacionado con su acción sobre las membranas de las células neuronales (Pucéat et al., 1989; Burka et al., 1997; Ortuño et al., 2002). Además de su efecto anestésico, tiene propiedades antifúngicas y antibacterianas (Ross y Ross, 1999). Incluso se ha observado, en *Sparus aurata*, que tenía cierta capacidad inmunosupresora (Ortuño et al., 2002).



**Figura 6.** Estructura química del 2-fenoxietanol. Este compuesto se presenta comercialmente en forma líquida oleosa. Es moderadamente soluble en agua ( $\leq 2,67\text{g}/100\text{ mL}$  a  $25^\circ\text{C}$ ) y muy soluble en etanol. Su peso molecular es de  $138,16\text{ g mol}^{-1}$ .

### El MS-222

El MS-222 (Figura 7), es el ácido 3-aminobenzoico etil éster metanosulfonato, cuya denominación genérica es la de tricaína. Es un agente anestésico que actúa en los peces como un anestésico general. Es rápidamente absorbido, a través de las branquias, y metabolizado (Burka et al., 1997). Su excreción tiene lugar por vía urinaria y a las 24 h sus niveles tisulares disminuyen casi a cero (Ross y Ross, 1999). Se sabe que actúa como depresor del SNC y se ha hipotetizado que su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para bloquear la transmisión nerviosa (Wang et al., 1994; Burka et al., 1997). Un aspecto negativo relacionado con su utilización es su capacidad para inducir la secreción de cortisol (Thomas y Robertson, 1991; Small, 2003).



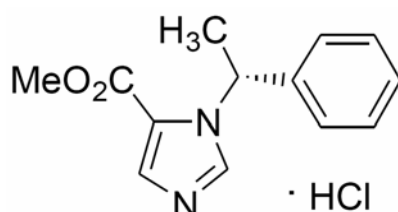
**Figura 7.** Estructura química del MS-222. Este compuesto se presenta comercialmente en forma pulverulenta (cristales de tricaína) de color blanco. Debe mantenerse alejado de la luz, a una temperatura inferior a los  $0^\circ\text{C}$  y en condiciones de desecación. Su peso molecular es de  $261,30\text{ g mol}^{-1}$ . Posee una cadena lateral sulfonada, lo que le confiere una naturaleza ácida pero al mismo tiempo altamente soluble en agua. Este anestésico es más potente en aguas templadas y de baja dureza (Ross y Ross, 1999).

### El metomidato

El metomidato (Figura 8), (DL-1-(1-fenil-etil)-5-(metoxicarbonil) imidazol clorhidrato) también conocido como marinil, methoxymol o aquacalm, es un agente anestésico hipnótico no barbitúrico (Burka et al., 1997), que induce a un profundo sueño, sin eliminar la reacción al dolor (Malmstrøm et al., 1993). El



principal beneficio que proporciona su utilización, es su capacidad para prevenir el aumento en los niveles de cortisol después de un estrés de manipulación (Thomas y Robertson, 1991; Small, 2003), posiblemente por inhibición del citocromo P450, enzima mitocondrial relacionada con la síntesis del cortisol (Vanden Bossche, 1984; Wagner et al., 1984).



**Figura 8.** Estructura química del metomidato (clorhidrato de metomidato). Este compuesto se presenta comercialmente en forma de polvo seco (cristalino) de color blanco. Su peso molecular es de 266,72 g mol<sup>-1</sup>. Puede ser almacenado por largos periodos a temperatura ambiente (20-30°C) si se mantiene seco y protegido de la luz.

#### 1.4. DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN DEL ESTRÉS

Actualmente es posible detectar y cuantificar los cambios en casi todos los elementos asociados a las respuestas primarias del estrés (Pottinger, 2008), aunque de estas el indicador más utilizado de la activación del eje HHI es la determinación de los niveles plasmáticos de cortisol (Pottinger, 2008), el cual puede ser medido por técnicas de RIA (Costas, et al., 2008) y/o ELISA (Tintos et al., 2006). Con respecto al posible uso de las catecolaminas como índices de estrés hay dos problemas; en primer lugar sus niveles circulantes se incrementan casi de inmediato después de la generación de un mínimo estrés y en segundo lugar la complejidad de su extracción desde la sangre y de su análisis (HPLC-EC), hacen que su uso este prácticamente restringido a la investigación sobre el estrés (Pottinger, 2008). En este último rango también podríamos incluir a la determinación de los niveles de neurotransmisores cerebrales (Øverli et al., 2001), los niveles sanguíneos de la ACTH (Sumpter et al., 1986), prolactina (PRL) (Pottinger et al., 1992) y somatolactina (SL) (Rand-Weaver et al., 1993) o los del mRNA de la CRH (Doyon et al., 2005).

Por el contrario los análisis de algunos de los parámetros relacionados con las respuestas secundarias son más fáciles de determinar, y por tanto de potencial uso en acuicultura. Entre ellos podríamos citar el análisis plasmático de glucosa y lactato, ambos pueden ser verificados con el empleo de kits comerciales (Aragão et al., 2008; Vijayan et al., 1997a), y la determinación de los índices hematológicos como la hemoglobina, que puede ser fácilmente determinada mediante el empleo de un kit comercial y el hematocrito mediante el método del

microhematocrito (Morales et al., 2005). Existen otras medidas pero su uso está restringido a la investigación: niveles de glucógeno hepático, niveles de enzimas metabólicas (Vijayan et al., 1997a; Trenzado et al., 2003) y niveles de aminoácidos libres en el plasma (Pinto et al., 2007).

Finalmente, cuando la situación estresante persiste y se vuelve crónica, entonces las llamadas respuestas terciarias son fácilmente visibles y detectables por un piscicultor experto: cambios en el comportamiento, disminución del crecimiento, del factor de condición, aumento en la incidencia de enfermedades (ectoparásitos, fúngicas, víricas y bacterianas) y un deterioro reproductivo.

## 1.5. AMINAS BIÓGENAS CEREBRALES

En los peces, la mayoría de los aspectos relacionados con la síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación enzimática de las aminas biógenas cerebrales son similares a aquellos de los mamíferos (Aldegunde, 1998; Hernández-Rauda, 1998).

### Las catecolaminas: dopamina y noradrenalina

Las catecolaminas cerebrales dopamina (DA) y noradrenalina (NA) están implicadas en el control o modulación de numerosos procesos fisiológicos. Distintos grupos celulares catecolaminérgicos, localizados en diferentes áreas cerebrales, están implicados en funciones de control motor, control respiratorio y cardiovascular, procesamiento de información sensorial, funciones autónomas, reproducción, respuestas al estrés o control endocrino (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). La adrenalina (A) se encuentra en concentraciones muy bajas en el cerebro de los peces teleosteos y todavía no se conoce su función a nivel de SNC (Winberg y Nilsson, 1993; De Pedro et al., 2001).

La dopamina y la noradrenalina se sintetizan a partir del aminoácido semiesencial L-tirosina (Figura 9), que puede proceder de la dieta o de la transformación del aminoácido fenilalanina en el hígado. Llega al cerebro desde la circulación sanguínea pasando la barrera hematoencefálica mediante un transportador específico de aminoácidos neutros. La L-tirosina que se encuentra en el citoplasma celular es hidroxilada al compuesto 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por acción del enzima tirosina hidroxilasa (EC 1.14.16.2, TH) utilizando como cofactores la tetrahidrobiopterina y O<sub>2</sub>. Esta enzima es la que se considera como el factor limitante en la síntesis de las catecolaminas (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). Una vez formado el L-DOPA, este es descarboxilado para formar la DA por acción de la enzima citoplasmática L-aminoácido aromático descarboxilasa (EC 4.1.1.28, L-AADC), que requiere piridoxal fosfato (vitamina B6) como cofactor. La mayor parte de la DA así formada es almacenada dentro de vesículas sinápticas principalmente en las terminales neuronales. La NA se

sintetiza en las neuronas noradrenérgicas a partir de la DA mediante la acción de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (EC 1.14.17.1, D $\beta$ H), que se encuentra asociada a las vesículas sinápticas de almacenamiento. Esta enzima requiere del ácido ascórbico, O<sub>2</sub>, y Cu<sup>+2</sup> como cofactores para llevar a cabo la reacción. La NA es almacenada de forma similar a la DA, en las terminales de las neuronas noradrenérgicas (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004).

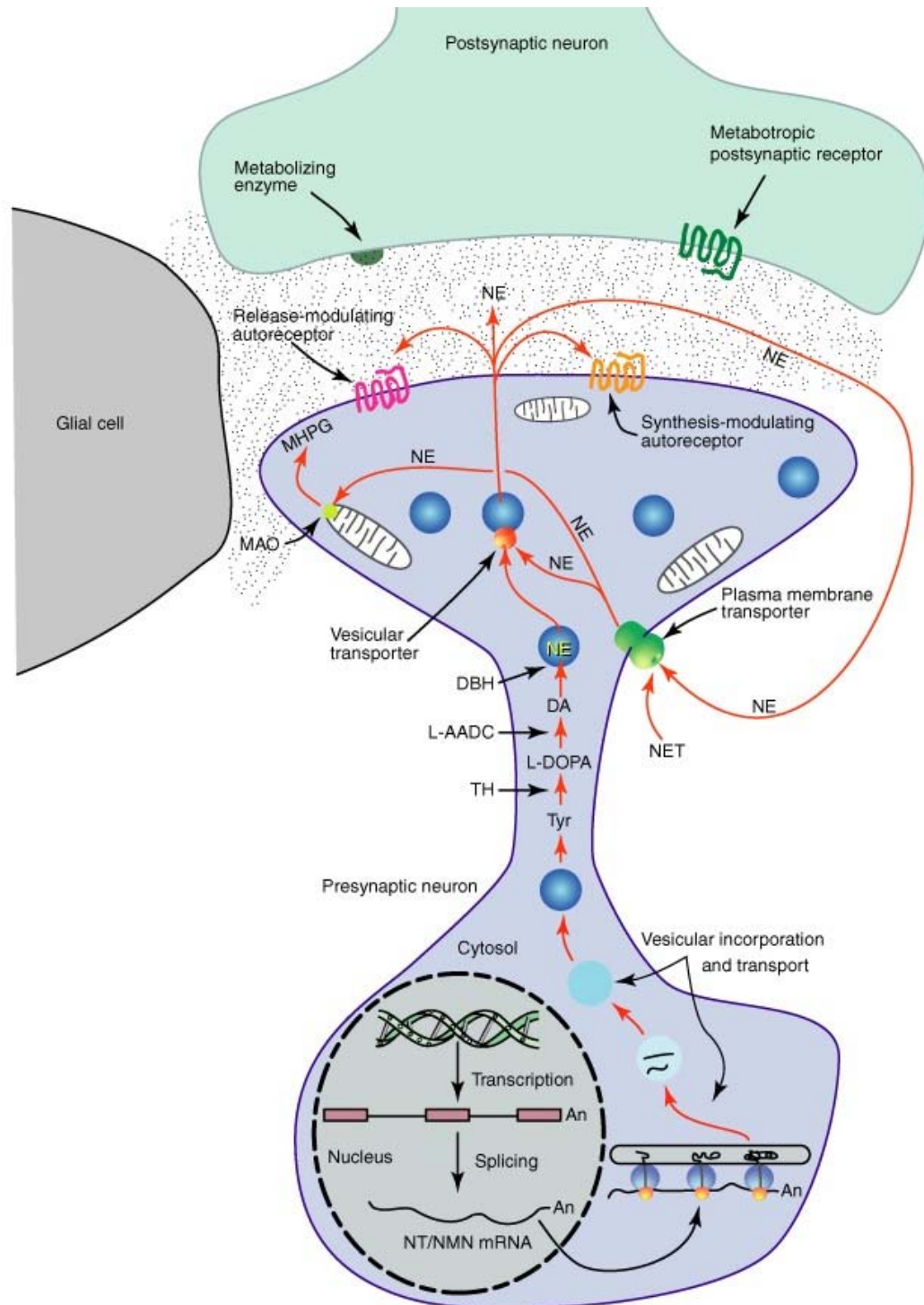
La liberación de la DA y la NA desde las terminales neuronales se realiza por un proceso de exocitosis durante el cual la membrana de las vesículas sinápticas se fusiona con la membrana presináptica, y como consecuencia el contenido vesicular es liberado a la hendidura sináptica, donde los neurotransmisores se ligan a receptores específicos en la membrana postsináptica (von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2002). Este proceso ocurre en respuesta a la despolarización de la terminal neuronal y es calcio-dependiente (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). Tras su acción sobre los receptores, las catecolaminas son retiradas de la hendidura sináptica por un sistema de recaptación de alta afinidad desde la membrana presináptica (ATPasa Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependiente) (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). Una vez en el citoplasma, la mayor parte de las aminas es recaptada por las vesículas de almacenamiento a través de un proceso de recaptación dependiente de una H<sup>+</sup>-ATPasa (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004).

La DA y la NA que no son recaptadas por las vesículas de almacenamiento, son catabolizadas por las enzimas monoamina oxidasa (EC 1.4.3.4, MAO) y por la catecol-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.6, COMT). La MAO se encuentra dentro de las neuronas, ligada a la membrana externa de las mitocondrias, y degrada la NA al ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA) y la DA al ácido 3,4-dihidroxi fenilacético (DOPAC) (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). En condiciones in vivo normales, la DA se degrada formando sobre todo metabolitos ácidos, siendo el DOPAC el más abundante. Sin embargo, en el catabolismo de la NA, se producen mayoritariamente metabolitos de tipo neutro como el dihidroxi fenilglicol y el 3-metoxi-4-hidroxi fenilglicol (MHPG), siendo minoritarios sus metabolitos ácidos como el ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA) (von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2002). La ruta metabólica en la que interviene la COMT sirve principalmente para degradar las catecolaminas extracelulares que aún no han sido recaptadas hacia el interior de la terminal neuronal (Kuhar et al., 1998; Deutch y Roth, 2004). La COMT actúa sobre la NA dando lugar a la normetanefrina, y sobre la DA, dando lugar a la 3-metoxitiramina (Kuhar et al., 1998; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2002; Deutch y Roth, 2004).



**Figura 9.** Esquema simplificado de la ruta biosintética de la DA y NA. La tirosina (Tyr) es metabolizada por la tirosina hidroxilasa (TH) a 3,4-dihidroxi fenilalanina (L-DOPA), esta es descarboxilada para formar la DA por acción de la enzima L-aminoácido

aromático descarboxilasa (L-AADC). La DA es almacenada en las vesículas sinápticas, este sería el paso final para las neuronas dopaminérgicas. En la neurona noradrenérgica la DA es metabolizada a NA, por acción de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), siendo finalmente almacenada de forma similar a la DA (Figura adaptada de Deutch y Roth, 2004).



## La serotonina

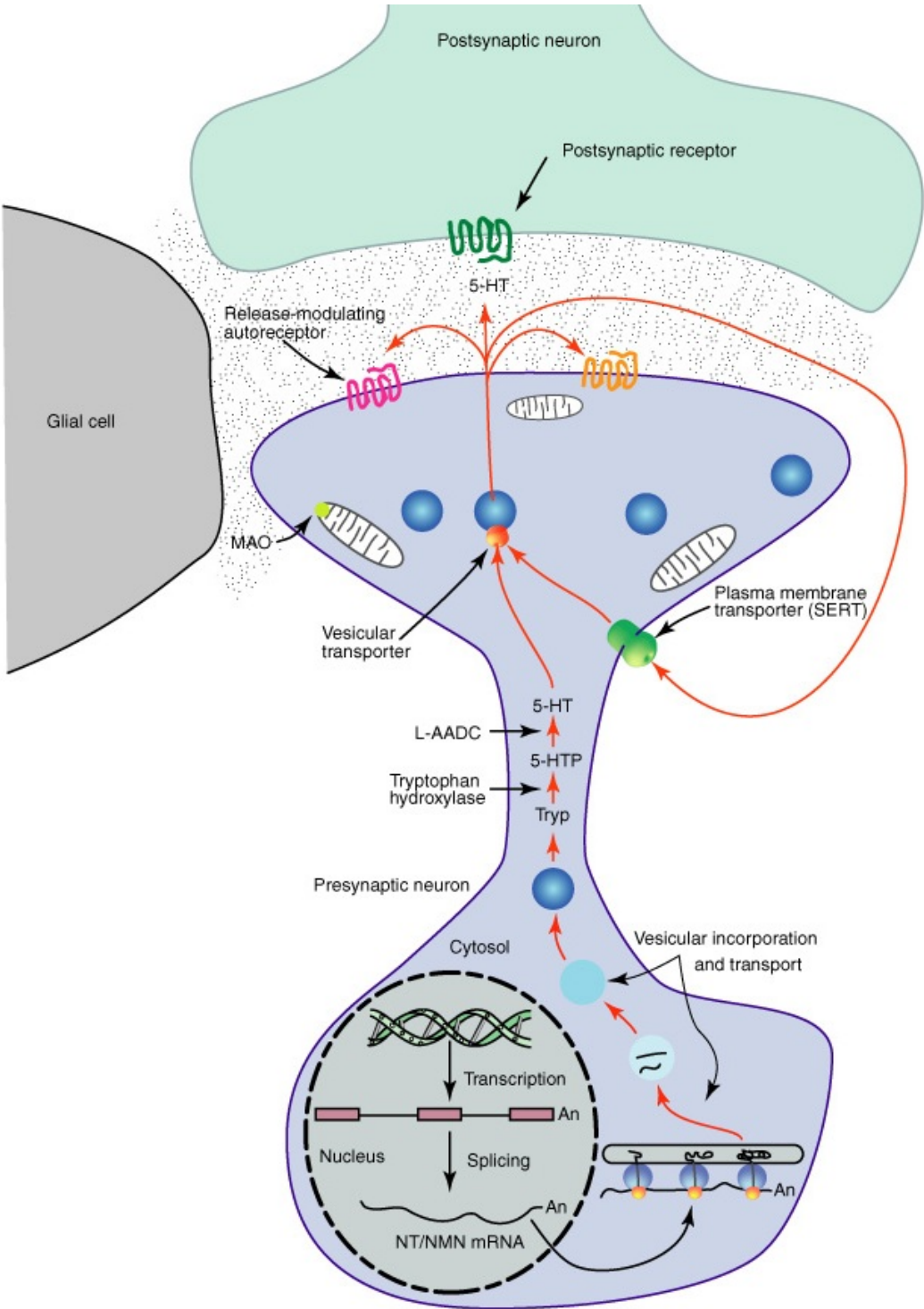
La serotonina actúa como un neurotransmisor implicado en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, tales como el sueño, apetito, termorregulación, comportamiento y el control de la secreción de hormonas hipofisarias (Aldegunde, 1998; Fraser y Hensler, 1998).

La serotonina (5HT) o 5-hidroxitriptamina, es una indolamina sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptófano, que procede de la dieta. Llega al cerebro desde la circulación sanguínea pasando la barrera hematoencefálica mediante el transportador específico de aminoácidos neutros (Aldegunde et al., 1998). Una vez en el citoplasma de las neuronas serotoninérgicas el L-triptófano (Figura 10) es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5HTP) mediante la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (EC 1.14.16.4, TrpOH). Esta es una enzima citoplasmática que requiere como cofactores la tetrahidrobiopterina y O<sub>2</sub>. Esta enzima es la etapa limitante en la tasa de síntesis de 5HT (Fraser y Hensler, 1998; Aldegunde et al., 2000; Deutch y Roth, 2004). El 5HTP formado es transformado a 5HT mediante una descarboxilación catalizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (EC 4.1.1.28; L-AADC) que requiere piridoxal fosfato como cofactor (Kruk y Pycock, 1991). Su actividad in vivo es muy superior a la de la triptófano hidroxilasa, de modo que la mayoría del 5HTP se convierte al instante en 5HT (Tison et al., 1991; Aldegunde 1998). De forma similar a lo indicado para las catecolaminas, la 5HT se acumula en las vesículas sinápticas. Tanto la liberación de la 5HT, como su recaptación, a través de la membrana neuronal y vesicular, transcurren por medio de mecanismos similares a los indicados para las catecolaminas (Fraser y Hensler, 1998; Deutch y Roth, 2004).

En los peces, la 5HT es catabolizada fundamentalmente por la enzima MAO que se encuentra en el interior de las neuronas y células gliales. La MAO transforma la 5HT en 5-hidroxiindolacetaldehído y éste es oxidado de forma inmediata por una aldehído deshidrogenasa para producir ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HIAA), que es el metabolito mayoritario de la 5HT en el cerebro (Fraser y Hensler, 1998; Some y Helander, 2002; Deutch y Roth, 2004).



**Figura 10.** Esquema simplificado de la ruta biosintética de la serotonina (5HT). El triptófano (Tryp) es metabolizado a 5-hidroxitriptófano (5HTP) mediante la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TrpOH). El 5HTP formado es transformado a 5HT mediante una descarboxilación catalizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC). La 5HT es almacenada en las vesículas sinápticas (Figura adaptada de Deutch y Roth, 2004).





## 2. Objetivos





En la acuicultura intensiva es inevitable la presencia de diferentes factores de estrés que darán lugar a distintos tipos de estrés, un estrés fuerte que puede provocar mortalidades masivas o un estrés subletal que puede comprometer las funciones fisiológicas y comportamentales normales. En este último caso los efectos nocivos no siempre son visibles a corto plazo sino que pueden manifestarse a medio o largo plazo (Barton e Iwama, 1991). Es evidente que el estrés significa una importante pérdida económica para los acuicultores, o puede confundir los resultados de una investigación (Small, 2003). Por esta razón, reconocer los síntomas del estrés y saber prevenir y/o reducir las respuestas de estrés durante la manipulación, son factores críticos que pueden reducir el costo y así incrementar los beneficios para el piscicultor (Barton, 1997).

Para la prevención o reducción de las respuestas de estrés durante la manipulación, en muchos casos, es imprescindible el uso de anestésicos. Por esta razón, en este trabajo nos proponemos estudiar diferentes aspectos de cuatro anestésicos (2-fenoxietanol, MS-222, aceite de clavo y metomidato) de amplio uso en la acuicultura que nos permitan caracterizarlos y así poder evaluar su adecuación al uso en los juveniles de *Solea senegalensis*. Para ello se estudiarán en cada uno de ellos los siguientes aspectos:

1. Su eficacia anestésica.
2. En base a que la administración de algunos anestésicos puede inducir un incremento de los niveles de cortisol, se estudiará su potencial acción estresante.
3. Se evaluará la capacidad de atenuar las respuestas primarias y secundarias de estrés (capacidad anti-estrés) desencadenadas por dos tipos de estrés (exposición al aire y de persecución), típicos en las manipulaciones de rutina en acuicultura y experimentación.
4. Actualmente se empieza a considerar que los cambios en la actividad neurotransmisora cerebral son una respuesta (primaria o secundaria) al estrés. Dado que los estudios sobre este tema son muy escasos, se estudiará: a) el efecto de los dos diferentes tipos de estrés sobre la actividad monoaminérgica en diferentes regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo y tectum óptico) y b) la capacidad de los anestésicos para atenuar las potenciales acciones del estrés sobre la actividad monoaminérgica.

Uno de los parámetros que marcan la calidad del agua, y que es fácilmente alterable en los cultivos de peces, es el nivel del amoníaco. La exposición de los peces a él produce evidentes cambios en el comportamiento que son un claro reflejo de su acción estresante. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluará:

5. El efecto de la exposición al amoniaco sobre las diferentes respuestas primarias y secundarias de estrés.
6. El efecto de la exposición al amoniaco sobre la actividad monoaminérgica en diferentes regiones del cerebro (hipotálamo, telencéfalo y tectum óptico).

### 3. Material y métodos



### 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En todas las experiencias se utilizaron juveniles de lenguado de la especie *Solea senegalensis* procedentes del Instituto Español de Oceanografía (Canido, Vigo), situado a unos 100 km del lugar de trabajo, la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). El transporte de los peces se realizó siempre por las mañanas en tanques especialmente acondicionados y provistos con un sistema de difusión de aire. Además, con el objetivo de reducir el metabolismo y estrés de los peces durante el transporte, este se realizó siempre con el agua a bajas temperaturas y con los animales en ayunas.

Al llegar al acuario de la Facultad de Biología (con un fotoperiodo establecido de 12 h luz-12 h oscuridad, las luces se encendían a las 8:00 h), los animales se trasladaron desde los contenedores de transporte a tanques de almacenamiento de 300 L, permaneciendo a una densidad del orden de 2,6 a 2,8 kg m<sup>-2</sup>. Estos tanques estaban provistos de un aporte continuado de aire y de agua de mar con una salinidad de 36-38 g L<sup>-1</sup>. Esta agua se mantuvo a una temperatura de 14 ± 1°C, a un pH de 7,5-8,0 y con una saturación de oxígeno por encima de un 80 %. Una vez que los peces estaban en los tanques de almacenamiento y con el propósito de que se recuperaran del estrés, derivado del transporte y de su distribución, los animales permanecieron sin alimento los primeros 3 o 4 días del periodo de aclimatación, que continuaba posteriormente un mínimo de 2 semanas. Durante la aclimatación los peces se alimentaron siempre a la misma hora (17:00 h) del día, *ad libitum*, con pienso comercial Skretting LE-2. A partir de estos tanques de almacenamiento los peces eran retirados de acuerdo con las necesidades experimentales, para ello los animales eran distribuidos en tanques de experimentación (100 L). El día previo al desarrollo del experimento se sometieron a un periodo de 24 h de ayuno.

Regularmente, a lo largo de todas las experiencias, además de realizar la limpieza de los tanques retirando los residuos (restos de alimento y heces), también se controlaron el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto (oxímetro modelo Oxi 320/set; WTW Wissenschaftlich, Weilheim, Alemania). Los niveles de nitrito y amoníaco total (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se controlaron semanalmente mediante un kit comercial (API™ - Aquarium Pharmaceuticals Inc., Chalfont, USA). En el desarrollo de los experimentos siempre se siguieron las directrices marcadas por la Unión Europea (86/609/EU) y el gobierno Español (RD 1201/2005) para el uso de animales en investigación.

El acuario funciona en sistema de recirculación. Este está compuesto por dos depósitos de agua marina externos que sirven para reabastecer y mantener los niveles de agua de los depósitos internos del sistema. El sistema de tratamiento de agua sigue básicamente esta línea: tanque de decantación, filtro mecánico (bomba y filtro de arena), esterilización (ultravioleta), filtro biológico y 2 depósitos de agua (2000 L). El circuito cuenta con un sistema automático de control de temperatura.

### 3.2. ANESTÉSICOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Los anestésicos empleados en los experimentos fueron el 2-fenoxietanol, metomidato, aceite de clavo y el MS-222, suministrados respectivamente por Panreac Química S.A. (Barcelona, España); Syndel International Inc. (Vancouver, Canadá); Omya Peralta GmbH (Hamburg, Alemania); Sigma Aldrich CO, (St. Louis, USA). Debido a la baja solubilidad del aceite de clavo, este se disolvió previamente en etanol (94%) 1:9 (aceite de clavo:etanol). Pruebas preliminares, confirmaron que el volumen de etanol utilizado no tuvo un efecto anestésico. Los otros anestésicos fueron disueltos directamente en agua marina.

El agua utilizada en todos los experimentos para la preparación de las diferentes soluciones, fue destilada y desionizada a través de un sistema Water PRO™ PS LABCONCO®, (Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA). Todos los reactivos utilizados a lo largo de las experiencias fueron de grado analítico, suministrados por las siguientes casas: Merck (Darmstadt, Alemania), Scharlau FEROSA (Barcelona, España), Romil Chemicals Limited (USA), Riedel-deHaën (Seelze, Alemania) y Probus S.A. (Barcelona, España). El acetonitrilo fue de grado cromatográfico (Merck; Darmstadt, Alemania).

### 3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

#### Extracción de la sangre y obtención del plasma

Para la extracción de sangre se utilizaron jeringuillas estériles de 1 mL (25 GA, 0,5 x 16 mm; Plastipak, Becton Dickinson, Dublín, Irlanda) previamente heparinizadas. Para ello se disolvieron 80 mg de heparina amónica (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) en 20 mL de solución salina (NaCl 0,6% p/v). Esta solución se empleó como anticoagulante (Figura 11).



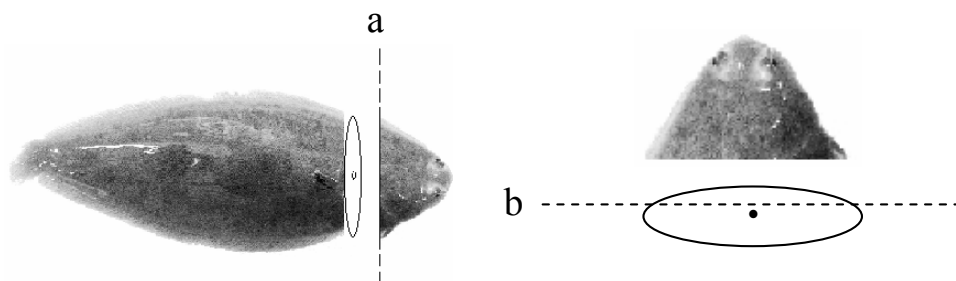
**Figura 11.** Visión global del método de extracción de la sangre.

El lenguado anestesiado se colocaba en una superficie estable sobre un paño húmedo, con el que se le cubría la cabeza. En esta situación se procedía a la extracción de la sangre por medio de una punción en la región caudal (Figura 11). Para ello la aguja se insertaba muy suavemente en la región caudal hasta llegar a tocar la espina dorsal, se procedió entonces a un pequeño retroceso y desplazamiento de la aguja, aproximadamente un milímetro por debajo de la misma, hacia la posición de la vena caudal. Se hizo una ligera succión con el émbolo hasta conseguir la salida de sangre y en este instante la jeringa se mantuvo fija y se siguió aplicando poco a poco una ligera succión hasta recolectar la cantidad de sangre deseada. Hay que tener cuidado de succionar lentamente para evitar el colapso venoso. Una vez que la sangre había sido extraída, se retiraba la aguja y se invertía la jeringuilla varias veces para que se produjera una mezcla uniforme entre la sangre y el anticoagulante. Efectuada esta maniobra, la sangre se guardaba provisionalmente en viales de 1,5 mL mantenidos en hielo picado. Previamente a la obtención de las muestras de plasma, y en el mismo día, se cuantificaba el hematocrito y se separaban las muestras (100  $\mu$ L de sangre, a 2°C) destinadas al análisis de la hemoglobina.

Para la obtención del plasma, se centrifugaron las muestras de sangre a 11600 x g durante 5 min a 4°C (Microcentrífuga Kubota KM-15200, Tokio, Japón). El sobrenadante no hemolizado se transfería a nuevos viales. Se separaban alícuotas de 50  $\mu$ L (para el análisis de glucosa, lactato y cortisol) en viales de 1,5 mL. Todas las alícuotas se almacenaban a -80°C (Sanyo, MDF- U3286 S).

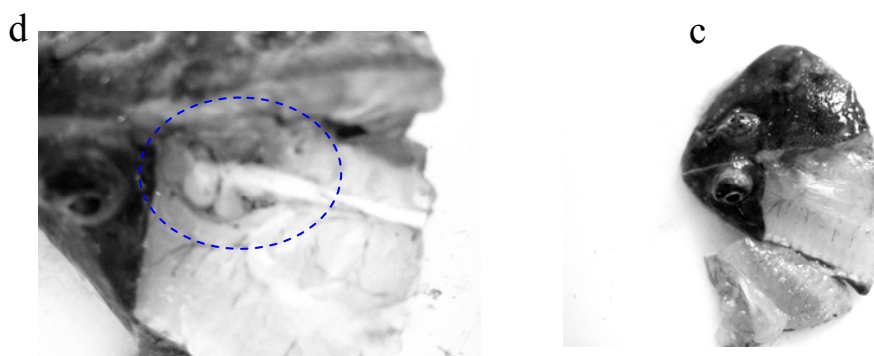
### Extracción del cerebro

Una vez anestesiado el animal, se sacrificó por decapitación. Para esto se realizó un corte (a) en sentido transversal a la columna vertebral por detrás del opérculo. A continuación se realizó otro corte (b), esta vez por encima y paralelo a la columna vertebral, que nos permitió retirar los tejidos que recubren la parte superior del cráneo (c), dejando expuesto el cerebro (d) (Figura 12). Este se extrajo con la ayuda de unas pinzas e inmediatamente fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C para su posterior procesado.



**Figura 12.** Vista parcial del proceso de extracción del cerebro en el lenguado.



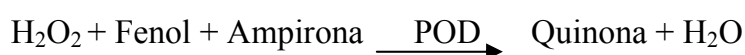


**Figura 12 (continuación).** Vista parcial del proceso de extracción del cerebro en el lenguado.

### 3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

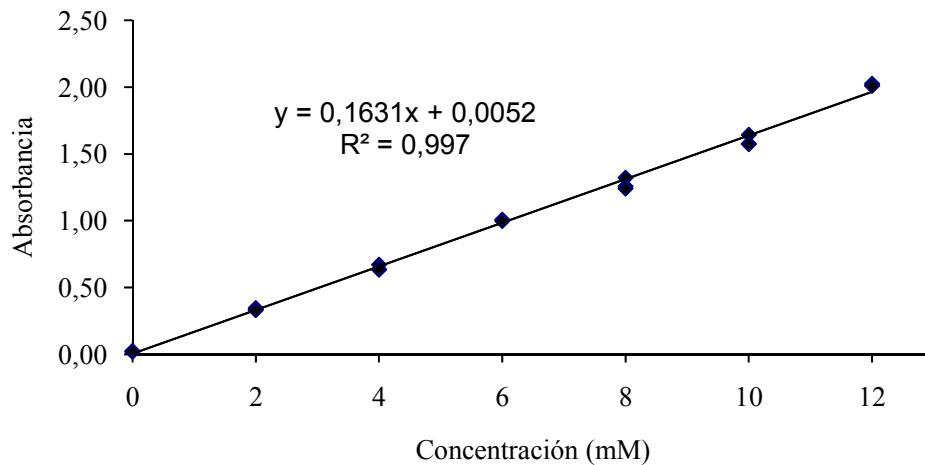
#### Análisis de la glucosa

La medida de la cantidad de glucosa en el plasma se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (Spinreact, S.A., Girona, España), que se basa en un test enzimático-colorimétrico (GOD-POD). Esta cuantificación se fundamenta en el método de Trinder (1969) para la determinación de glucosa, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Para el desarrollo del análisis, con ayuda de una micropipeta, se depositaron en una placa de 96 pocillos (Bioster s.p.a.; Seriate, Italia), alícuotas de un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de plasma o de patrón de concentraciones de glucosa conocidas (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 mM) para la elaboración de una recta patrón (Figura 13). A continuación se añadieron 300  $\mu\text{L}$  del reactivo unificado.

Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 15 min de agitación. Con esto el contenido de los pocillos adquiere un color rojo de intensidad variable. El resultado del análisis se obtiene por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en un lector de placas Sunrise Absorbance reader (Tecan Group Ltd; Mannedorf, Zurich, Suiza). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones finales de glucosa en las muestras se obtuvieron por extrapolación de las absorbancias obtenidas, tomando como referencia la recta patrón elaborada el mismo día del análisis con las concentraciones de glucosa conocidas.

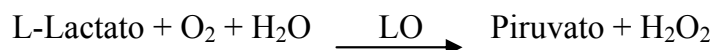


**Figura 13.** Típica recta patrón de glucosa desarrollada en uno de los análisis realizados en una muestra de plasma.

El kit consta de dos reactivos y un patrón de glucosa de 100 mg dL<sup>-1</sup>. El reactivo 1 consiste en una solución tampón de composición: TRIS 92 mM, fenol 0,3 mM, pH 7,4. El reactivo 2 contiene los enzimas: glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4; GOD) 15000 U L<sup>-1</sup>, peroxidasa (EC 1.11.1.7; POD) 1000 U L<sup>-1</sup> y 4-aminofenazona (4-AF) 2,6 mM. Una vez mezclados ambos reactivos, la solución que se obtiene es estable durante un mes a una temperatura de 2-8°C, protegida de la luz.

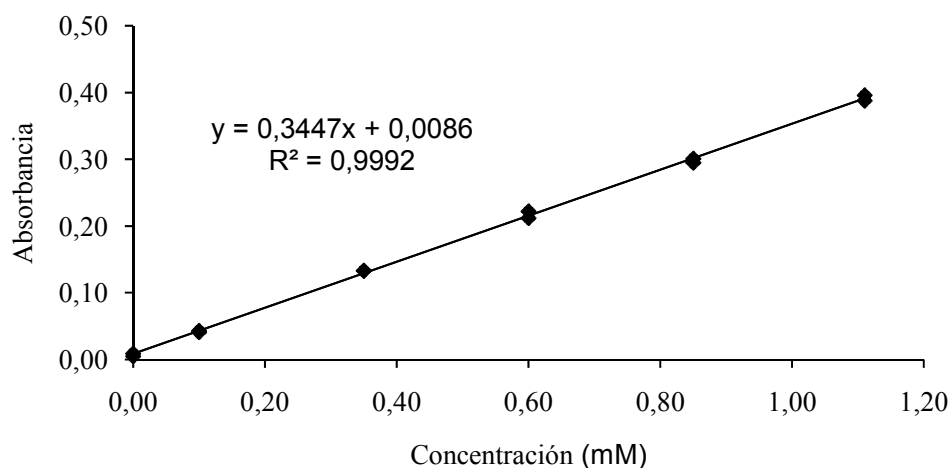
### Análisis del lactato

Las medidas de la cantidad de lactato en el plasma se llevarán a cabo mediante el empleo de un kit comercial (Spinreact, S.A., Girona, España), que se basa en un test enzimático-colorimétrico (LO-POD). Esta cuantificación se fundamenta en el método de Gau (1984) para la determinación de lactato, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Para el desarrollo del análisis se depositaron en una placa de 96 pocillos (Bioster s.p.a.; Seriate, Italia), alícuotas de un volumen de 10 μL de plasma o de patrón de concentraciones de lactato conocidas (0; 0,1; 0,35; 0,6; 0,85 y 1,11 mM)

para la elaboración de una recta patrón (Figura 14). A continuación se añadieron 225  $\mu\text{L}$  del reactivo unificado. La placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, y se agitó durante 30 s. Con esto el contenido de los pocillos adquiere un color rosa de intensidad variable. El resultado del análisis se obtiene por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. El espectrofotómetro empleado fue un lector de placas Sunrise Absorbance reader (Tecan Group Ltd; Mannedorf, Zurich, Suiza). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones finales de lactato en las muestras se obtuvieron por extrapolación de las absorbancias obtenidas, tomando como referencia la recta patrón elaborada el mismo día del análisis con las concentraciones de lactato conocidas.



**Figura 14.** Típica recta patrón de lactato desarrollada en uno de los análisis realizados en muestras de plasma.

El kit consta de dos reactivos y un patrón de lactato de 10 mg  $\text{dL}^{-1}$ . El reactivo 1 consiste en una solución tampón de composición: PIPES 50 mM, 4-clorofenol 4 mM, pH 7,5. El reactivo 2 contiene los enzimas lactato oxidasa (EC 1.1.3.2; LO) 800  $\text{U L}^{-1}$ , peroxidasa (EC 1.11.1.7; POD) 2000  $\text{U L}^{-1}$  y 4-aminofenazona (4-AF) 0,4 mM. Una vez mezclados ambos reactivos, la solución que se obtiene es estable durante un mes a una temperatura de 2-8°C, protegida de la luz.

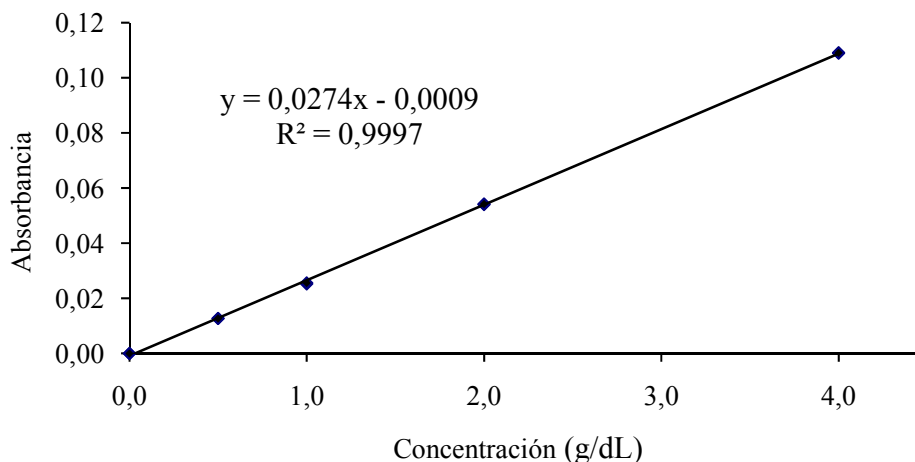
### Análisis de la hemoglobina

La determinación de la cantidad de hemoglobina en la sangre se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (Spinreact, S.A., Girona, España). El principio del método se basa en que la hemoglobina es oxidada por la acción del

ferricianuro a metahemoglobina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada.

Para el desarrollo del análisis, con ayuda de una micropipeta, se depositaron en cada tubo alícuotas de un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de sangre o de patrón de concentraciones de hemoglobina conocidas (0; 0,5; 1,0; 2,0 y 4  $\text{g dL}^{-1}$ ) para la elaboración de una recta patrón (Figura 15). A continuación se añadieron 5 mL del reactivo de trabajo, haciendo uso de un dispensador Eppendorf. Los tubos se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Con esto el contenido de los tubos adquiere un color marrón de intensidad variable.

El resultado del análisis se obtiene por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, ajustando a cero con el blanco correspondiente (NaCl 0,6%), y empleando una cubeta de un centímetro de paso de luz. El espectrofotómetro empleado fue del modelo Uvikon 930 (Kontron AG, Instruments; Zürich, Suiza). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones finales de hemoglobina en las muestras se obtuvieron por extrapolación de las absorbancias obtenidas, tomando como referencia la recta patrón elaborada el mismo día del análisis con las concentraciones de hemoglobina conocidas.



**Figura 15.** Típica recta patrón de hemoglobina desarrollada en uno de los análisis realizados en muestras de sangre.

El kit consta de un reactivo que consiste en una solución de ferricianuro de potasio 0,60 mM, cianuro de potasio 77 mM y dihidrogeno fosfato de potasio 2 mM. El reactivo de trabajo se obtiene mezclando la solución con agua mQ (245 mL de agua mQ + 5 mL solución). Una vez mezclados, el reactivo que se obtiene es estable durante dos meses a una temperatura de 2-8°C, protegido de la luz.

### **Cuantificación del hematocrito**

La determinación del valor del hematocrito en la sangre se llevó a cabo mediante la técnica del microhematocrito. Para esto se utilizaron tubos capilares heparinizados de 75 mm de longitud x 1,5 - 1,6 mm de diámetro (Deltalab S. L., Barcelona, España).

Para el desarrollo de la medida se llenaran con sangre los capilares hasta un máximo de  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, sellando una de las extremidades con plastilina. A continuación se centrifugó en una centrifuga (modelo radial, marca Orto) para microhematocrito durante 5 min a 10000 x g. Las determinaciones del hematocrito se realizaron por duplicado para cada muestra. El valor del hematocrito se obtuvo calculando el porcentaje ocupado por la columna de hematíes en el volumen total de sangre en el capilar.

### **Análisis del cortisol**

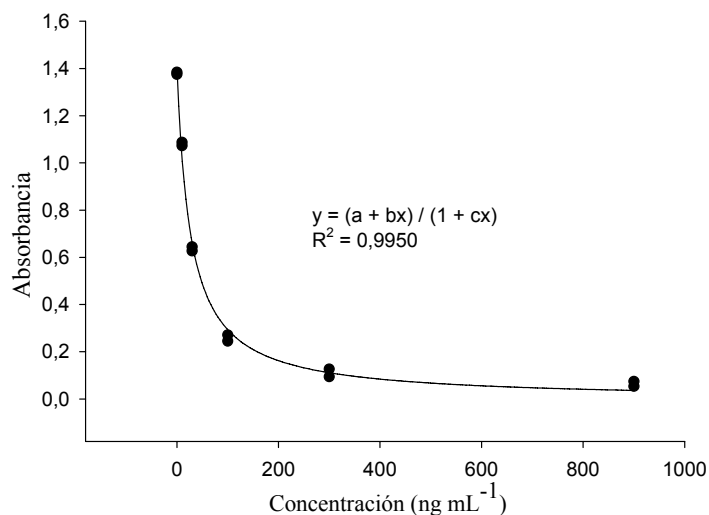
La medida de los niveles de cortisol en el plasma se llevó a cabo mediante el empleo de un kit comercial (Cortisol, Ref. KS18EW; RADIM SpA, Roma, Italia). El método esta basado en un inmunoensayo enzimático (EIA).

La técnica del ensayo se basa en una primera incubación donde el cortisol de la muestra compite con el cortisol conjugado por unirse al sitio específico del anticuerpo que se encuentra unido al pocillo de la microplaca. A continuación se lava todo el material no unido al anticuerpo. Una vez hecho esto, se añade el cromógeno (substrato), y se realiza una segunda incubación. Finalmente se adiciona un bloqueador de la reacción, y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro. La actividad enzimática que esta unida a la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en el patrón y en las muestras. Por tanto, el cortisol conjugado, es decir, el que esta ligado a la enzima, es revelado en la incubación con cromógeno. Cuanto más color en las muestras y en los patrones, mas cortisol conjugado estará presente unido al cromógeno y tendremos menos cortisol no conjugado. El cortisol no conjugado es el que queremos determinar.

Para el desarrollo del análisis, se depositaron en una microplaca de 96 pocillos alícuotas de un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de plasma, control (151 ng  $\text{mL}^{-1}$  de cortisol) o de patrón de concentraciones de cortisol conocidas (0, 10, 30, 100, 300, 900 ng  $\text{mL}^{-1}$ ) para la elaboración de una recta patrón (Figura 16). A continuación se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cortisol conjugado unificado, con un adhesivo se tapó la microplaca y se incubó durante 60 min en estufa a 37°C. A continuación, se retiró el adhesivo y se procedió el lavado de la microplaca, eliminando todo el líquido por inversión en una pileta y secando sobre papel de filtro. A continuación se añade a cada pocillo 300  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado unificada, que posteriormente se elimina, repitiendo este proceso de lavado otras 4 veces. Hecho

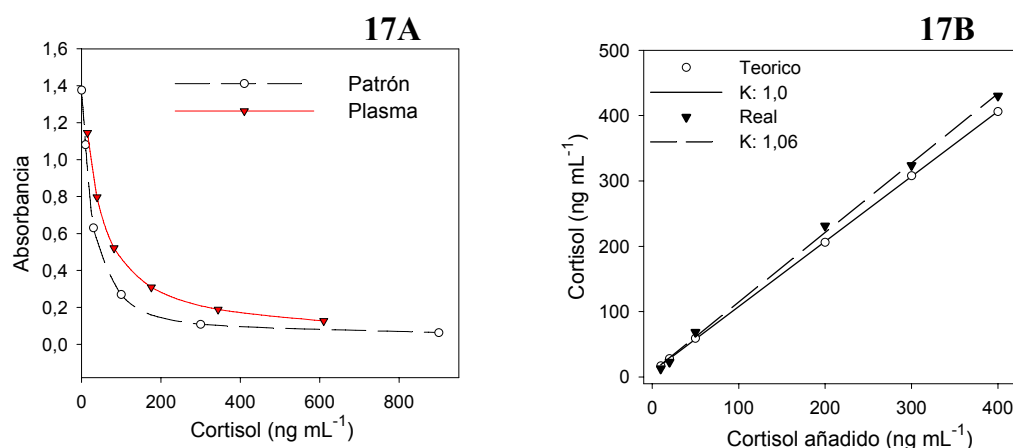
esto, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del cromógeno unificado, preparado minutos antes de ser utilizado, a todos los pocillos. Se tapó la microplaca con un adhesivo y se incubó en estufa a 37°C por 15 min. El contenido de los pocillos adquiere un color azul de intensidad variable. A continuación, se retiró el adhesivo y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo bloqueador ( $\text{SO}_4\text{H}_2$  1N). El contenido de los pocillos adquiere un color amarillo de intensidad variable. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en las muestras y patrones.

Los resultados de los análisis se obtuvieron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. El espectrofotómetro empleado fue un lector de placas Sunrise Absorbance reader (Tecan Group Ltd; Mannedorf, Zurich, Suiza). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones finales de cortisol en las muestras se obtuvieron por extrapolación de las absorbancias obtenidas, tomando como referencia la recta patrón elaborada el mismo día del análisis con las concentraciones de cortisol conocidas.



**Figura 16.** Típica recta patrón de cortisol desarrollada en uno de los análisis realizados en muestras de plasma.

Previamente a su utilización, el kit fue validado para su uso en peces realizando pruebas de linealidad con diluciones seriadas (Figura 17A: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) de un pool de plasma de lenguado con una elevada concentración de cortisol, y de sobrecargas de cortisol (Figura 17B: 10, 20, 50, 200, 300 y 400 ng mL<sup>-1</sup>) a un pool de plasma bajo en cortisol. Los coeficientes de variación intraensayo (repetibilidad) e interensayo (reproductibilidad) siempre estuvieron por debajo de un 7%. La recuperación (en %) media fue de un 99,3  $\pm$  6,7. Este porcentaje varió entre un valor de 91,3  $\pm$  12 hasta concentraciones de 200 ng mL<sup>-1</sup> y uno de 107  $\pm$  2,3 por encima de este valor.



**Figuras 17A, 17B.** Test de paralelismo entre las curvas de dilución del plasma de leñuado y patrones (17A), y test de sobrecarga (17B).

El kit consta de una *microplaca* de 96 pocillos, revestidos de anticuerpo (de conejo) anti-cortisol. Seis viales de *patrones* liofilizados con las concentraciones: 0, 10, 30, 100, 300 y 900 ng mL<sup>-1</sup> de cortisol (conservador neomicina), que se reconstituyó añadiendo a los viales 1 mL de agua mQ. Estabilidad 10-15 días a 2-8°C. Un vial con 2,7 mL de *conjugado enzimático* (concentrado) constituido por: cortisol, HRPO, BSA, ANS, estabilizadores (conservante neomicina), y dos viales de *conjugado diluyente* (12 mL cada) constituido por: tampón citrato, BSA, (conservantes neomicina y thimerosal). Para obtener el conjugado enzimático unificado o de trabajo (cortisol + enzima) se añadieron 1,2 mL del conjugado *enzimático concentrado* a cada uno de los viales del *conjugado diluyente*. Esta solución es estable durante 8 semanas a 2-8°C.

Un vial de *suero control* constituido por cortisol (151 ng mL<sup>-1</sup>) en suero matriz, liofilizado, (conservante neomicina). Se reconstituyó añadiendo 1 mL de agua mQ. Estabilidad 5-7 días 2-8°C.

Un vial (50 mL) con *solución de lavado* (concentrado) constituido por PBS-Tween 20 (conservante thimerosal): La solución de lavado unificada o de trabajo se consiguió vertiendo el vial de 50 mL a un matraz aforado de 500 mL, a continuación se añadió agua mQ hasta completar los 500 mL. Esta solución es estable 30 días a 2-8°C.

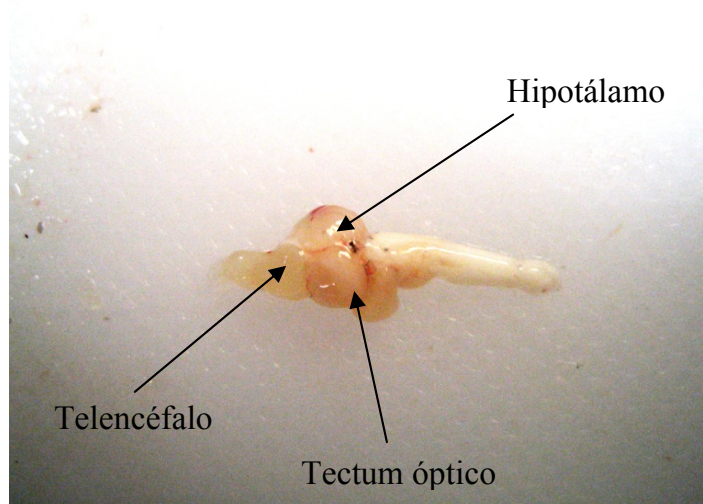
Un vial (15 mL) de *solución cromógena* constituido por TMB, tampón citrato-fosfato, DMSO y un vial (15 mL) de *tampón substrato* (tampón citrato-fosfato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para obtener el cromógeno unificado o de trabajo se mezclaron iguales volúmenes de cromógeno y tampón-substrato (15 mL:15 mL). Estabilidad hasta 1 hora después de preparado.

Un vial (14 mL) de *reactivo bloqueador* (SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1N) listo para uso. Dos *adhesivos* para tapar la microplaca.

### 3.5. ANÁLISIS DE AMINAS BIÓGENAS CEREBRALES

#### Procesado de las muestras destinadas a la cuantificación de aminas

El encéfalo congelado se diseccionó a  $< 4^{\circ}\text{C}$ . De esta disección se extrajeron el hipotálamo, telencéfalo y el tectum óptico (Figura 18). Tras ser pesados, los tejidos se homogenizaron en frío utilizando la fase móvil como vehículo de homogenización. El telencéfalo e hipotálamo se homogenizaron en un volumen de  $800\ \mu\text{L}$ , y los tectos ópticos en uno de  $1000\ \mu\text{L}$ . Para llevar a cabo la homogenización se empleó un procesador ultrasónico Kontes (modelo KT50), aplicando pulsos de 1 segundo de duración a intervalos de 5 segundos hasta la completa disgregación del tejido. El homogenizado así obtenido se centrifugó a  $20000 \times g$  durante 10 min a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga Beckman (modelo Avanti™ 30 Centrifuge). Los sobrenadantes se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para el posterior análisis cromatográfico.



**Figura 18.** Regiones cerebrales del encéfalo del lenguado que fueron disecadas para el posterior análisis. Visión lateral-inferior de un cerebro.

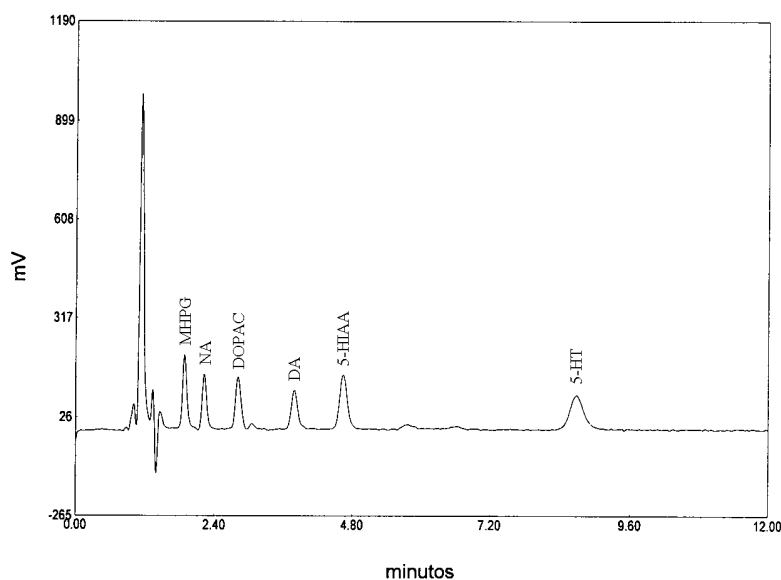
#### Determinación cromatográfica de los niveles de aminas

El contenido de las aminas biógenas y metabolitos (5HT, 5HIAA, DA, DOPAC, NA, MHPG) en los tejidos cerebrales se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica (HPLC-EC), según lo descrito por Ruibal (2003) con modificaciones mínimas. El sistema cromatográfico consistió en un detector electroquímico (ESA Coulochem II Model 5100A, Esa Inc., Massachusetts, USA) formado por un modulo de control y una célula analítica modelo 5010 de electrodo dual. Los potenciales de

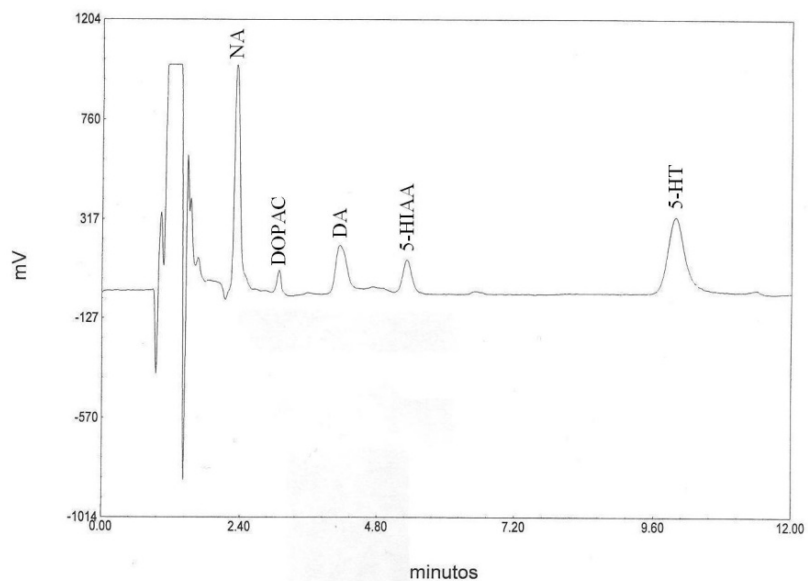


oxidación aplicados en la célula electroquímica fueron de + 30 mV para el electrodo 1 y + 290 mV para el electrodo 2 (electrodo de análisis). La bomba impulsora de la fase móvil fue una bomba Gilson con doble amortiguador de pulso, modelo 305 Piston Pump (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, USA). La columna utilizada para la separación cromatográfica fue una columna de fase reversa Tracer Extrasil de octadecilsilice (ODS-2), con un relleno microparticulado de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y unas dimensiones de 15 cm de largo por 0,4 cm de diámetro interno (Teknokroma<sup>®</sup>, Barcelona, España). Durante todos los ensayos se utilizaron filtros precolumna Phenomenex<sup>®</sup> (C<sub>18</sub> - ODS, Octadecyl; SecurityGuard<sup>™</sup>, USA).

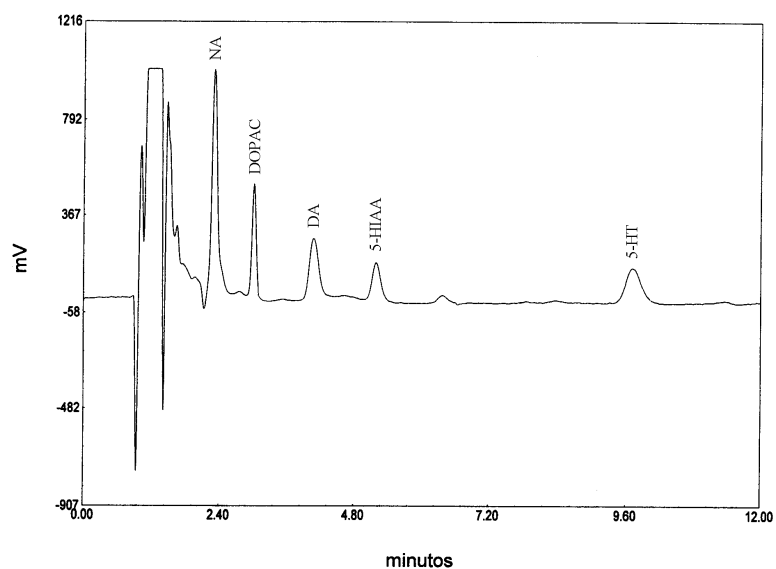
Los análisis se hicieron a temperatura ambiente y con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La inyección de las muestras fue manual, utilizando una jeringuilla Hamilton Gastight<sup>®</sup> de alta precisión de 50  $\mu\text{L}$ . El inyector utilizado fue un Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne Incorporated, California, USA) provisto de un bucle de 20  $\mu\text{L}$ . La fase móvil empleada consistió en un tampón de acetato (40 mM de acetato de sodio y 8 mM de ácido cítrico) con 0,134 mM de EDTA, 1,30 mM de ácido octanosulfónico y acetonitrilo (10 % v/v). El pH final se ajustó a 3,65 con ácido ortofosfórico (85 %). La fase móvil se filtró a través de filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Lida Manufacturing Corp., de Teknokroma<sup>®</sup> S. Coop. C. Ltda., USA), y se desgasificó por medio de un baño de ultrasonidos (Selecta S. A., Barcelona, España). Con estas condiciones la duración de los cromatogramas fue de aproximadamente 12 min.



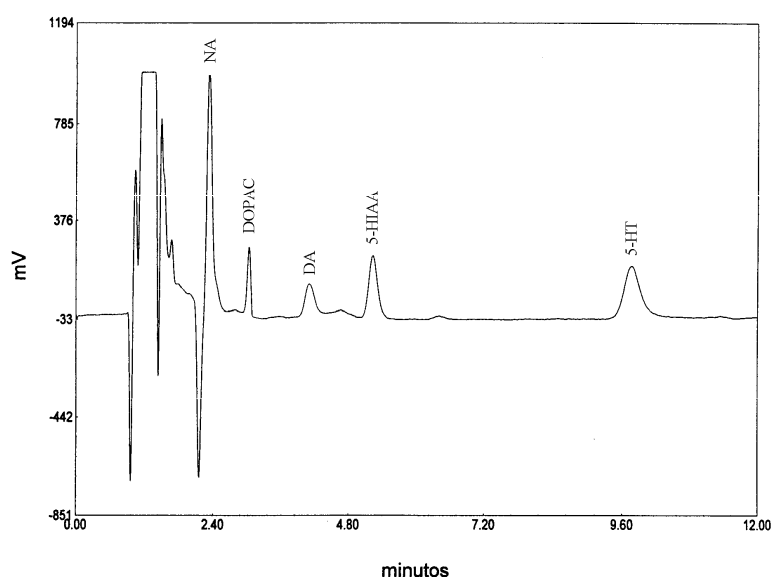
**Figura 19.** Cromatograma típico de un patrón compuesto correspondiente a 50 pg de cada una de las aminas: Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5HT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HIAA), 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG).



**Figura 20.** Cromatograma típico de un homogenizado de hipotálamo del lenguaje. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5HT), ácido 3,4-dihydroxifenilacético (DOPAC), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HIAA).



**Figura 21.** Cromatograma típico de un homogenizado de telencéfalo del lenguaje. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5HT), ácido 3,4-dihydroxifenilacético (DOPAC), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HIAA).



**Figura 22.** Cromatograma típico de un homogenizado de tectum óptico del lenguado. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5HT), ácido 3,4-dihidroxiindol-3-acético (DOPAC), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HIAA).

La adquisición y posterior integración de los picos cromatográficos se llevó a cabo utilizando el paquete informático Biocrom 2000. Se emplearon las áreas de los picos cromatográficos generados por patrones externos de concentración conocida (Figura 19) para la cuantificación de los niveles de aminas en las muestras problema (Figuras 20, 21, 22). Para el desarrollo de los patrones se partió de soluciones madre guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , que en el día del ensayo se diluyeron para obtener una concentración de trabajo de  $50\text{ pg}/20\text{ }\mu\text{L}$ .

Se preparó un patrón compuesto partir de stocks individuales ( $0,1\text{ mg mL}^{-1}$ ), de NA, DOPAC, DA, 5HIAA, 5HT, MHPG, preparados en una solución antioxidante de  $0,4\text{ M}$  de ácido perclórico,  $0,1\text{ mM}$  de  $\text{EDTA Na}_2$  y  $0,4\text{ mM}$  de metabisulfito  $\text{Na}_2$ . Alícuotas de cada uno de los stocks individuales se diluyeron conjuntamente en un volumen adecuado de fase móvil, para obtener una concentración final de  $50\text{ ng mL}^{-1}$  de cada amina. Esta solución se diluyó finalmente hasta los  $50\text{ pg}/20\mu\text{L}$  de 5HT, 5HIAA, NA, MHPG, DA y DOPAC en fase móvil.

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. La significación estadística de las diferencias entre las medias de dos grupos se estableció mediante el test paramétrico T-Student. En los casos en los que la comparación de las medias era entre varios grupos se empleó un análisis de la varianza (ANOVA)

de una o de dos vías y, en caso de existir significación, se ejecutaba el test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Stat 2.0 (SPSS Science Software, UK Ltd).



## 4. Diseño experimental

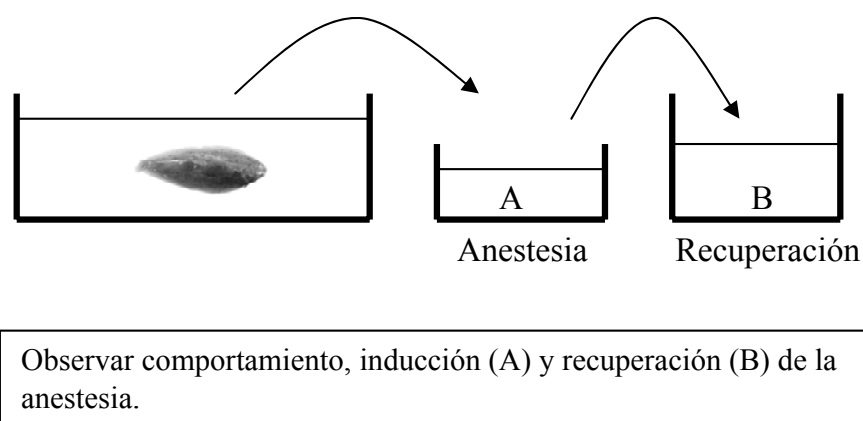


#### 4.1. DEFINICIÓN DE LOS ESTADIOS DE ANESTESIA, INDUCCIÓN Y RECUPERACIÓN, EN EL LENGUADO

El objetivo de este experimento fue determinar y describir las características que definen cada uno de los diferentes estadios de la anestesia, tanto en su fase de inducción como en la de recuperación, y comprobar si siguen los mismos parámetros ya establecidos para otras especies de peces no planos. Para ello se observaron cuidadosamente los cambios en el comportamiento de juveniles del lenguado *Solea senegalensis* (Figura 23).

El estudio comenzó con la captura individual de los peces (n: 10;  $65 \pm 6$  g) con un salabardo, y su transferencia desde el acuario de mantenimiento (300 L) a un acuario de observación (10 L, acuario A), donde ya se había adicionado previamente el anestésico 2-fenoxietanol ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ). A partir de este instante se verificaron cada minuto los siguientes parámetros: el movimiento opercular, el estado de equilibrio y la respuesta a un estímulo táctil (toque). Se consideró que cuando la frecuencia opercular era imperceptible se alcanzaba el estadio III de inducción de anestesia. Tan pronto como el animal alcanzaba este estadio III, se retiraba del acuario de observación y se pasaba al de recuperación (100 L, acuario B), donde se colocaba con el lado ciego para arriba. A partir de este momento se evaluaban los mismos parámetros mencionados previamente.

En estas experiencias se asume que la pérdida de equilibrio tiene lugar cuando el pez colocado con su lado ciego para arriba, es incapaz de recuperar su postura normal. Del mismo modo, la recuperación del equilibrio tiene lugar cuando el pez es capaz de recuperar su postura normal.



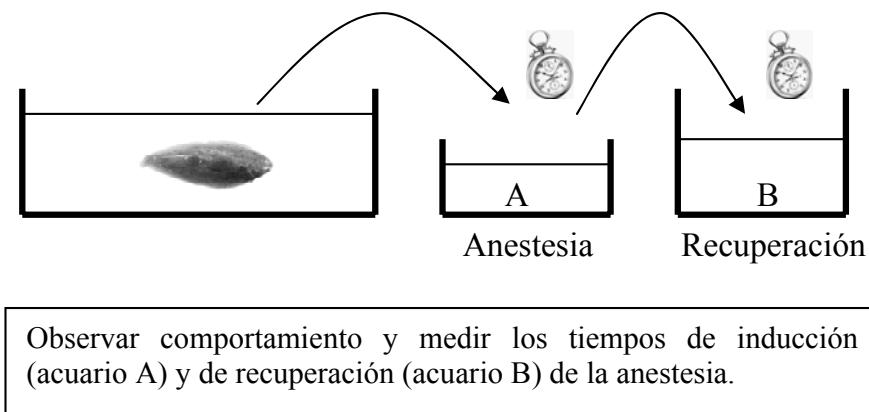
**Figura 23.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para el estudio de las características que definen los estadios de anestesia y recuperación en el lenguado.



#### 4.2. DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE INDUCCIÓN Y RECUPERACIÓN EN LENGUADOS ANESTESIADOS CON DIFERENTES DOSIS DE ANESTÉSICOS

Este experimento se diseñó para determinar cual es la dosis mínima de cada uno de los anestésicos que nos permiten alcanzar el estadio II de anestesia, en el menor tiempo posible. En este trabajo se consideraron adecuados aquellos tiempos que están por debajo de los 3 minutos para la inducción, y de 5 minutos para la recuperación (Marking y Meyer, 1985). Para llevar a cabo este estudio se utilizaron animales de un peso de  $98,5 \pm 2,5$  g. Se estudiaron 4 anestésicos, evaluando diferentes dosis de cada uno de ellos: 2-fenoxietanol (300, 400, 500, 600 mg L<sup>-1</sup>), metomidato (4, 5, 6 mg L<sup>-1</sup>), aceite de clavo (20, 30, 40 mg L<sup>-1</sup>) y MS-222 (50, 75, 100 mg L<sup>-1</sup>). El número de animales utilizados para cada dosis fue de 6-9.

Metodológicamente este experimento se desarrolló de un modo similar al indicado previamente en el apartado 4.1. No obstante, en este caso se consideró que el pez se encontraba en el estado de anestesia II cuando perdía el equilibrio y no reaccionaba a un pequeño pinchazo en la región caudal (Woody et al., 2002); es en este momento cuando se determina el tiempo de inducción. El tiempo de recuperación se marca cuando el animal en el tanque de recuperación es capaz de recuperar su postura normal (Figura 24).



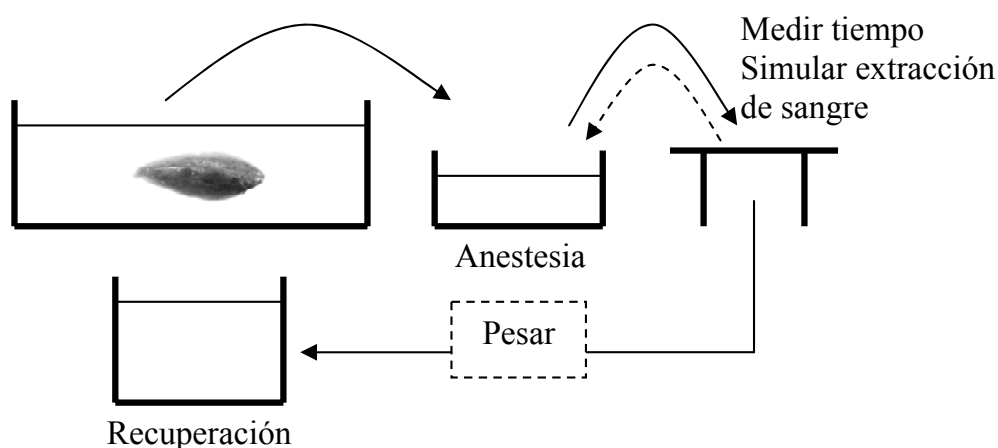
**Figura 24.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para determinar las dosis menores de cada anestésico precisas para alcanzar el estadio de anestesia II.

#### 4.3. ESTUDIO PARA EVALUAR LA PROFUNDIDAD DE LA ANESTESIA EN EL ESTADIO II

Este experimento fue diseñado para evaluar la profundidad del estadio II de anestesia, es decir su capacidad para permitir llevar a cabo una manipulación invasiva (Figura 25). Para desarrollar esta experiencia se realizó una pequeña

extracción de sangre, comprobando la presencia o ausencia de respuestas reflejas (King et al., 2005). Los anestésicos y dosis evaluadas fueron: 2-fenoxietanol ( $500$  y  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ), metomidato ( $6$  y  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ), aceite de clavo ( $40$  y  $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) y MS-222 ( $100$  y  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estas experiencias se desarrollaron en función del peso de los peces ( $74 \pm 4 \text{ g}$ ,  $213 \pm 15 \text{ g}$  y  $300 \pm 12 \text{ g}$ ). El número de animales utilizados para cada dosis fue de 5-12.

El experimento se desarrolló siguiendo los protocolos empleados en el experimento anterior (4.2). Una vez que el animal alcanzaba el estadio II de anestesia, era capturado y colocado cuidadosamente sobre una paño húmedo. Con auxilio de una jeringa ( $1\text{mL} - 25 \text{ GA}$ ) se hizo una pequeña extracción de sangre desde la vena caudal. Si el pez reaccionaba a esta manipulación, este se devolvía al acuario de observación, repitiendo el proceso cada minuto hasta que el pez no presentaba respuestas reflejas. En este momento se determinaba el tiempo. También, en este caso, se determinó el tiempo de recuperación del mismo modo que en los casos anteriores.



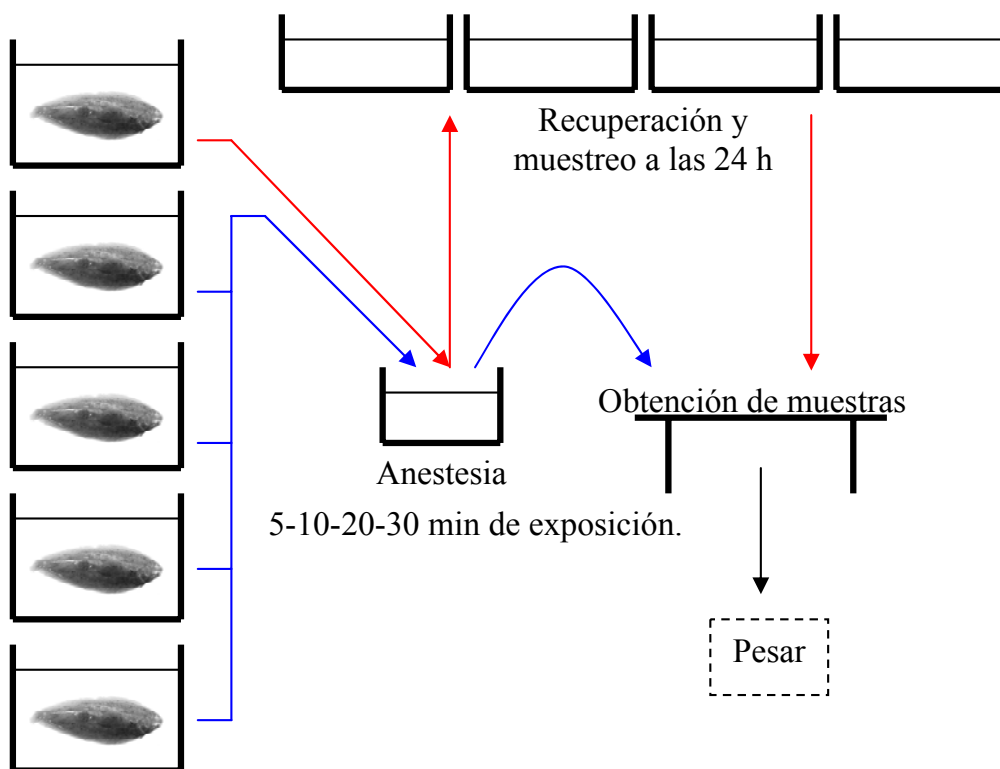
**Figura 25.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para investigar la profundidad anestésica del estadio II de anestesia.

#### 4.4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS SOBRE DIVERSOS INDICADORES SANGUÍNEOS Y PLASMÁTICOS DE ESTRÉS

El objetivo de este experimento fue investigar los posibles efectos, agudos estresantes, de la exposición por un periodo de 5, 10, 20 y 30 minutos, a los diferentes agentes anestésicos estudiados: aceite de clavo ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ), MS-222 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), 2-fenoxietanol ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) y metomidato ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Además se planteó otro grupo de experimentos en el cual, después de exponer a los animales durante 30 minutos al correspondiente agente anestésico, estos se pasaron a acuarios de recuperación (2 peces por acuario) y se muestrearon 24 horas después.

La toma de muestras a las 24 horas se realizó bajo anestesia (se utilizó el mismo anestésico al cual fue expuesto inicialmente). En todos los casos, se valoraron los siguientes indicadores de estrés: glucosa, lactato y cortisol plasmático, y los parámetros sanguíneos: hematocrito y hemoglobina.

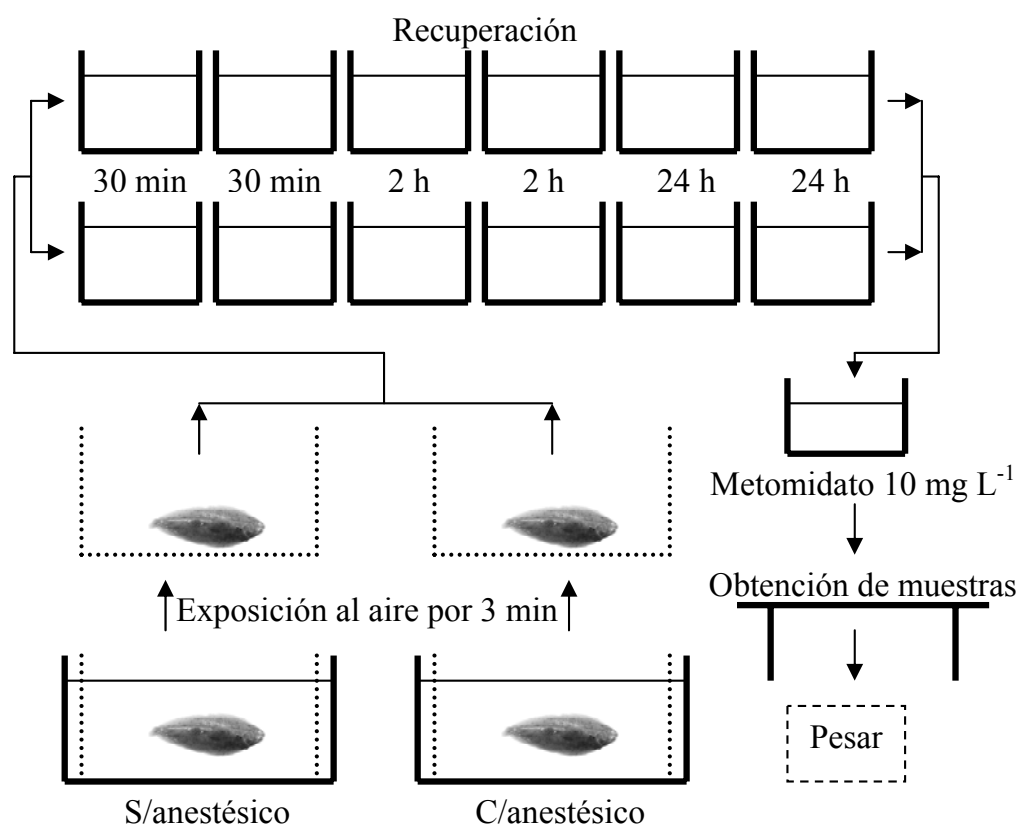
Para esta serie de experimentos los animales ( $96 \pm 2$  g) se distribuyeron en 5 tanques de 100 L (8 peces/acuario). Todos los peces de un acuario se capturaron rápidamente y se pasaron al acuario de observación, donde se había adicionado previamente una de las soluciones anestésicas a evaluar. A partir de este momento, los animales, de un modo aleatorio, son retirados a los tiempos de 5, 10, 20 y 30 min para la extracción de sangre. Otro grupo de peces después de permanecer durante 30 minutos en el anestésico se pasaron a acuarios de recuperación para ser muestreados a las 24 horas. En toda esta serie de experimentos los animales retirados a los 5 minutos son los que se toman como controles (Figura 26). Para cada dosis y tiempo se utilizaron 7-8 peces.



**Figura 26.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para investigar el efecto de una exposición a los anestésicos sobre los niveles de diversos indicadores de estrés.

#### 4.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIESTRÉS DE LOS DIFERENTES ANESTÉSICOS FRENTE A UN ESTRÉS AGUDO (EXPOSICIÓN AL AIRE) EN JUVENILES DE *Solea senegalensis*

Este experimento, y el siguiente, tuvieron como objetivo evaluar la capacidad antiestrés del 2-fenoxietanol ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ), metomidato ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), aceite de clavo ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) y MS-222 ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) frente a un estrés agudo, en este caso la exposición al aire (Figura 27). Se analizaron los siguientes indicadores de estrés: glucosa, lactato y cortisol plasmático, y los parámetros sanguíneos: hematocrito y hemoglobina.



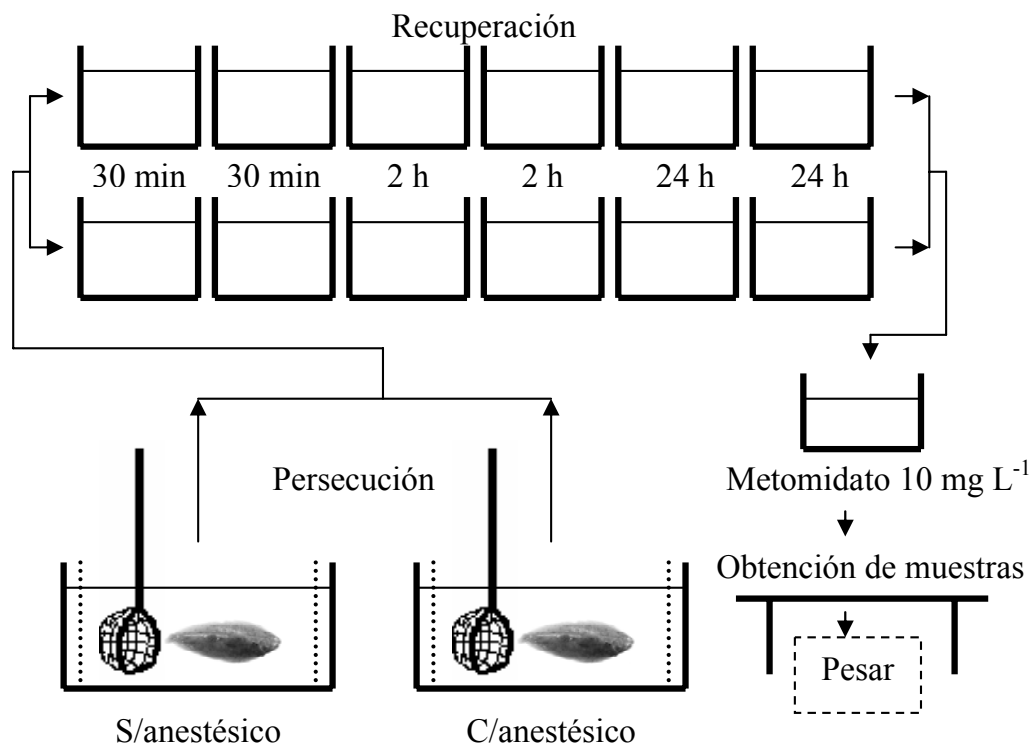
**Figura 27.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para investigar la capacidad antiestrés (exposición al aire durante 3 minutos) de los anestésicos. S: sin anestesia, C: con anestesia.

Para esta serie de experimentos se utilizaron lenguados de un peso de  $79 \pm 2 \text{ g}$ . Los animales se distribuyeron en 2 acuarios de 100 L (12 peces/acuario) que estaban revestidos por una red rígida. El desplazamiento vertical de esta red es la que nos permitió hacer la exposición al aire. El experimento comenzó con la exposición de los peces de un acuario, durante 3 minutos, al aire (peces estresados sin pretratamiento con el anestésico). Inmediatamente después estos animales son reubicados en acuarios de recuperación (50 L) (2 peces/acuario), y a los 30 min, 2 horas y 24 horas son capturados (de dos en dos en menos de 15 s) e introducidos

en el acuario de observación al que se le había adicionado previamente metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) como agente anestésico. Esta dosis induce una rápida y profunda anestesia en menos de 1,5 min. En este momento se retiran los peces, se realiza la extracción de sangre y se pesan. Con los peces del otro acuario de 100 L se procedió del mismo modo, pero previo a la exposición al aire los animales se anestesiaron, añadiendo el agente anestésico correspondiente al acuario durante un periodo de 3 minutos (peces estresados pretratados con el anestésico). Inmediatamente después se exponen al aire y se procede del mismo modo que en el caso anterior.

#### 4.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIESTRÉS DE LOS DIFERENTES ANESTÉSICOS FRENTE A UN ESTRÉS AGUDO (PERSECUCIÓN) EN JUVENILES DE *Solea senegalensis*

En este experimento se evaluaron y analizaron los mismos anestésicos (2-fenoxietanol  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ; metomidato  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ; aceite de clavo  $30 \text{ mg L}^{-1}$  y MS-222  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) y parámetros de estrés que en el experimento anterior (4.5), pero en este caso el estrés es causado por una persecución con un salabardo (Figura 28).



**Figura 28.** Representación esquemática del procedimiento utilizado para investigar la capacidad antiestrés (persecución durante 3 minutos) de los anestésicos. S: sin anestesia, C: con anestesia.

Para esta serie de experimentos se utilizaron lenguados con un peso de  $83 \pm 3$  g. Los lenguados se encontraban distribuidos inicialmente en 2 acuarios de 100 L (12 peces/acuario). El experimento comenzó con la persecución enérgica de los peces, por medio de un salabardo durante 1 minuto. Después se interrumpió la persecución por 2 minutos, para reanudarla nuevamente durante otros 2 minutos (peces estresados sin pretratamiento con el anestésico). Inmediatamente después estos animales se reubicaron en acuarios de recuperación (50 L) (2 peces/acuario), y a los 30 min, 2 horas y 24 horas son capturados (de dos en dos) e introducidos en el acuario de observación, al que se le había adicionado previamente metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) como agente anestésico. En este momento se realizó la extracción de sangre y el pesado. Con los peces del otro acuario de 100 L se procedió del mismo modo, pero previamente a la persecución los animales son anestesiados, añadiendo el agente anestésico correspondiente al acuario durante un periodo de 3 minutos (peces estresados pretratados con el anestésico). Inmediatamente después se comenzó con el protocolo de persecución y se procedió del mismo modo que en el caso anterior.

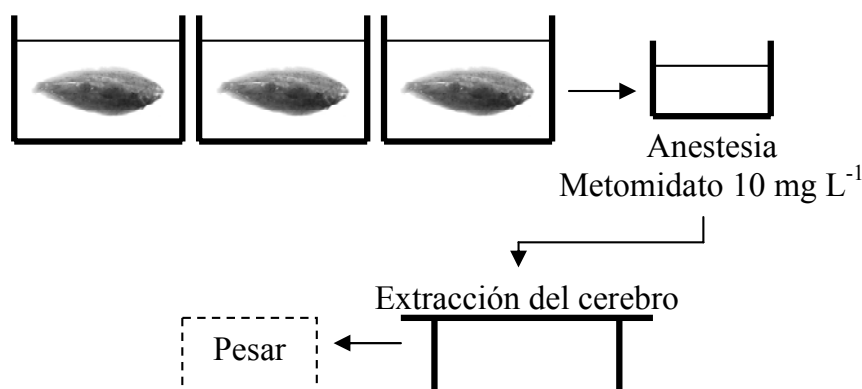
#### **4.7. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS (EXPOSICIÓN AL AIRE) SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NEUROTRANSMISORES: EFECTO DE LOS ANESTÉSICOS**

Esta serie de experimentos se desarrolló para determinar el posible efecto del estrés sobre la actividad de diversos sistemas de neurotransmisión cerebrales (5HT, DA y NA). Para esta serie de experimentos se utilizaron lenguados de un peso de  $120 \pm 5$  g. Los lenguados se encontraban distribuidos inicialmente en 2 acuarios (Figura 27) de 100 L (12 peces/acuario). El diseño de este experimento es similar, con pequeñas modificaciones, al llevado a cabo en el experimento previo (4.5). En este caso el muestreo se realizó únicamente a las 2 y 24 horas de la aplicación del estrés a los peces sin o con pretratamiento-anestésico. Después de estos tiempos los peces se capturaron (de dos en dos) y se introdujeron en el acuario de observación al que se le había adicionado previamente metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) como agente anestésico. En este momento se realiza la decapitación, extracción del cerebro y el pesado. El número total de animales utilizados por grupo fue de 6.

#### **4.8. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS (PERSECUCIÓN) SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NEUROTRANSMISORES: EFECTO DE LOS ANESTÉSICOS**

Para este experimento se utilizaron lenguados de un peso de  $92 \pm 4$  g. Se procedió de un modo similar a lo indicado en el apartado 4.6 y 4.7. El número de animales utilizados por grupo fue de 6.

Para este experimento y el anterior (4.7) se realizó un grupo control. Para ello partimos de lenguados de un peso de  $138 \pm 7$  g, que se encontraban distribuidos en 3 tanques de 100 L (3 peces/acuario) (Figura 29). En este caso, los peces sin ningún tipo de manipulación previa, fueron capturados ( $< 15$  s) del mismo modo que en los experimentos anteriores e introducidos en el acuario de observación (metomidato  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Una vez anestesiados, los animales se sacrificaron, se extrajeron los cerebros y se pesaron. El número total de animales utilizados en este grupo control fue de 9.



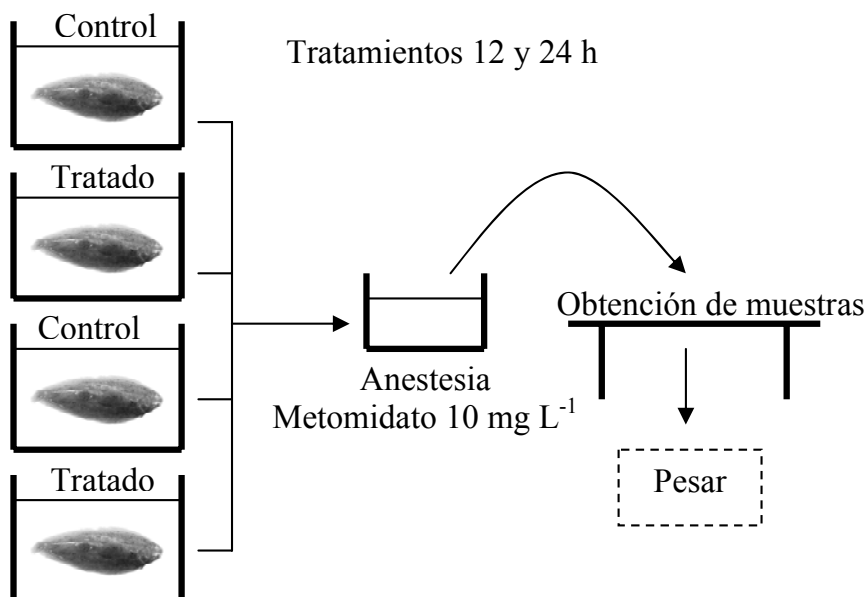
**Figura 29.** Representación esquemática del protocolo correspondiente al grupo control.

#### 4.9. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL AMONIACO SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, PLASMÁTICOS, Y SOBRE LOS NIVELES DE LOS NEUROTRASMISORES CEREBRALES EN JUVENILES DE *Solea senegalensis*

El objetivo de este experimento fue determinar los posibles efectos de la exposición durante 12 y 24 horas a  $64,4 \text{ mg L}^{-1}$  (50% de la  $LC_{50/48 \text{ h}}$ ) de amoníaco exógeno (amoníaco total) sobre diversos índices de estrés (glucosa, lactato y cortisol, hematocrito y hemoglobina) y sobre la actividad de diversos sistemas de neurotransmisión cerebrales (5HT, DA y NA).

Para este experimento se utilizaron peces con un peso de  $86 \pm 3$  g. En este experimento los animales se distribuyeron en 2 acuarios control y 2 tratados (6 peces/acuario 50 L) (Figura 30). En el día del tratamiento, se cerró la entrada del agua a los acuarios, y se adicionó la solución de cloruro de amonio (concentración teórica en el acuario  $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). A las 12 y a las 24 h de exposición se capturaron los peces desde los tanques control o tratados. Para evitar en lo posible el estrés de captura los peces son sedados previamente, adicionando una solución anestésica (metomidato, concentración final  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) directamente al acuario ( $50 \text{ L}$ ) donde se encontraban los animales (home tank anesthesia). Una vez sedados se transfirieron (de 2 en 2) al acuario de observación previamente preparado con una solución anestésica de metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Una vez anestesiados se

retiraron, procediendo a la extracción de una muestra de sangre, cerebro, y al pesado. Este protocolo experimental fue repetido otra vez, de modo que el número final de animales por grupo fue de 12.



**Figura 30.** Representación esquemática de las condiciones de experimentación a que fueron sometidos los lenguados para estudiar el efecto del amoníaco.

Al principio y a las 12 y 24 h se toma una muestra de agua para el análisis colorimétrico (650 nm, espectrofotómetro Perkin Elmer - USA) de los niveles reales de amoníaco total. A las 12 y 24 h se obtuvieron valores de amoníaco superiores del orden de un 18 y un 11% con respecto al valor inicial.





## 5. Resultados



### 5.1. DEFINICIÓN DE LOS ESTADIOS DE ANESTESIA, INDUCCIÓN Y RECUPERACIÓN, EN EL LENGUADO

Las características que definen los diferentes estadios (I, II, III) de anestesia y recuperación en el lenguado están resumidas en la Tabla 1. El estadio II de anestesia se caracterizó por una pérdida del equilibrio, del tono muscular, de los movimientos corporales, por una baja tasa de ventilación opercular y por una fuerte atenuación de las respuestas reflejas a un estímulo táctil. El estadio III se caracterizó por una pérdida total de la actividad refleja y por unos movimientos operculares casi imperceptibles.

Estadios de anestesia	Descripción
I	Pérdida parcial del equilibrio Los peces conservan algunos movimientos corporales
II	Pérdida total del equilibrio y del tono muscular Baja frecuencia de movimientos operculares (tasa de ventilación) Respuestas reflejas fuertemente atenuadas
III	Movimientos operculares imperceptibles Pérdida total de los reflejos espinales.
Estadios de recuperación	Descripción
I	Ausencia de equilibrio No presentan ningún movimiento corporal Empiezan a recuperar los movimientos operculares
II	Recuperación del equilibrio y de algunos movimientos corporales Recuperación de la frecuencia de los movimientos operculares
III	Similar a preanestesia Frecuencia opercular ligeramente aumentada en relación al estado de preanestesia.

**Tabla 1.** Características de los estadios de inducción y recuperación de la anestesia en el *Solea senegalensis* (adaptado de Iwama et al., 1989).

### 5.2. DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE INDUCCIÓN Y DE RECUPERACIÓN EN LENGUADOS ANESTESIADOS CON DIFERENTES DOSIS DE ANESTÉSICOS

En la Tabla 2 se representan los tiempos de inducción y recuperación, obtenidos después de la administración de las diferentes dosis de los diferentes anestésicos. Con todos los anestésicos estudiados, los tiempos de inducción fueron dependientes de la dosis ( $P < 0,05$ ), es decir, disminuyeron con el aumento de las dosis. Los mayores y menores tiempos de inducción variaron entre: i) los 13,16 y 1,50 minutos, para las dosis de 300 y 600 mg L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol,

respectivamente, ii) los 3,12 y 1,50 minutos con las dosis de 4 y 6 mg L<sup>-1</sup> de metomidato, respectivamente, iii) los 3,50 y 1,66 minutos con las dosis de 20 y 40 mg L<sup>-1</sup> de aceite de clavo, respectivamente, y iv) los 7,50 y 2,25 minutos con las dosis de 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de MS-222, respectivamente.

Con el 2-fenoxietanol, los tiempos de inducción obtenidos con cada dosis son significativamente diferentes entre ellos ( $P < 0,05$ ). Los tiempos de inducción obtenidos: i) con las dosis de 5 y 6 mg L<sup>-1</sup> de metomidato son significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que el obtenido con la dosis de 4 mg L<sup>-1</sup>, ii) con la dosis de 40 mg L<sup>-1</sup> de aceite de clavo fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que los obtenidos con la dosis de 20 y 30 mg L<sup>-1</sup>, y iii) con las dosis de 75 y 100 mg L<sup>-1</sup> de MS-222 fueron significativamente menores que el obtenido con la dosis de 50 mg L<sup>-1</sup>.

Anestésico	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	n	Tiempo (min)	
			Inducción	Recuperación
2-Fenoxietanol	300	6	13,2 ± 1,30 <sup>a</sup>	5,35 ± 1,03 <sup>a</sup>
	400	8	8,37 ± 0,73 <sup>b</sup>	6,09 ± 0,92 <sup>a</sup>
	500	8	4,37 ± 0,67 <sup>c</sup>	5,47 ± 1,52 <sup>ab</sup>
	600	8	1,50 ± 0,37 <sup>d</sup>	1,94 ± 0,56 <sup>b</sup>
Metomidato	4	9	3,12 ± 0,39 <sup>a</sup>	9,09 ± 1,44 <sup>a</sup>
	5	6	1,50 ± 0,22 <sup>b</sup>	3,70 ± 1,18 <sup>b</sup>
	6	8	1,50 ± 0,26 <sup>b</sup>	4,30 ± 1,20 <sup>b</sup>
Aceite de clavo	20	6	3,50 ± 0,34 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,75 <sup>a</sup>
	30	7	3,16 ± 0,40 <sup>a</sup>	3,76 ± 1,01 <sup>a</sup>
	40	6	1,66 ± 0,33 <sup>b</sup>	3,59 ± 1,10 <sup>a</sup>
MS-222	50	4	7,50 ± 1,19 <sup>a</sup>	2,76 ± 1,09 <sup>c</sup>
	75	7	2,42 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,14 <sup>c</sup>
	100	8	2,25 ± 0,31 <sup>b</sup>	2,99 ± 0,68 <sup>c</sup>

**Tabla 2.** Tiempos de inducción y recuperación para el *Solea senegalensis* anestesiados con varias concentraciones de cuatro agentes anestésicos. Tiempo de inducción: tiempo necesario para alcanzar el estadio II de anestesia. Tiempo de recuperación: tiempo necesario para retornar al estadio II de recuperación. Los datos se expresan como la media ± SEM. Para cada agente anestésico, los valores en una misma columna indicados con diferentes letras sobrescritas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). n: numero de peces.

Los tiempos de recuperación para todos los anestésicos evaluados siempre estuvieron por debajo de los 10 min. Para el aceite de clavo y el MS-222 el tiempo

de recuperación fue independiente de la dosis. Los tiempos de recuperación obtenidos: i) con las dosis de 5 y 6 mg L<sup>-1</sup> de metomidato fueron significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que el obtenido con la dosis de 4 mg L<sup>-1</sup>, y ii) con la dosis de 600 mg L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que los obtenidos con las dosis de 300 y 400 mg L<sup>-1</sup>.

Tomando como referencia unos tiempos de inducción y recuperación menores de 3 y 5 minutos respectivamente, se observa que las menores dosis efectivas que se encontraron, fueron: 600 mg L<sup>-1</sup> para el 2-fenoxietanol, 5 mg L<sup>-1</sup> para el metomidato, 30 mg L<sup>-1</sup> para el aceite de clavo y 75 mg L<sup>-1</sup> para el MS-222.

### 5.3. ESTUDIO PARA EVALUAR LA PROFUNDIDAD DE LA ANESTESIA EN EL ESTADIO II

Los resultados se resumen en la Tabla 3. En ella se representan los tiempos, dependiendo del peso de los peces, necesarios para alcanzar una profundidad anestésica que nos permita una extracción de sangre, y los tiempos de recuperación. Solamente con las siguientes dosis se consiguieron respuestas efectivas por debajo de los 3 minutos: 600 mg L<sup>-1</sup> (2-fenoxietanol), 6 y 8 mg L<sup>-1</sup> (metomidato) con los peces de  $74 \pm 4$  g, y 600 mg L<sup>-1</sup> (2-fenoxietanol), 8 mg L<sup>-1</sup> (metomidato) y 200 mg L<sup>-1</sup> (MS-222) con los peces de  $213 \pm 15$  g. Con el aceite de clavo los tiempos siempre estuvieron por encima de los 3 minutos.

Cuando se comparan los tiempos de inducción los resultados fueron los siguientes: i) con las dosis de 500 y 600 mg L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol, los tiempos de inducción fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en el grupo de peces con un peso de  $300 \pm 12$  g, que en los grupos de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g y  $213 \pm 15$  g. Mientras que con la dosis de 600 mg L<sup>-1</sup>, el tiempo de inducción de los peces con un peso de  $213 \pm 15$  g fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que el observado en el grupo de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g, ii) con las dosis de 6 y 8 mg L<sup>-1</sup> de metomidato, los tiempos de inducción fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en el grupo de peces de  $300 \pm 12$  g, que en los grupos de peces de  $74 \pm 4$  g y  $213 \pm 15$  g. Con la dosis de 6 mg L<sup>-1</sup> el tiempo de inducción del grupo de peces con un peso de  $213 \pm 15$  g fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que en el observado en el grupo de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g, iii) con las dosis de 40 y 80 mg L<sup>-1</sup> de aceite de clavo, los tiempos de inducción fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los grupos de peces con un peso de  $300 \pm 12$  g y  $213 \pm 15$  g, que en el grupo de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g, y iv) Con las dosis de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> de MS-222, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de inducción entre los diferentes grupos de peces ( $74 \pm 4$  g,  $213 \pm 15$  g, y  $300 \pm 12$  g).

Para el 2-fenoxietanol y el aceite de clavo el tiempo requerido para una extracción de sangre fue dependiente del peso y de la dosis ( $P < 0,05$ ). Para el metomidato fue dependiente del peso ( $P < 0,001$ ), y para el MS-222 fue dependiente de la dosis ( $P < 0,001$ ) (Tabla 4).

En la mayoría de los casos, los tiempos de recuperación para cualquier dosis y anestésico siempre estuvieron por encima de los 5 minutos (entre  $5,36 \pm 1,75$  min y  $40,13 \pm 8,37$  min), con la única excepción de la dosis de  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol en los peces de menor peso, en este caso el tiempo de recuperación fue  $4,11 \pm 1,31$  min (Tabla 3).

2-Fenoxietanol		500 mg L <sup>-1</sup>		600 mg L <sup>-1</sup>	
Peso (g)	n	Inducción	Recuperación	Inducción	Recuperación
74 ± 4	5 - 6	3,81 ± 0,45 <sup>a</sup>	7,00 ± 1,03 <sup>f</sup>	1,74 ± 0,05 <sup>c</sup>	4,11 ± 1,31 <sup>g</sup>
213 ± 15	6	4,58 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,87 <sup>f</sup>	2,82 ± 0,36 <sup>d</sup>	7,24 ± 0,97 <sup>g</sup>
300 ± 12	6	7,54 ± 0,74 <sup>b</sup>	5,36 ± 1,75 <sup>f</sup>	4,30 ± 0,18 <sup>e</sup>	9,82 ± 2,22 <sup>g</sup>
Metomidate		6 mg L <sup>-1</sup>		8 mg L <sup>-1</sup>	
Peso (g)	n	Inducción	Recuperación	Inducción	Recuperación
74 ± 4	6 - 7	2,99 ± 0,29 <sup>a</sup>	15,74 ± 4,01 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,17 <sup>d</sup>	11,89 ± 2,40 <sup>c</sup>
213 ± 15	5 - 7	5,65 ± 0,45 <sup>b</sup>	20,72 ± 2,51 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,32 <sup>d</sup>	9,16 ± 2,52 <sup>c</sup>
300 ± 12	5	9,30 ± 1,41 <sup>c</sup>	14,15 ± 4,49 <sup>a</sup>	13,40 ± 1,96 <sup>e</sup>	40,13 ± 8,37 <sup>d</sup>
Aceite de clavo		40 mg L <sup>-1</sup>		80 mg L <sup>-1</sup>	
Peso (g)	n	Inducción	Recuperación	Inducción	Recuperación
74 ± 4	11 - 12	5,38 ± 0,53 <sup>a</sup>	6,32 ± 0,73 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,42 <sup>c</sup>	12,56 ± 1,73 <sup>b</sup>
213 ± 15	10 - 11	11,09 ± 2,51 <sup>b</sup>	9,85 ± 2,17 <sup>a</sup>	8,16 ± 0,57 <sup>d</sup>	12,06 ± 1,40 <sup>b</sup>
300 ± 12	12	10,45 ± 0,84 <sup>b</sup>	8,70 ± 0,79 <sup>a</sup>	8,34 ± 0,67 <sup>d</sup>	14,59 ± 1,97 <sup>b</sup>
MS-222		100 mg L <sup>-1</sup>		200 mg L <sup>-1</sup>	
Peso (g)	n	Inducción	Recuperación	Inducción	Recuperación
74 ± 4	6	7,15 ± 0,65 <sup>a</sup>	7,07 ± 1,08 <sup>e</sup>	3,99 ± 0,22 <sup>c</sup>	7,95 ± 1,60 <sup>i</sup>
213 ± 15	6	6,33 ± 1,02 <sup>a</sup>	7,49 ± 2,06 <sup>e</sup>	2,83 ± 0,31 <sup>c</sup>	10,43 ± 1,64 <sup>i</sup>
300 ± 12	6	6,55 ± 0,55 <sup>a</sup>	7,19 ± 2,60 <sup>e</sup>	3,34 ± 0,25 <sup>c</sup>	18,10 ± 3,11 <sup>h</sup>

**Tabla 3.** Tiempos necesarios para poder desarrollar una extracción de sangre en el *Solea senegalensis*, en función del peso de los peces. Tiempo de inducción (min): tiempo necesario para alcanzar un estadio de anestesia que permita una extracción de sangre sin respuestas reflejas. Tiempo de recuperación (min): tiempo necesario para retornar al estadio II de recuperación. Los datos se expresan como la media ± SEM. Para cada agente anestésico, los valores en una misma columna indicados con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). n: numero de peces.

Cuando se comparan los tiempos de recuperación dentro de un mismo anestésico, los resultados fueron los siguientes: i) con las dos dosis del 2-fenoxietanol y del aceite de clavo no se observaron diferencias significativas, ii)

con la dosis de 8 mg L<sup>-1</sup> de metomidato, el tiempo de recuperación fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en el grupo de peces con un peso de  $300 \pm 12$  g que el observado en los grupos de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g y  $213 \pm 15$  g, iii) con la dosis de 200 mg L<sup>-1</sup> de MS-222, el tiempo de recuperación fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en el grupo de peces con un peso de  $300 \pm 12$  g, que los observados en los grupos de peces con un peso de  $74 \pm 4$  g y  $213 \pm 15$  g.

Para el 2-fenoxietanol, aceite de clavo y MS-222 los tiempos de recuperación fueron independientes del peso (Tabla 4).

Parámetro	Tratamiento	Peso	Dosis	Peso x Dosis
Inducción	2-Fenoxietanol	< 0,001	< 0,001	ns
Inducción	Metomidato	< 0,001	ns	< 0,001
Inducción	Aceite de clavo	< 0,001	< 0,05	ns
Inducción	MS-222	ns	< 0,001	ns
Recuperación	2-Fenoxietanol	ns	ns	ns
Recuperación	Metomidato	< 0,01	ns	< 0,001
Recuperación	Aceite de clavo	ns	< 0,001	ns
Recuperación	MS-222	ns	< 0,01	ns

**Tabla 4.** *P*-valores del análisis de varianza de dos vías de los parámetros medidos (tiempos de inducción y de recuperación) después del tratamiento con los respectivos anestésicos. ns: no significativo.

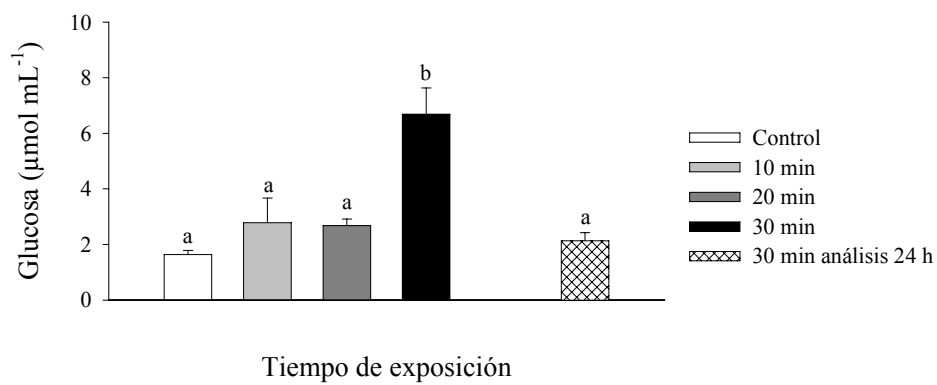
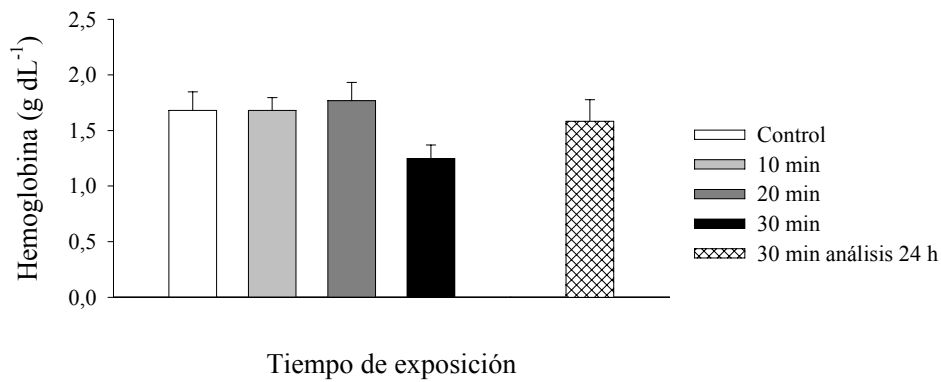
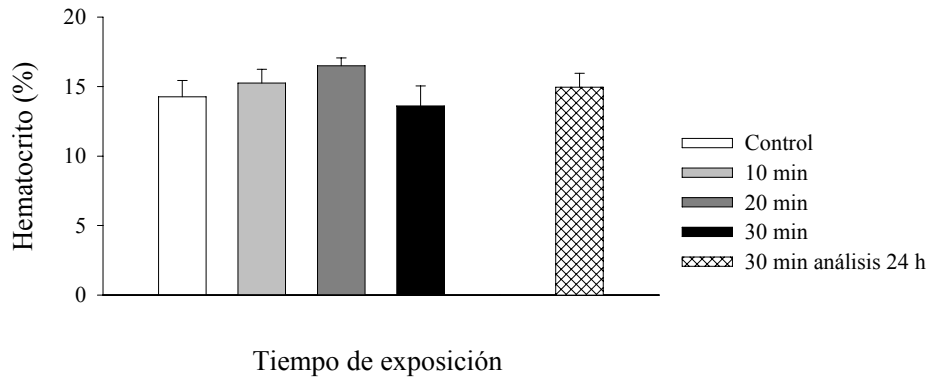
#### 5.4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS SOBRE DIVERSOS INDICADORES SANGUÍNEOS Y PLASMÁTICOS DE ESTRÉS

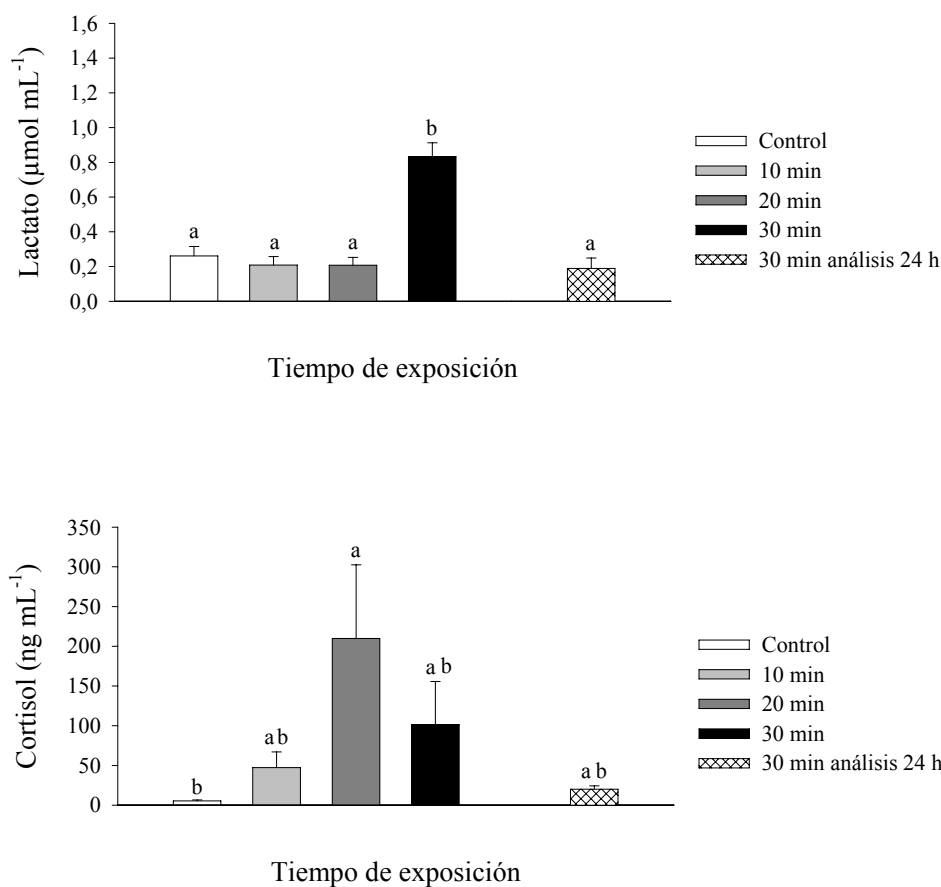
##### 2-Fenoxietanol

Los datos correspondientes a los efectos de la exposición al 2-fenoxietanol por un periodo de: i) 5 (control), 10, 20, 30 min y ii) de 30 minutos con toma de muestras a las 24 horas, se representan en la Figura 31. Los niveles del hematocrito y hemoglobina no muestran alteraciones significativas en ninguno de los casos estudiados. No obstante, si se puede apreciar un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) después de los 30 minutos de exposición en los niveles de la glucosa y lactato, con relación a sus respectivos controles (5 minutos de exposición). Con respecto al cortisol el incremento detectado a los 20 minutos sólo es significativo ( $P < 0,05$ ) frente al control de 5 minutos de exposición. En todos los casos los



niveles a las 24 horas y 30 minutos de exposición, no se modifican significativamente con respecto a los niveles basales detectados a los 5 minutos de exposición.



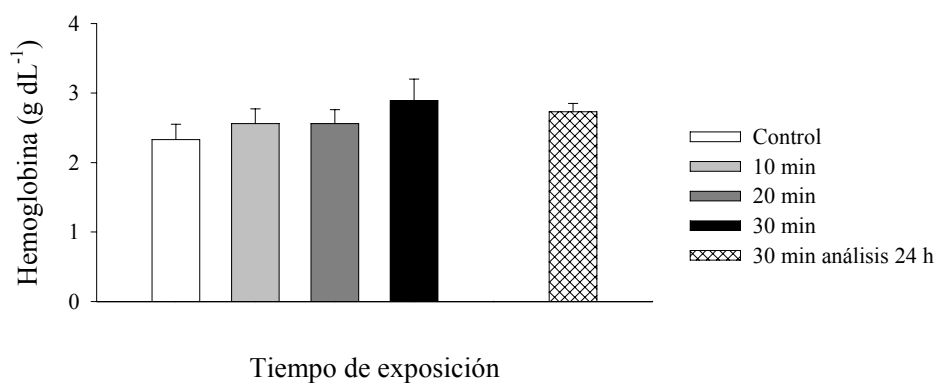
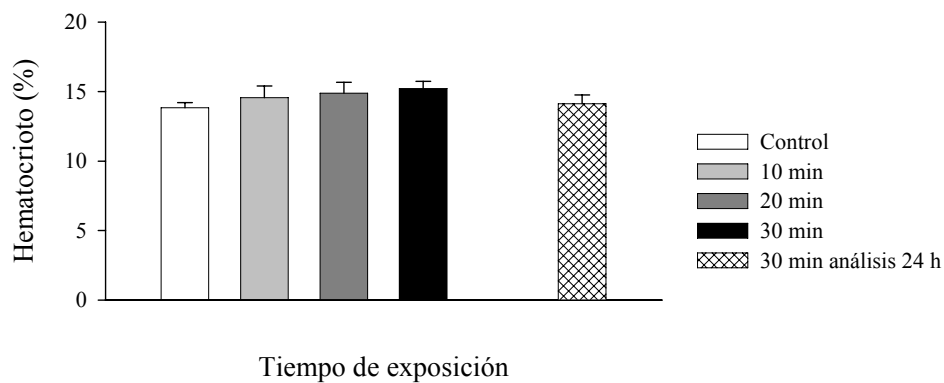


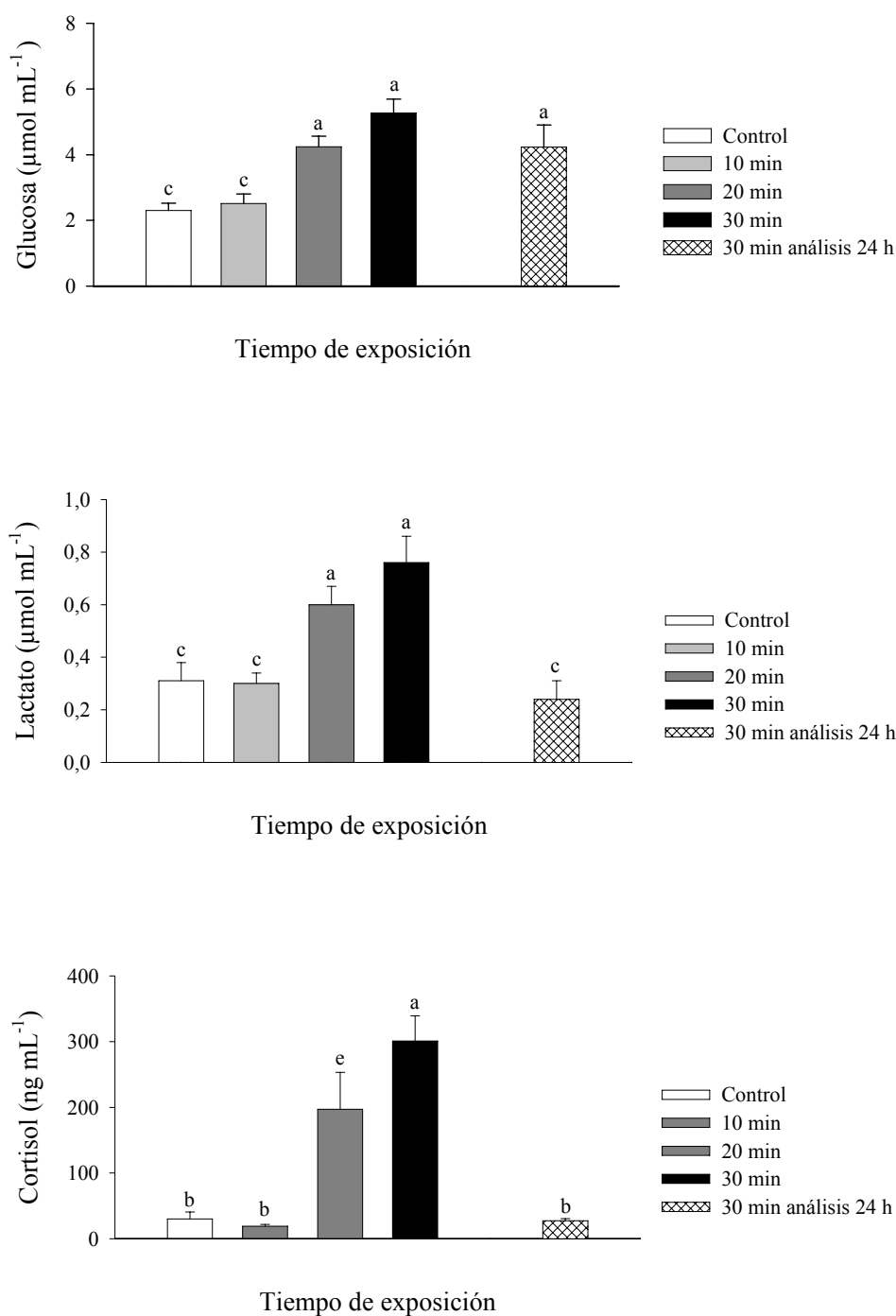
◀ **Figura 31.** Efecto de la exposición al 2-fenoxietanol ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hemoglobina, hematocrito) durante 5 (control), 10, 20, 30 min, y a las 24 horas después de una exposición de 30 min. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 7-8 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Aceite de clavo

Los datos correspondientes a los efectos de la exposición al aceite de clavo por un periodo de: i) 5 (control), 10, 20, 30 min y ii) de 30 minutos con toma de muestras a las 24 horas, se representan en la Figura 32. Los niveles del hematocrito y hemoglobina no muestran alteraciones significativas en ninguno de los casos estudiados. Para la glucosa y lactato se observan aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) a los 20 y 30 minutos después de la exposición, siempre mayores a los 30 minutos, con relación a sus respectivos controles. Con respecto al cortisol se

observa una dinámica similar, un aumento gradual y significativo ( $P < 0,05$ ) a partir de los 20 minutos de exposición. En el grupo de 24 horas, los niveles de lactato y cortisol no son significativos con respecto a los niveles basales detectados a los 5 minutos de exposición. Por el contrario los niveles de glucosa se mantienen significativamente elevados ( $P < 0,05$ ).

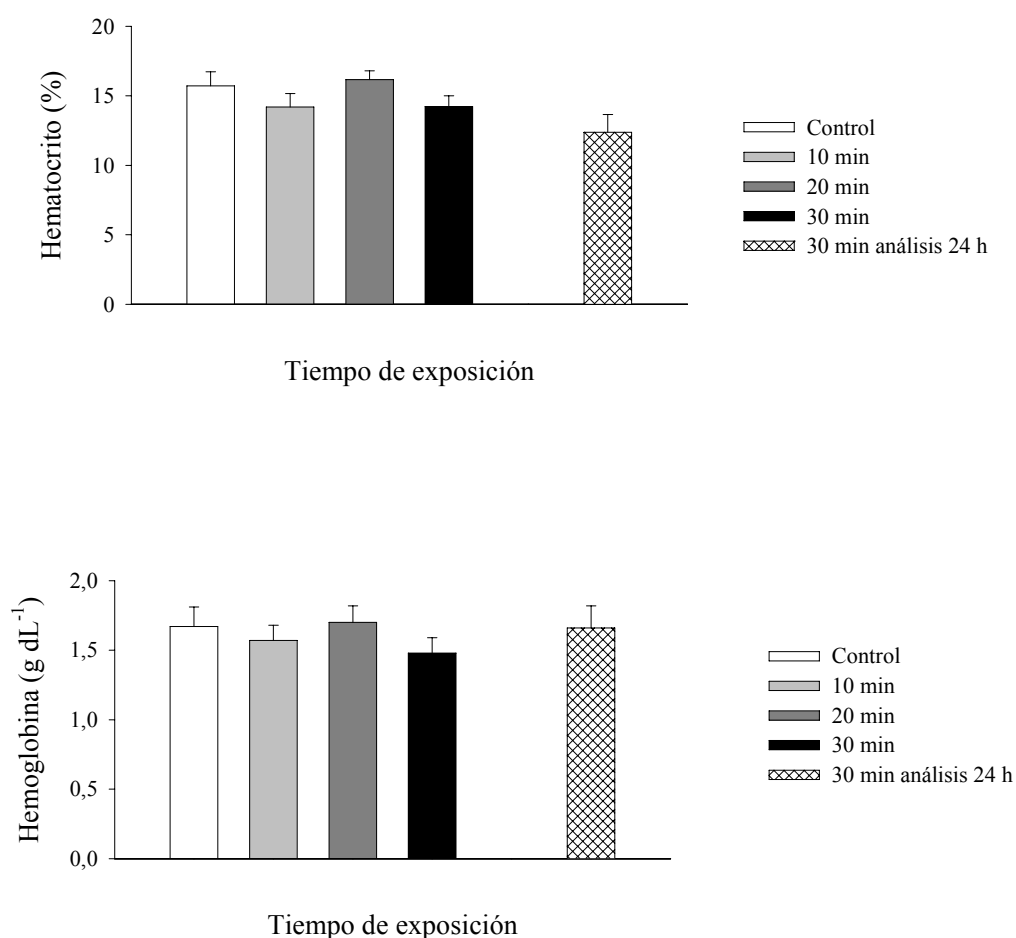


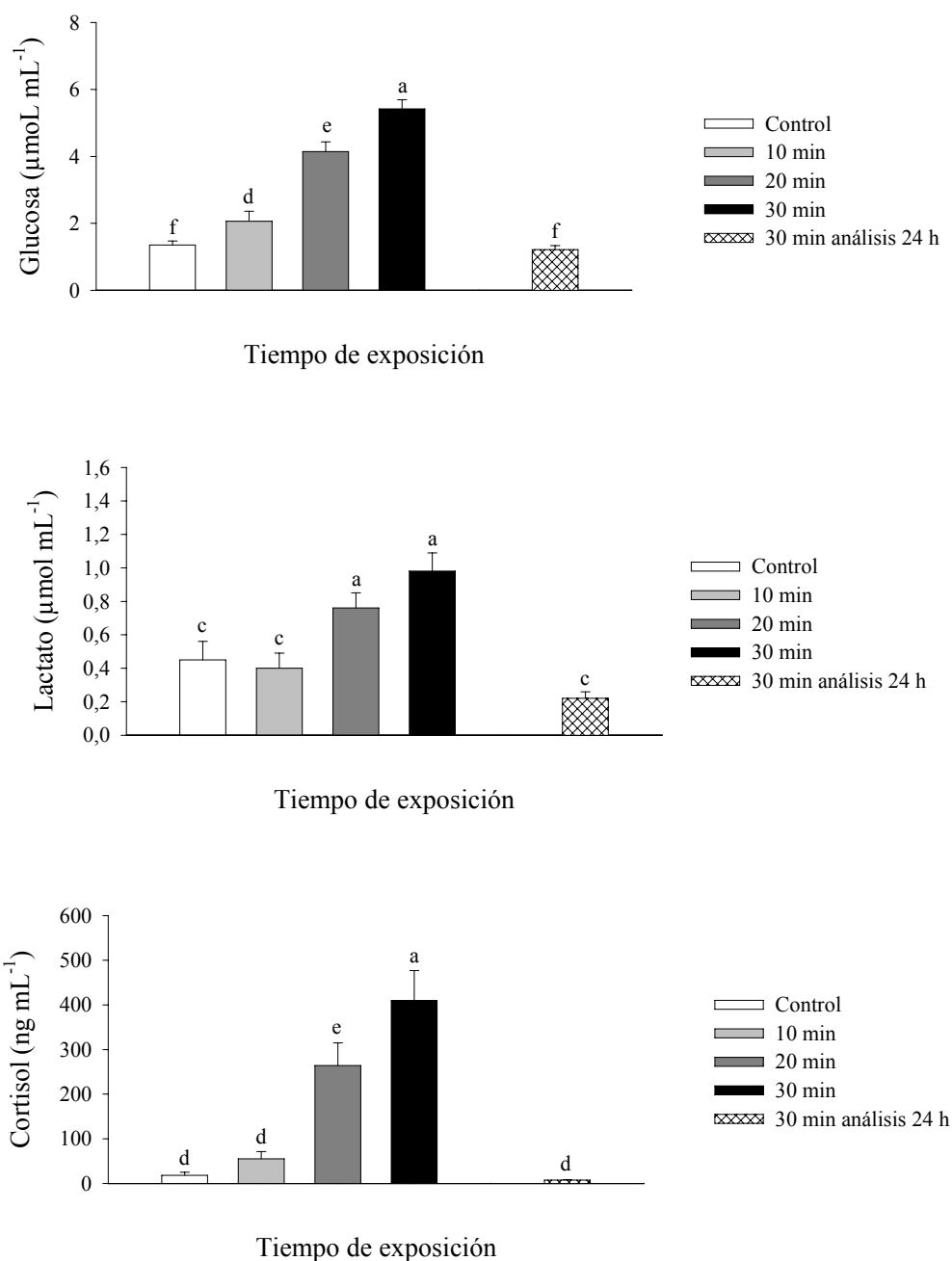


▲  
 ◀ **Figura 32.** Efecto de la exposición al aceite de clavo ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hemoglobina, hematocrito) durante 5 (control), 10, 20, 30 min y a las 24 horas después de una exposición de 30 min. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 7-8 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## MS-222

Los datos correspondientes a los efectos de la exposición al MS-222 por un periodo de: i) 5 (control), 10, 20, 30 min y ii) de 30 minutos con toma de muestras a las 24 horas, se representan en la Figura 33. Los niveles del hematocrito y hemoglobina no muestran alteraciones significativas en ninguno de los casos estudiados. Para la glucosa se observa un aumento gradual y significativo ( $P < 0,05$ ) a partir de los 10 min de exposición, frente a su control; mientras que para el lactato la dinámica es similar, pero los incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) sólo se aprecian a los 20 y 30 minutos de exposición. Con respecto al cortisol se observa una dinámica similar a la detectada con la glucosa, pero sus niveles sólo se incrementan significativamente ( $P < 0,05$ ) a los 20 y 30 minutos de exposición. En todos los casos los niveles a las 24 horas y 30 minutos de exposición, no se modifican significativamente con respecto a los niveles basales detectados a los 5 minutos de exposición.

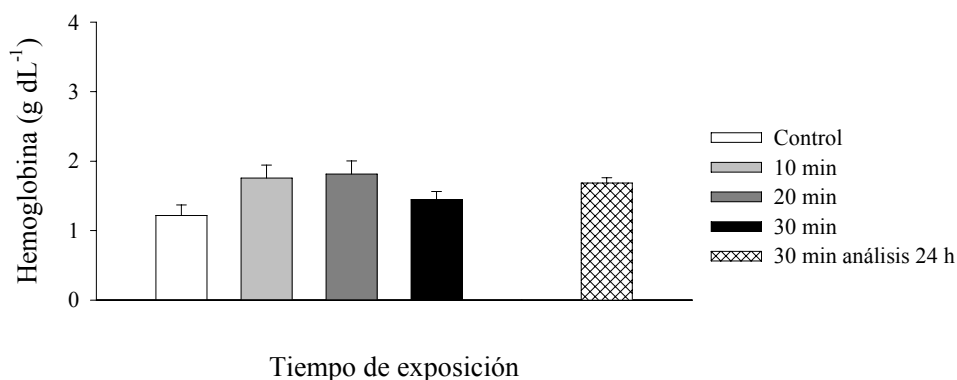
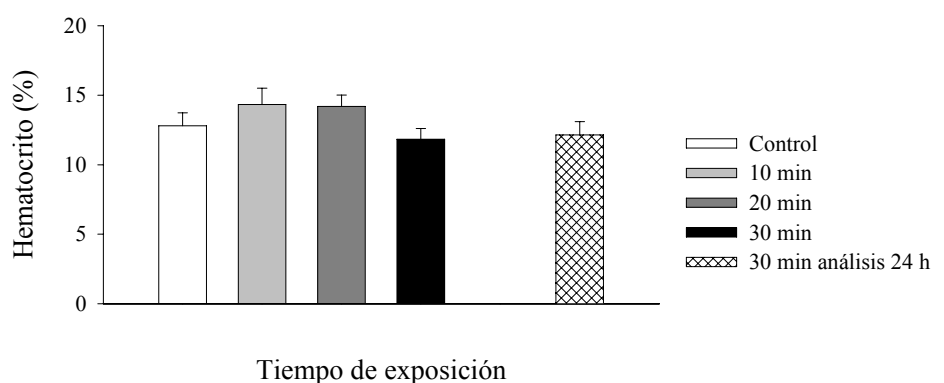


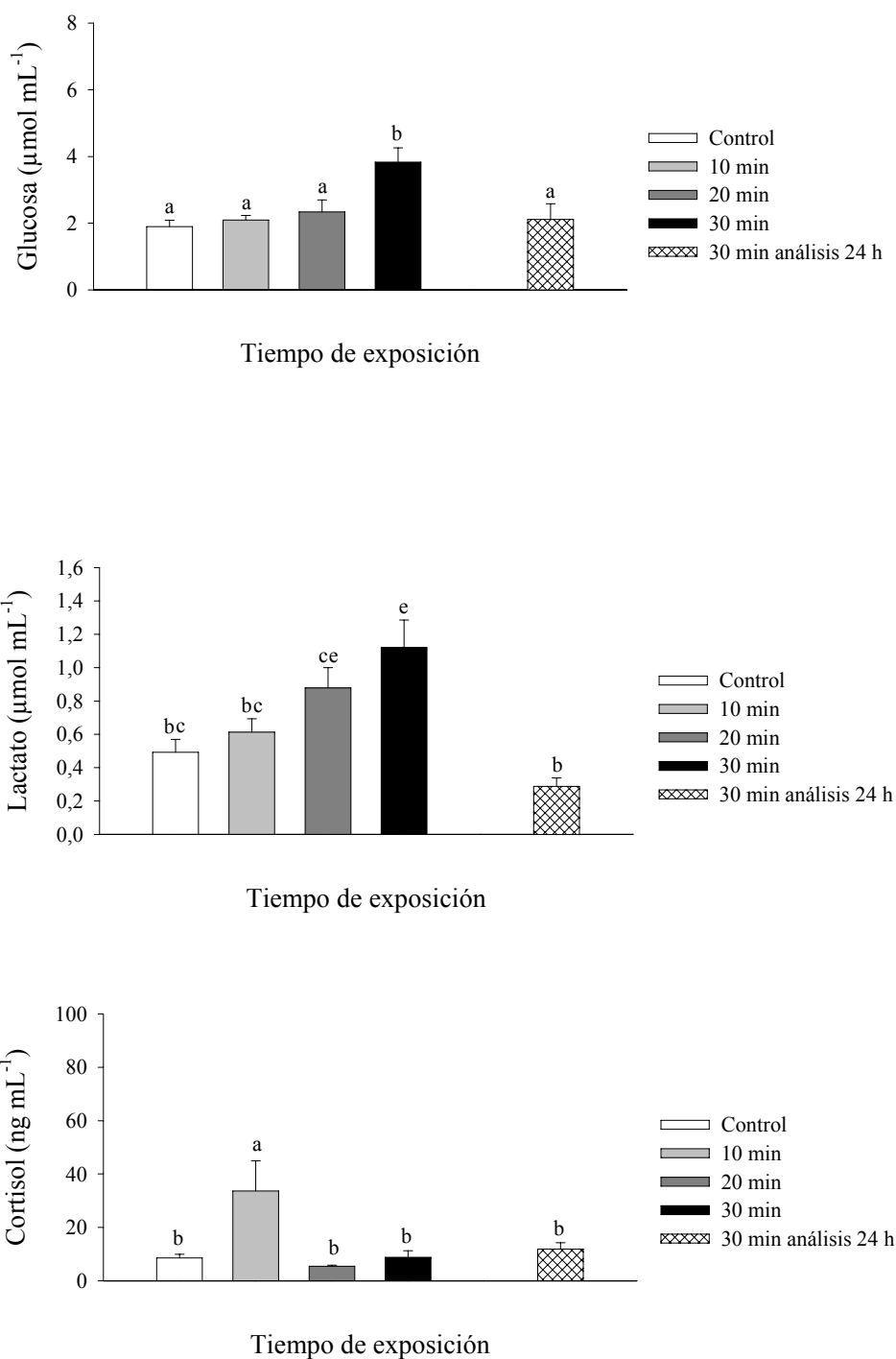


▲  
 ◀ **Figura 33.** Efecto de la exposición al MS-222 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hemoglobina, hematocrito) durante 5 (control), 10, 20, 30 min y a las 24 horas después de una exposición de 30 min. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 7-8 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Metomidato

Los datos correspondientes a los efectos de la exposición al metomidato por un periodo de: i) 5 (control), 10, 20, 30 min y ii) de 30 minutos con toma de muestras a las 24 horas, se representan en la Figura 34. Los niveles del hematocrito y hemoglobina no muestran alteraciones significativas en ninguno de los casos estudiados. Para la glucosa se observa un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) 30 minutos después de la exposición, frente a su correspondiente control; mientras que para el lactato el incremento fue gradual aunque sólo significativo ( $P < 0,05$ ) a los 30 minutos de exposición. Con respecto al cortisol sólo se observa un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) de sus niveles a los 10 minutos de exposición. En todos los casos los niveles a las 24 horas y 30 minutos de exposición, no se modifican significativamente con respecto a los niveles basales detectados a los 5 minutos de exposición.





▲  
 ◀ **Figura 34.** Efecto de la exposición al metomidato ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hemoglobina, hematocrito) durante 5 (control), 10, 20, 30 min y a las 24 horas después de una exposición de 30 min. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 7-8 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



#### 5.4.1. ESTUDIO COMPARADO DE LOS EFECTOS DE LOS CUATRO ANESTÉSICOS SOBRE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y PLASMÁTICOS: UNA VISIÓN GLOBAL

En la Tabla 5 se representan, de un modo comparado, las acciones de cada anestésico (2-fenoxietanol 500 mg L<sup>-1</sup>, aceite de clavo 80 mg L<sup>-1</sup>, MS-222 200 mg L<sup>-1</sup>, metomidato 6 mg L<sup>-1</sup>) sobre los parámetros hematológicos (hemoglobina y hematocrito) y plasmáticos (glucosa, lactato, y cortisol) por un periodo de: i) 5 (control), 10, 20, 30 min y ii) de 30 minutos con toma de muestras a las 24 horas. El estudio estadístico sólo se realizó para comparar las diferencias entre anestésicos.

En el caso del hematocrito no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de exposición a los 5 (control), 10 y 20 min y entre los de 30 min muestreo a las 24 horas. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre los grupos de exposición a los 30 minutos, concretamente el valor del hematocrito del grupo del aceite de clavo es significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que el observado para el del metomidato.

Con respecto a los valores de hemoglobina, se observó que los animales expuestos al aceite de clavo presentaron los niveles más elevados ( $P < 0,05$ ) en todos los tiempos de exposición frente a los obtenidos con los otros grupos de anestésicos (2-fenoxietanol, MS-222 y metomidato). Entre los otros anestésicos no se detectaron diferencias significativas.

Con respecto a los valores de glucosa, a los 5 min (control) de exposición, los animales expuestos al aceite de clavo presentaron los niveles más elevados, aunque sólo significativamente ( $P < 0,05$ ) frente a los del MS-222. Entre los otros tres anestésicos (2-fenoxietanol, MS-222 y metomidato) no se observaron variaciones significativas. A los 10 min de exposición no se detectaron diferencias significativas entre los animales expuestos a los cuatro anestésicos. A los 20 minutos de exposición, nuevamente es con el aceite de clavo cuando se observaron los valores más altos, aunque muy similares a los obtenidos con el MS-222. En ambos casos los valores son significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) a los observados en los grupos de animales expuestos al 2-fenoxietanol y metomidato. A los 30 min de exposición los valores más altos corresponden a los observados con el 2-fenoxietanol, aceite de clavo y MS-222, todos ellos fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores frente a los observados con el metomidato. Finalmente, en el grupo de animales de exposición de 30 min y muestreo a las 24 horas, se observaron los valores más elevados ( $P < 0,05$ ) en los animales expuestos al aceite de clavo en comparación a los detectados con el 2-fenoxietanol, MS-222 y metomidato. De un modo general se observó la misma dinámica para 2-fenoxietanol, MS-222 y metomidato, es decir los valores máximos a los 30 minutos con un retorno hacia los valores control a las 24 horas.

Hematocrito %					
Anest.	5 min (control)	10 min	20 min	30 min	30 min (24h)
2-Phe	14,27 ± 1,16	15,25 ± 1,00	16,50 ± 0,57	13,60 ± 1,44 <sup>ab</sup>	14,96 ± 0,99
Ac. clavo	13,84 ± 0,36	14,56 ± 0,84	14,88 ± 0,79	15,22 ± 0,52 <sup>a</sup>	14,13 ± 0,62
MS-222	15,71 ± 1,02	14,18 ± 0,98	16,16 ± 0,64	14,23 ± 0,77 <sup>ab</sup>	12,37 ± 1,28
Met.	12,79 ± 0,96	14,33 ± 1,17	14,18 ± 0,84	11,84 ± 0,76 <sup>b</sup>	12,13 ± 0,96
Hemoglobina g dL <sup>-1</sup>					
Anest.	5 min (control)	10 min	20 min	30 min	30 min (24h)
2-Phe	1,68 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,68 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,19 <sup>a</sup>
Ac. clavo	2,33 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,56 ± 0,20 <sup>b</sup>	2,89 ± 0,31 <sup>b</sup>	2,73 ± 0,12 <sup>b</sup>
MS-222	1,67 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,57 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,16 <sup>a</sup>
Met.	1,22 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,75 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,08 <sup>a</sup>
Glucosa µmol mL <sup>-1</sup>					
Anest.	5 min (control)	10 min	20 min	30 min	30 min (24h)
2-Phe	1,64 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,79 ± 0,88	2,68 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,69 ± 0,94 <sup>b</sup>	2,13 ± 0,29 <sup>a</sup>
Ac. clavo	2,30 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,51 ± 0,29	4,24 ± 0,32 <sup>b</sup>	5,27 ± 0,42 <sup>b</sup>	4,23 ± 0,67 <sup>b</sup>
MS-222	1,35 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,30	4,14 ± 0,29 <sup>b</sup>	5,42 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,12 <sup>a</sup>
Met.	1,90 ± 0,19 <sup>ab</sup>	2,09 ± 0,14	2,34 ± 0,36 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,43 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,47 <sup>a</sup>
Lactato µmol mL <sup>-1</sup>					
Anest.	5 min (control)	10 min	20 min	30 min	30 min (24h)
2-Phe	0,26 ± 0,05	0,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,08	0,19 ± 0,06
Ac. clavo	0,31 ± 0,07	0,30 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,10	0,24 ± 0,07
MS-222	0,45 ± 0,11	0,40 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,11	0,22 ± 0,04
Met.	0,49 ± 0,08	0,61 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,17	0,29 ± 0,05
Cortisol ng mL <sup>-1</sup>					
Anest.	5 min (control)	10 min	20 min	30 min	30 min (24h)
2-Phe	5 ± 1,20	47 ± 20,03	210 ± 92,60 <sup>a</sup>	101 ± 54,42 <sup>a</sup>	20 ± 4,36 <sup>bc</sup>
Ac. clavo	30 ± 10,61	19 ± 2,65	197 ± 56,32 <sup>a</sup>	301 ± 38,30 <sup>b</sup>	27 ± 3,24 <sup>c</sup>
MS-222	18 ± 6,85	55 ± 16,02	264 ± 50,92 <sup>a</sup>	410 ± 66,83 <sup>b</sup>	7 ± 1,45 <sup>a</sup>
Met.	9 ± 1,38	34 ± 11,26	5 ± 0,43 <sup>b</sup>	9 ± 2,46 <sup>a</sup>	12 ± 2,36 <sup>ab</sup>

**Tabla 5.** Media ± SEM. Parámetros hematológicos y plasmáticos en juveniles de *Solea senegalensis* en función del tiempo de exposición al 2-fenoxietanol, aceite de clavo, MS-222 y metomidato. Diferentes letras en una misma columna, de un mismo parámetro, indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Con respecto a los valores de lactato y de un modo general los valores más altos se encuentran en los animales tratados con el metomidato. No obstante, cuando se hicieron las comparaciones entre los anestésicos no se apreciaron diferencias significativas ni a los 5 min (control) y 30 min, ni a los 30 min con toma de muestras a las 24 horas. Sin embargo a los 10 min de exposición los valores de lactato se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en los animales expuestos al metomidato frente a los observados con los otros tres anestésicos. A los 20 min de exposición los valores obtenidos después de la exposición al metomidato, MS-222 y al aceite de clavo son significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) a los encontrados con el 2-fenoxietanol. De un modo general se observó la misma dinámica para los cuatro anestésicos evaluados, o sea valores máximos a los 30 min con retorno a los valores de control a las 24 horas.

En el caso del cortisol, el estudio comparativo realizado a los 5 (control) y 10 min de exposición no mostró ninguna variación significativa. A partir de estos tiempos los valores obtenidos después de la exposición al metomidato son siempre los menores, a los 20 min frente a los otros tres ( $P < 0,05$ ) y a los 30 min frente al aceite de clavo y MS-222 ( $P < 0,05$ ). Finalmente, en el grupo de animales de exposición de 30 min y muestreo a las 24 horas, los animales expuestos al 2-fenoxietanol y al aceite de clavo son los que presentaron las concentraciones más elevadas, significativas ( $P < 0,05$ ) frente a los del MS-222. No se detectaron diferencias significativas entre los animales expuestos al MS-222 y al metomidato. Con respecto a la evolución de las dinámicas de variación estas son similares para los animales expuestos al MS-222 y al aceite de clavo, donde se detecta el máximo a los 30 min de exposición, con retorno a valores basales a las 24 horas. En el caso de la exposición al metomidato y al 2-fenoxietanol los máximos se alcanzaron a los 10 y 20 min respectivamente; en ambos casos las concentraciones retornan a los valores de control a las 24 horas.

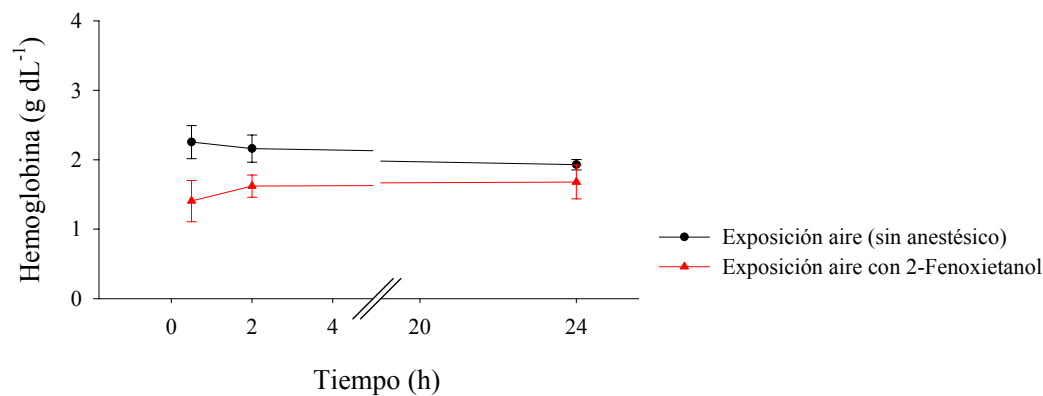
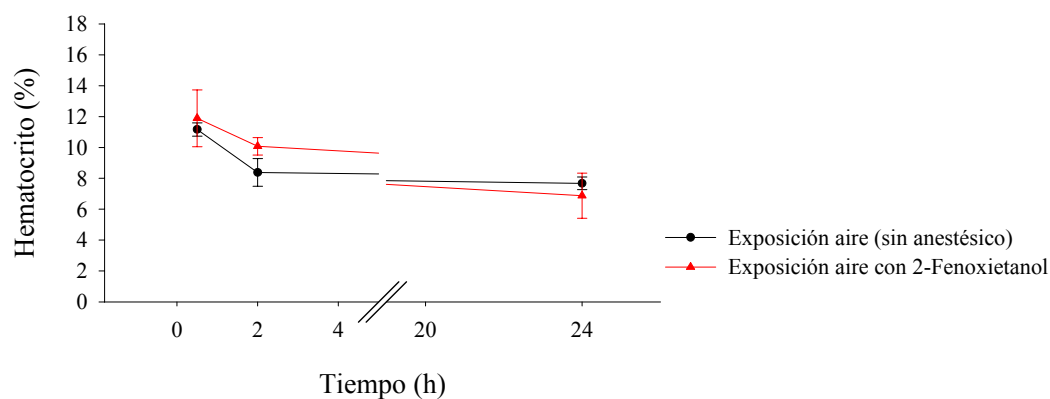
### **5.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIESTRÉS DE LOS DIFERENTES ANESTÉSICOS FRENTE A UN ESTRÉS AGUDO (EXPOSICIÓN AL AIRE) EN JUVENILES DE *Solea senegalensis***

De un modo general indicar que en los muestreos realizados 24 h después de haber expuesto a los peces durante 3 minutos al estrés, en ningún caso se detectaron variaciones significativas entre los grupos de peces estresados no anestesiados y los de peces estresados anestesiados.

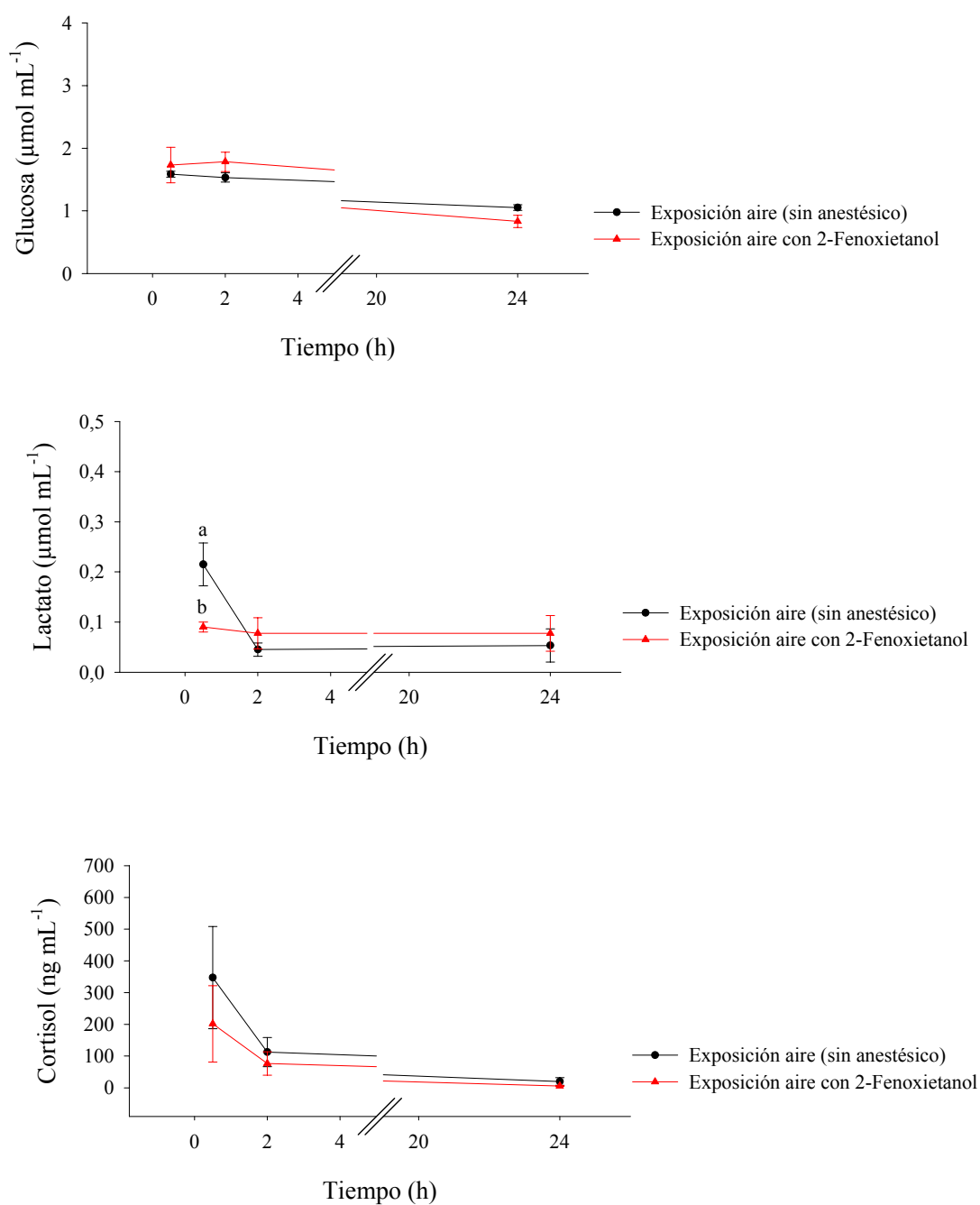
#### **2-Fenoxietanol**

Los datos correspondientes a las mediciones de los niveles del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol, se muestran en la Figura 35. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del hematocrito, hemoglobina, glucosa y cortisol cuando comparamos los animales

estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Sólo en el caso del lactato se observaron valores significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados que en los estresados anestesiados a los 30 min.



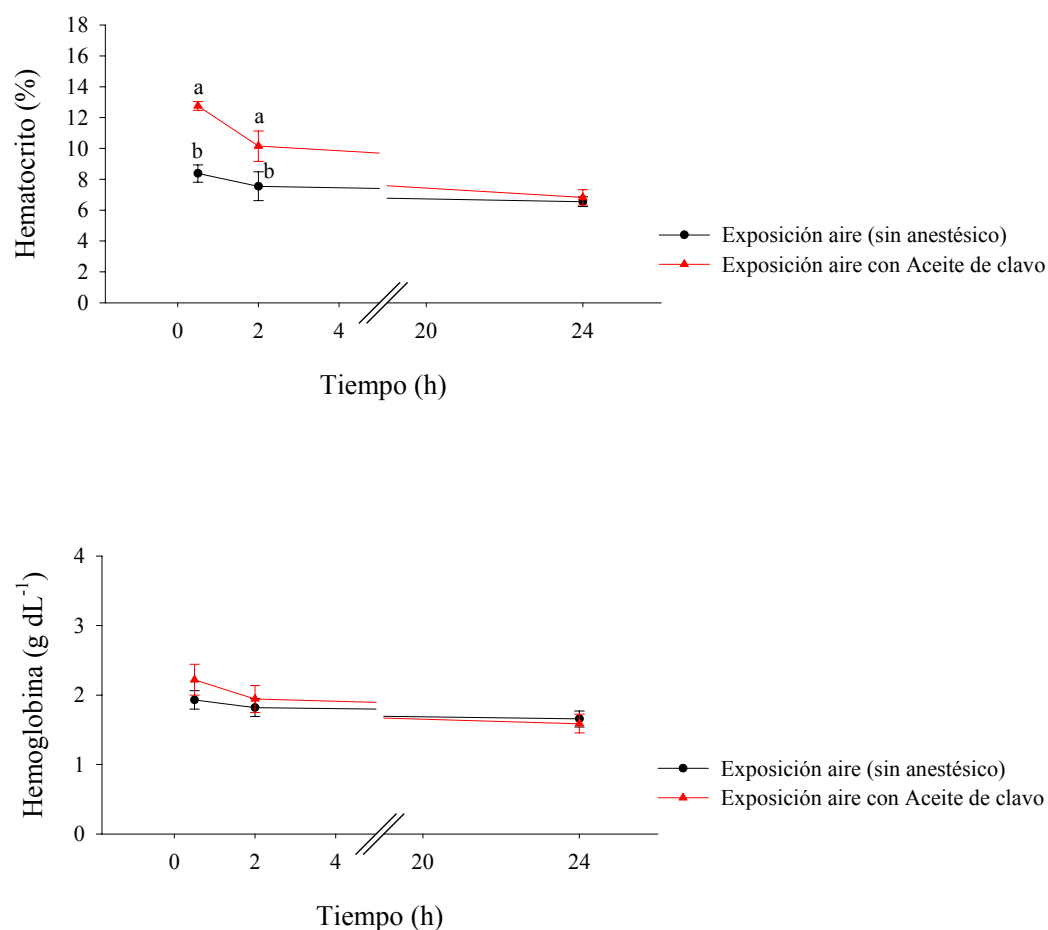
**Figura 35.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (2-Fenoxietanol,  $600\text{mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



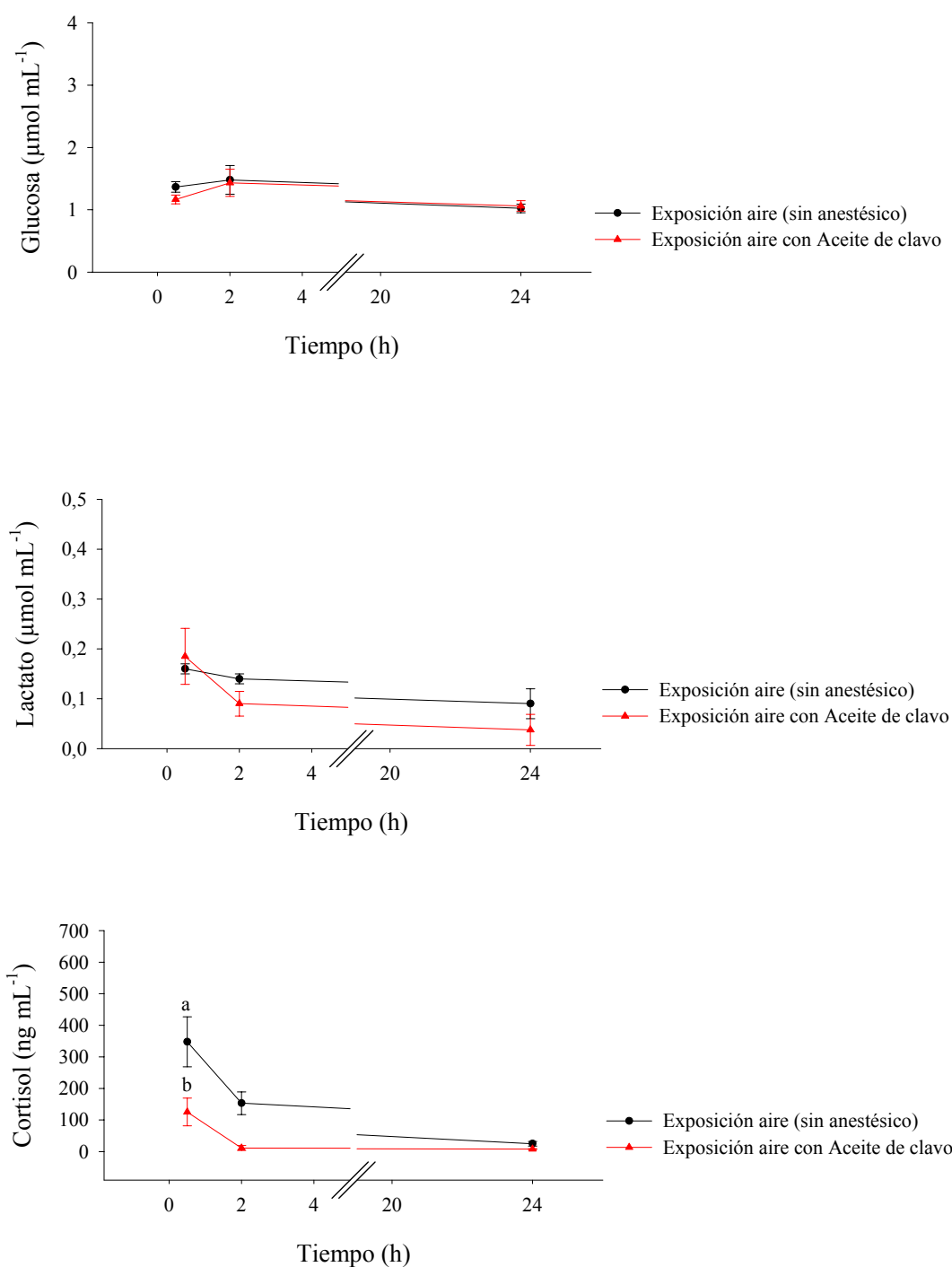
**Continuación Figura 35.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (2-Fenoxietanol,  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Aceite de clavo

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol, se muestran en la Figura 36. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles de la hemoglobina, glucosa y lactato cuando comparamos los animales estresados anestesiados con los animales estresados no anestesiados. Sin embargo en el caso del hematocrito sus niveles son mayores, tanto a los 30 min como a las 2 h, en el grupo de animales estresados anestesiados con aceite de clavo. Con respecto al cortisol, sus niveles siempre fueron menores en el grupo de animales estresados anestesiados, significativamente ( $P < 0,05$ ) a los 30 min.



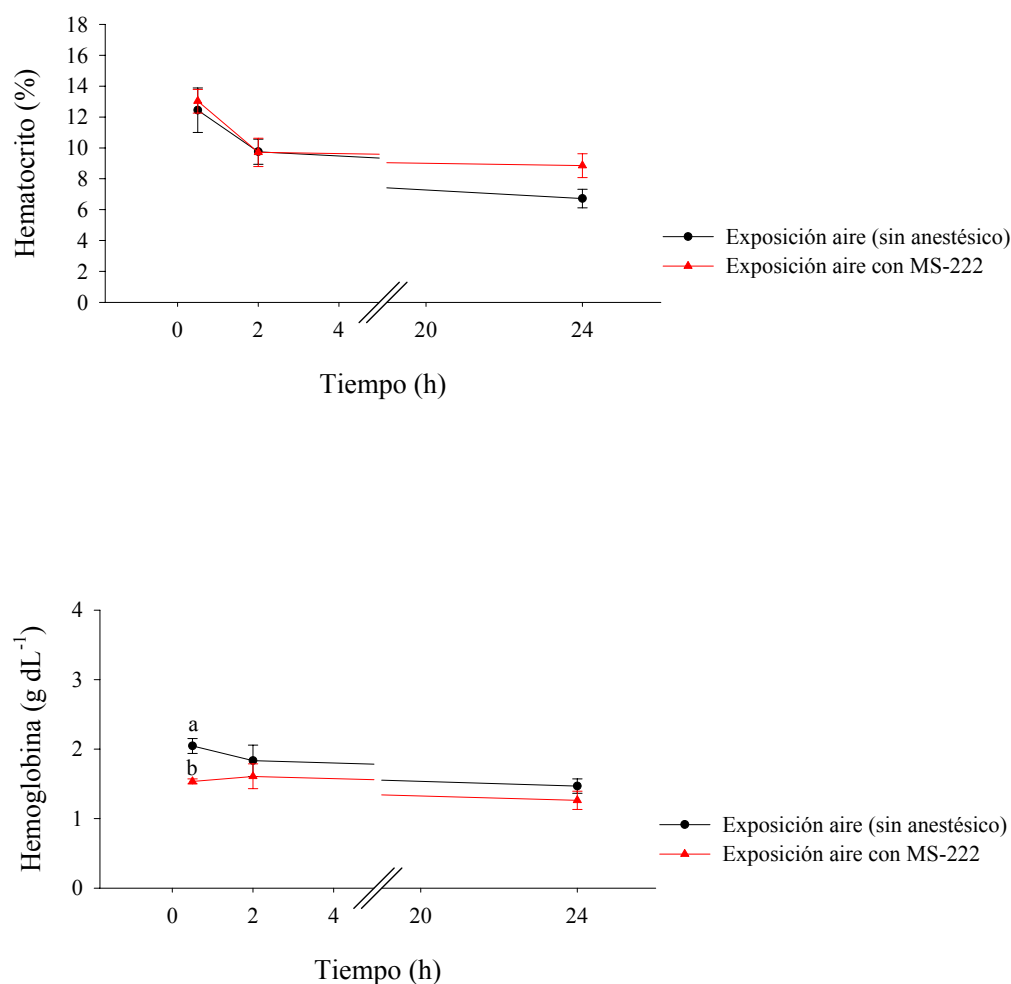
**Figura 36.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (Aceite de clavo,  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Continuación Figura 36.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (Aceite de clavo,  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

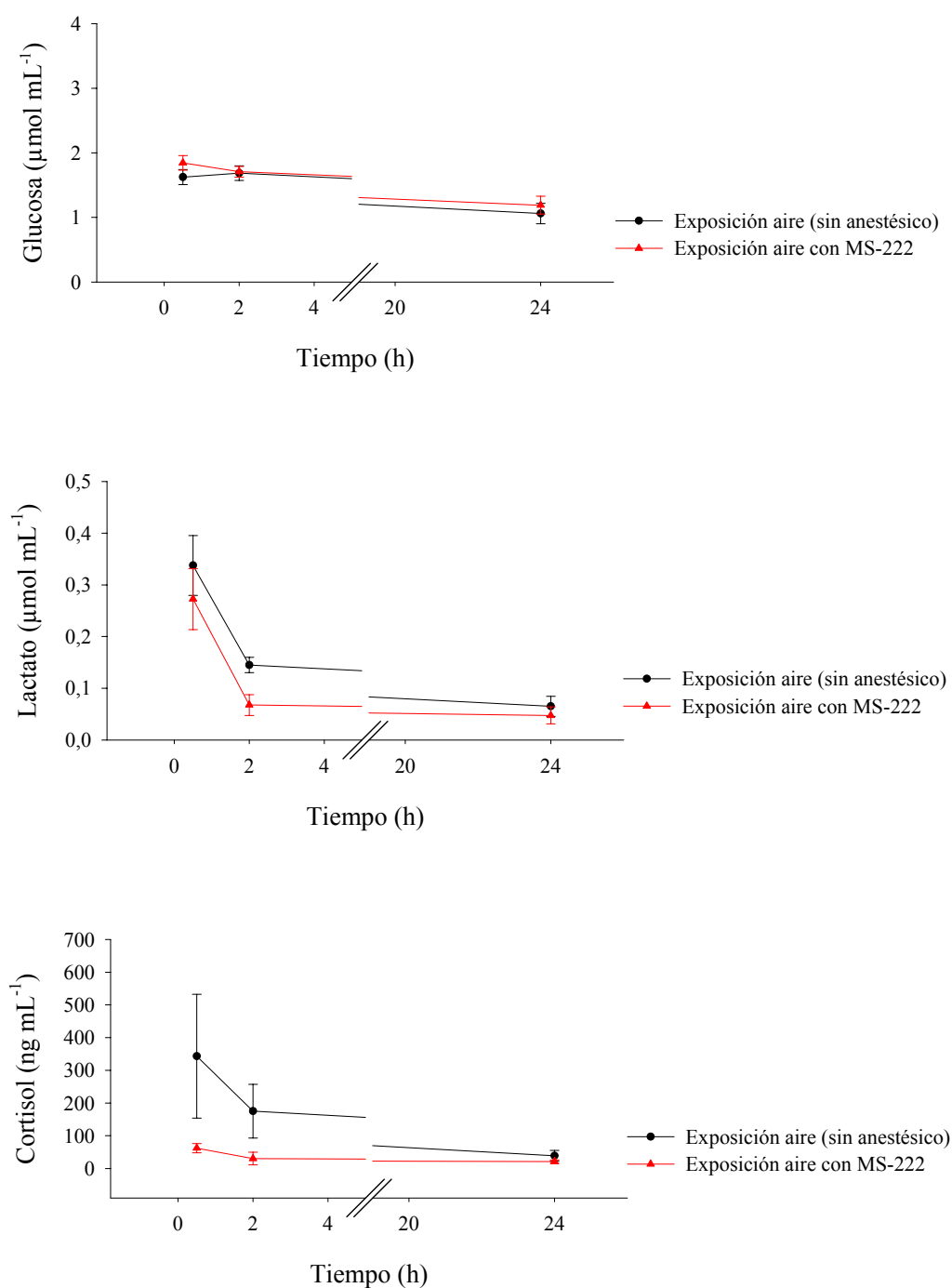
## MS-222

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol, se muestran en la Figura 37. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del hematocrito, glucosa, lactato y cortisol cuando comparamos los animales estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Solo en el caso de la hemoglobina sus niveles son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en el grupo de animales estresados no anestesiados, a los 30 min.



**Figura 37.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (MS-222, 75 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

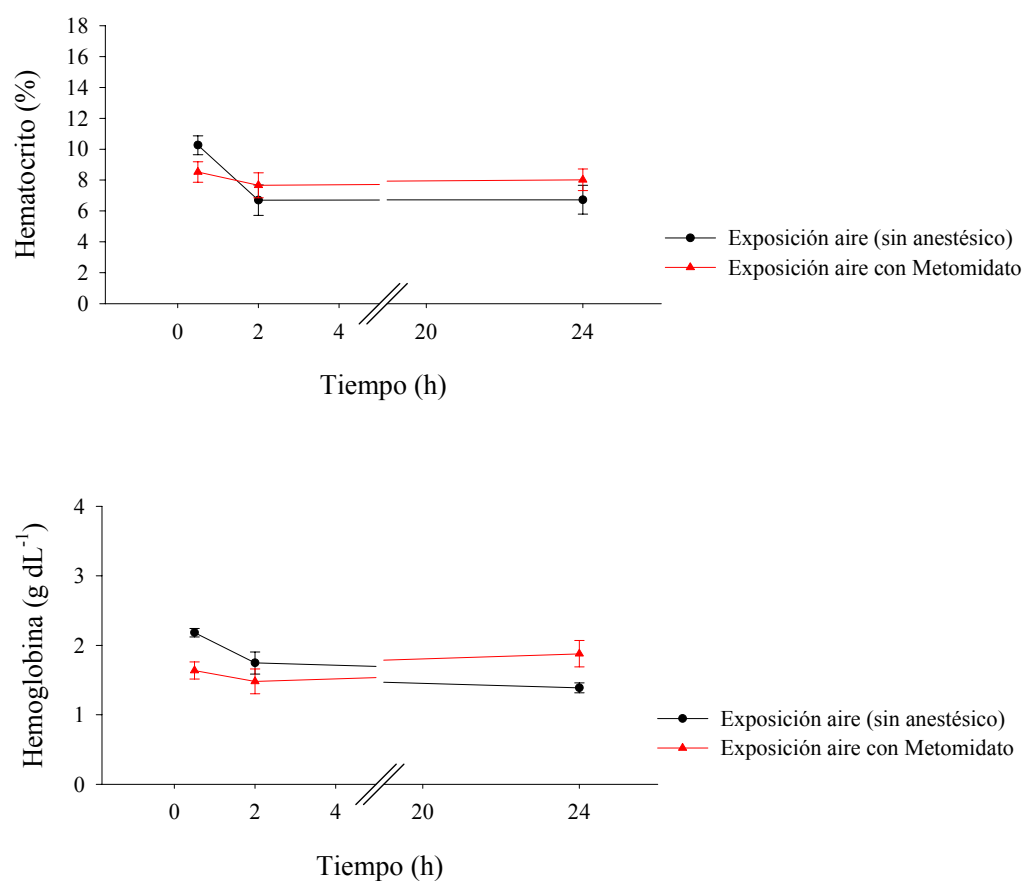




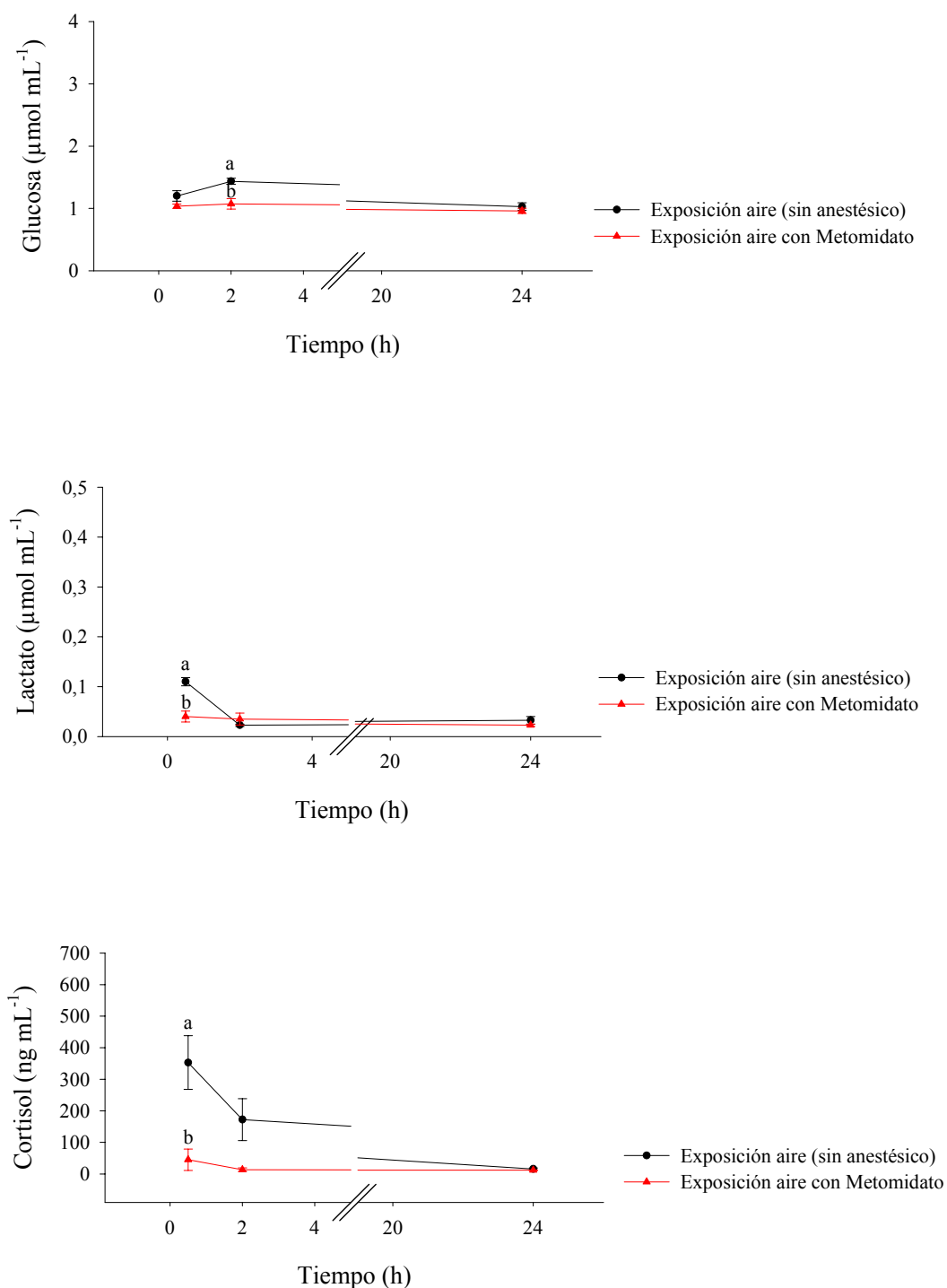
**Continuación Figura 37.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (MS-222,  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Metomidato

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato, y cortisol se muestran en la Figura 38. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del hematocrito y hemoglobina cuando comparamos los animales estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Sin embargo, cuando se observan los niveles de lactato y cortisol se comprueba que son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados 30 min después de la aplicación del estrés. Mientras que los niveles de glucosa son también significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores pero a las 2 h después de la aplicación del estrés.



**Figura 38.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (Metomidato 5 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



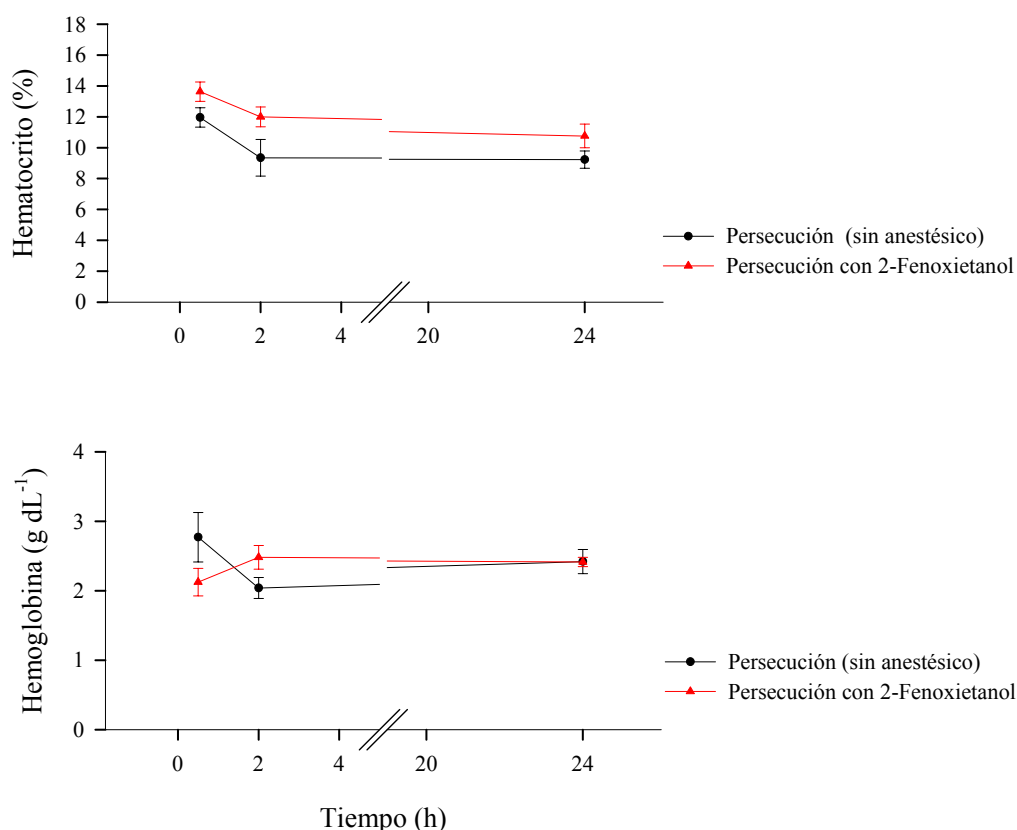
**Continuación Figura 38.** Efecto de la exposición al aire (3 min) en animales anestesiados (Metomidato  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## 5.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIESTRÉS DE LOS DIFERENTES ANESTÉSICOS FRENTE A UN ESTRÉS AGUDO (PERSECUCIÓN) EN JUVENILES DE *Solea senegalensis*

De un modo general indicar que en los muestreos realizados 24 h después de haber estado expuestos los peces durante 3 minutos al estrés, en ningún caso se detectaron variaciones significativas entre los grupos de peces estresados no anestesiados y los de peces estresados anestesiados.

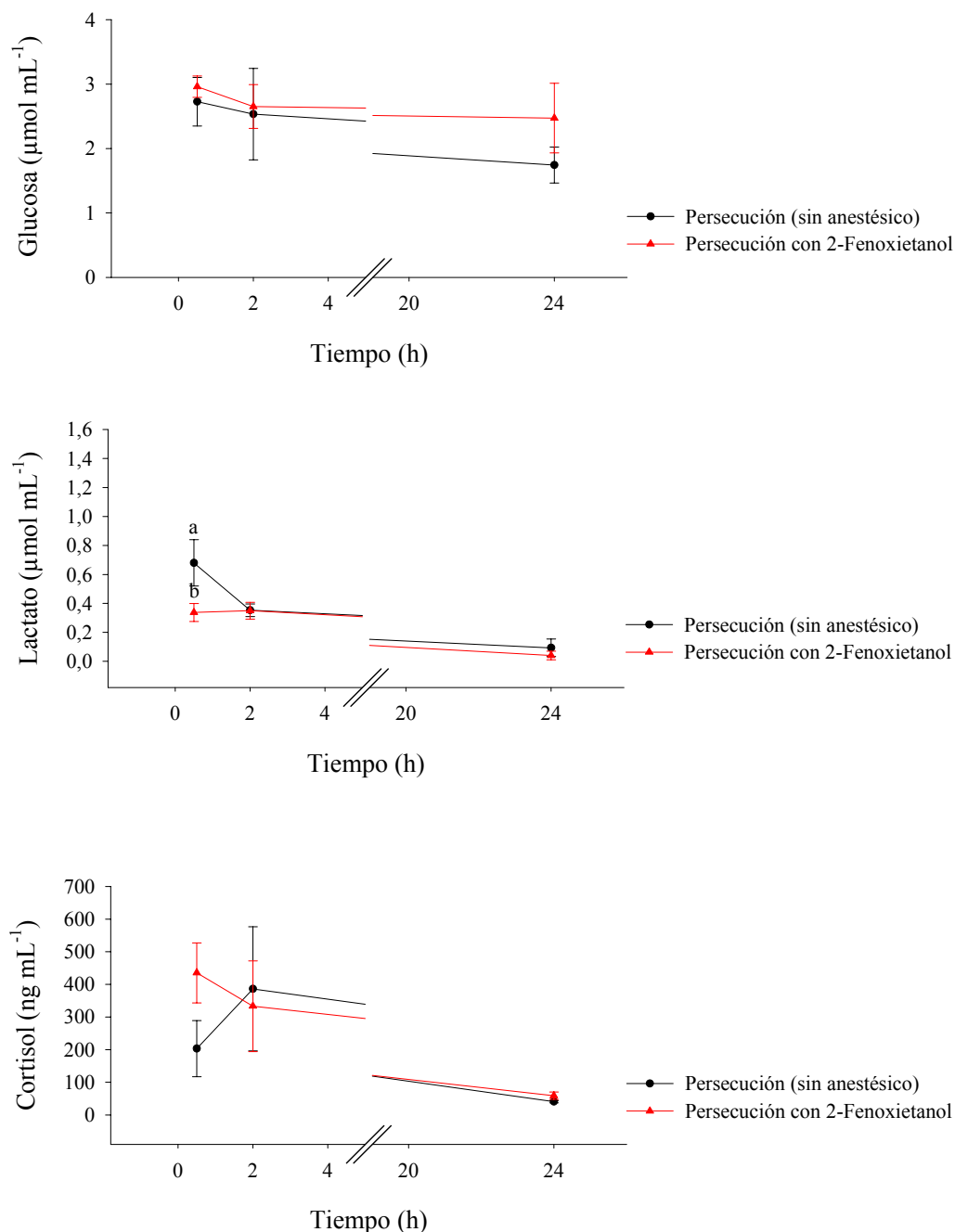
### 2-Fenoxietanol

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol se muestran en la Figura 39. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del hematocrito, hemoglobina, glucosa y cortisol, cuando se comparan los animales estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Sin embargo, cuando se observaron los niveles de lactato se comprueba que son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados, 30 min después de la aplicación del estrés.



**Figura 39.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (2-Fenoxietanol 600 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del

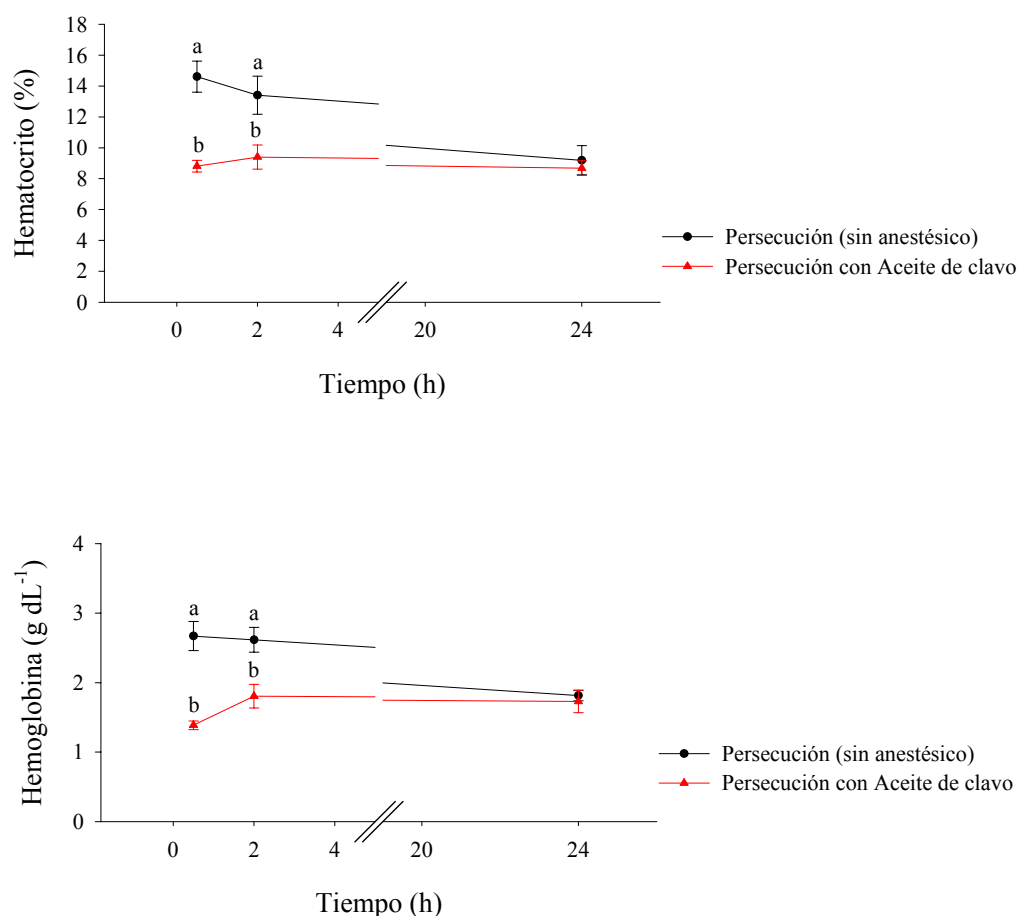
estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



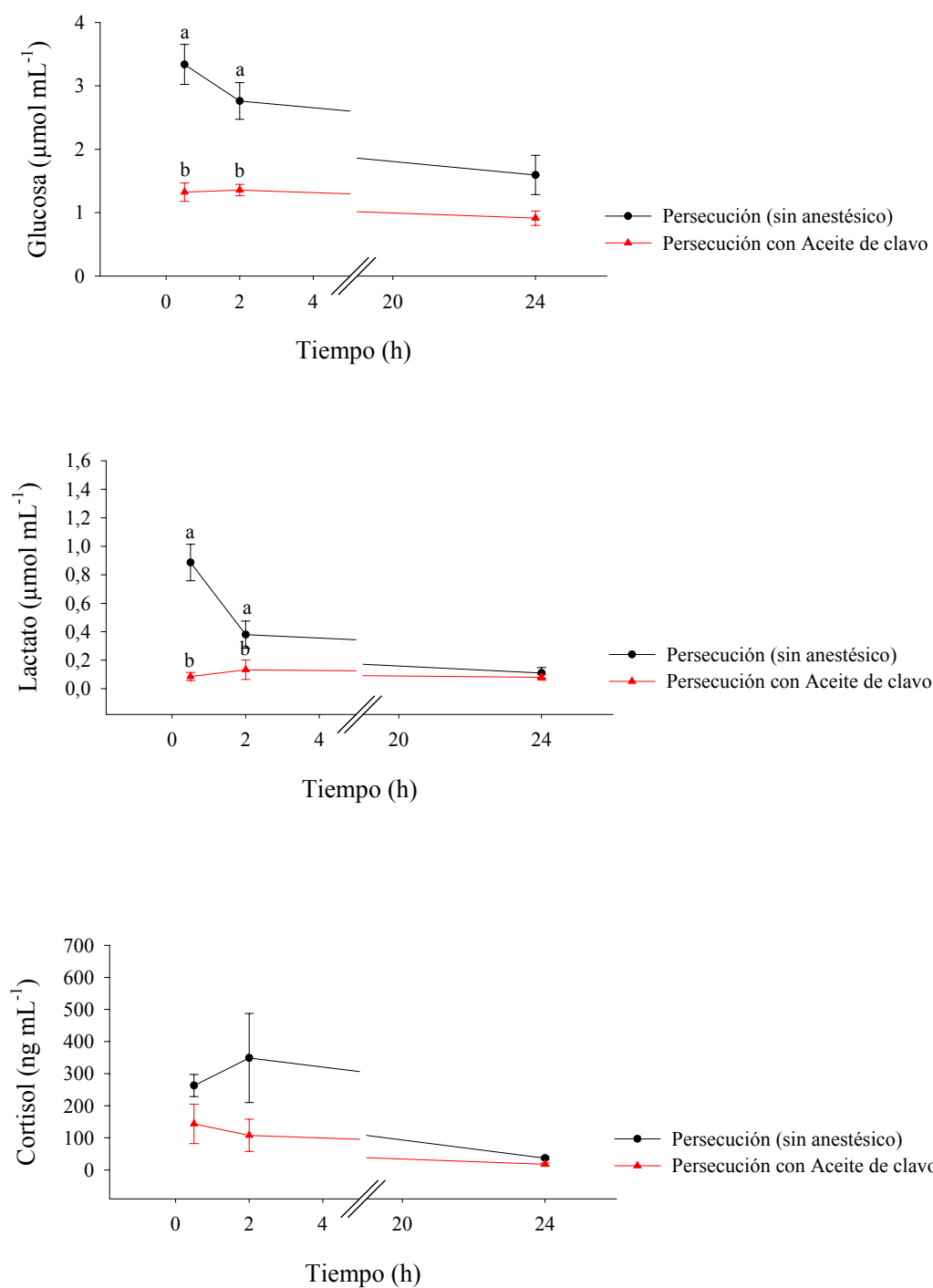
**Continuación Figura 39.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (2-Fenoxietanol  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Aceite de clavo

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol se muestran en la Figura 40. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del cortisol cuando se comparan los animales estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Sin embargo, cuando se observaron los niveles de hematocrito, hemoglobina, glucosa y lactato se comprueba que son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados 30 min y 2 horas después de la aplicación del estrés.



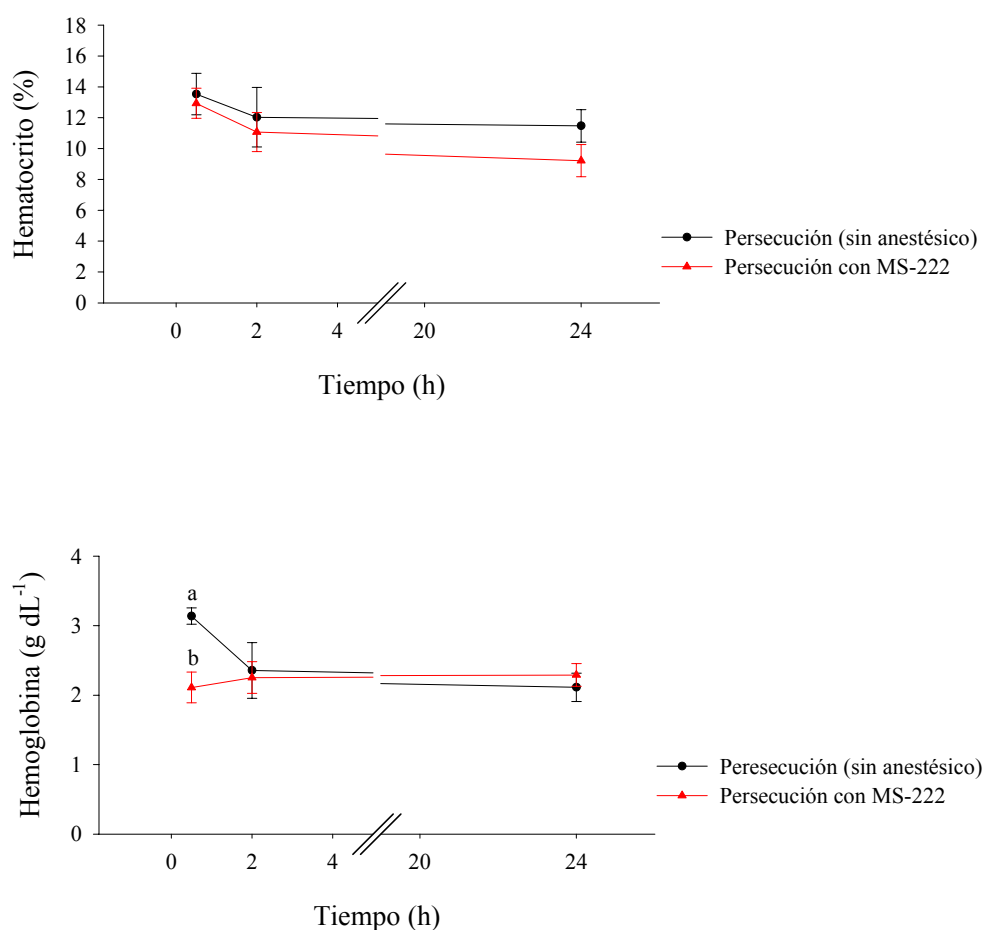
**Figura 40.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (Aceite de clavo 30 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Continuación Figura 40.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (Aceite de clavo  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

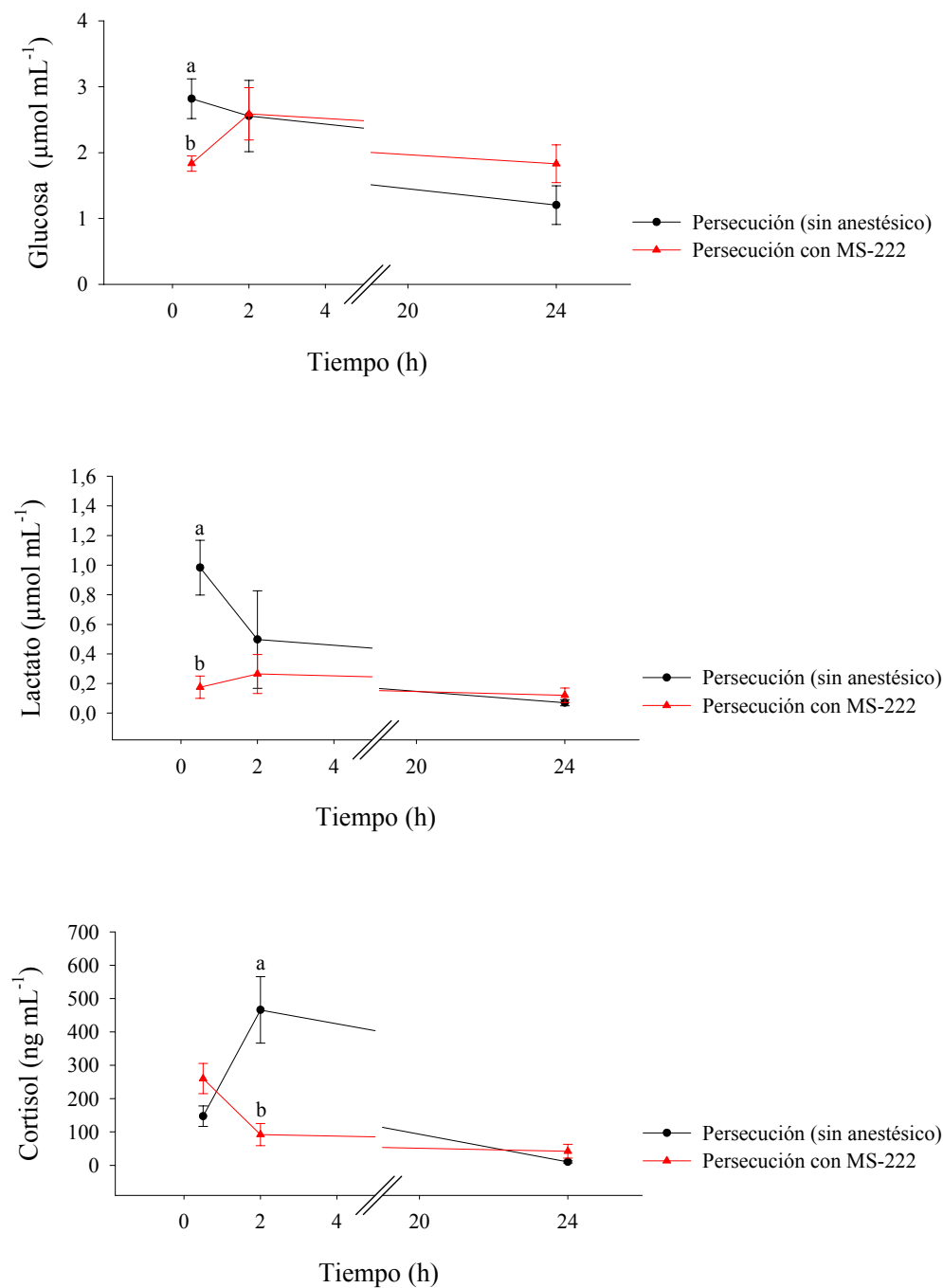
## MS-222

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato, y cortisol se muestran en la Figura 41. Se observa que no hubo diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles del hematocrito, cuando se comparan los animales estresados anestesiados y los animales estresados no anestesiados. Sin embargo, cuando se observaron los niveles de hemoglobina, glucosa y lactato se comprueba que son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados 30 min después de la aplicación del estrés. Mientras que los niveles de cortisol son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores a las 2 h después de la aplicación del estrés.



**Figura 41.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (MS-222, 75 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

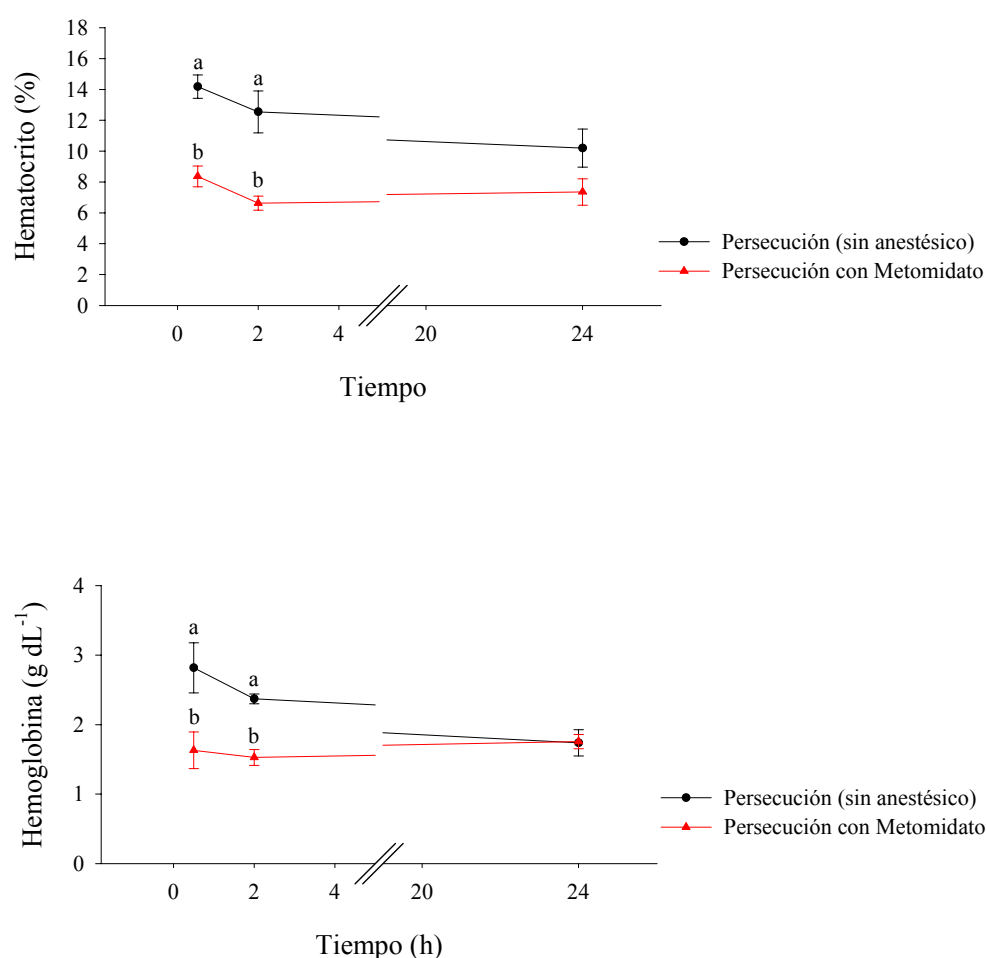




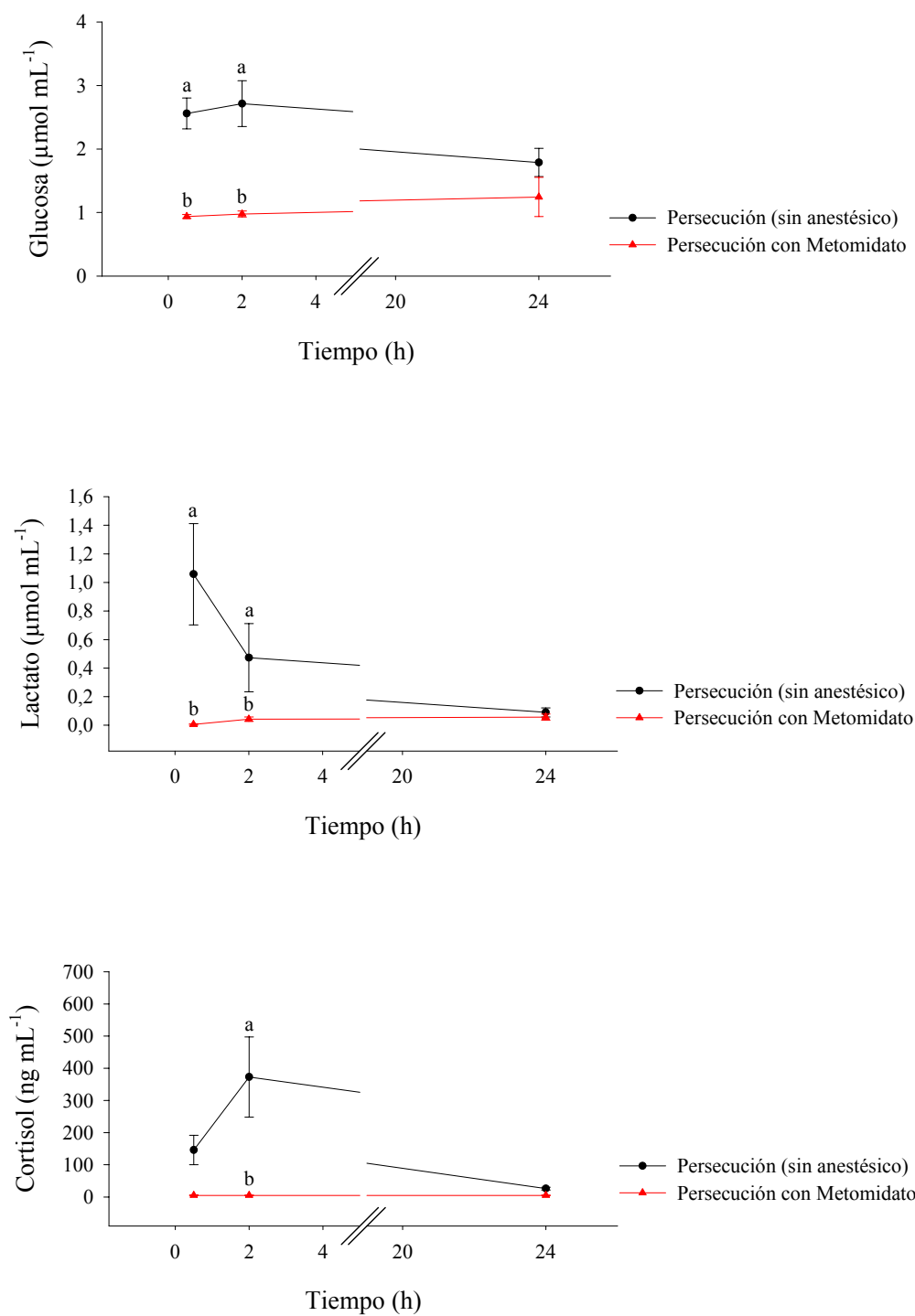
**Continuación Figura 41.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (MS-222,  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Metomidato

Los datos correspondientes a las mediciones del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato, y cortisol se muestran en la Figura 42. Se observan los niveles de hematocrito, hemoglobina, glucosa y lactato, y se comprueba que son significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los animales estresados no anestesiados 30 min y 2 horas después de la aplicación del estrés, cuando se comparan con los animales estresados anestesiados. Mientras que los niveles de cortisol son siempre mayores, pero significativamente ( $P < 0,05$ ) a las 2 h después de la aplicación del estrés.



**Figura 42.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (Metomidato 5 mg L<sup>-1</sup>) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



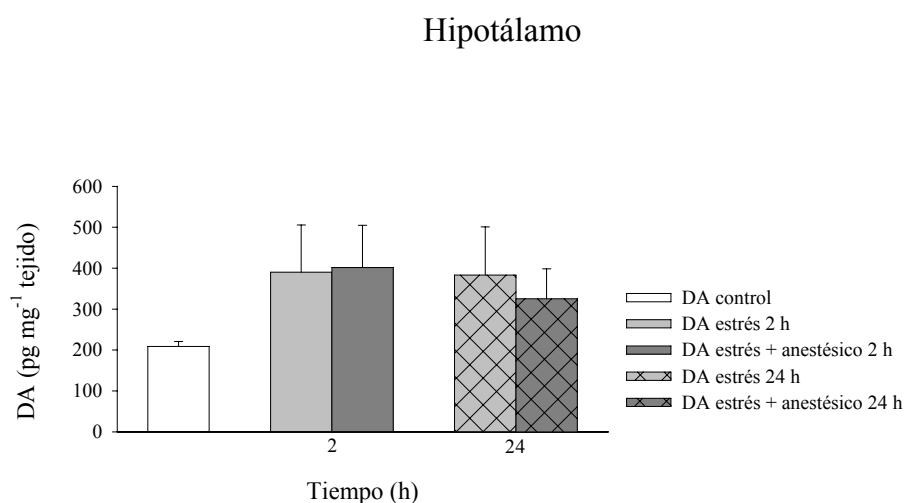
**Continuación Figura 42.** Efecto de la persecución (3 min) en animales anestesiados (Metomidato  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y no anestesiados sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina), 30 min, 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 4 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## 5.7. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS (EXPOSICIÓN AL AIRE) SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NEUROTRANSMISORES: EFECTO DE LOS ANESTÉSICOS

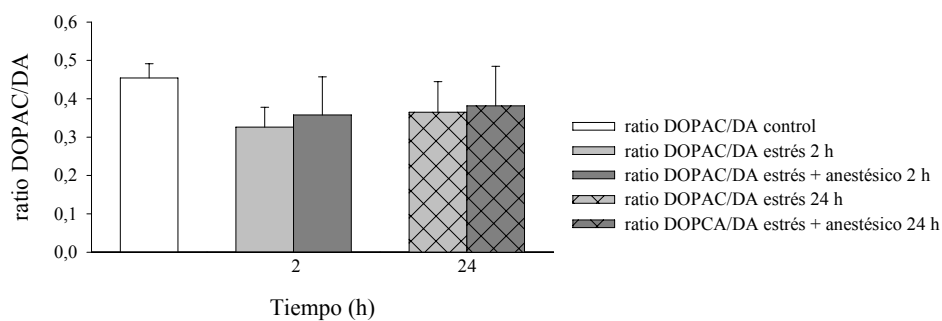
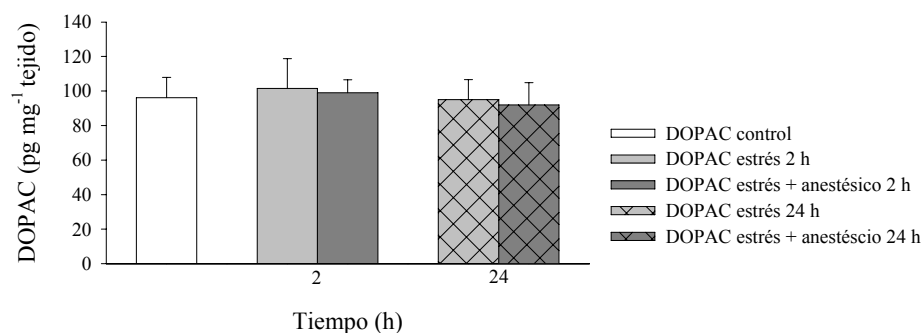
En todos los experimento se planteó un grupo de animales control no estresados (ver apartado 4.8), donde la extracción del cerebro se realizó en peces anestesiados con metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

### 2-Fenoxietanol

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 49. En los animales estresados no anestesiados y en los estresados anestesiados cuando se hicieron las comparaciones entre ellos y frente al grupo control, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la NA, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT ni en las relaciones DOPAC/DA y 5HIAA/5HT.

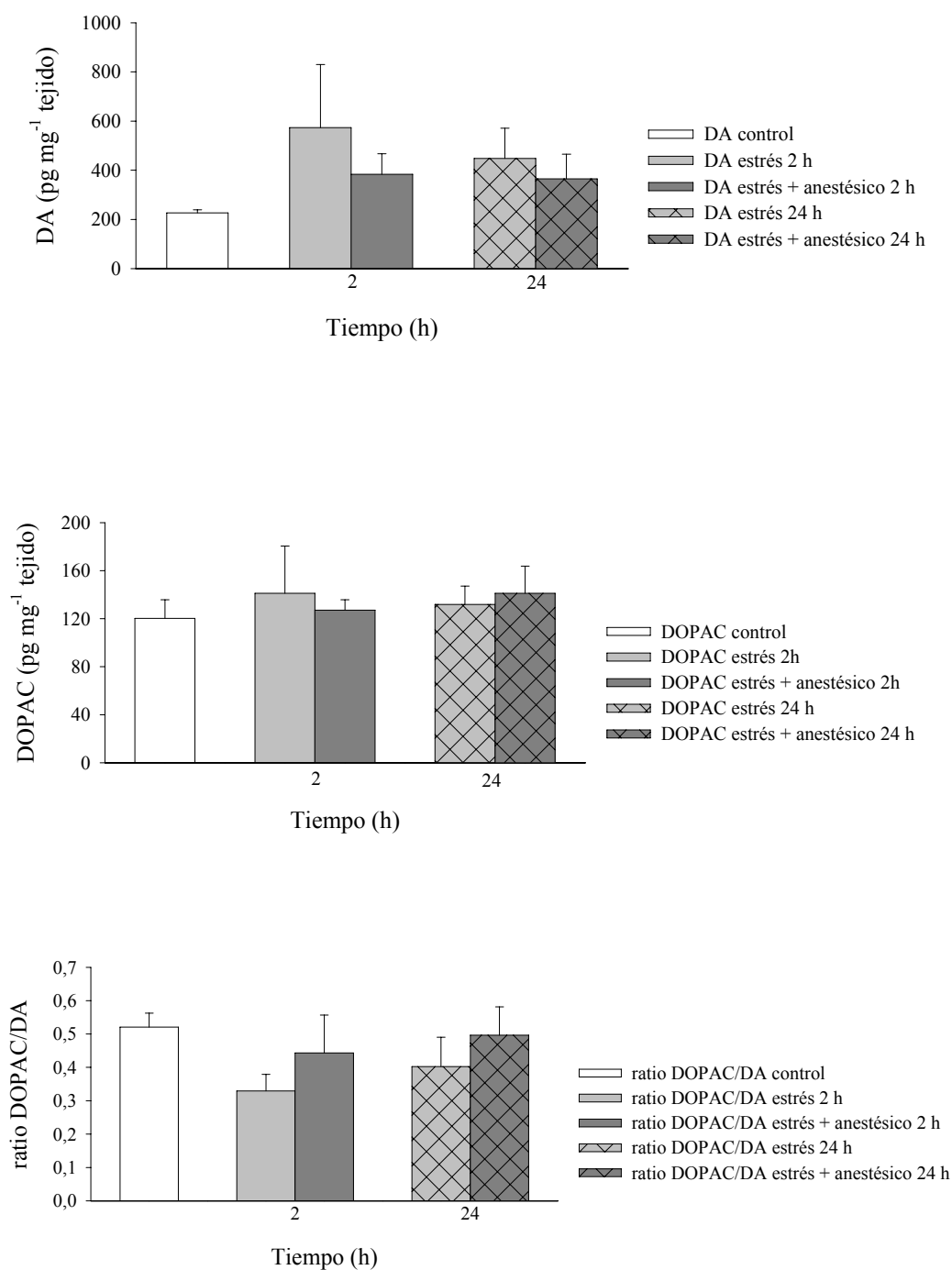


**Figura 43.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

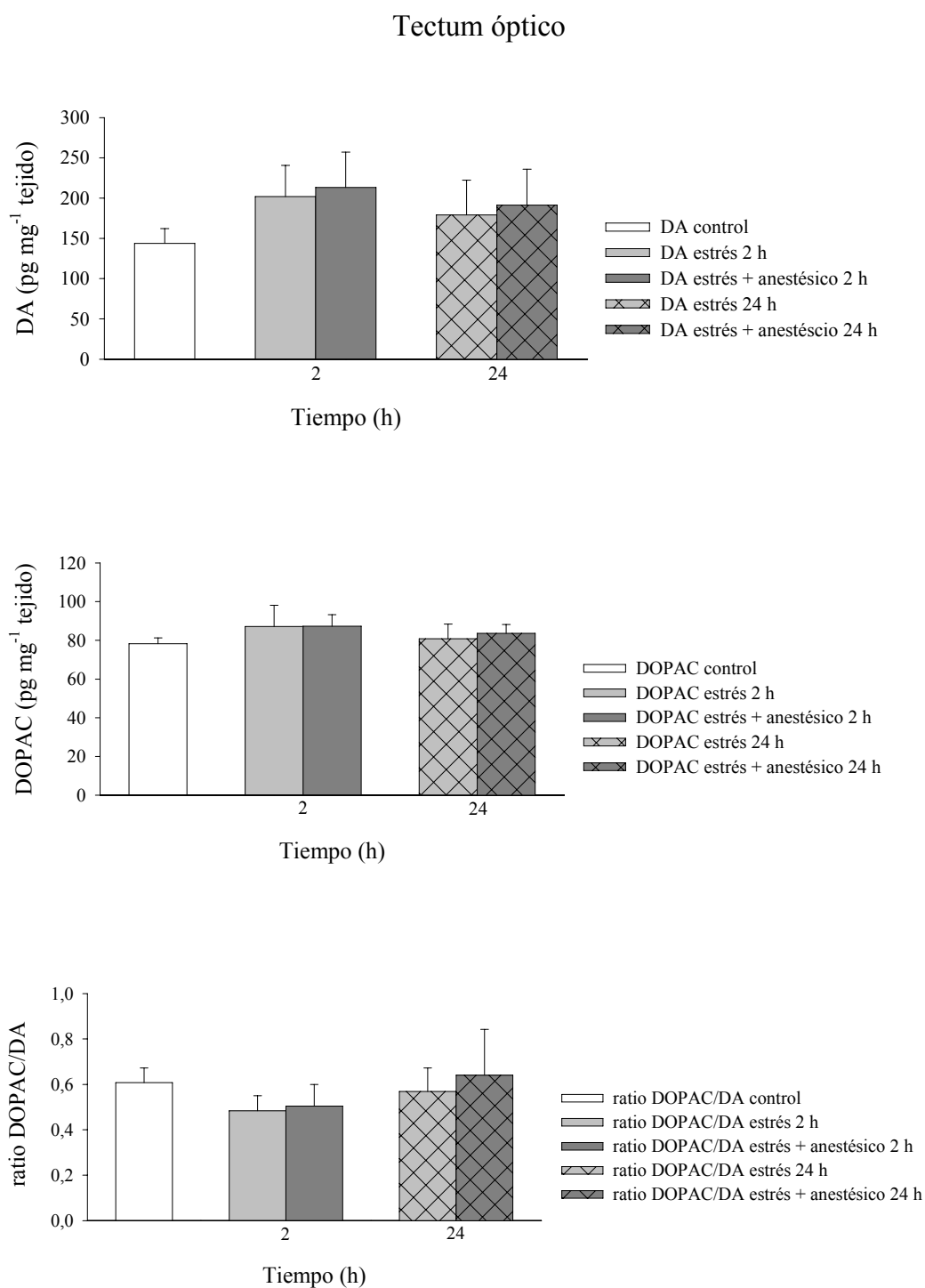


**Continuación Figura 43.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

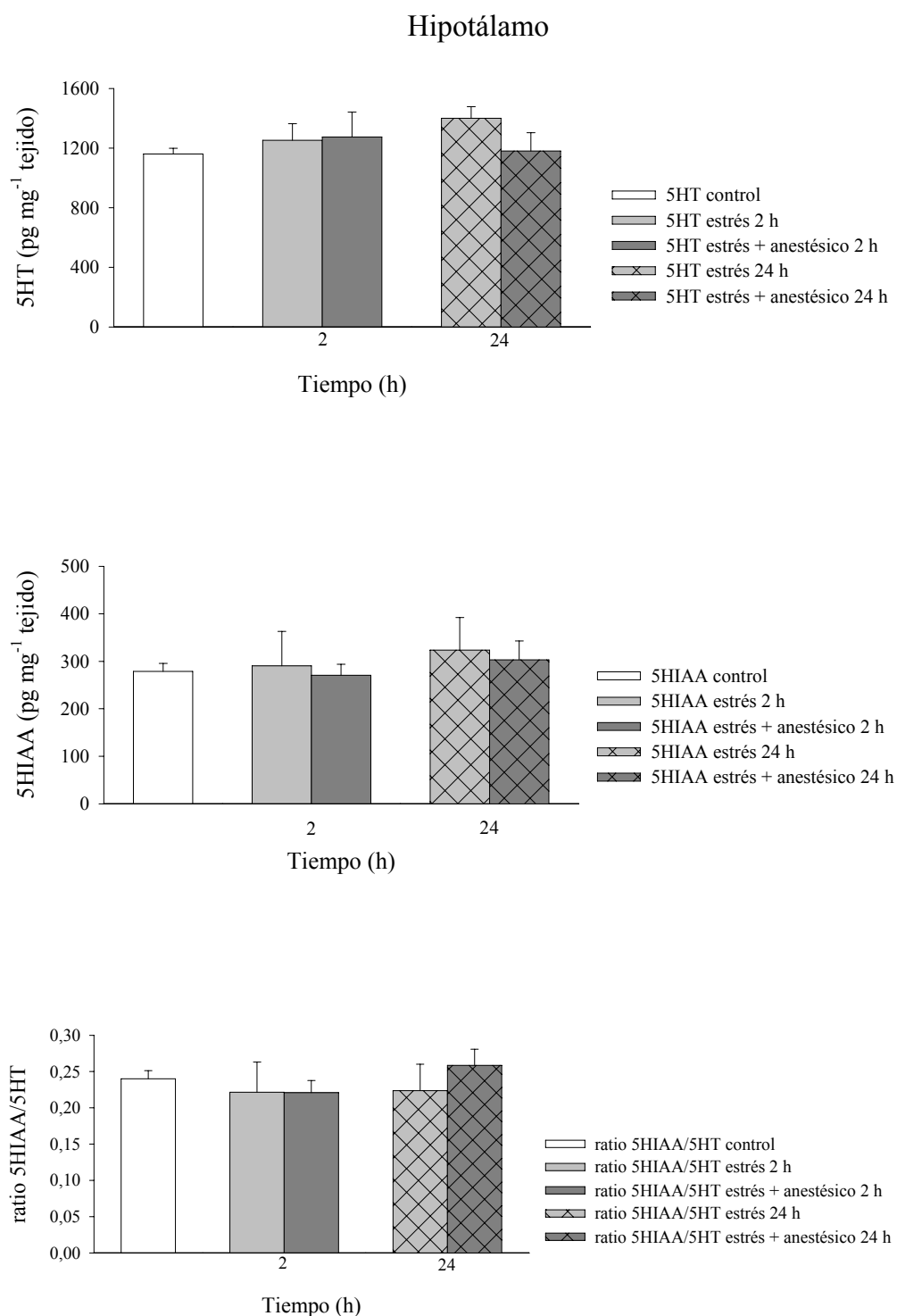
## Telencéfalo



**Figura 44.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

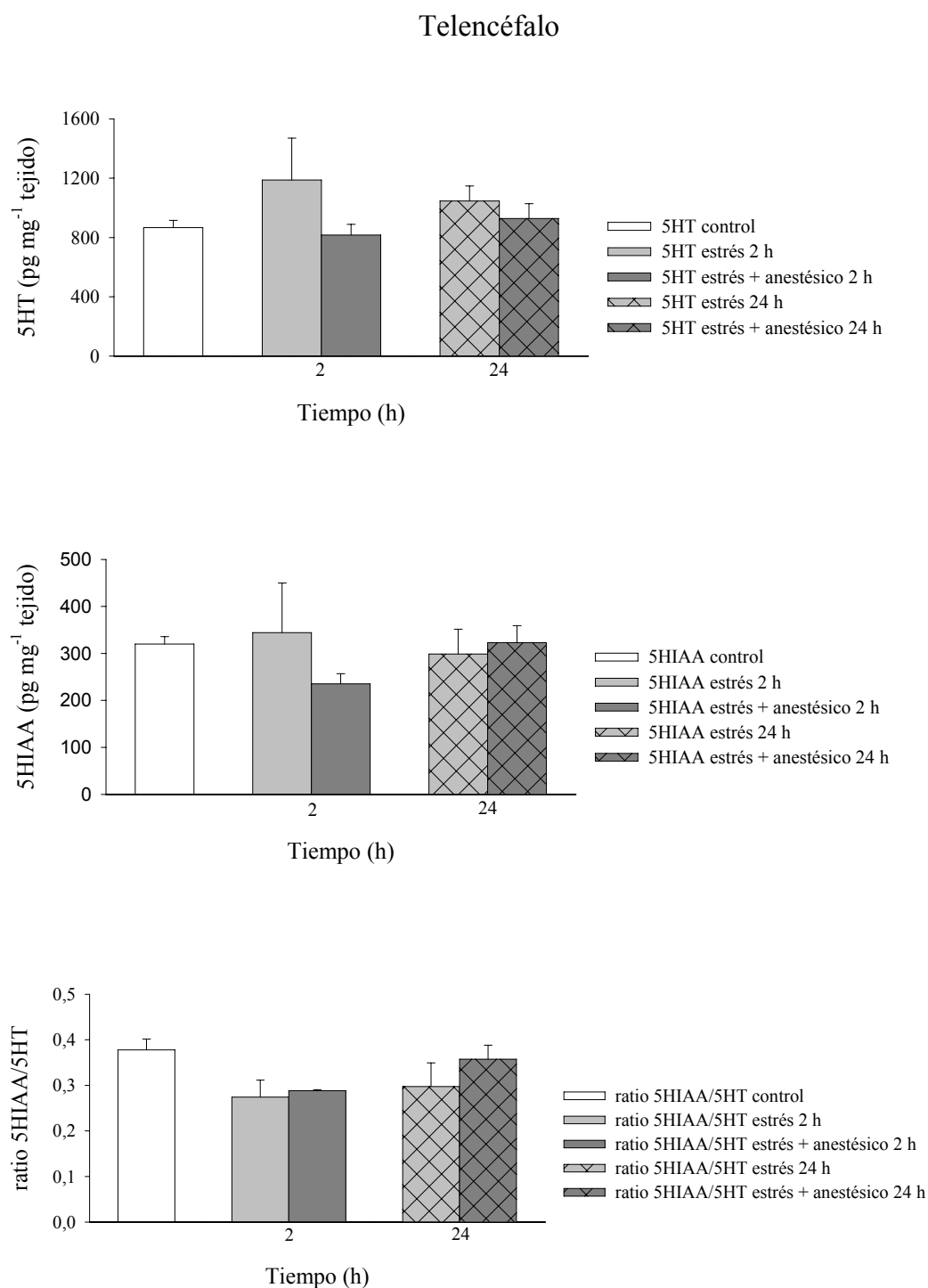


**Figura 45.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

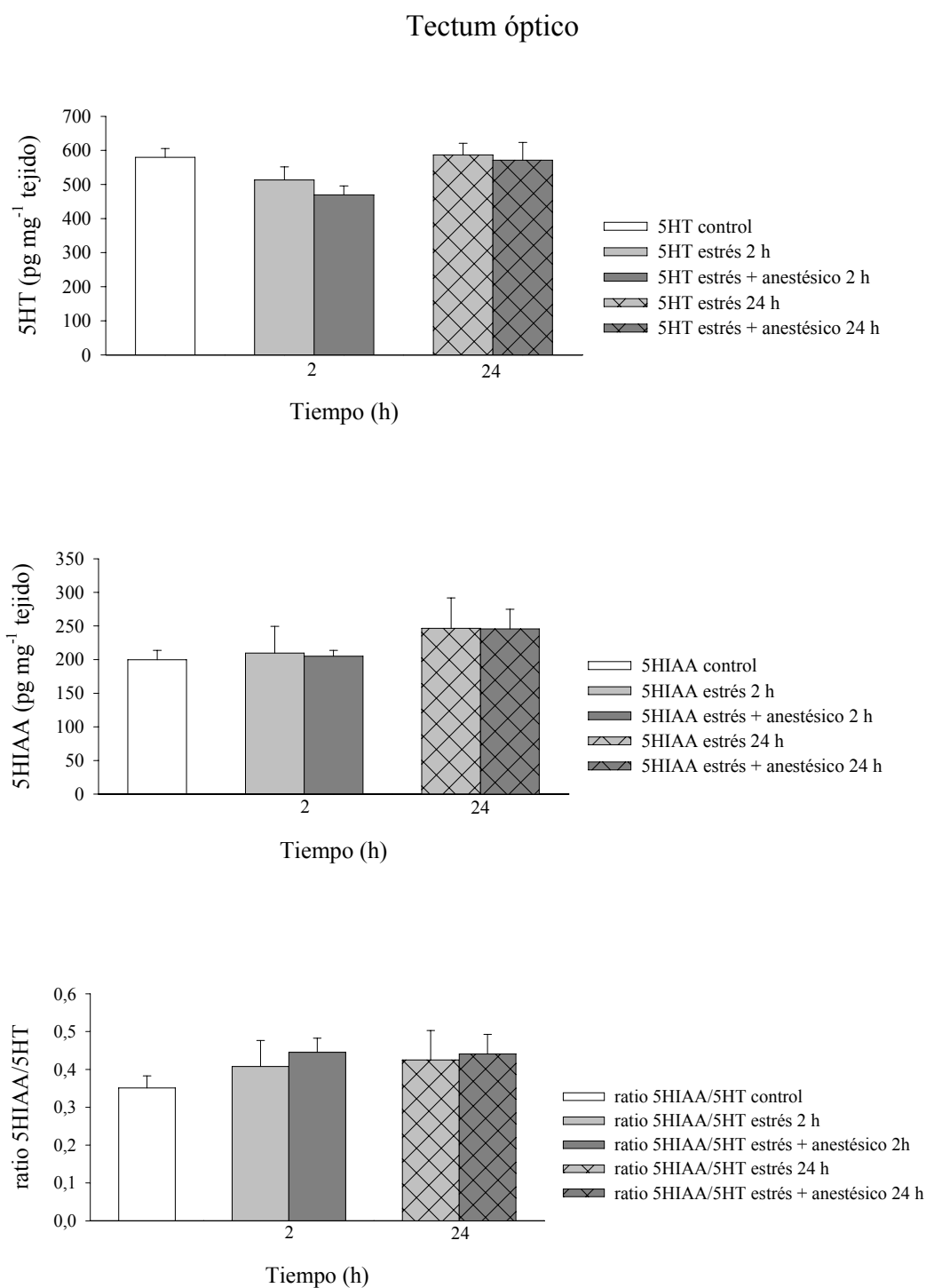


**Figura 46.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

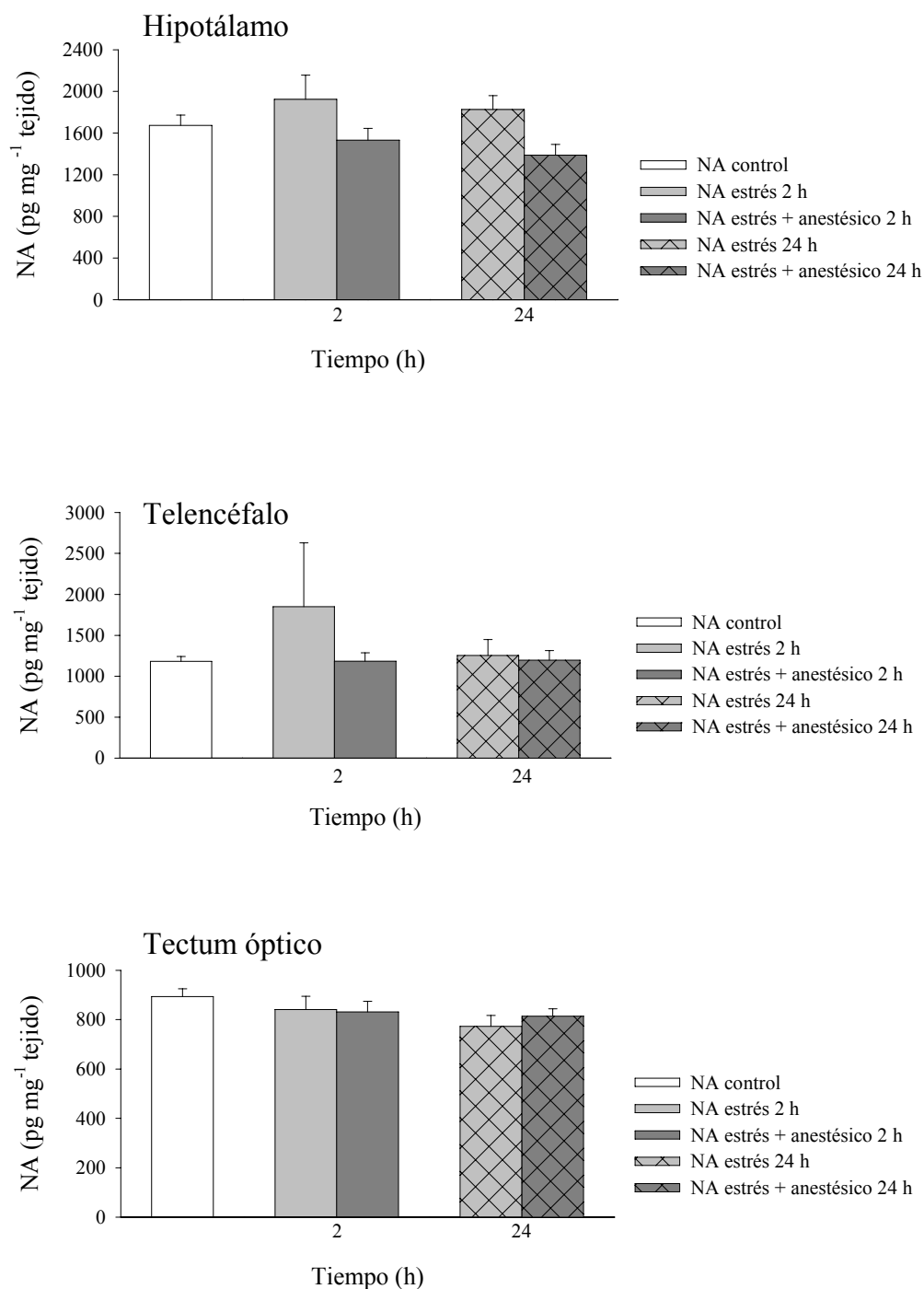




**Figura 47.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 48.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

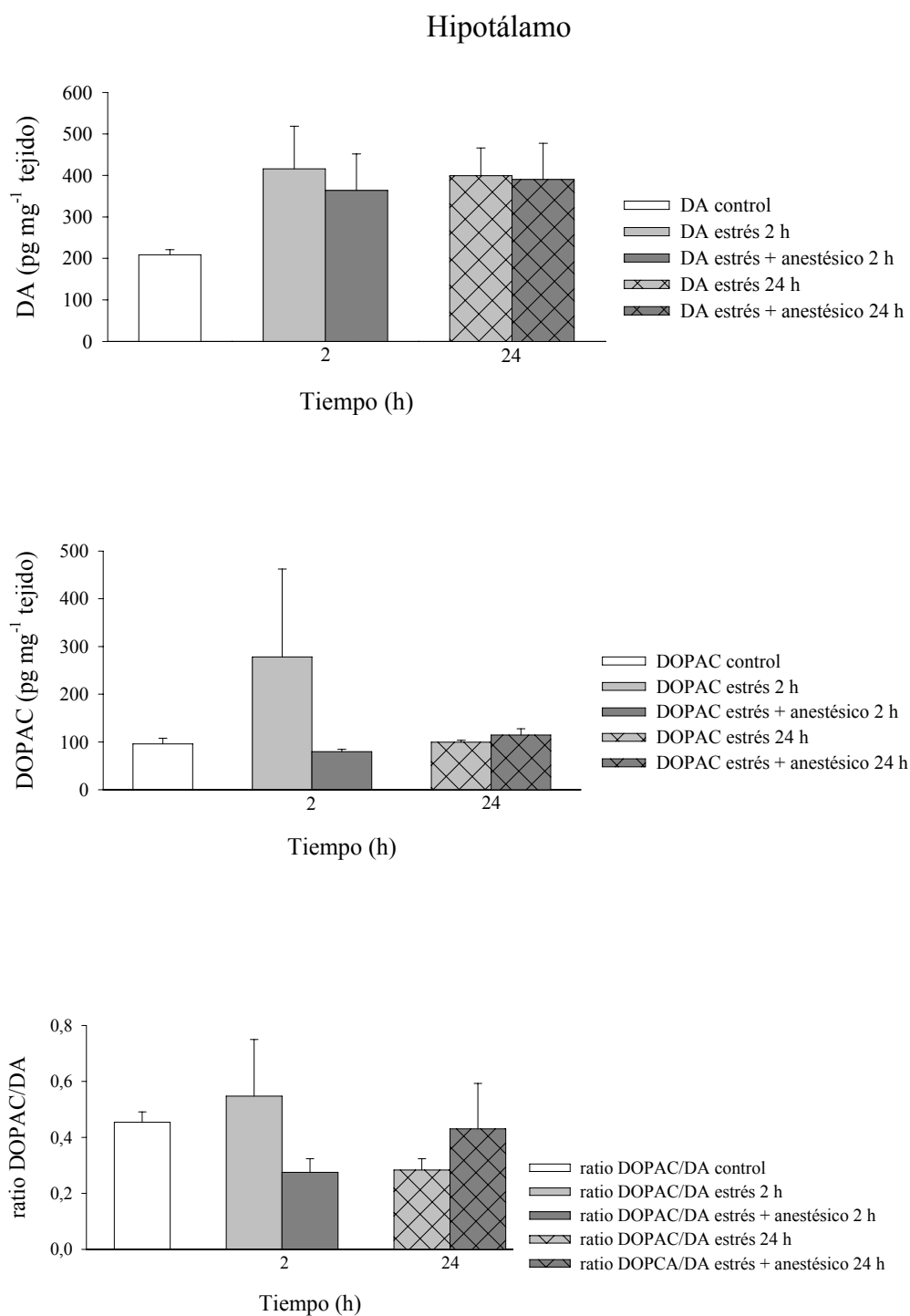


**Figura 49.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

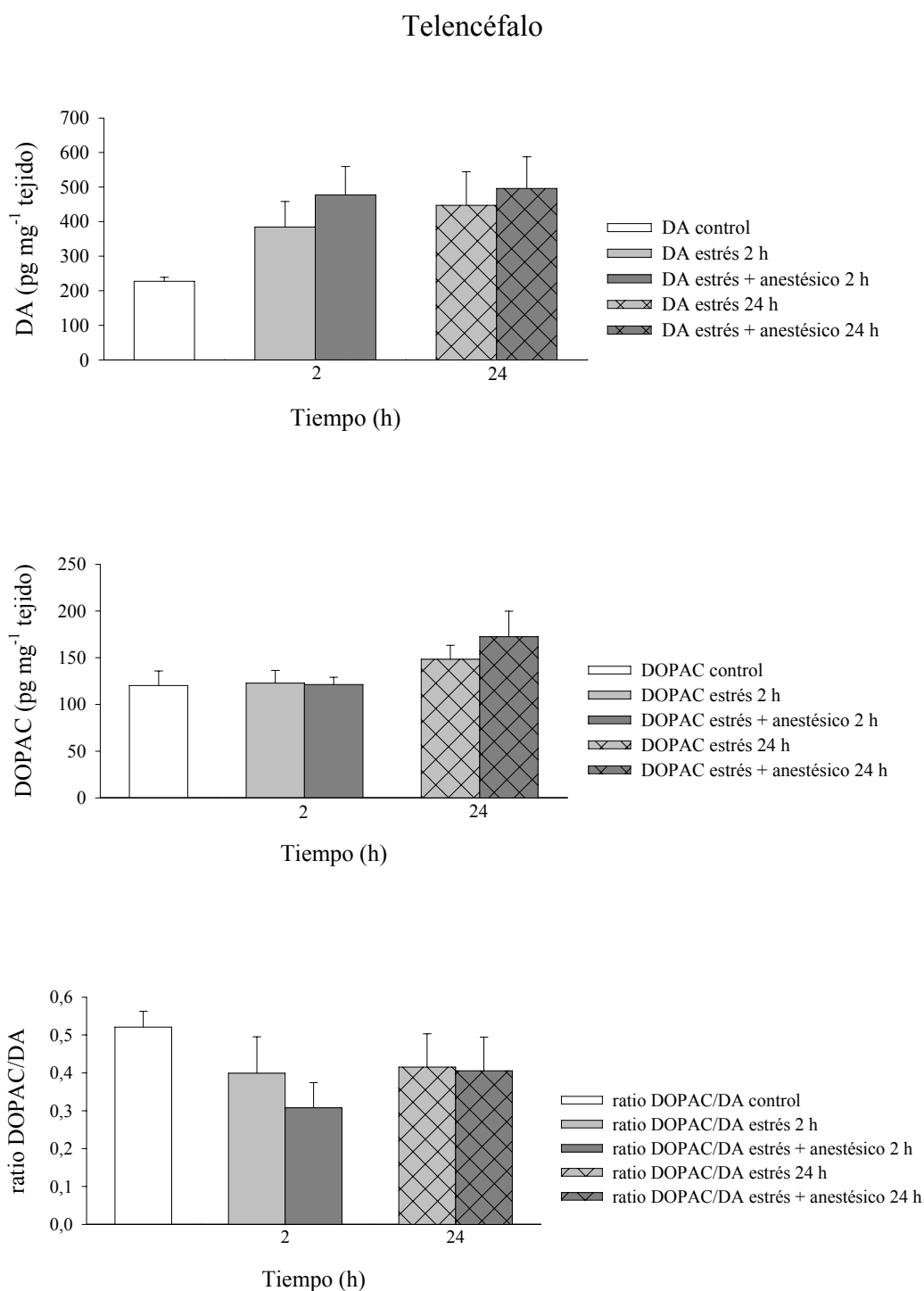
### **Aceite de clavo**

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56. De un modo general se comprobó que las variaciones significativas observadas a las 2 y 24 h después de la exposición al aire afectaron exclusivamente a los peces estresados no anestesiados. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables relativas al sistema dopaminérgico y noradrenérgico de las distintas regiones cerebrales estudiadas.

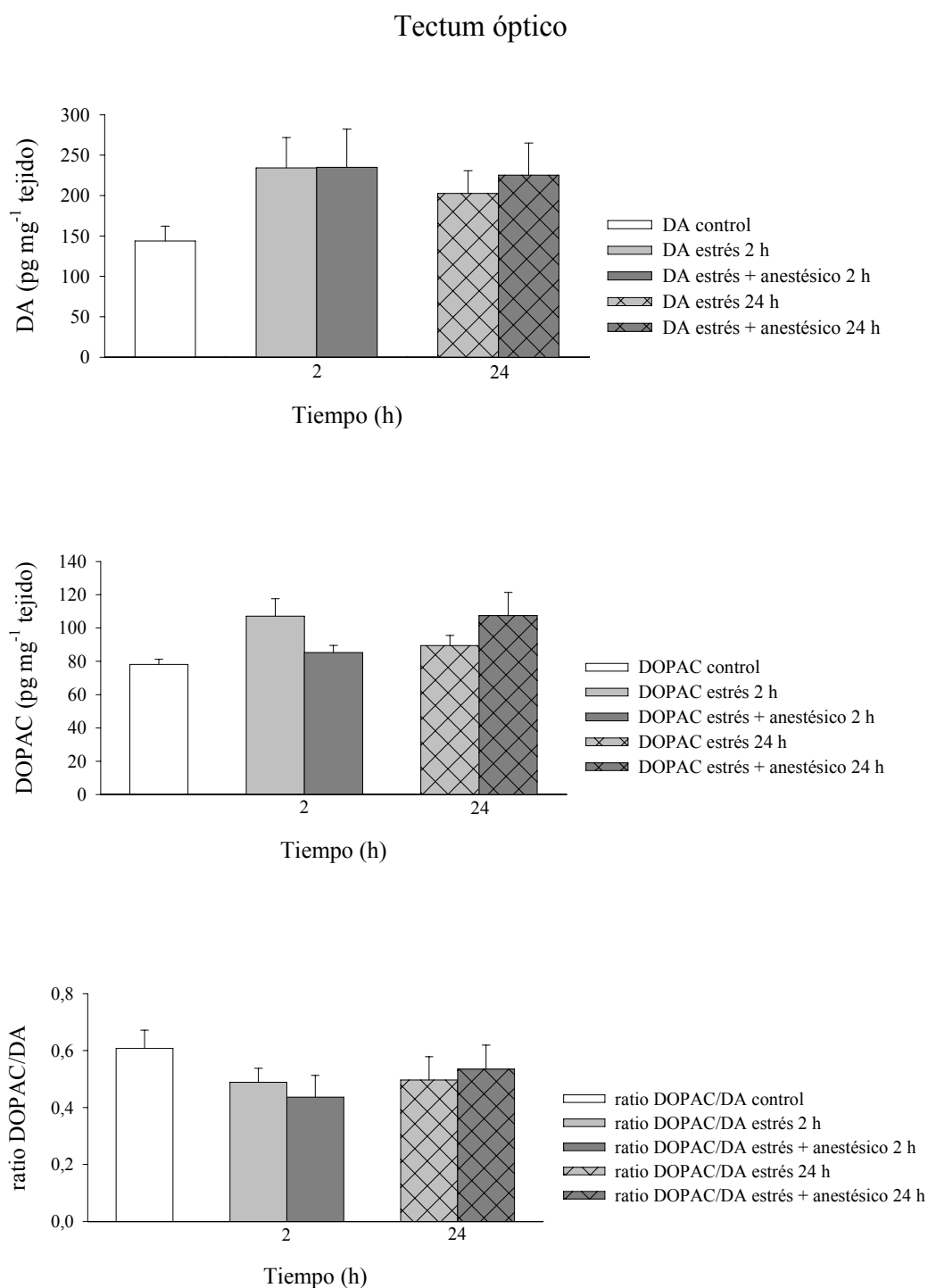
Con respecto al sistema serotoninérgico no se observaron modificaciones significativas en los niveles de la 5HT en las tres regiones estudiadas, cuando se comparan los animales estresados no anestesiados frente al grupo control. Por el contrario, los niveles del 5HIAA se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en los animales estresados no anestesiados a las 2 h en el hipotálamo (Figura 53), telencéfalo (Figura 54) y tectum óptico (Figura 55), y a las 24 h en el hipotálamo (Figura 53) y tectum óptico (Figura 55), frente a los niveles observados en los animales del grupo control. Igualmente, en el grupo de los animales estresados no anestesiados la relación 5HIAA/5HT se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) a las 2 h en el hipotálamo (Figura 53), telencéfalo (Figura 54) y tectum óptico (Figura 55), y a las 24 h en el tectum óptico (Figura 55), cuando se comparó frente a la del grupo control. Cuando se compararon los animales estresados anestesiados frente al grupo de animales control, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la 5HT, 5HIAA ni en la relación 5HIAA/5HT en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los animales estresados anestesiados, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el contenido del 5-HIAA 2 h después de la exposición al aire en el hipotálamo (Figura 53), telencéfalo (Figura 54) y tectum óptico (Figura 55). Igualmente, en la relación 5HIAA/5HT también se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a las 2 h en el hipotálamo (Figura 53) y en el telencéfalo (Figura 54).



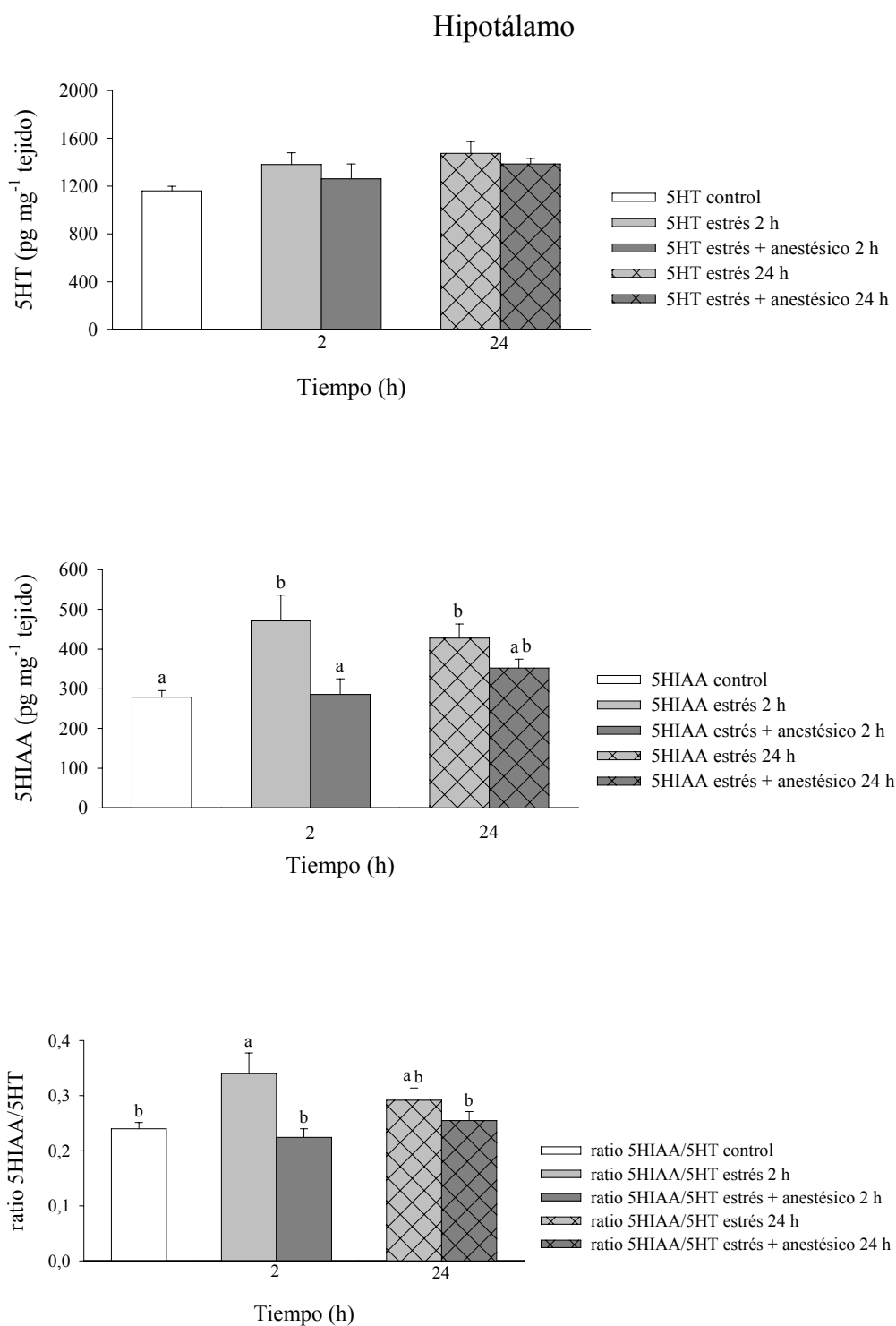
**Figura 50.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 51.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

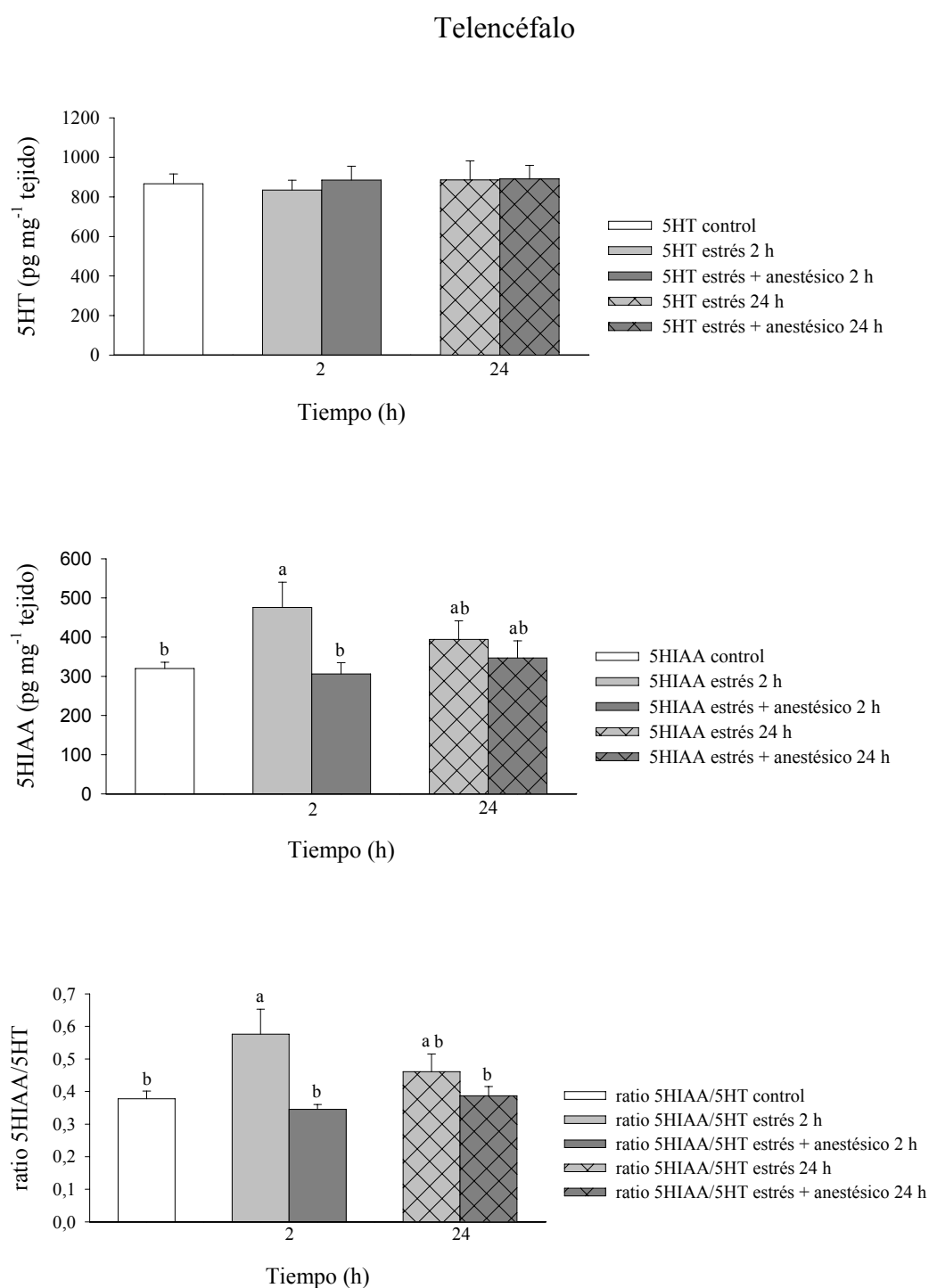


**Figura 52.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de langostina, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



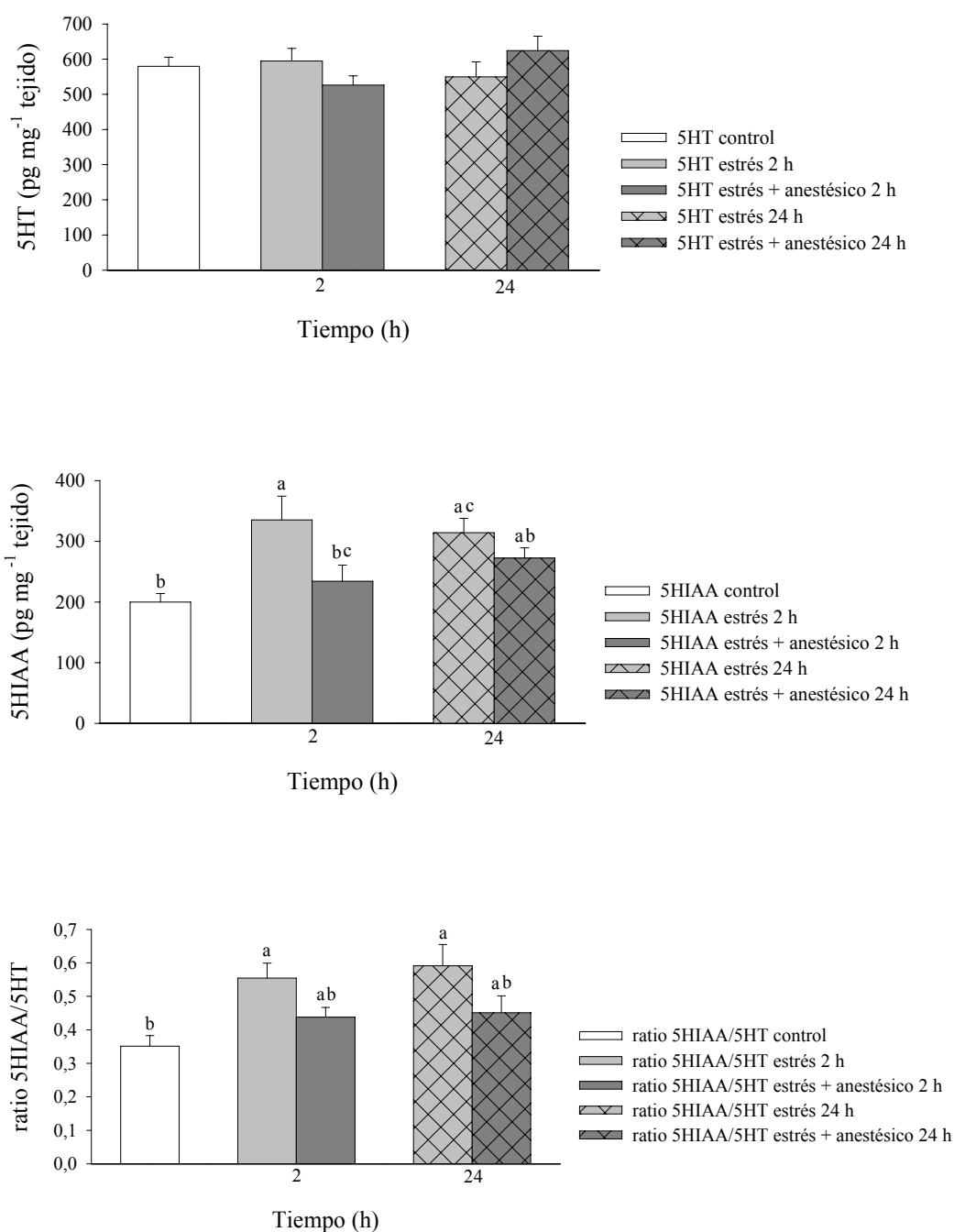
**Figura 53.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



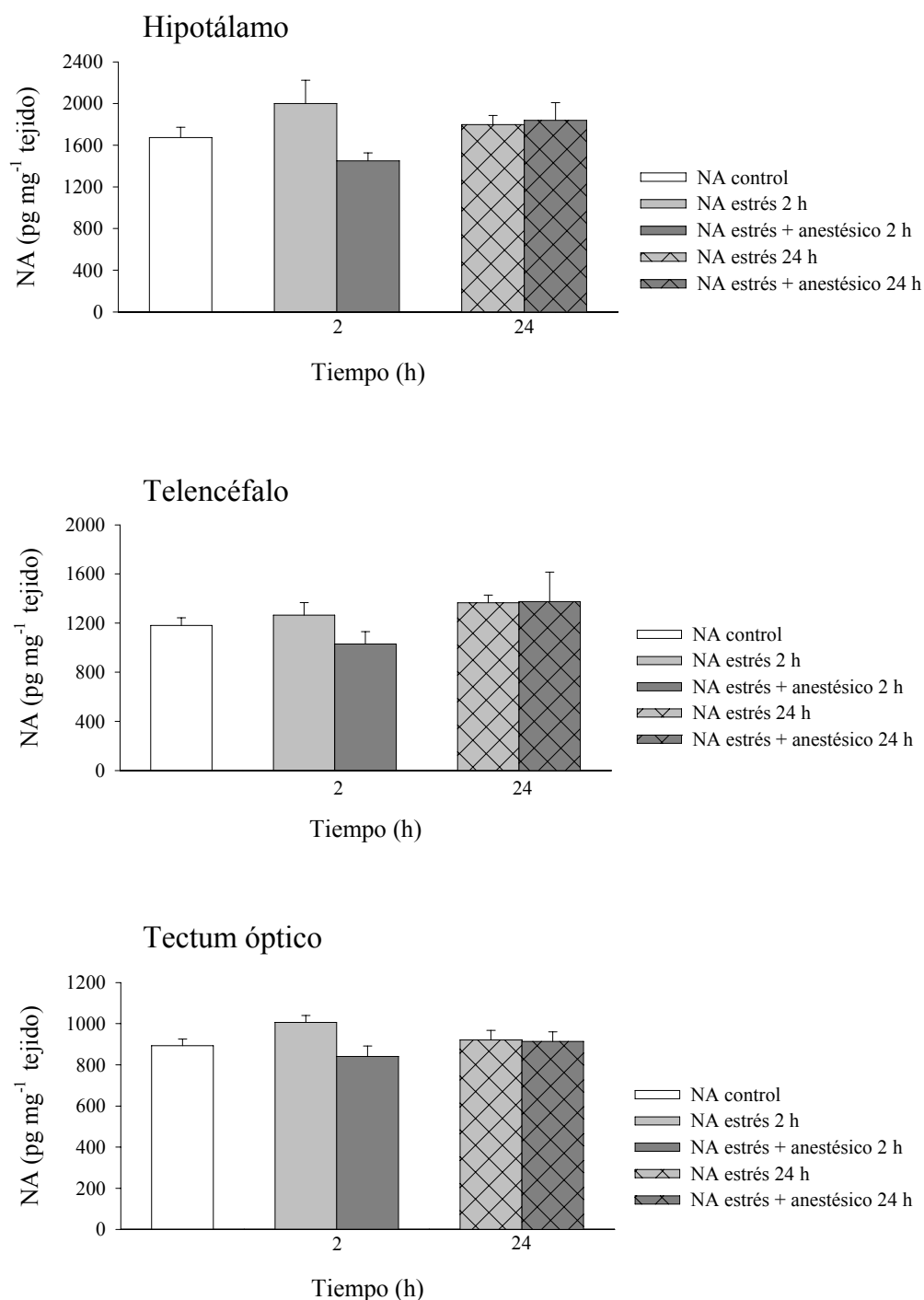


**Figura 54.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



**Figura 55.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

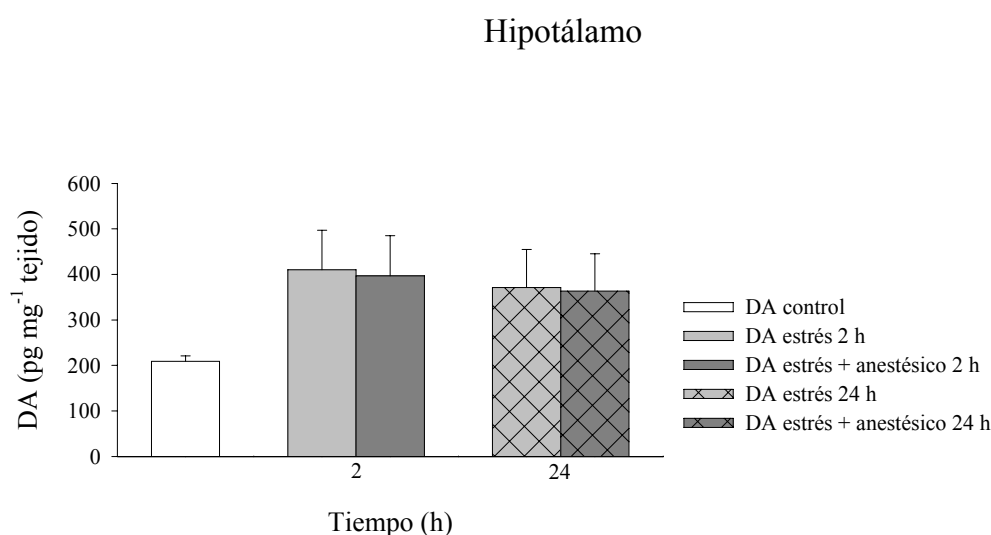


**Figura 56.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de langostido, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

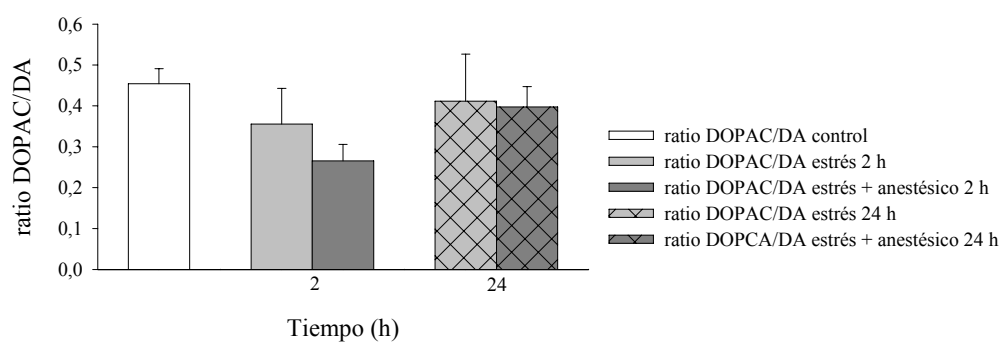
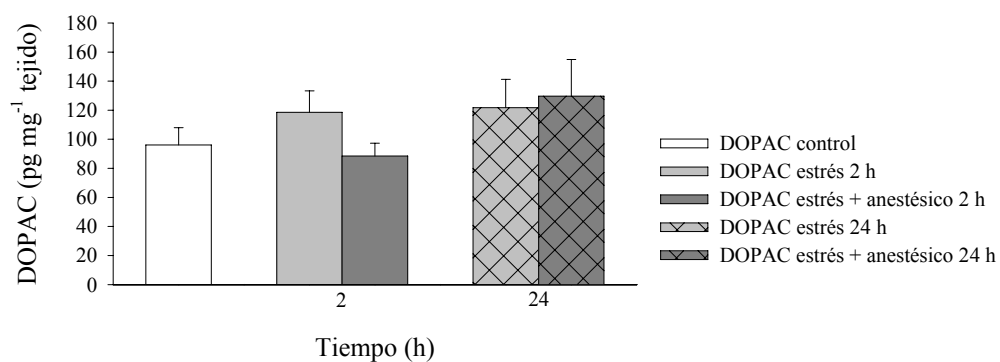
**MS-222**

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63.

En los animales estresados no anestesiados y en los estresados anestesiados, cuando la comparación se realizó frente al grupo de animales control, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables relativas al sistema dopaminérgico, serotoninérgico y noradrenérgico de las distintas regiones cerebrales estudiadas. Tampoco se observaron diferencias significativas con relación a los parámetros analizados cuando se comparan los animales estresados no anestesiados frente a los animales estresados anestesiados.

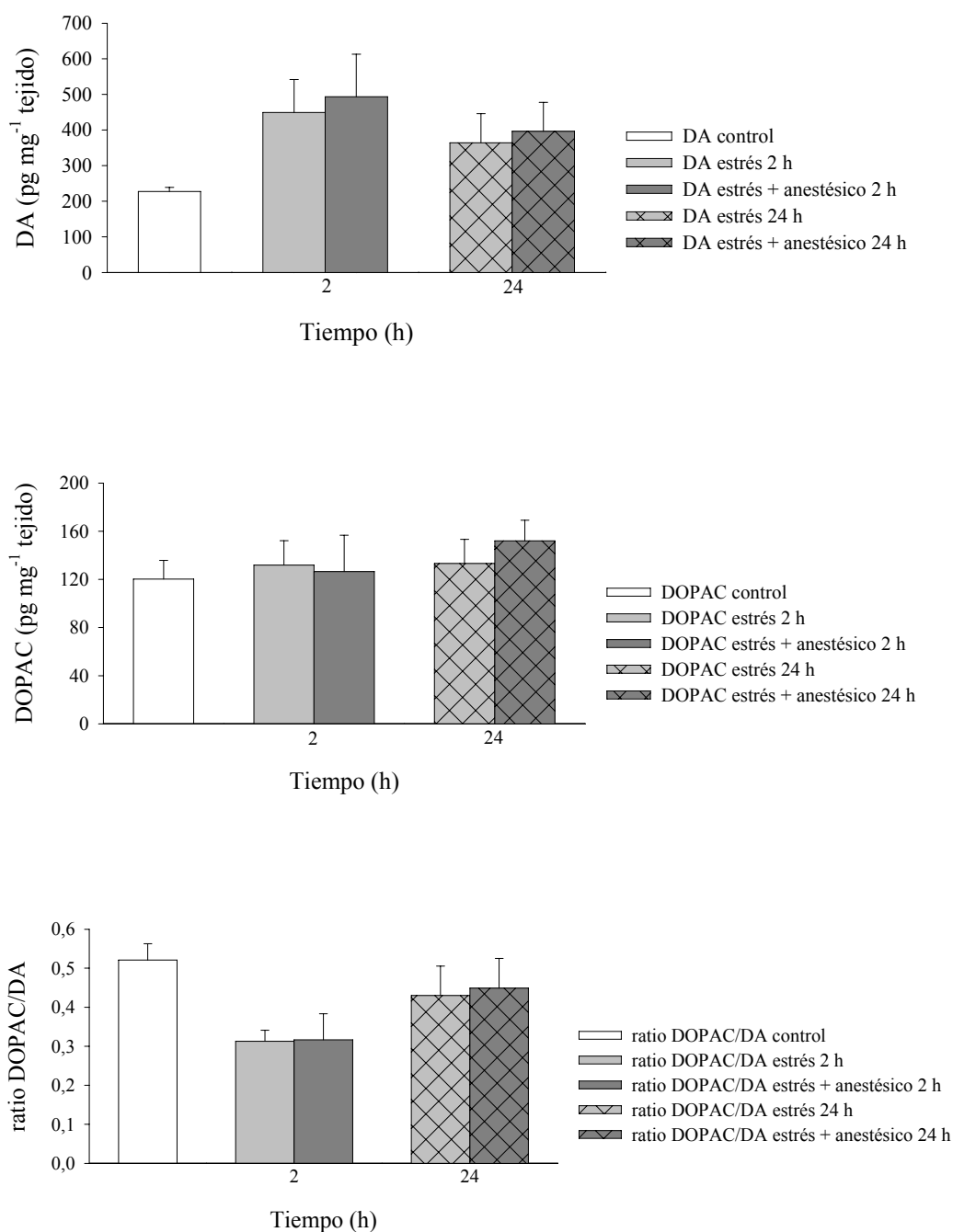


**Figura 57.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



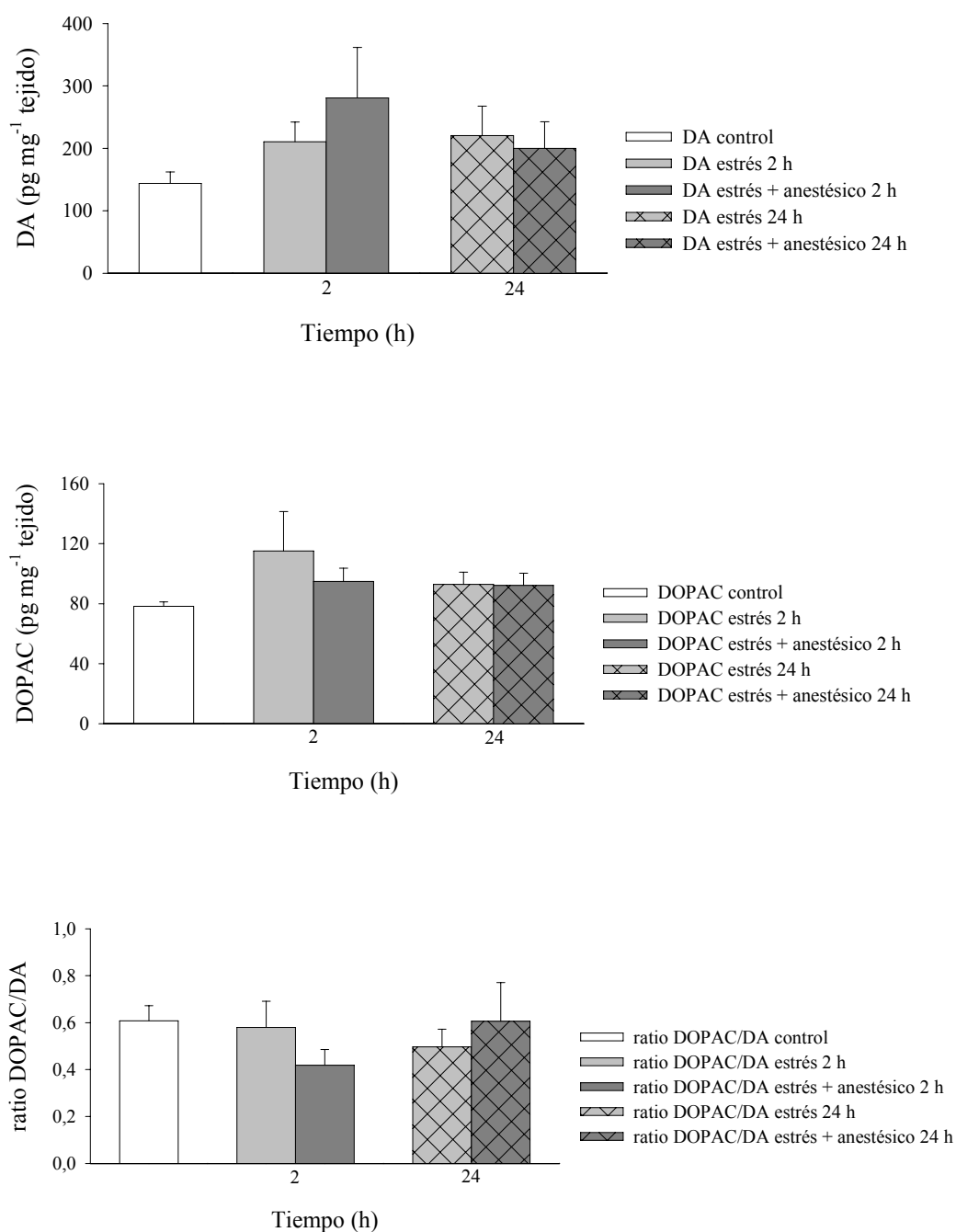
**Continuación Figura 57.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Telencéfalo



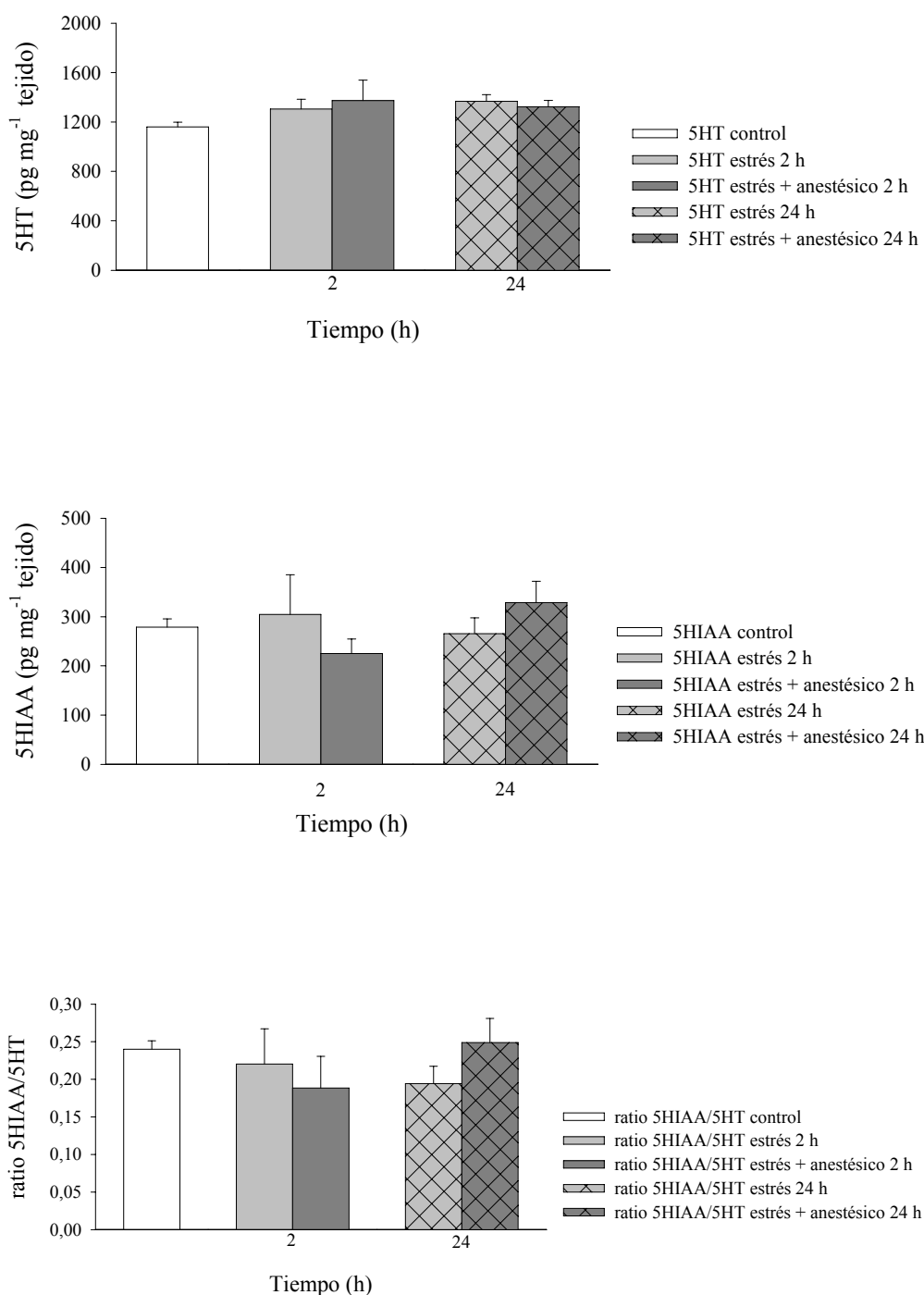
**Figura 58.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de langosta, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



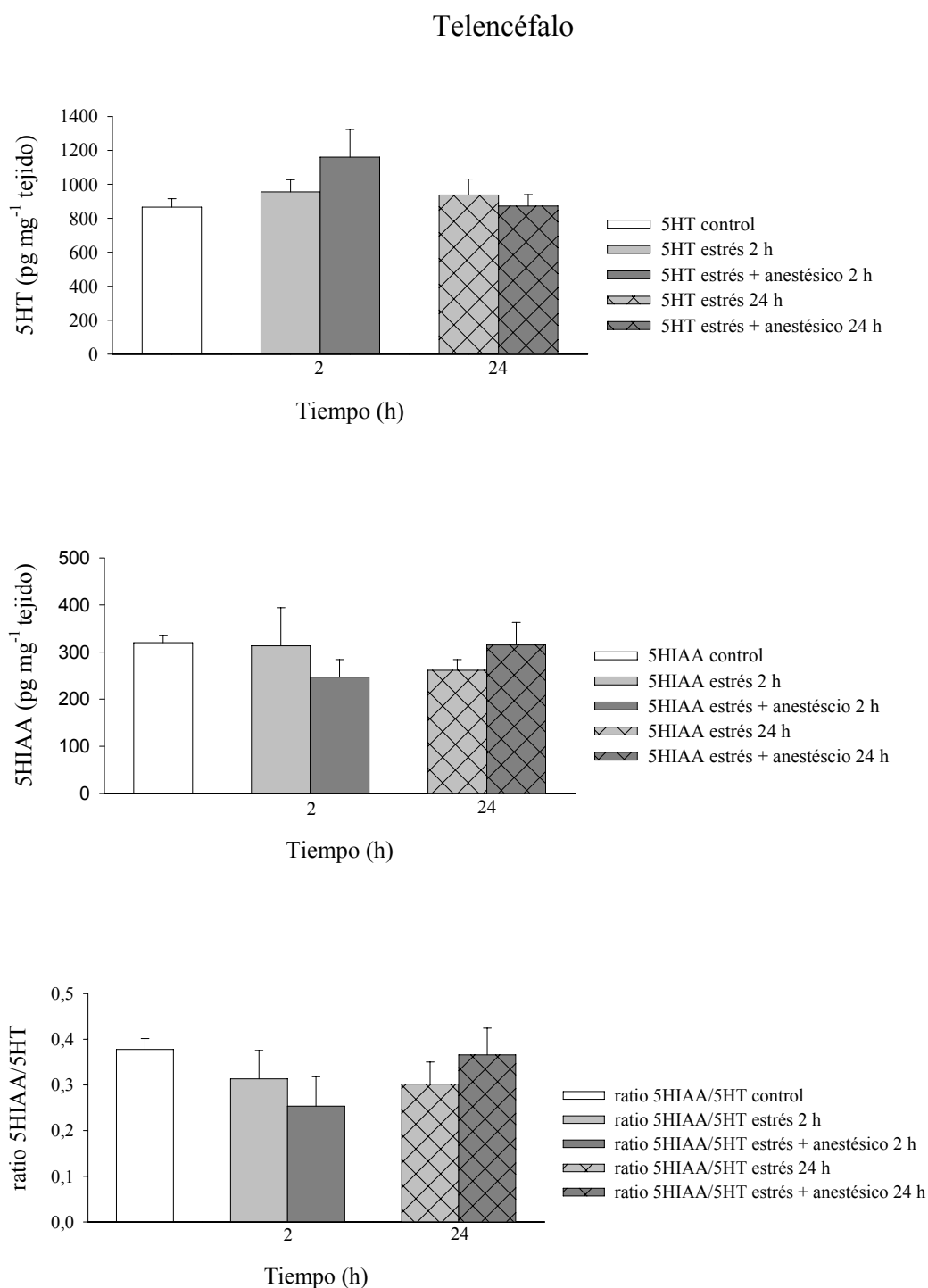
**Figura 59.** Niveles de DA, DOPAC y cociente DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueran sacrificados a las 2 y 24 horas después del estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras sobrescritas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Hipotálamo



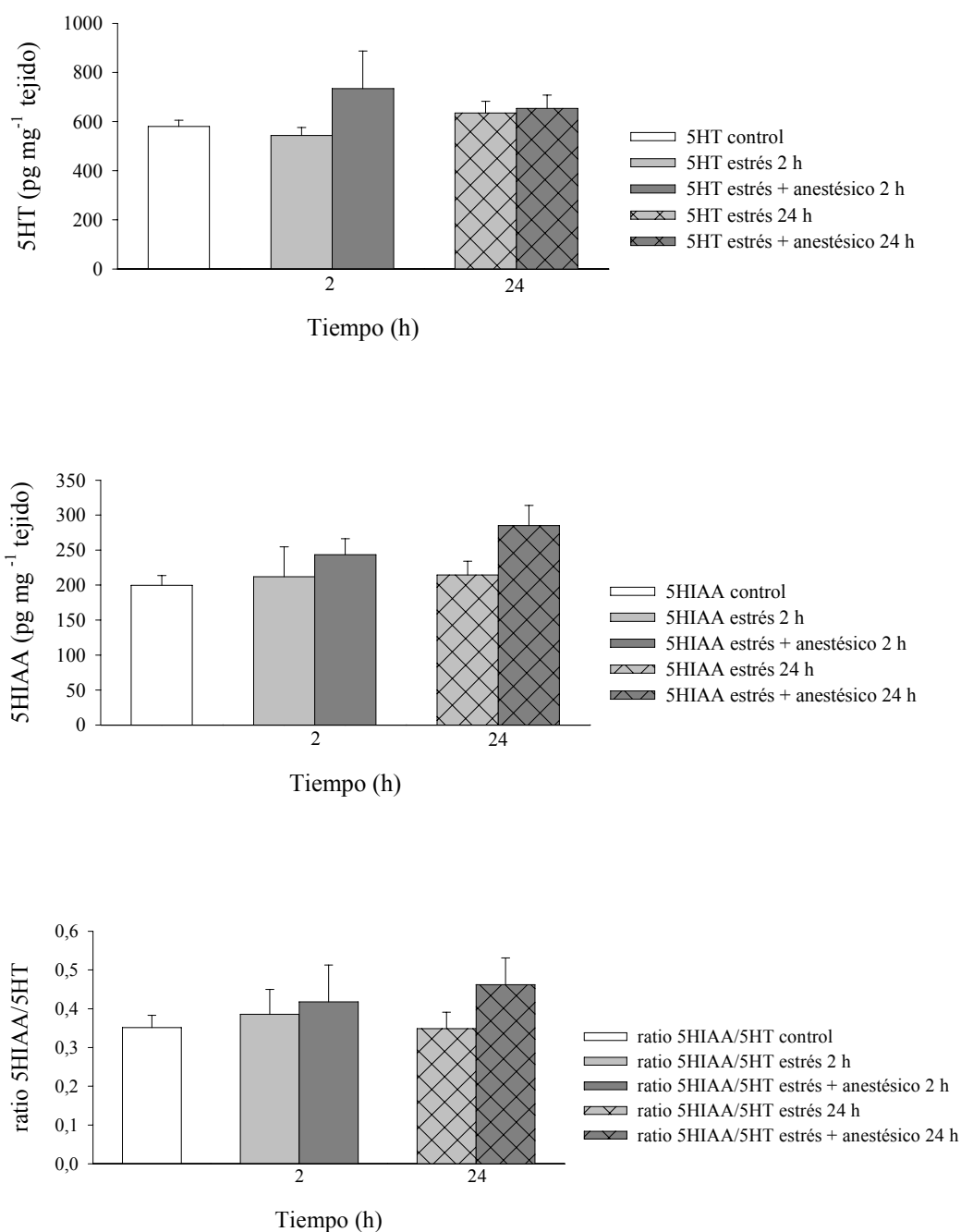
**Figura 60.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



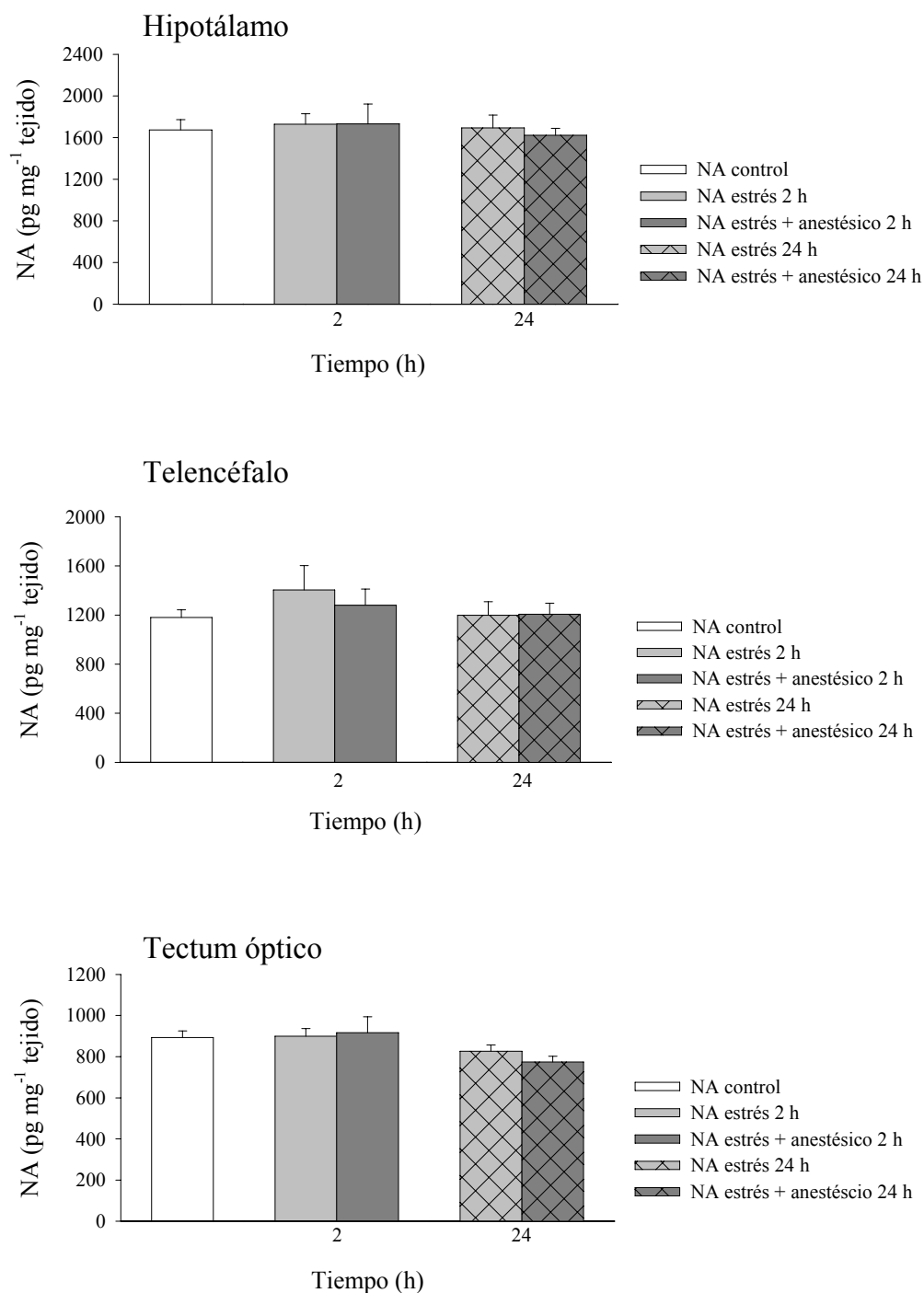


**Figura 61.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



**Figura 62.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



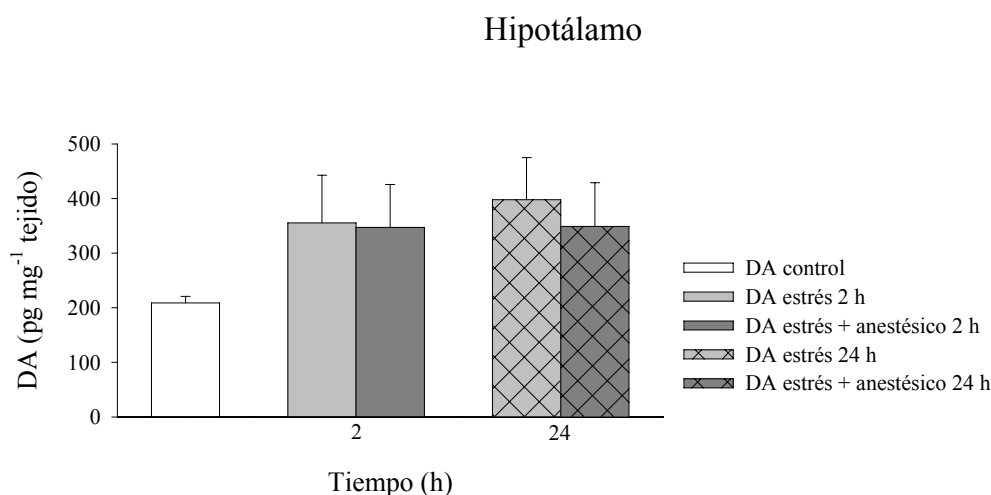
**Figura 63.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de langostido, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Metomidato

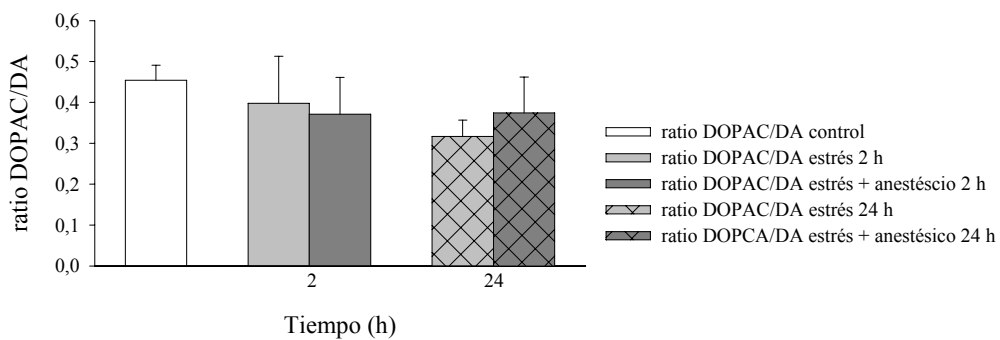
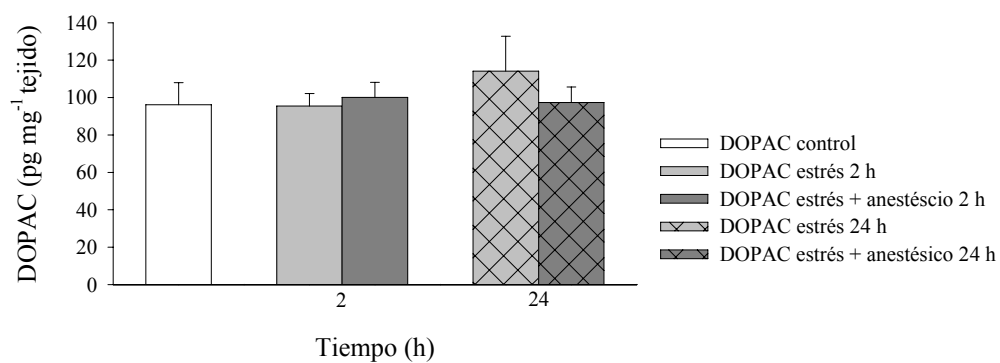
Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70.

No se observaron diferencias significativas, en ninguna de las variables relativas al sistema dopaminérgico y noradrenérgico de las distintas regiones cerebrales estudiadas, entre ninguno de los distintos grupos de animales evaluados.

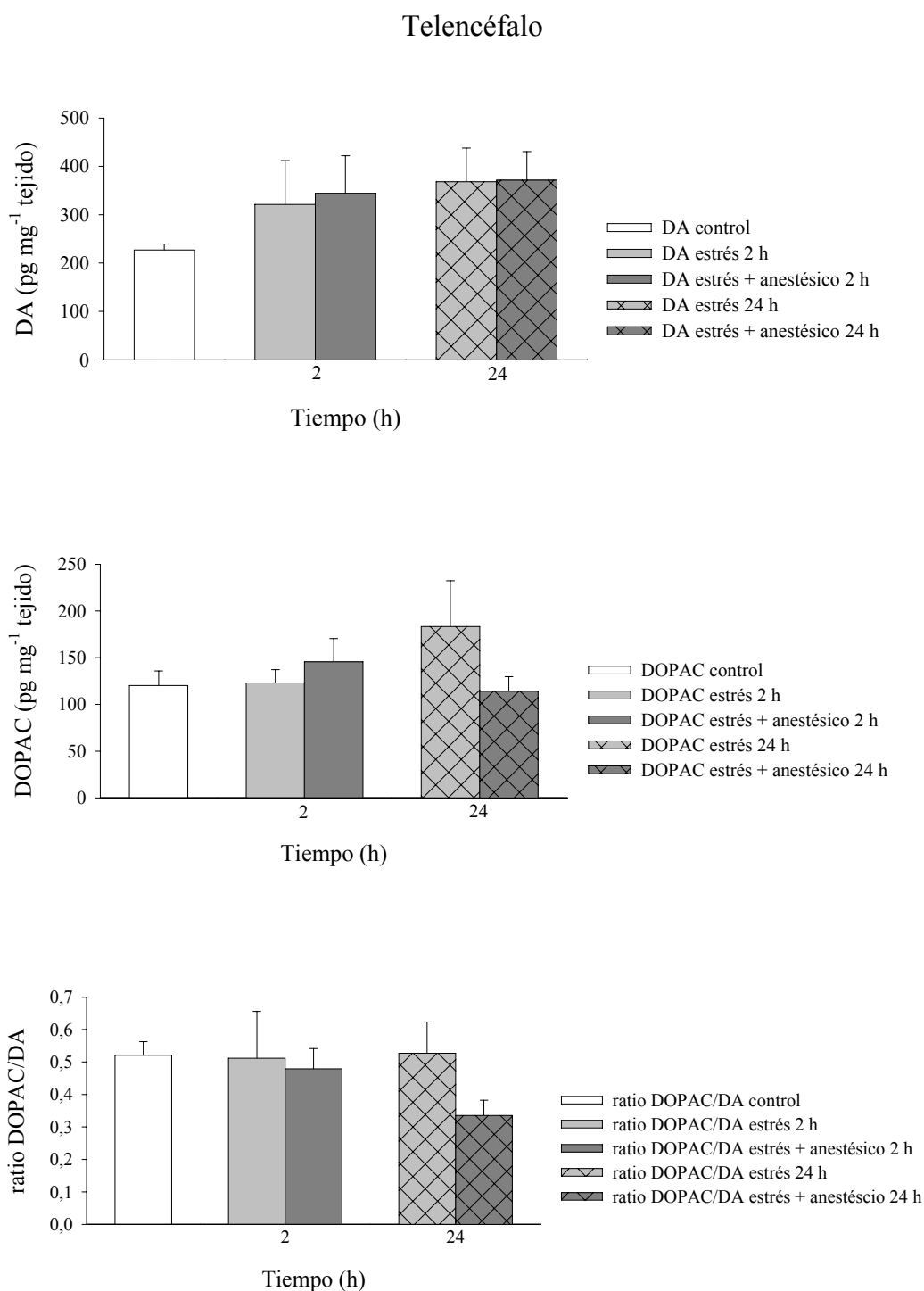
Con respecto al sistema serotoninérgico se observó un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la 5HT hipotalámica (Figura 67) a las 24 h después de la exposición al aire, en los animales estresados no anestesiados frente al grupo control. Por el contrario, los niveles del 5HIAA no sufrieron modificaciones significativas en las tres regiones estudiadas (Figuras 67, 68, 69). Cuando se compararon los animales estresados anestesiados frente al grupo de animales control, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la 5HT, 5HIAA ni en la relación 5HIAA/5HT en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (Figuras 67, 68, 69). Tampoco se observó ningún tipo de variación significativa en ninguno de los parámetros serotoninérgicos estudiados (Figuras 67, 68, 69), cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los animales estresados anestesiados.



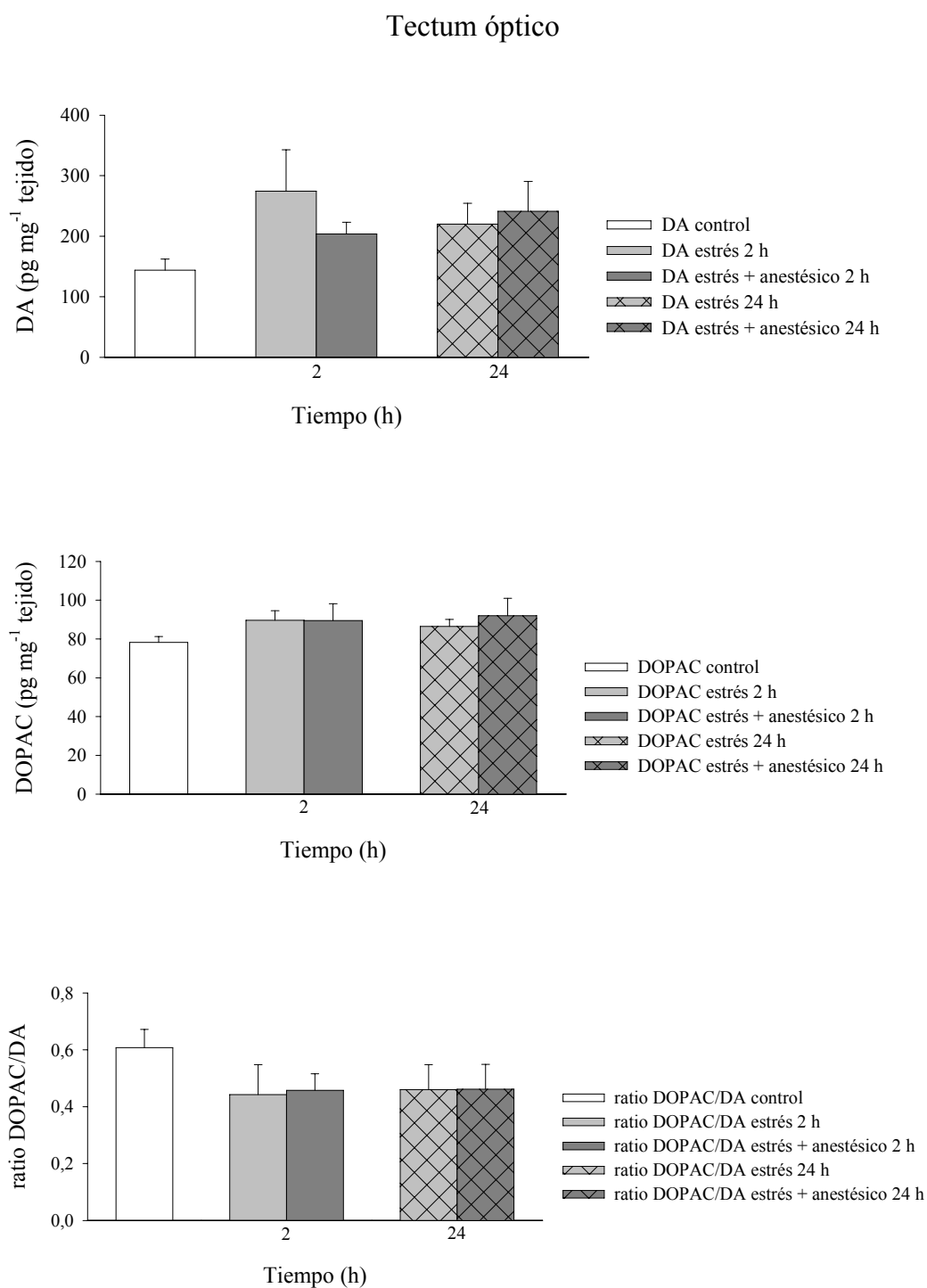
**Figura 64.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



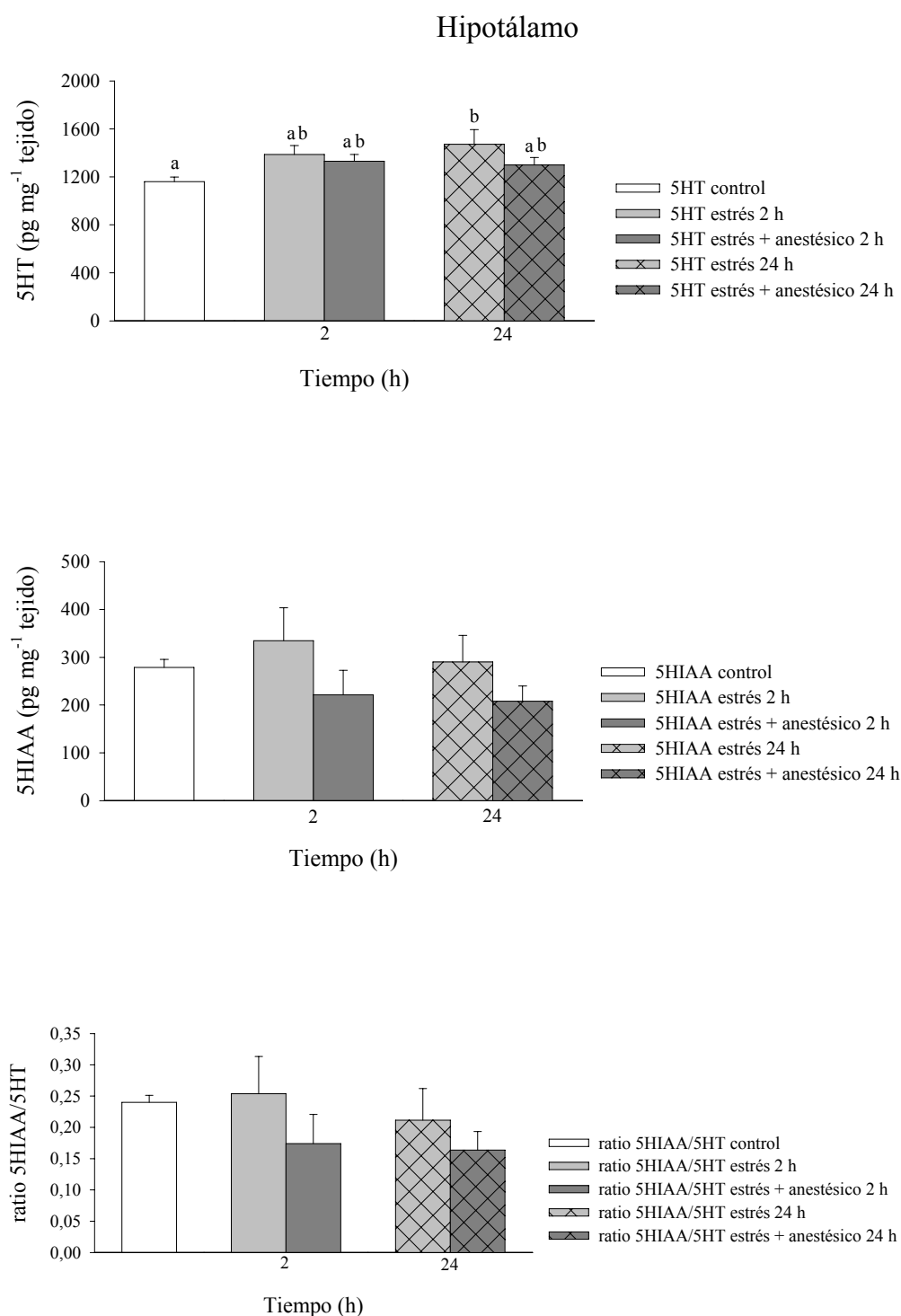
**Continuación Figura 64.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 65.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



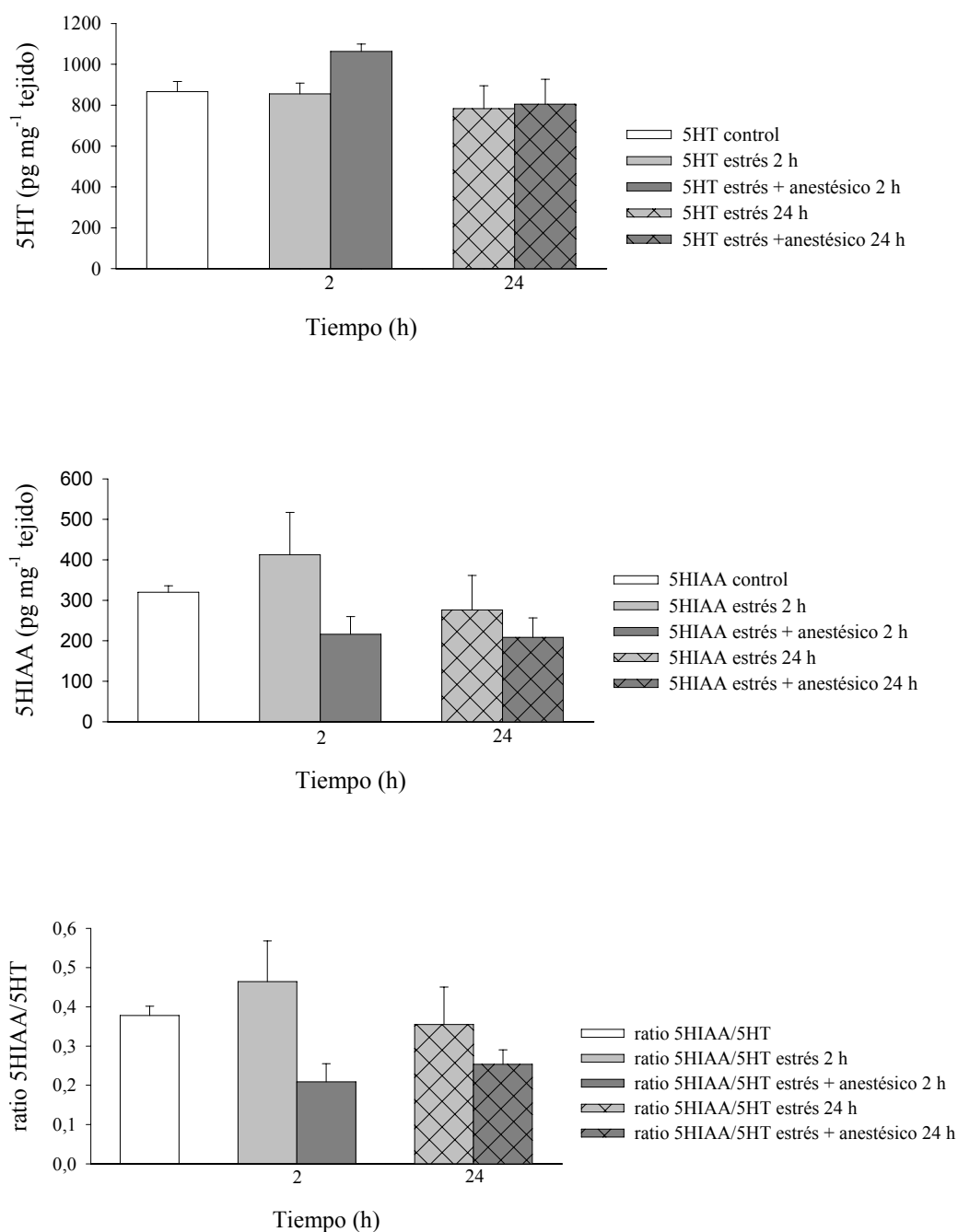
**Figura 66.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 67.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

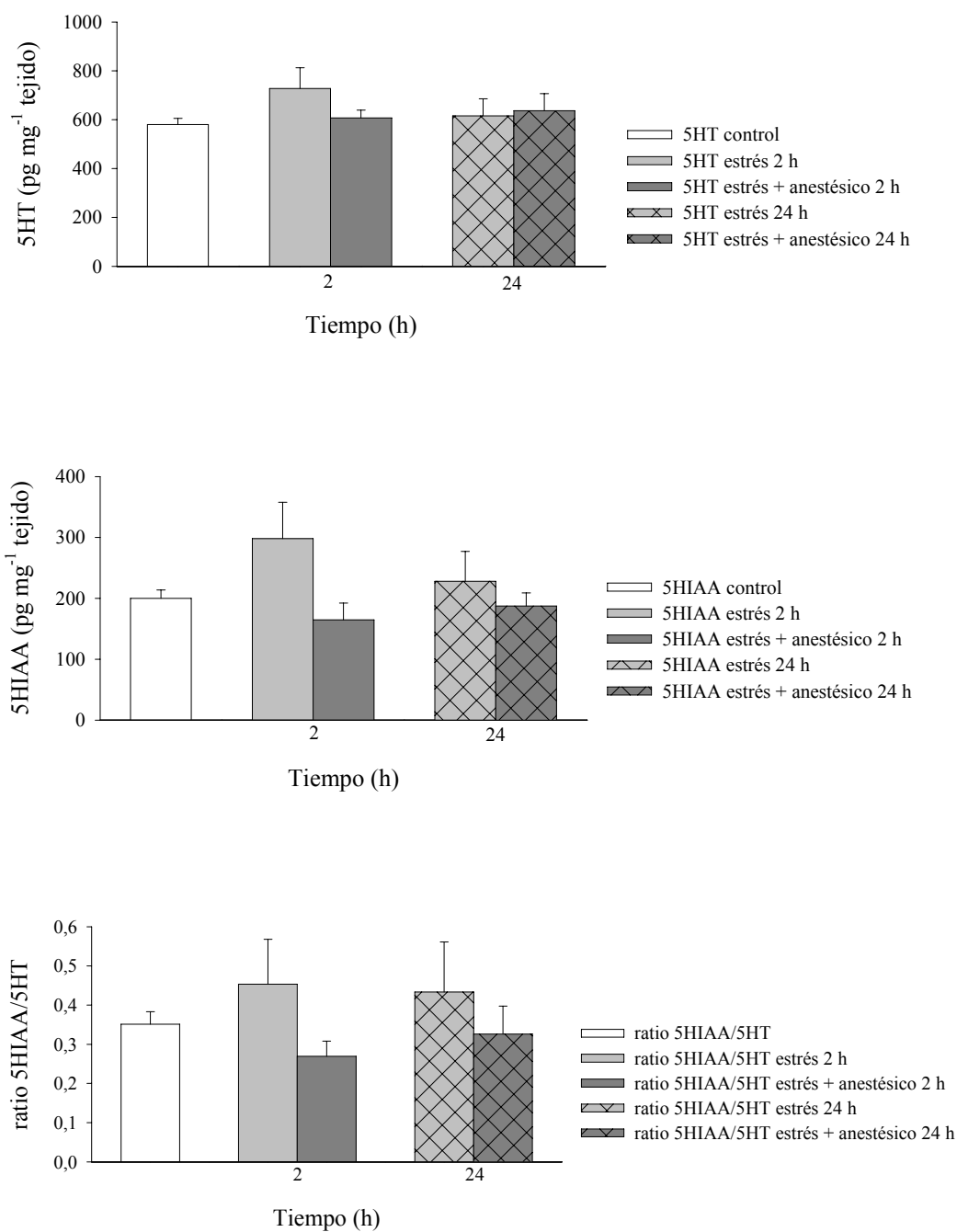


## Telencéfalo

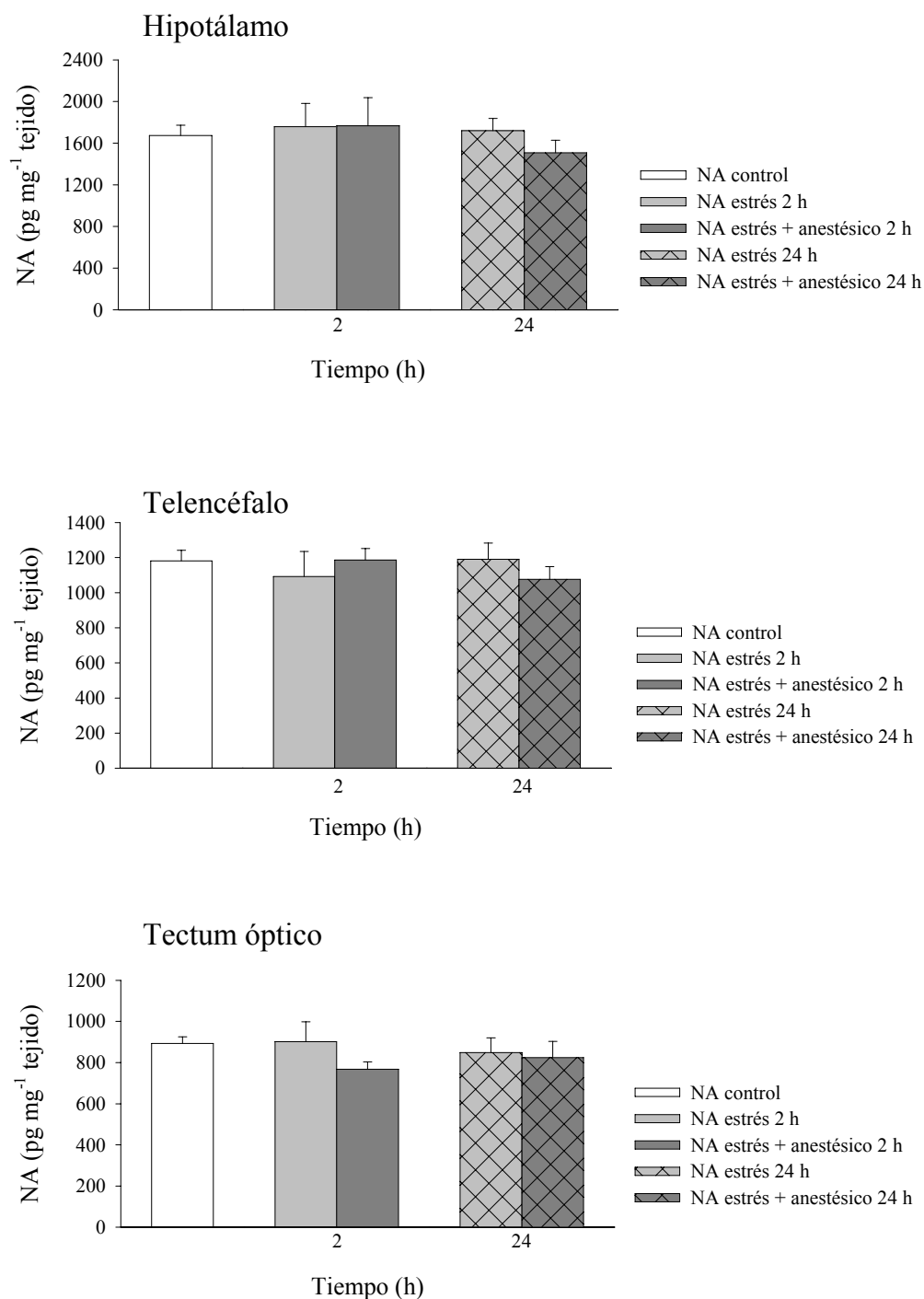


**Figura 68.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



**Figura 69.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 70.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (3 min exposición al aire) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## 5.8. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS (PERSECUCIÓN) SOBRE LOS NIVELES CEREBRALES DE NEUROTRANSMISORES: EFECTO DE LOS ANESTÉSICOS

En todos los experimento se desarrolló un grupo de animales control no estresados (ver apartado 4.8), donde la extracción del cerebro se realizó en peces anestesiados con metomidato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

### 2-Fenoxietanol

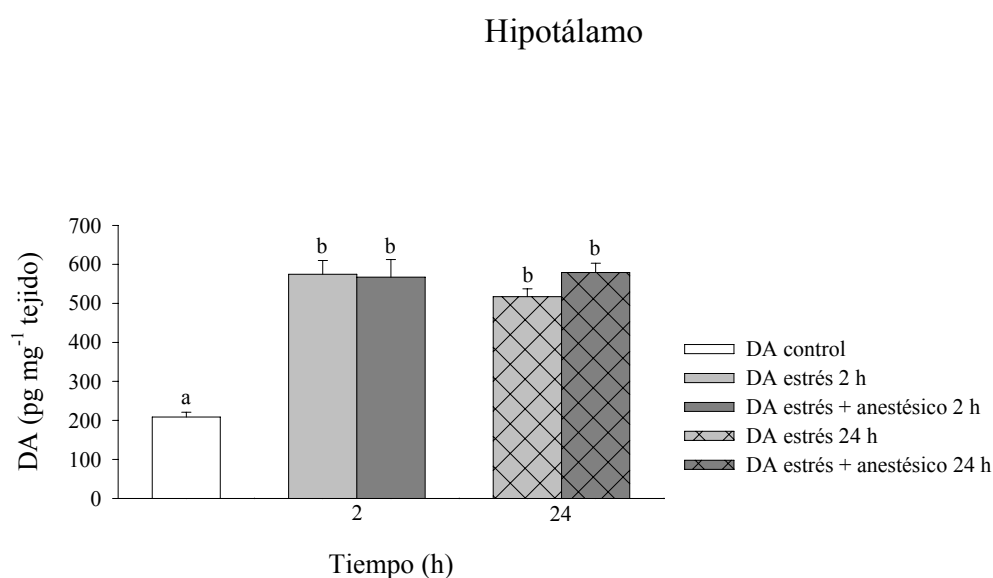
Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 71, 72, 73, 74, 75, 76 y 77. No se observó ninguna diferencia significativa en el contenido de la NA de las distintas regiones cerebrales entre los distintos grupos de animales evaluados.

Con respecto al sistema dopaminérgico los niveles de la DA se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en los grupos de los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados 2 y 24 h después de la exposición al estrés en el hipotálamo (Figura 71), telencéfalo (Figura 72) y en el tectum óptico (Figura 73), frente al grupo de animales control. Igualmente, se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles del DOPAC: i) a las 2 h en el hipotálamo (Figura 71) de los animales estresados no anestesiados, y ii) a las 2 h en el tectum óptico (Figura 73) de los animales estresados anestesiados, y a las 24 h en los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados, cuando las comparaciones se hicieron frente al grupo control. Por el contrario, en ambos grupos de animales se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la relación DOPAC/DA, a las 2 y 24 h en el telencéfalo (Figura 72) y en el tectum óptico (Figura 73) y a las 24 h en el hipotálamo (Figura 71), cuando las comparaciones se hicieron frente al grupo de animales control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente al grupo de animales estresados anestesiados, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la DA, DOPAC ni en la relación DOPAC/DA a las 2 y 24 h después de la exposición al estrés en el hipotálamo (Figura 71), telencéfalo (Figura 72) y en el tectum óptico (Figura 73).

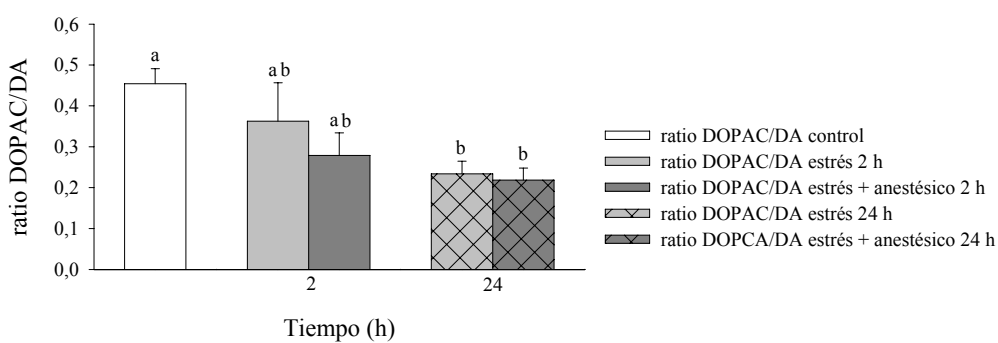
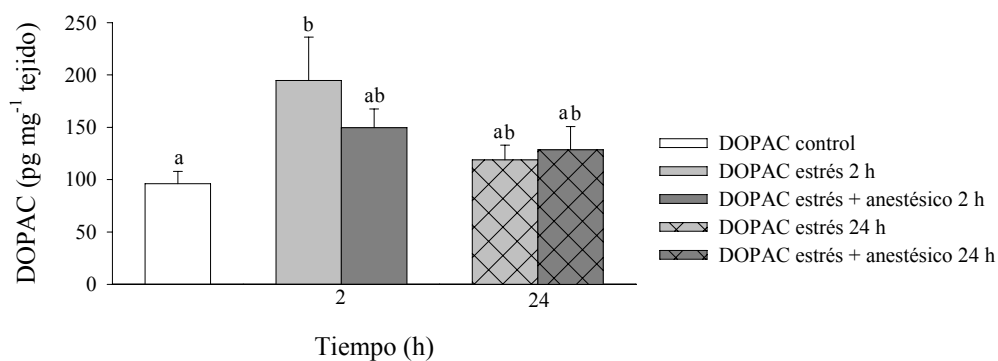
Con respecto al sistema serotoninérgico, ni en los animales estresados no anestesiados ni en los estresados anestesiados, se observaron modificaciones significativas en los niveles de la 5HT y de la relación 5-HIAA/5-HT en las tres regiones estudiadas cuando la comparación se realiza frente al grupo control. Por el contrario, los niveles del 5HIAA disminuyeron significativamente ( $P < 0,05$ ) en el telencéfalo (Figura 75) de los animales estresados anestesiados 2 h después del estrés. Con respecto al grupo de animales estresados no anestesiados, los niveles del 5HIAA se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las 2 y 24 h después

del estrés en el tectum óptico (Figura 76). En todos los casos las significaciones se realizaron frente al grupo de animales control.

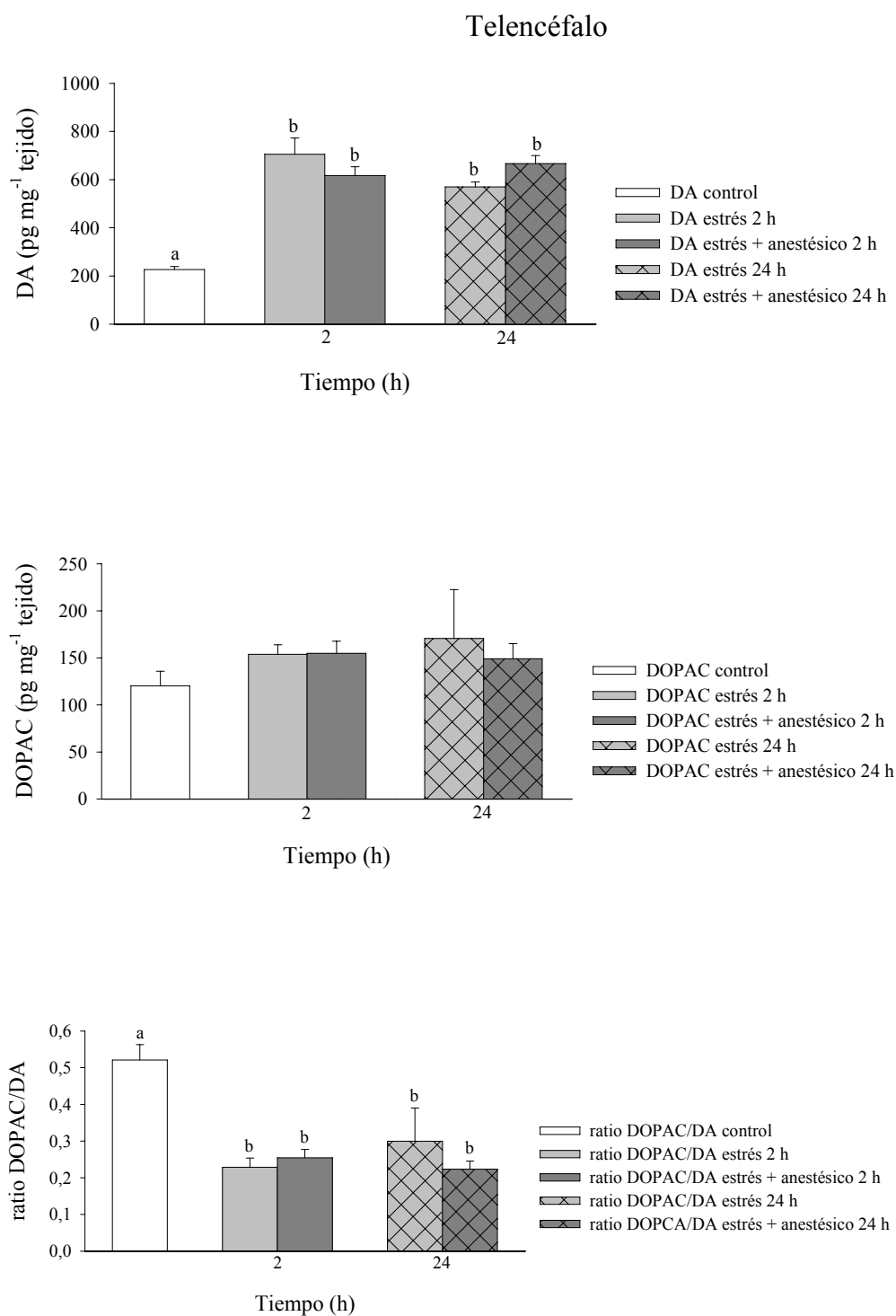
Cuando se comparan los animales estresados no anestesiados frente a los animales estresados anestesiados se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el contenido de la 5HT en el tectum óptico (Figura 76) a las 2 h después del estrés. Igualmente, también se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los niveles del 5HIAA en el telencéfalo (Figura 75) a las 2 h, y en el tectum óptico a las 2 y 24 h (Figura 76). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la relación 5HIAA/5HT cuando se comparan los animales estresados no anestesiados frente a los animales estresados anestesiados en las distintas regiones cerebrales.



**Figura 71.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

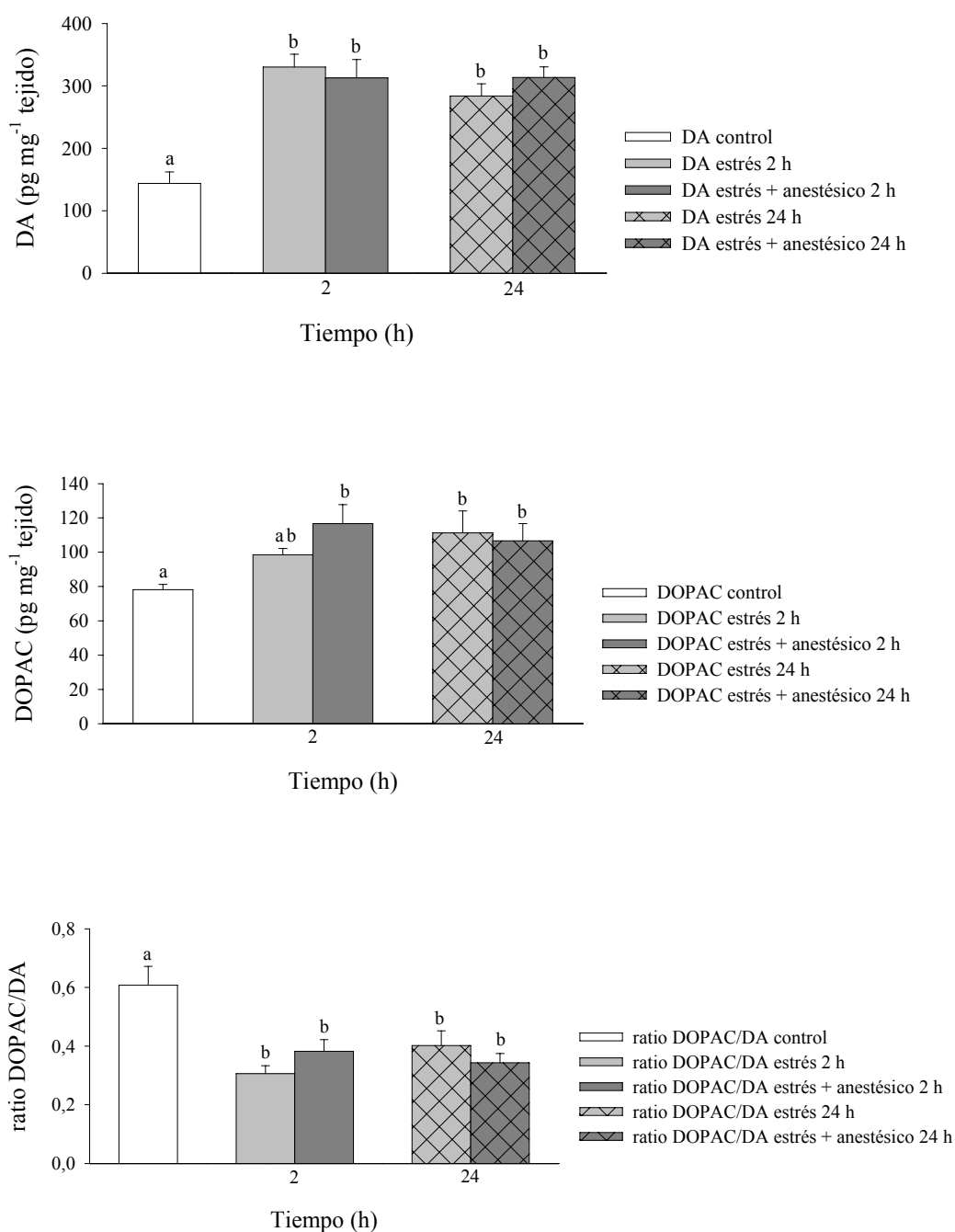


**Continuación Figura 71.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



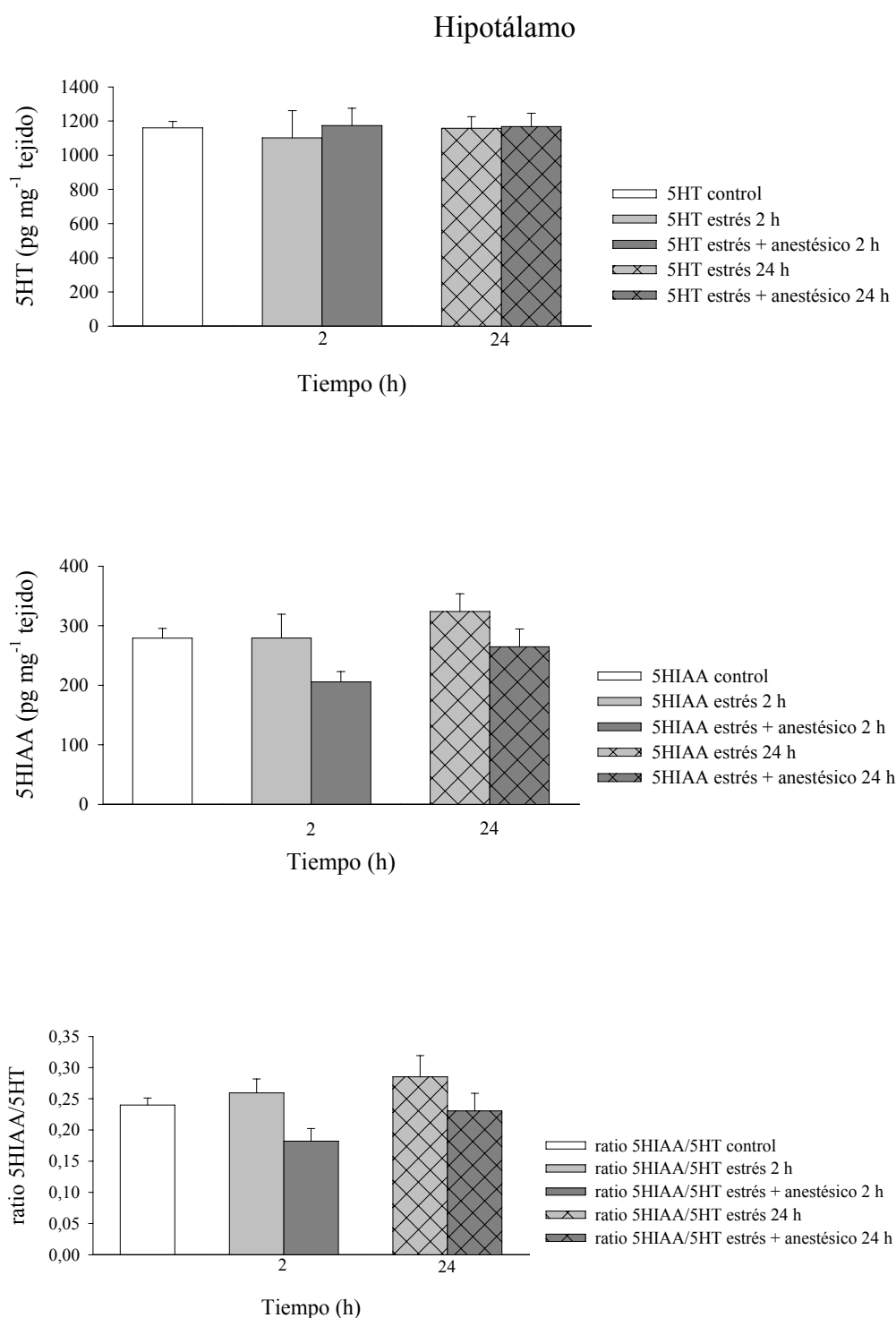
**Figura 72.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



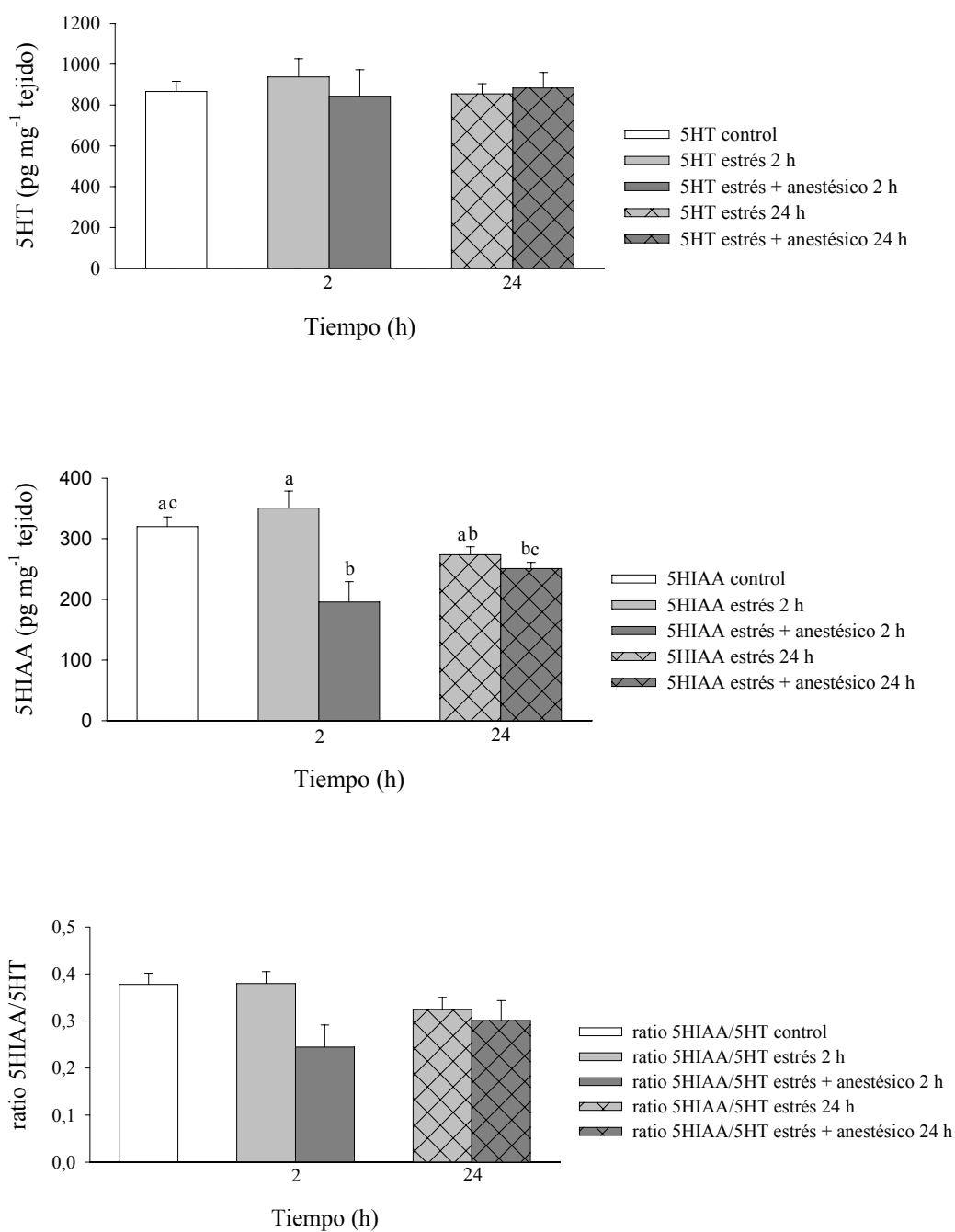
**Figura 73.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de langosta, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



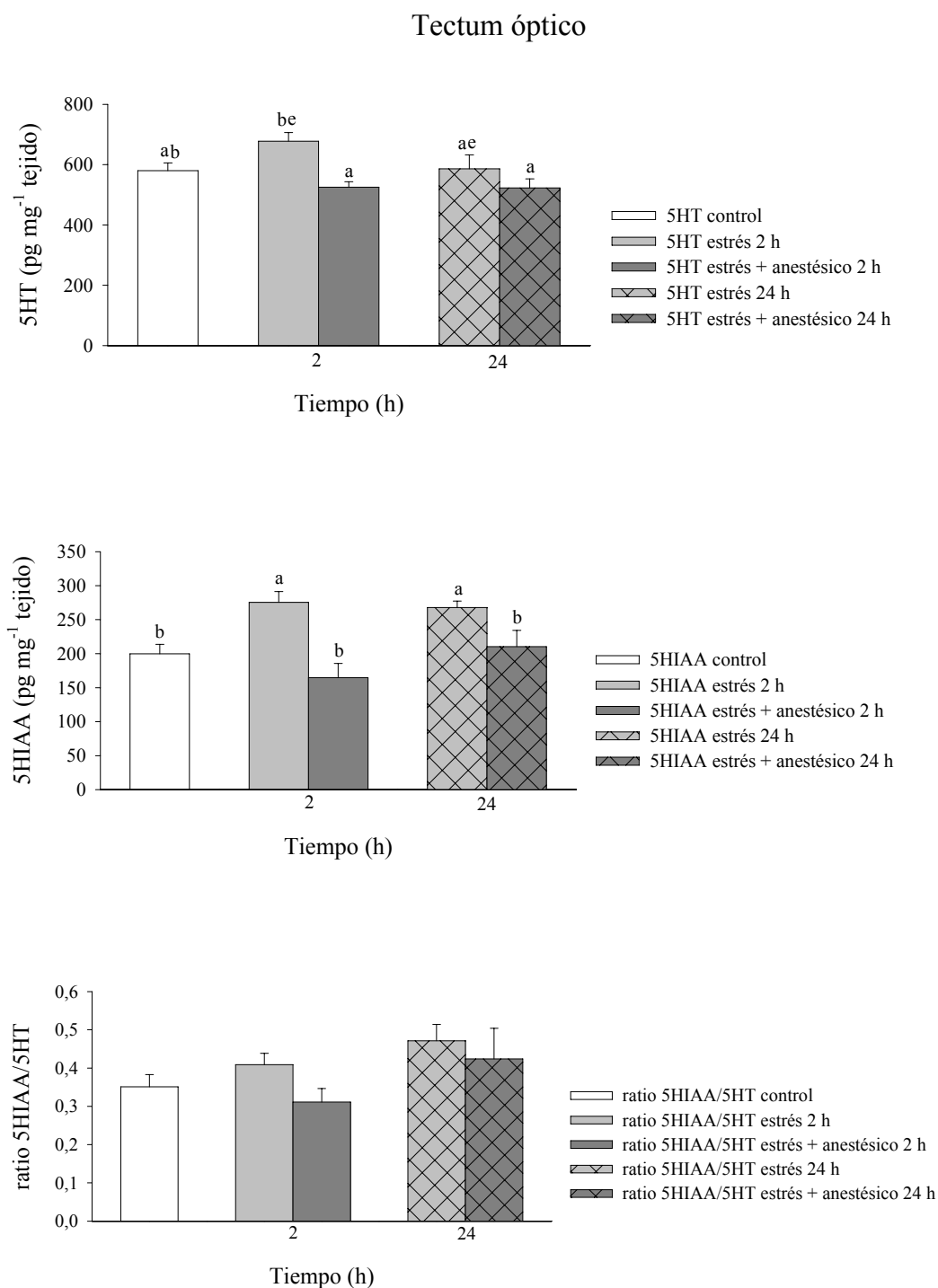


**Figura 74.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

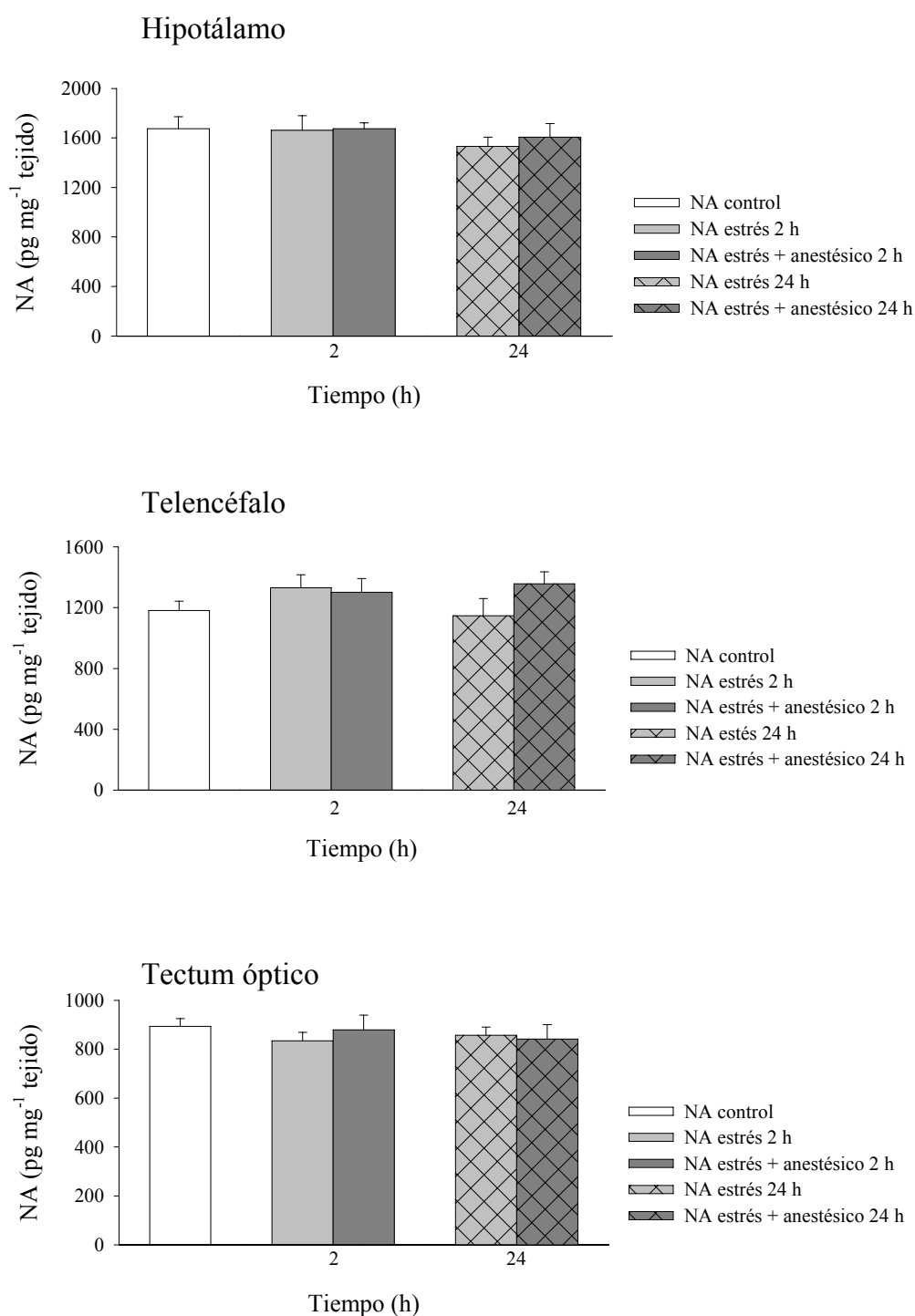
## Telencéfalo



**Figura 75.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 76.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 77.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con 2-fenoxietanol y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

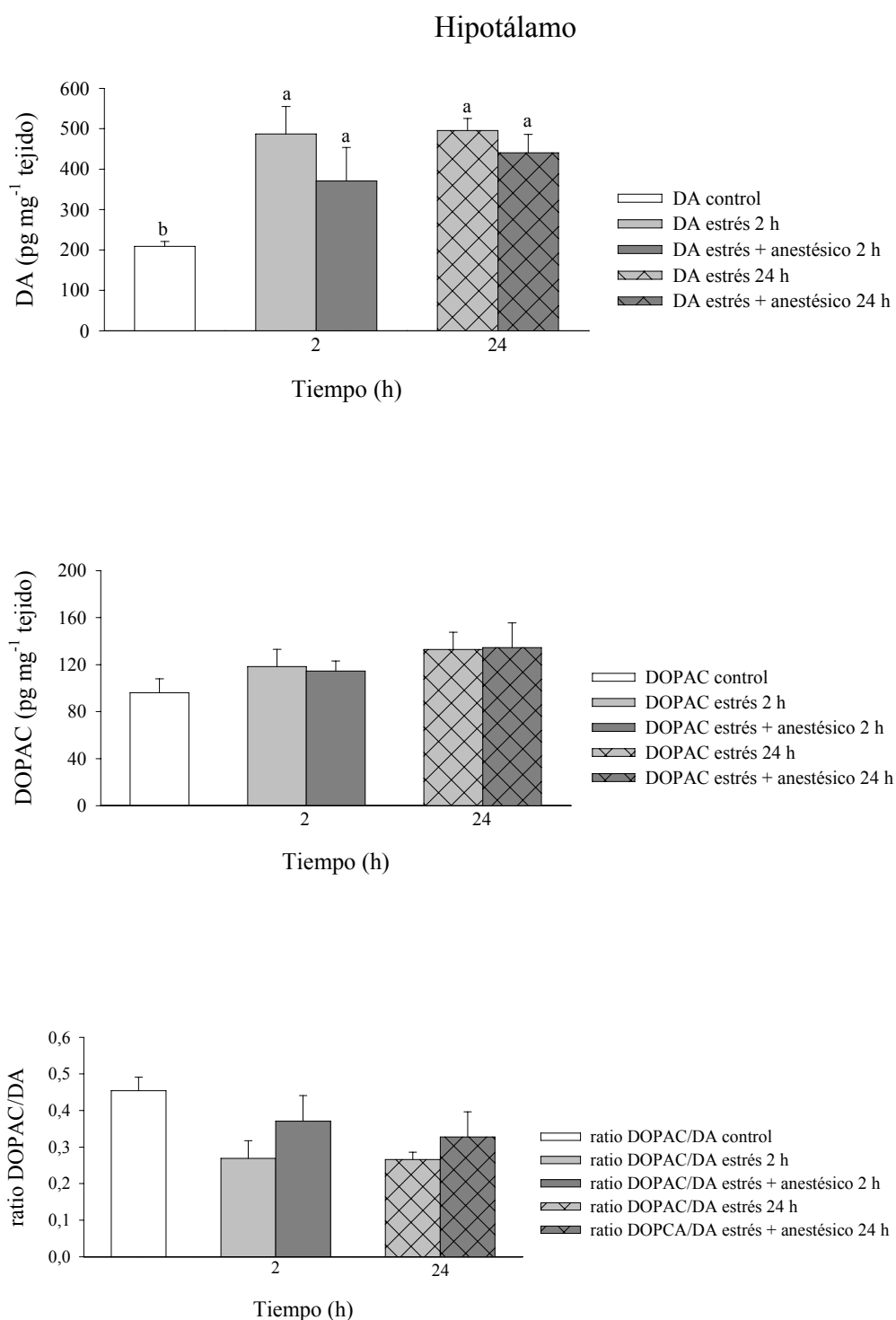
### **Aceite de clavo**

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 78, 79, 80, 81, 82, 83 y 84.

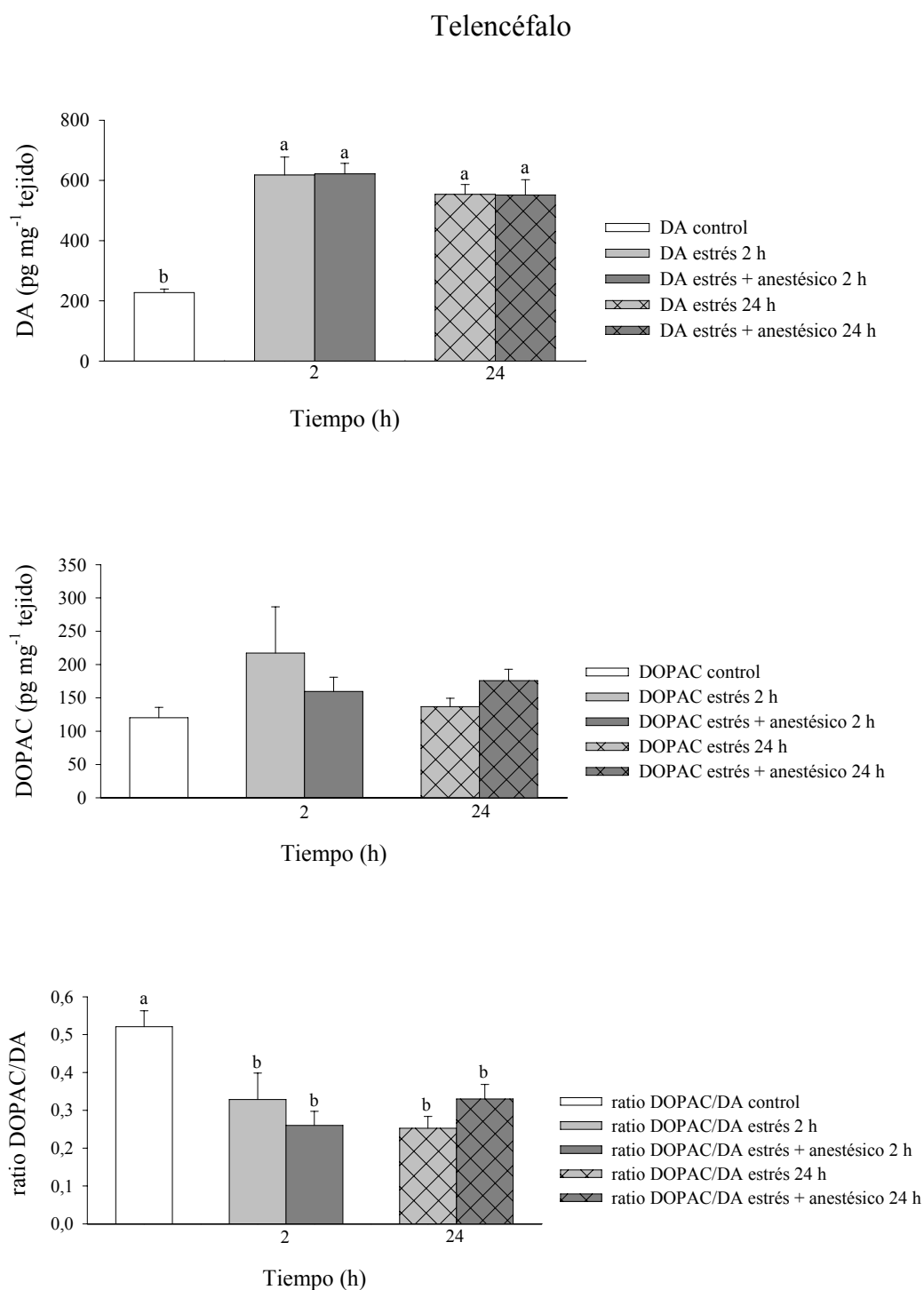
Con respecto al sistema dopaminérgico se observó un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la DA en el hipotálamo (Figura 78), telencéfalo (Figura 79) y en el tectum óptico (Figura 80), a las 2 y 24 h después de la exposición al estrés en los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. En ningún caso se observaron diferencias significativas en los niveles del DOPAC. Por el contrario, se observaron disminuciones significativas ( $P < 0,05$ ) en la relación DOPAC/DA en el telencéfalo (Figura 79) y en el tectum óptico (Figura 80), a las 2 y 24 h después de la exposición al estrés en los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. En todos los casos las comparaciones se realizaron frente al grupo de los animales control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente al grupo de animales estresados anestesiados no se observaron diferencias significativas en los niveles de la DA, DOPAC ni en la relación DOPAC/DA, en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (Figuras 78, 79, 80).

Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados y los animales estresados anestesiados frente al grupo de animales control (Figuras 81, 82, 83) no se observaron alteraciones significativas en los niveles de la 5HT ni en la relación 5HIAA/5HT a las 2 y 24 h después de la exposición al estrés en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Por el contrario se observó un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en los niveles del 5HIAA en el tectum óptico (Figura 83) a las 2 h en el grupo de animales estresados no anestesiados y a las 24 h en los de los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados, cuando se compararon frente al grupo control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente al grupo de animales estresados anestesiados no se observaron diferencias significativas en los niveles de la 5HT, 5HIAA ni en la relación 5HIAA/5HT en ningún caso (Figuras 81, 82, 83).

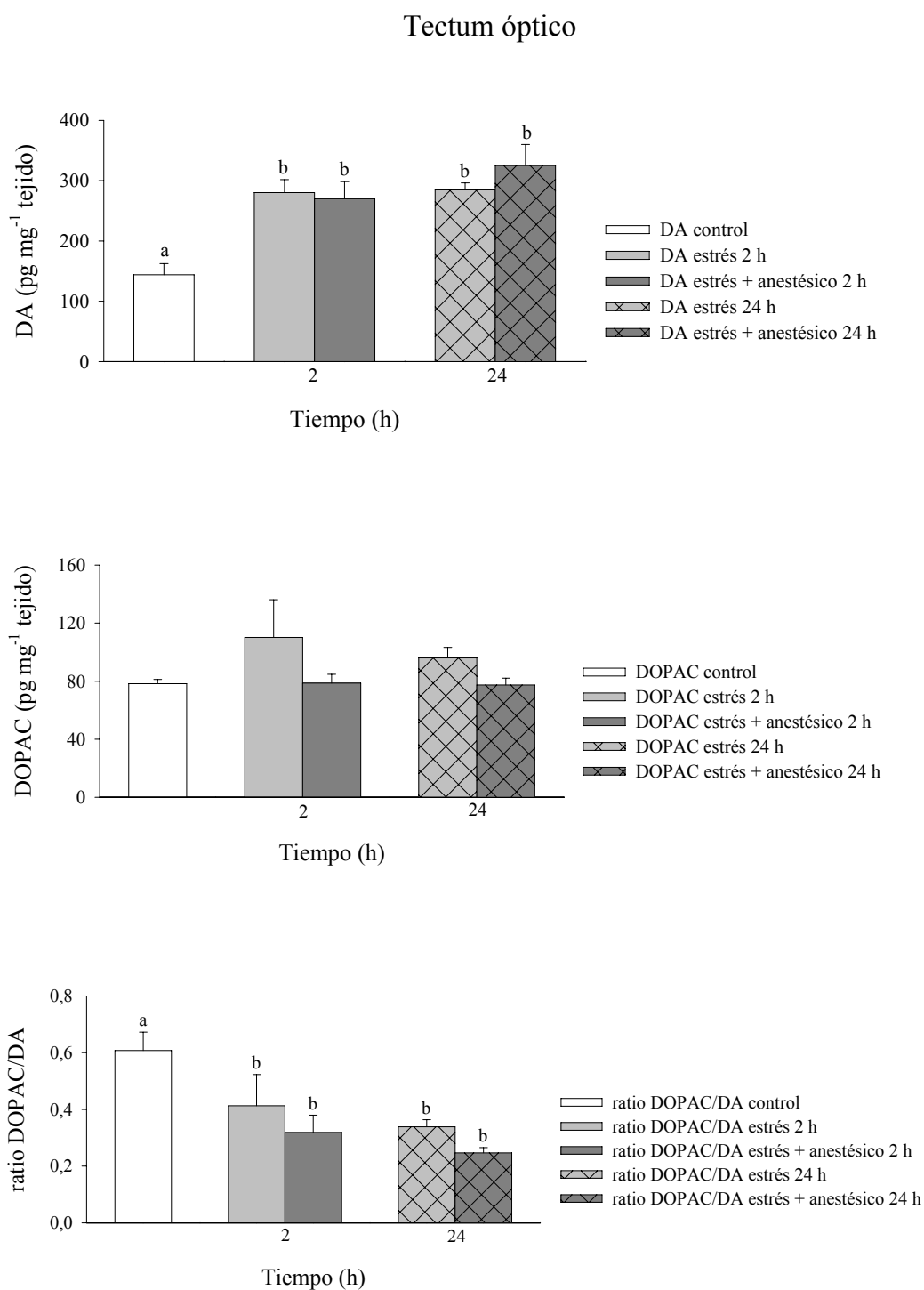
Con respecto al sistema noradrenérgico, el contenido de la NA en los animales estresados no anestesiados se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el hipotálamo (Figura 84) a las 24 h después de la exposición al estrés, frente al grupo control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon el grupo de animales estresados anestesiados frente al grupo control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los estresados anestesiados, no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de la NA (Figura 84).



**Figura 78.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de langosta, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

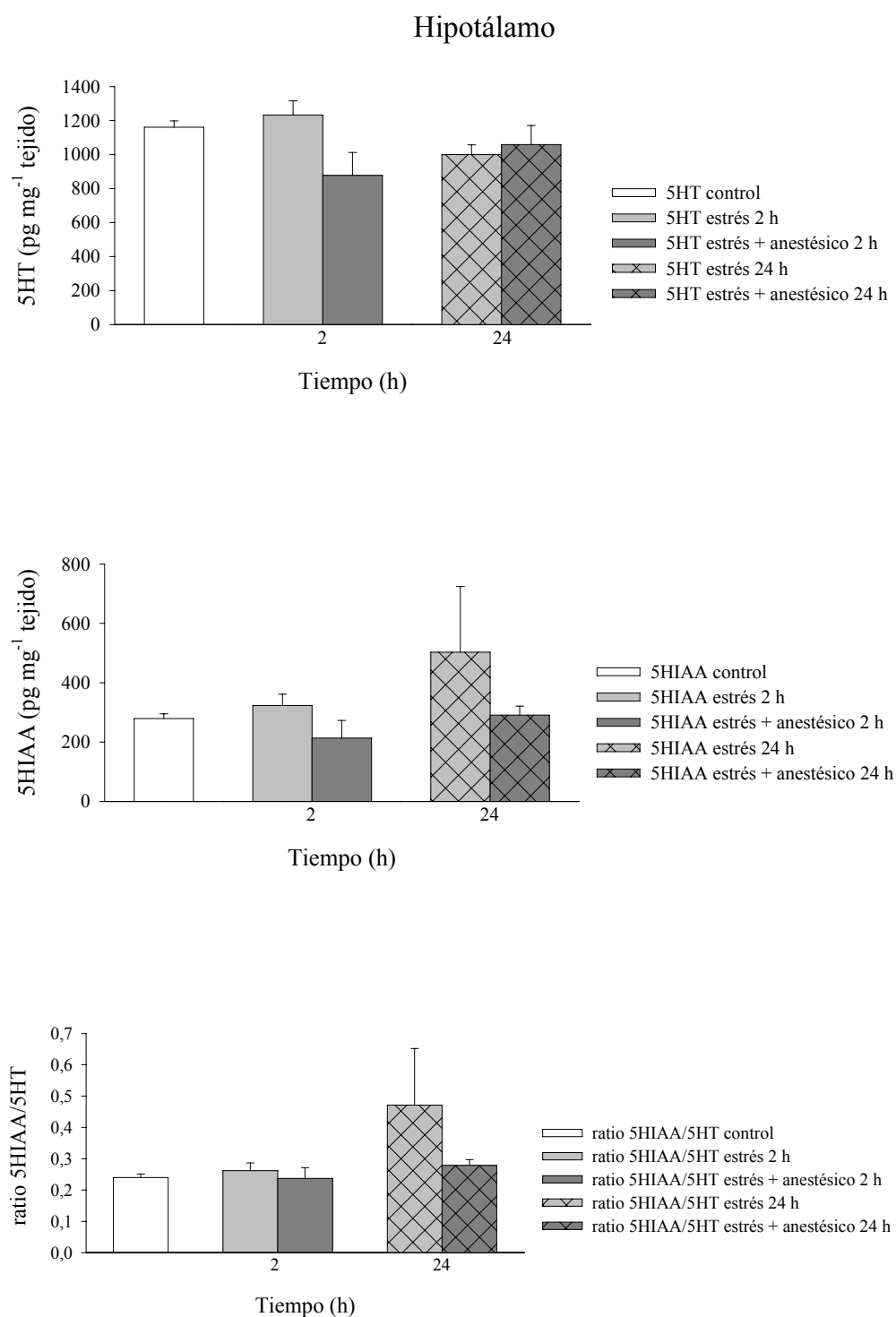


**Figura 79.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



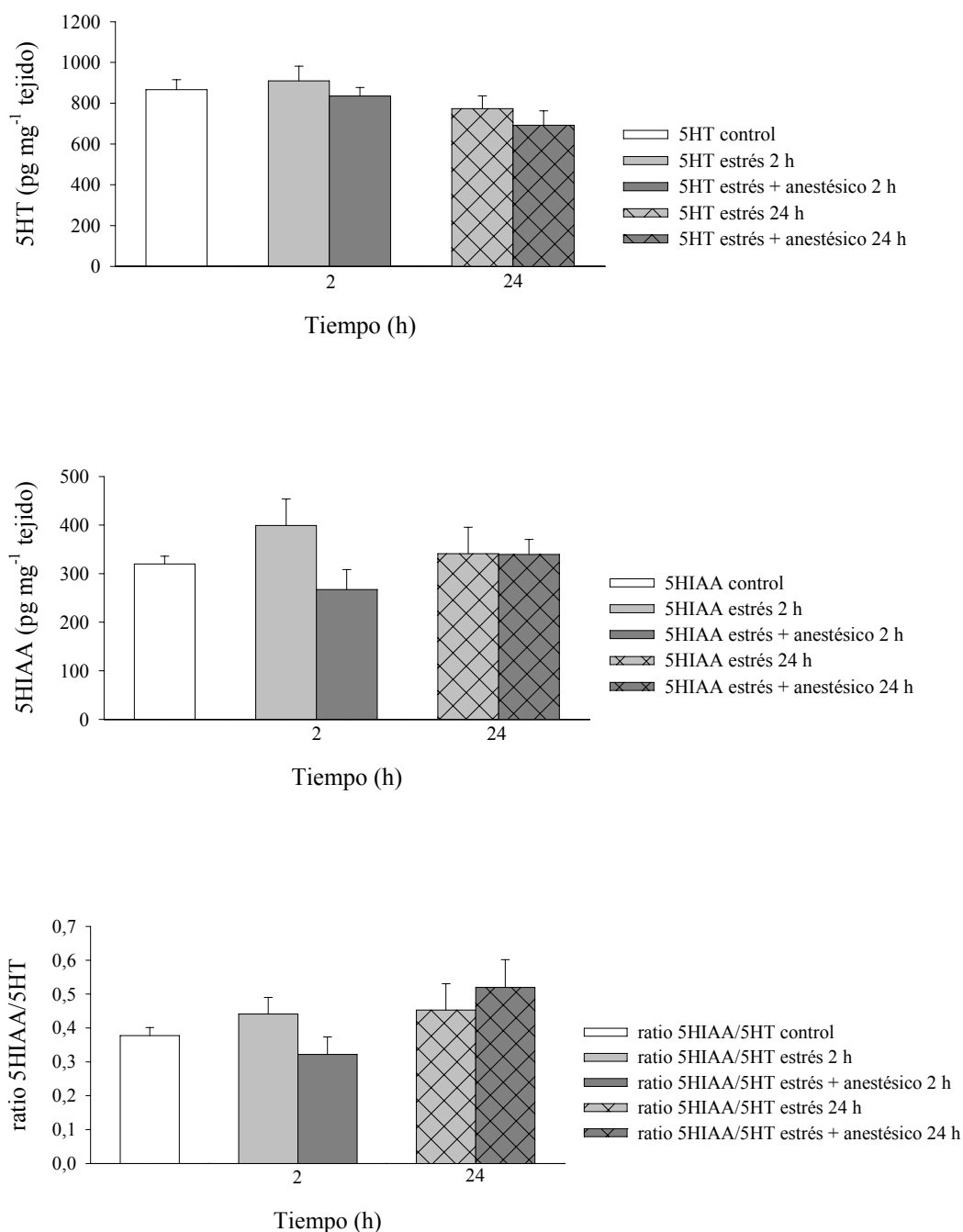
**Figura 80.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



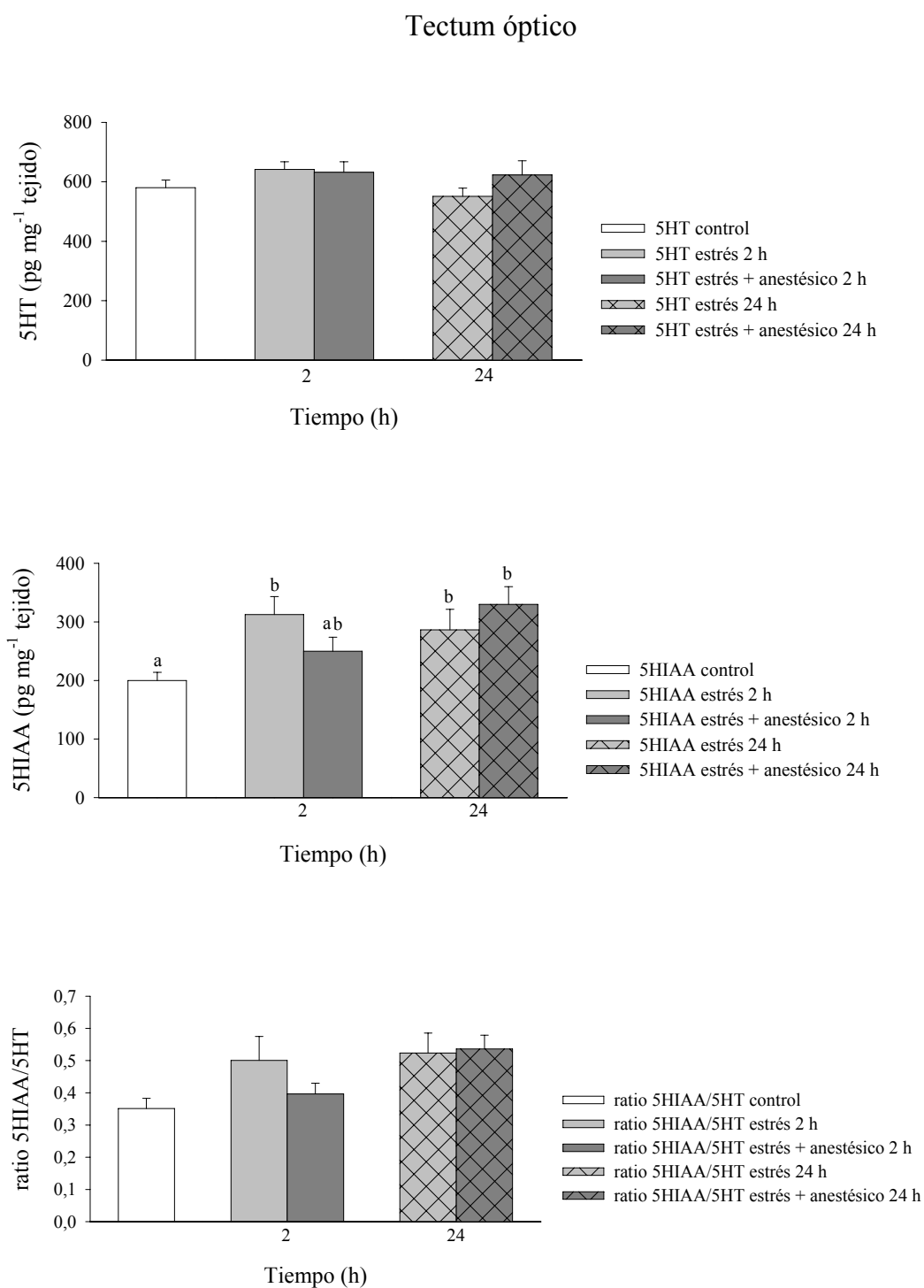


**Figura 81.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

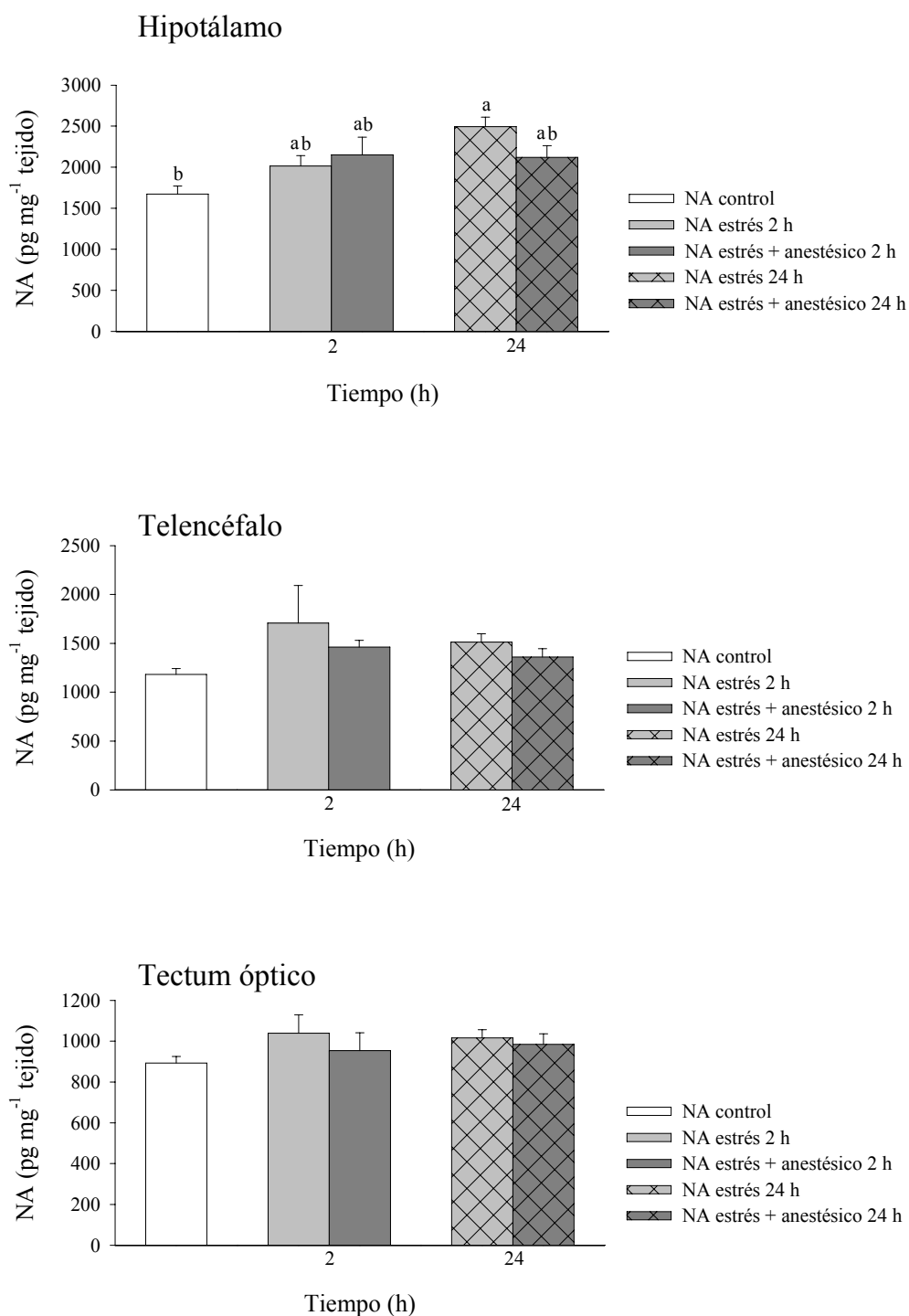
## Telencéfalo



**Figura 82.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 83.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



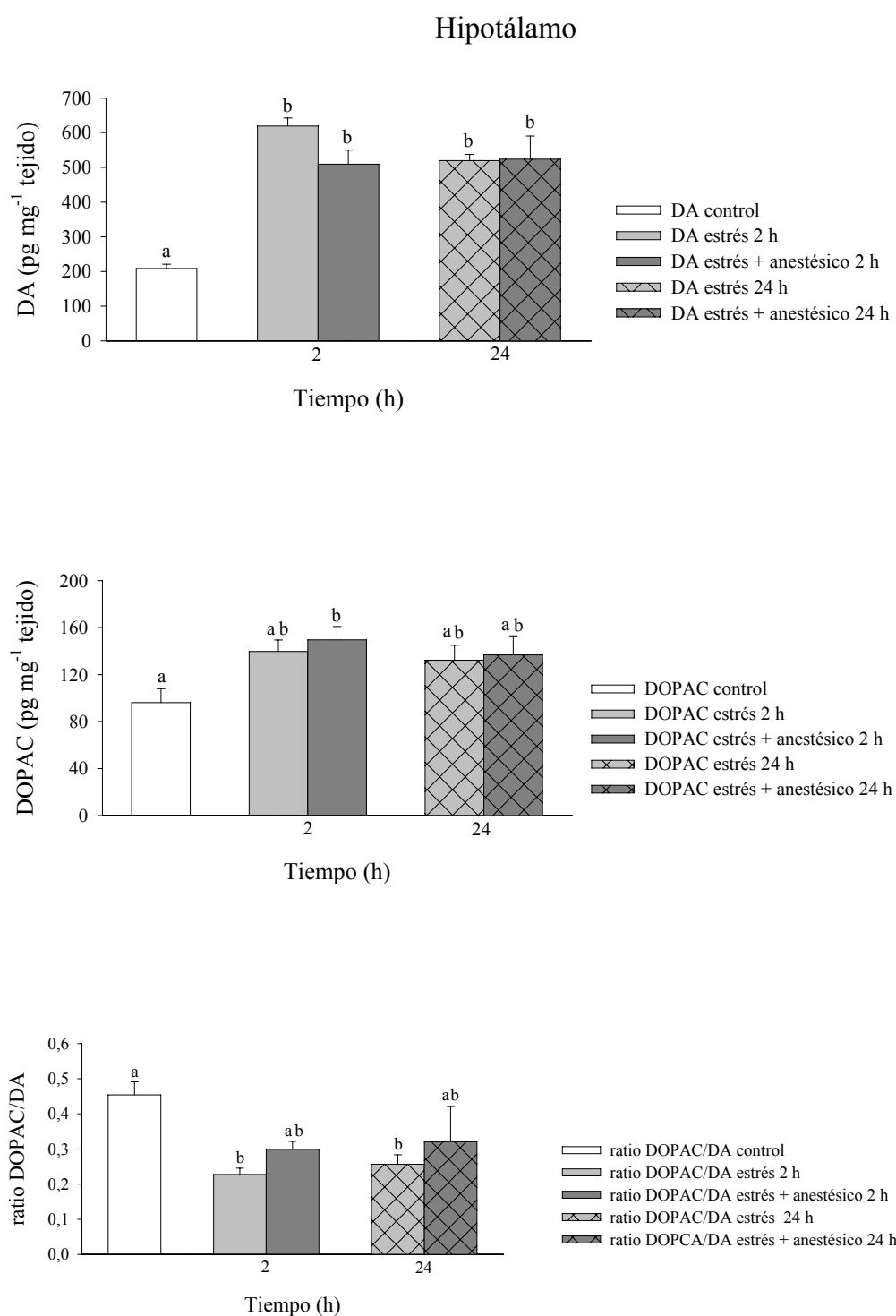
**Figura 84.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con aceite de clavo y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**MS-222**

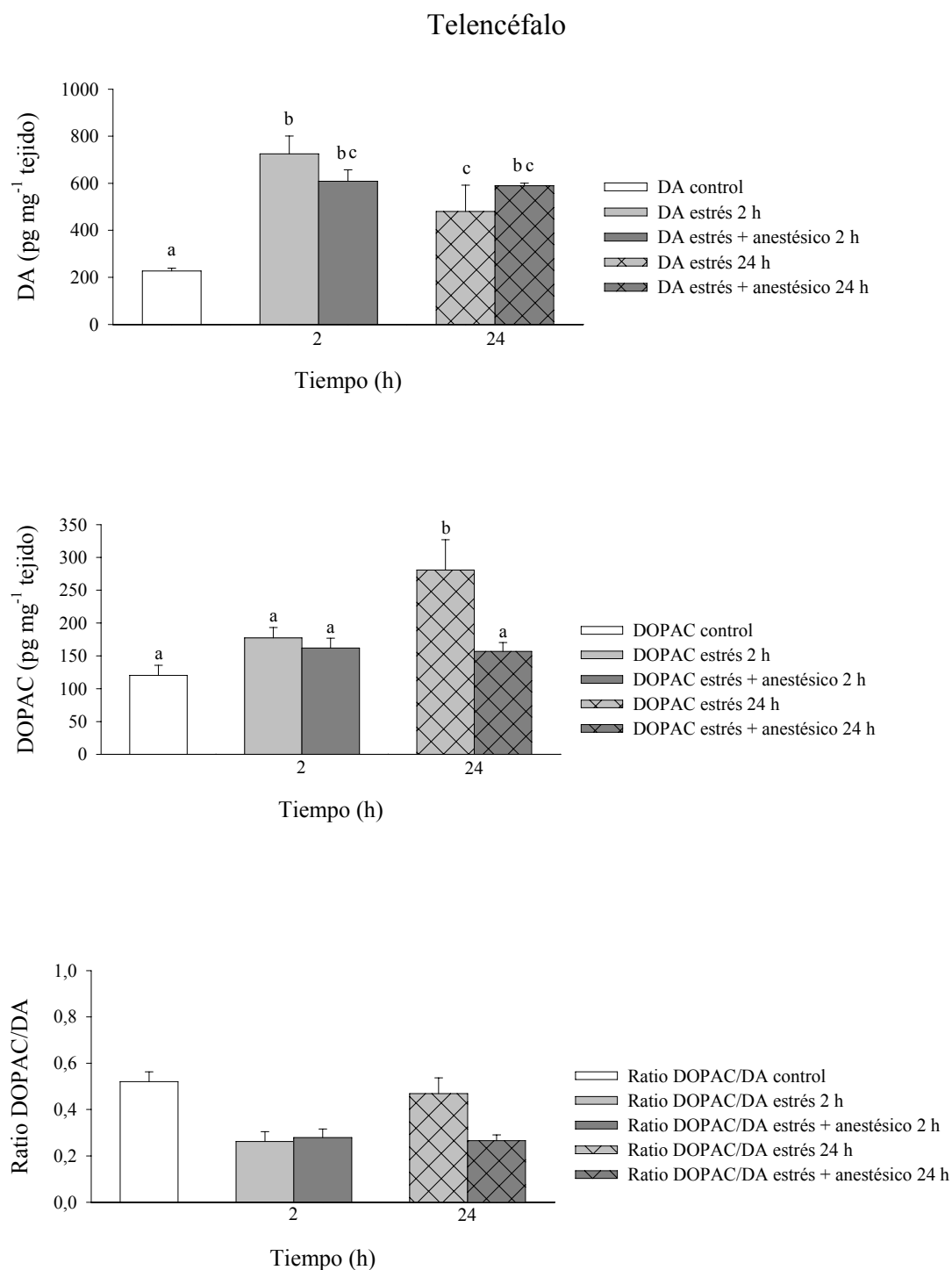
Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 85, 86, 87, 88, 89, 90 y 91. No se observaron diferencias significativas en el contenido de la NA en ninguna de las distintas regiones cerebrales estudiadas (Figura 91).

Con respecto al sistema dopaminérgico se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la DA en el hipotálamo (Figura 85), telencéfalo (Figura 86) y en el tectum óptico (Figura 87) a las 2 y 24 h después de la exposición al estrés, en los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. Igualmente, se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles del DOPAC, a las 2 h en el hipotálamo (Figura 85) de los animales estresados anestesiados, a las 24 h en el telencéfalo (Figura 86) de los animales estresados no anestesiados y a las 2 y 24 h en el tectum óptico (Figura 87) de los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. Por el contrario, se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la relación DOPAC/DA en el hipotálamo (Figura 85) a las 2 y 24 h y en el tectum óptico (Figura 87) a las 2 h después del estrés, en los animales estresados no anestesiados. En ningún caso se observaron diferencias significativas en la relación DOPAC/DA en los animales estresados anestesiados (Figuras: 85, 86, 87). En todos los casos las significaciones se realizaron frente al grupo de animales control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los estresados anestesiados no se observaron diferencias significativas en los niveles de la DA en las distintas regiones cerebrales estudiadas (Figura 85, 86, 87). Por el contrario, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los niveles del DOPAC en el telencéfalo (Figura 86) a las 24 h después del estrés. Con respecto a la relación DOPAC/DA no se observaron diferencias significativas ni en hipotálamo (Figura 85) ni en el telencéfalo (Figura 86), ni en el tectum óptico (Figura 87).

Con respecto al sistema serotoninérgico no se observaron alteraciones significativas en los niveles de la 5HT, en ninguna de las distintas regiones cerebrales estudiadas (Figuras 88, 89, 90), cuando las comparaciones se realizaron frente al grupo control. Con respecto a los niveles del 5HIAA no se observaron diferencias significativas en el grupo de los animales estresados anestesiados, aunque si ( $P < 0,05$ ) 2 h después del estrés (Figura 90) en el tectum óptico de los animales estresados no anestesiados, en ambos casos frente al grupo de animales control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a estresados anestesiados, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la 5HT y 5HIAA en ninguna de las regiones cerebrales (Figura 88, 89, 90). En el hipotálamo (Figura 88) se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la relación 5HIAA/5HT a las 24 h después del estrés, cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los estresados anestesiados.

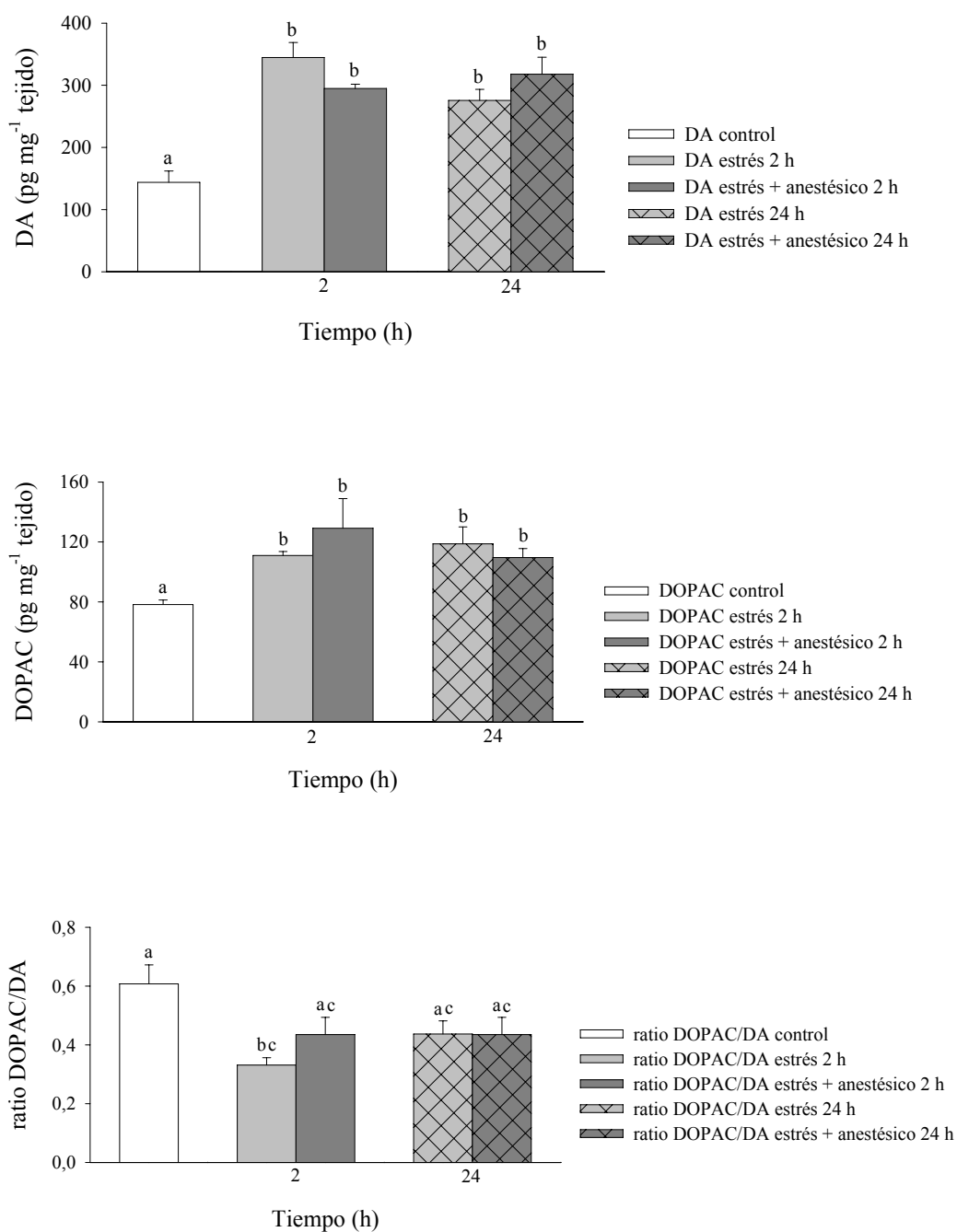


**Figura 85.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de langosta, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



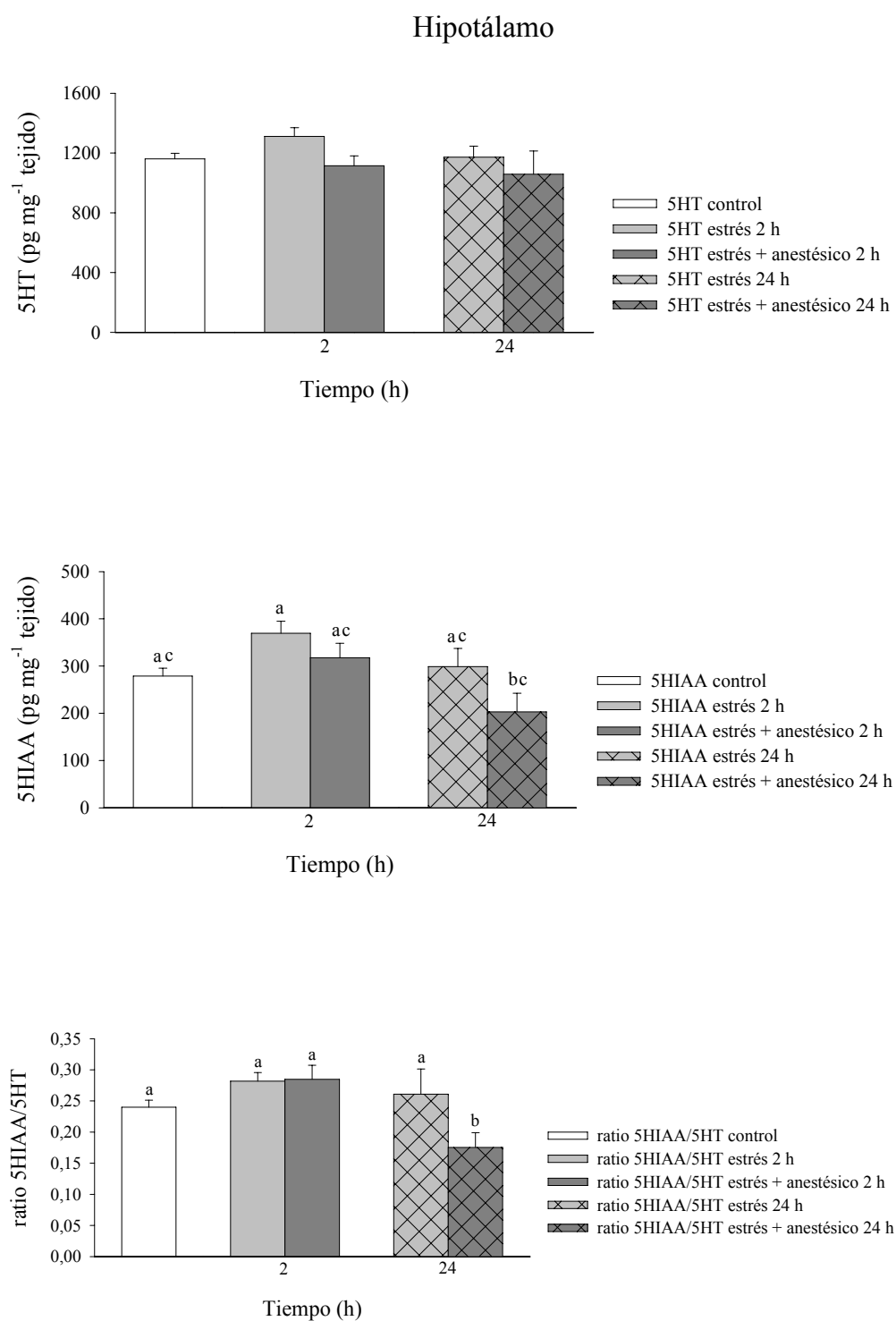
**Figura 86.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico

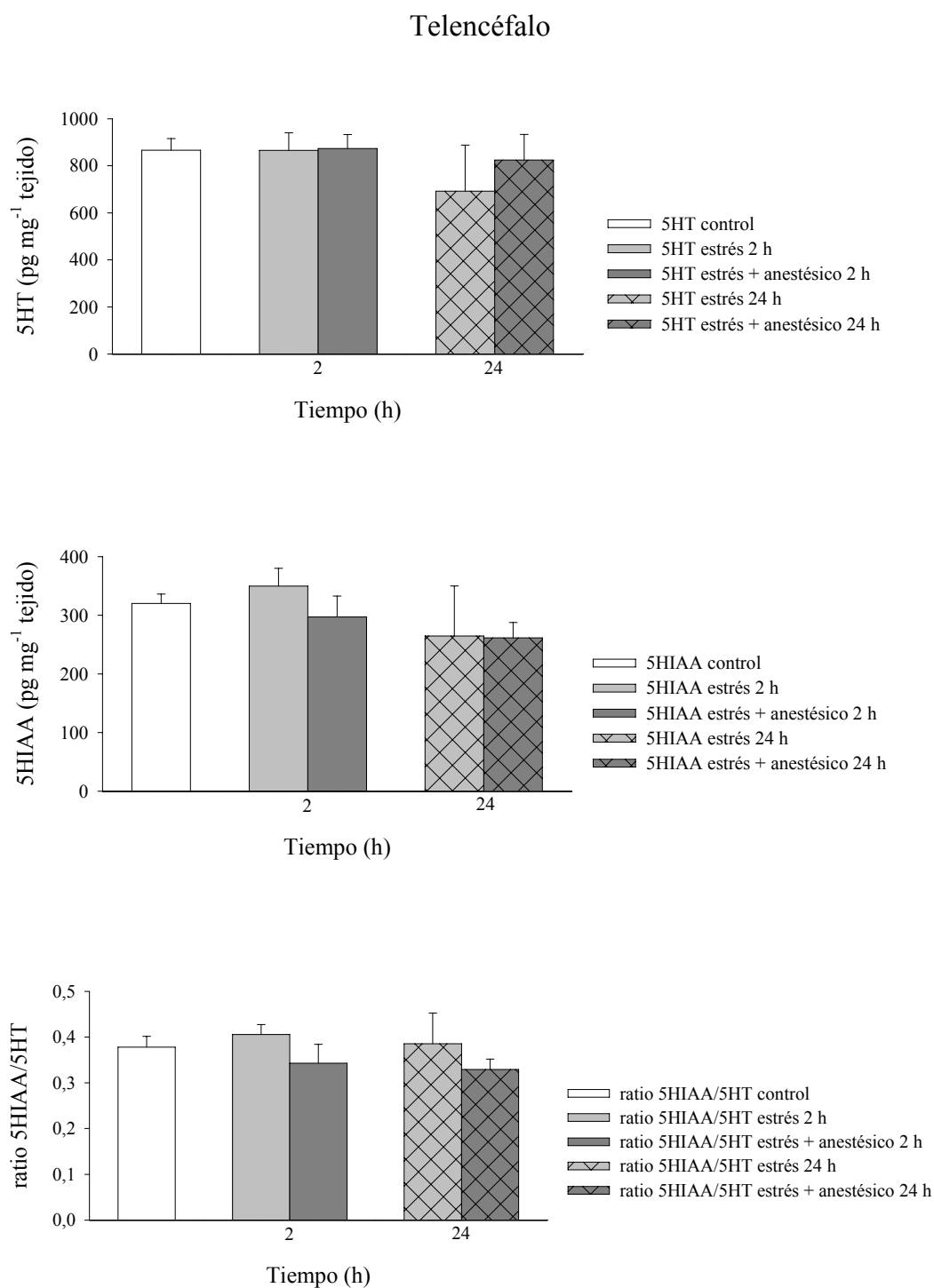


**Figura 87.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



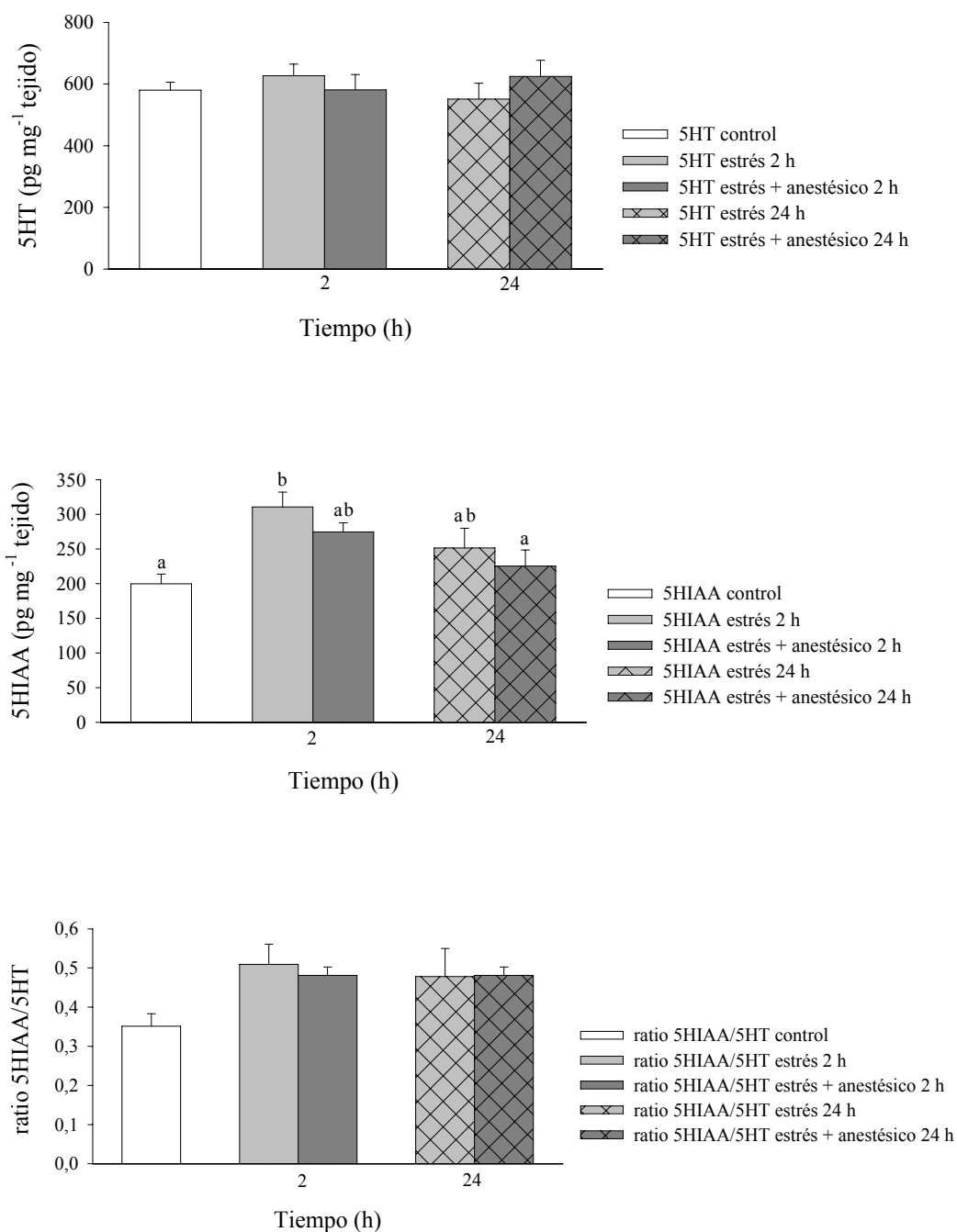


**Figura 88.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

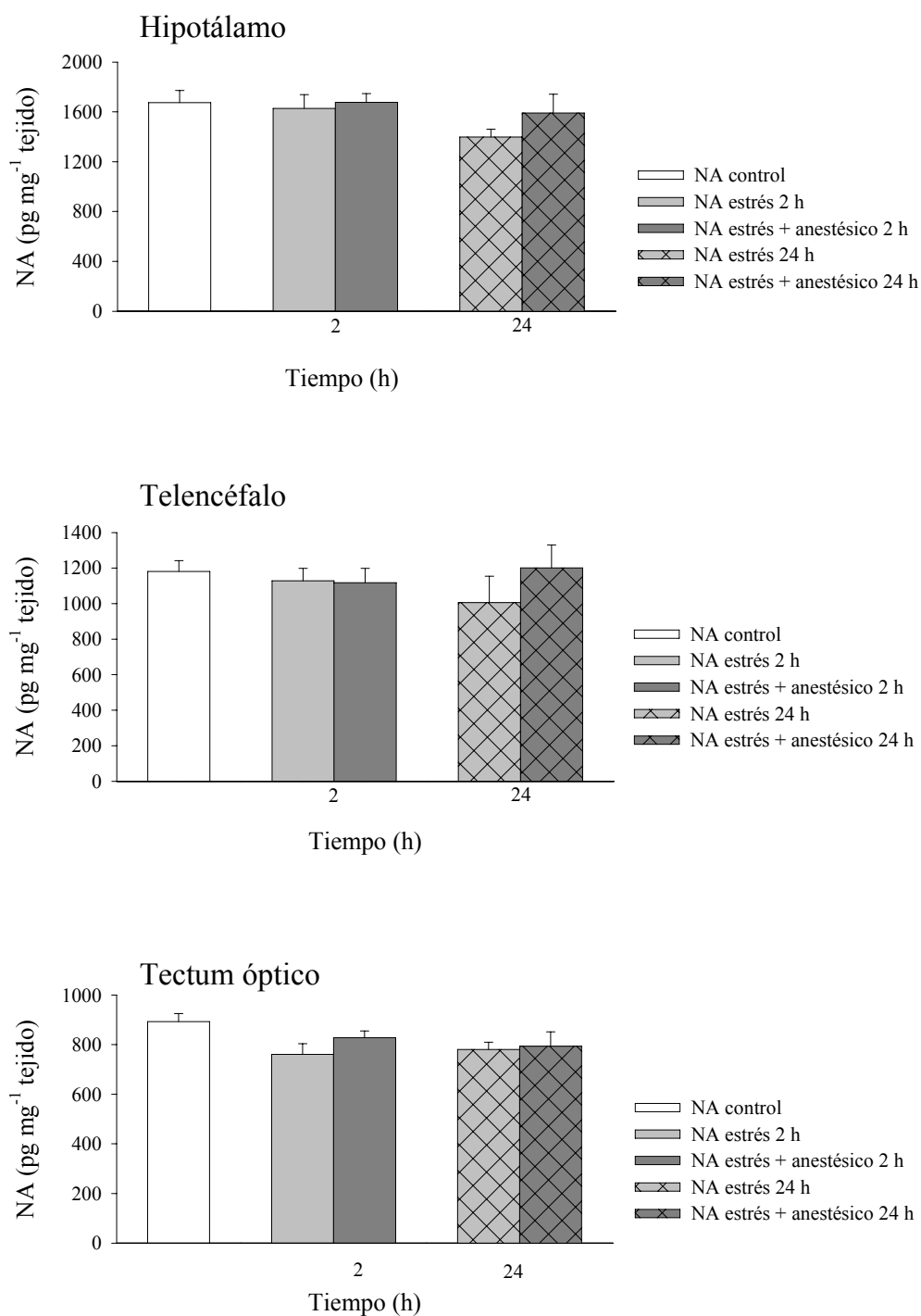


**Figura 89.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



**Figura 90.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 91.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con MS-222 y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Metomidato

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 92, 93, 94, 95, 96, 97 y 98.

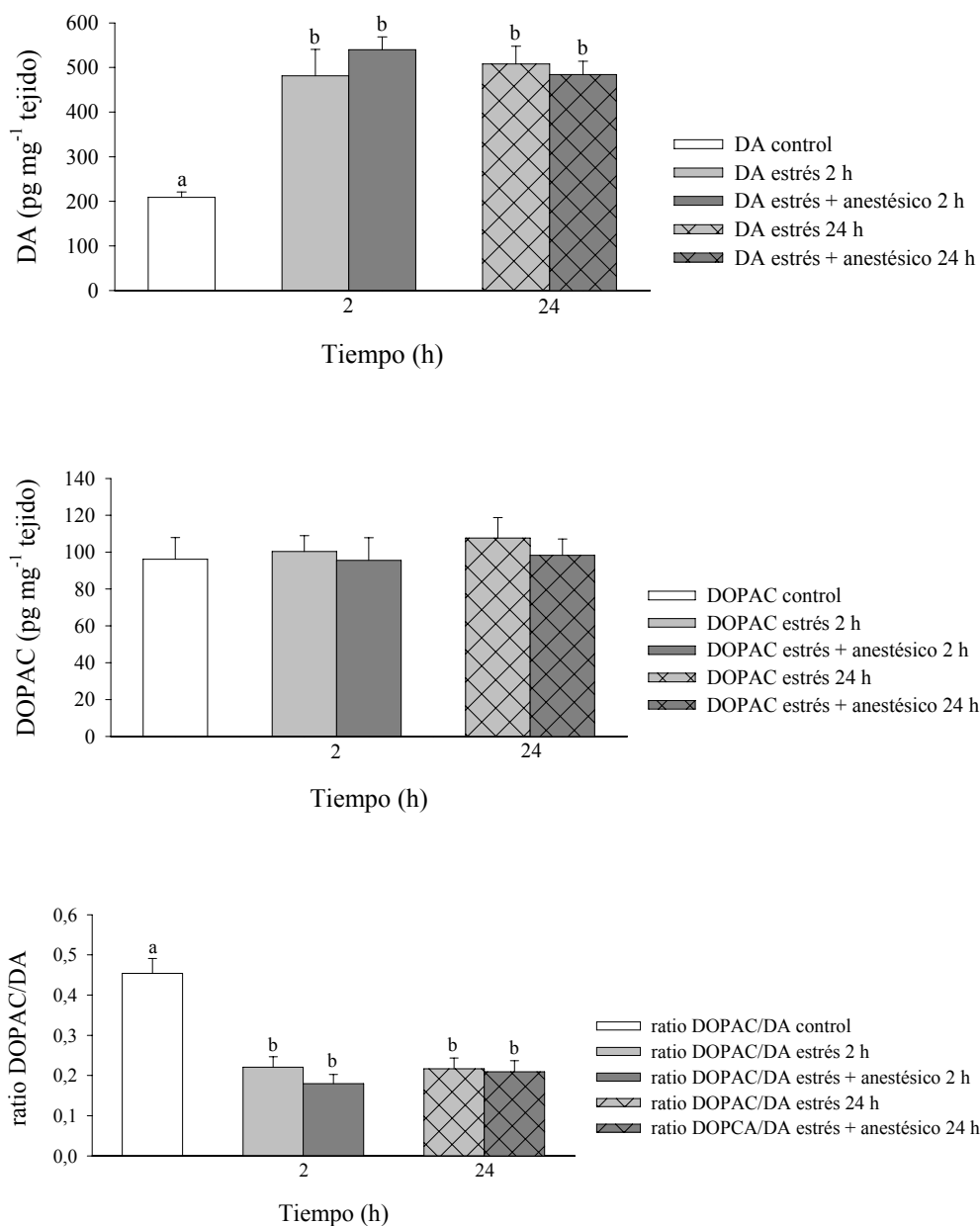
Con respecto al sistema noradrenérgico, en los animales estresados no anestesiados y en los estresados anestesiados cuando las comparaciones se realizaron frente al grupo control, se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la NA, a las 2 y 24 h después del estrés en el hipotálamo (Figura 98) y a las 24 h en el telencéfalo (Figura 98). Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a estresados anestesiados no se observaron diferencias significativas en las distintas regiones cerebrales (Figura 98).

Con respecto al sistema dopaminérgico se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la DA a las 2 y 24 h después del estrés en el hipotálamo (Figura 92), telencéfalo (Figura 93) y en el tectum óptico (Figura 94) de los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles del DOPAC en las distintas regiones cerebrales estudiadas (Figuras 92, 93, 94) de ambos grupos. Sin embargo, tanto a las 2 h como a las 24 h se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la relación DOPAC/DA en el hipotálamo (Figura 92), telencéfalo (Figura 93) y en el tectum óptico (Figura 94) de los animales estresados no anestesiados y estresados anestesiados. En todos los casos las significaciones son frente al grupo control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a estresados anestesiados no se observaron diferencias significativas en los niveles de la DA, DOPAC ni en la relación DOPAC/DA en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (Figuras 92,93, 94).

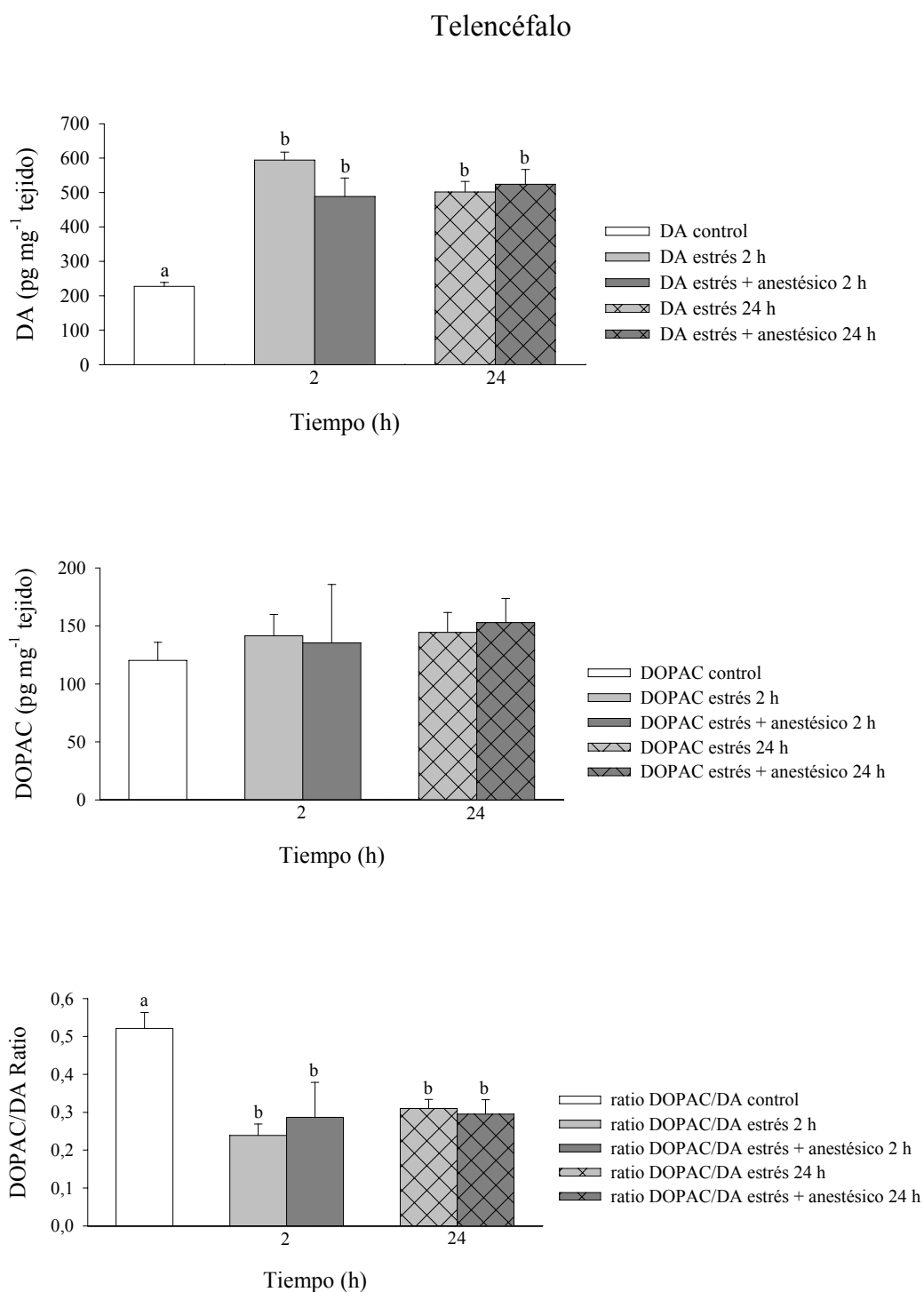
Con respecto al sistema serotoninérgico no se observaron alteraciones significativas en los niveles de la 5HT en las distintas regiones cerebrales estudiadas (Figuras 95, 96, 97). Por el contrario, en el tectum óptico (Figura 97) se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en los niveles del 5HIAA 2 h después del estrés en los animales estresados no anestesiados y a las 24 h en ambos grupos (Figura 97). Igualmente, la relación 5HIAA/5HT también se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) a las 2 y 24 h después del estrés en el hipotálamo (Figura 95) de los animales estresados no anestesiados y en el tectum óptico (Figura 97) a las 2 y 24 h en el grupo de animales estresados no anestesiados, y a las 24 h en el grupo de animales estresados anestesiados. En todos los casos las comparaciones se realizaron frente al grupo de animales control. Cuando se compararon los animales estresados no anestesiados frente a los estresados anestesiados, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la 5HT y en la relación 5HIAA/5HT en las distintas regiones estudiadas (Figuras 95, 96, 97). Sin embargo, si se observaron diferencias significativas ( $P <$

0,05) en los niveles del 5HIAA en el tectum óptico (Figura 97) 2 h después del estrés, cuando se compararon ambos grupos.

### Hipotálamo

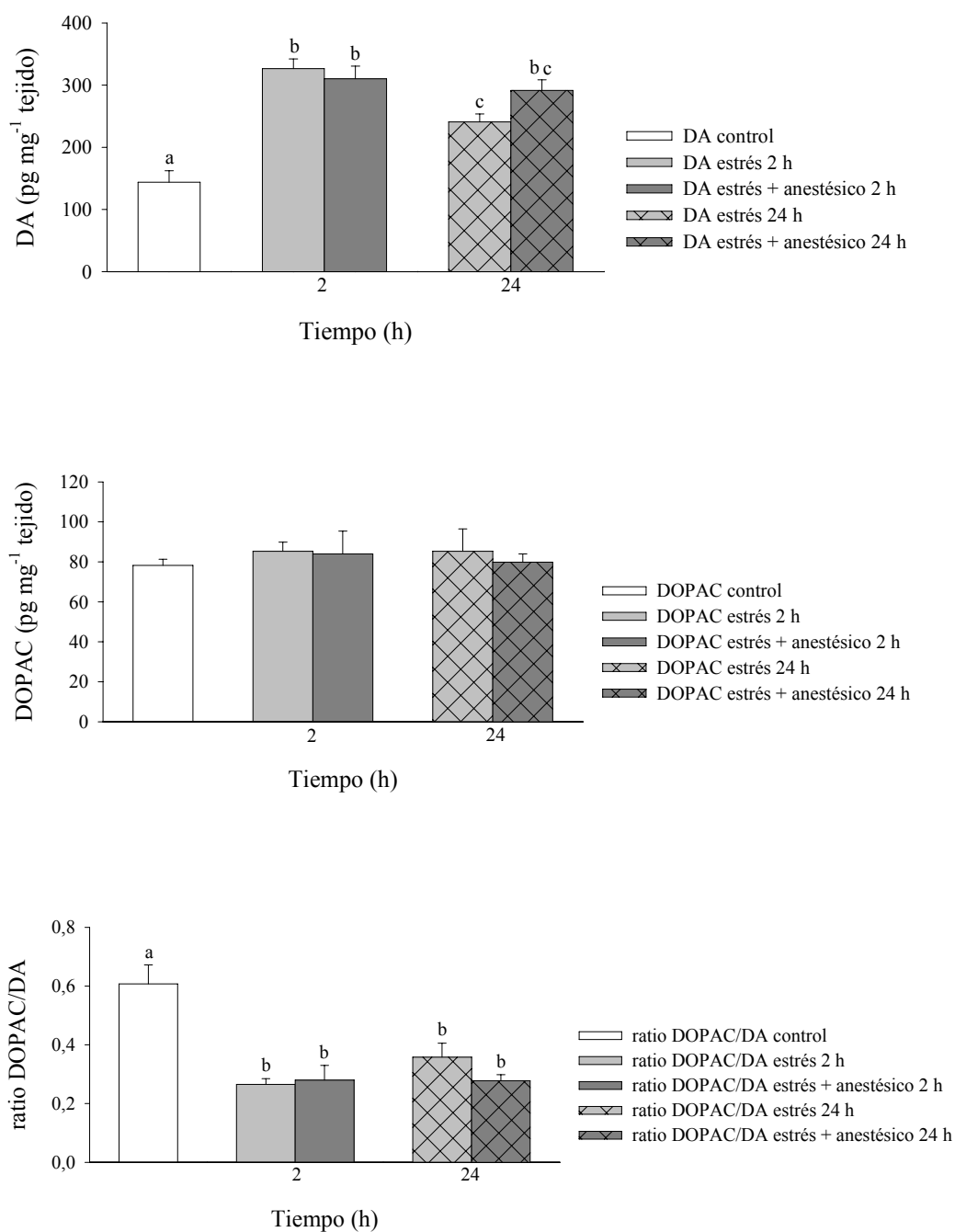


**Figura 92.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



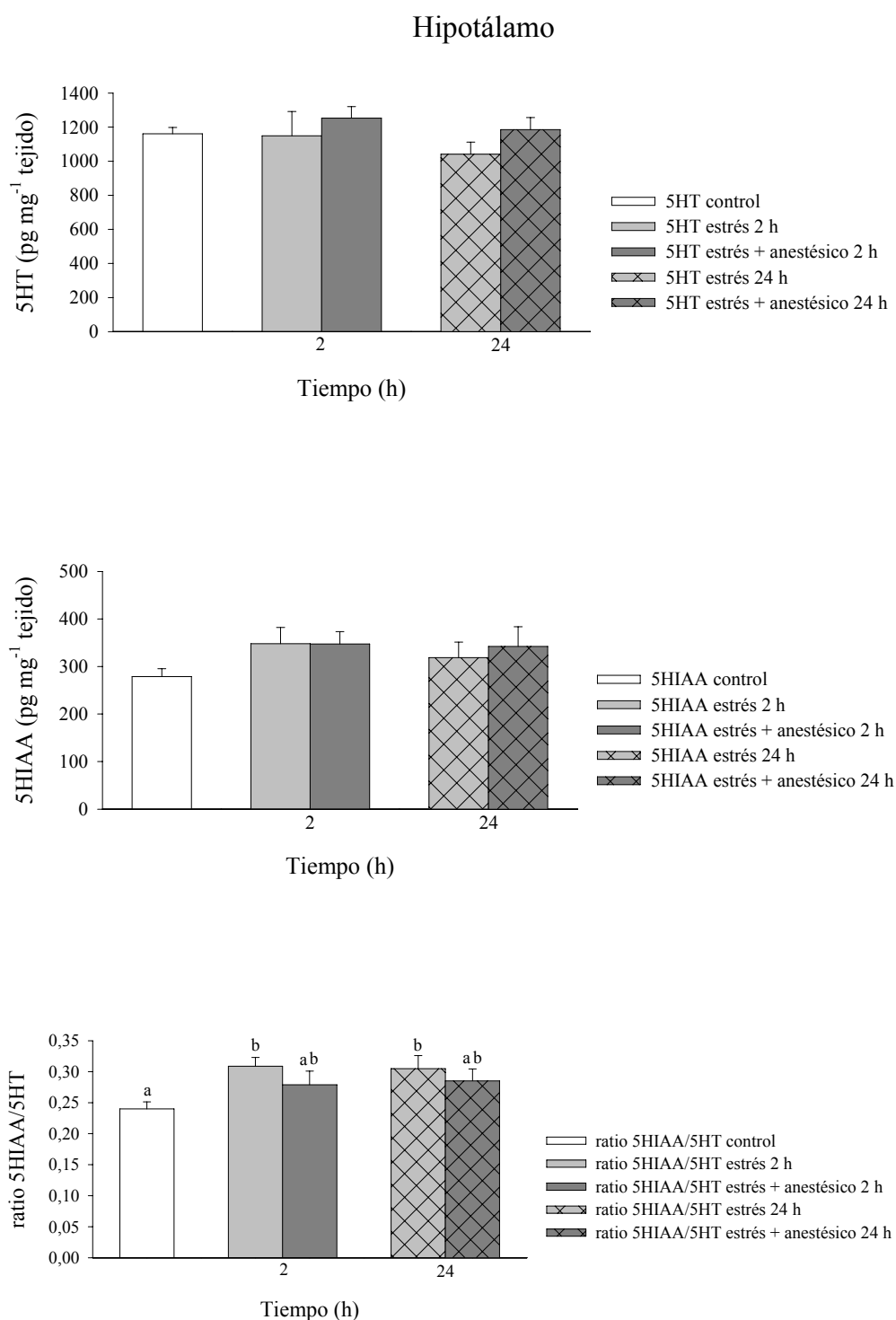
**Figura 93.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



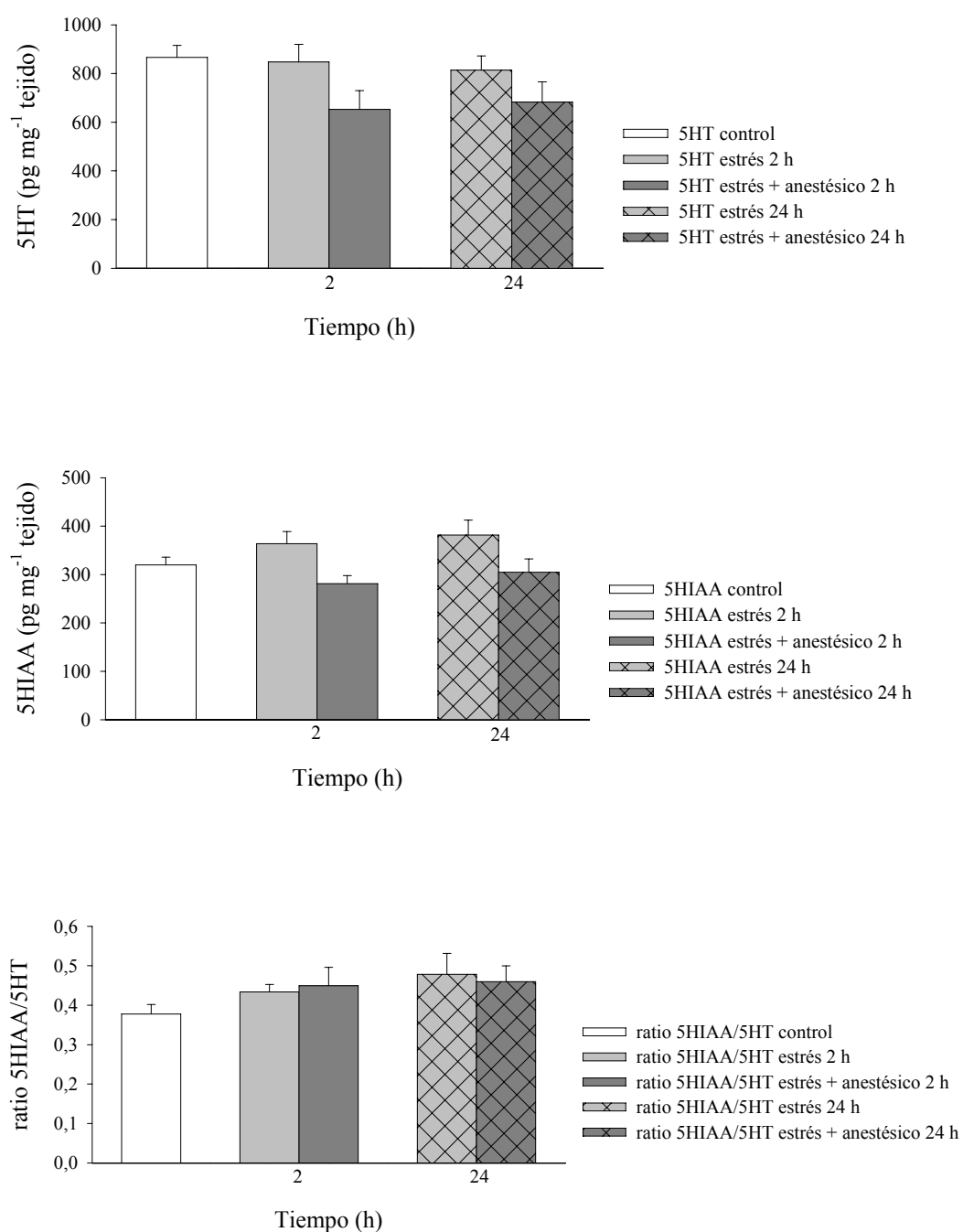
**Figura 94.** Niveles de DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de langostina, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).





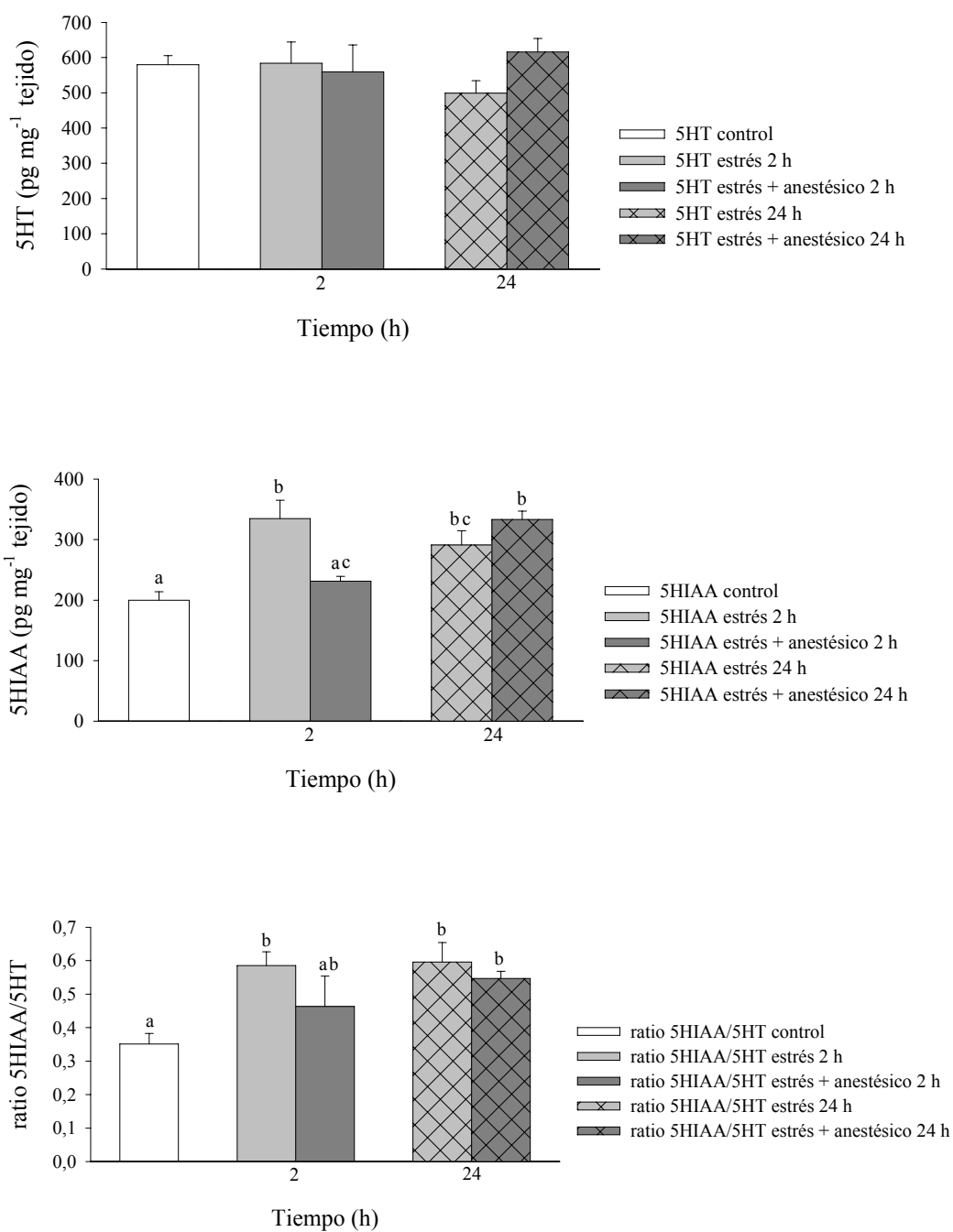
**Figura 95.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Telencéfalo

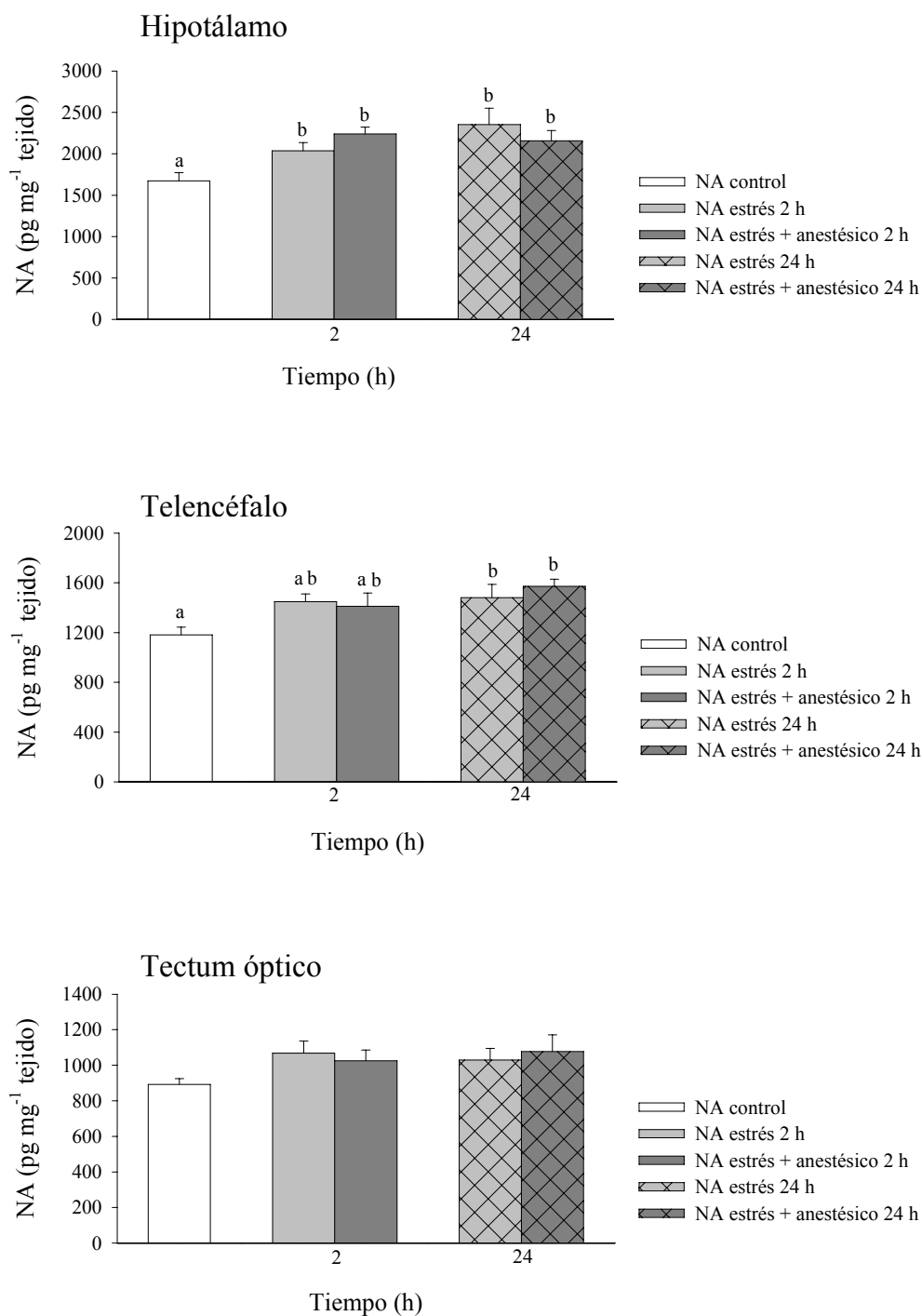


**Figura 96.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



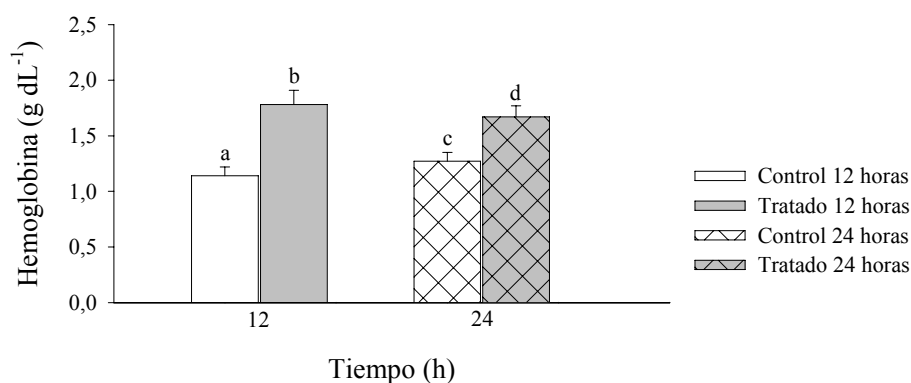
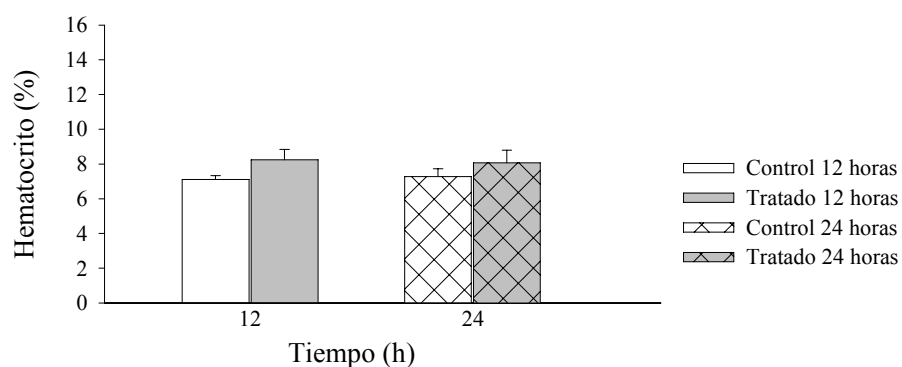
**Figura 97.** Niveles de 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

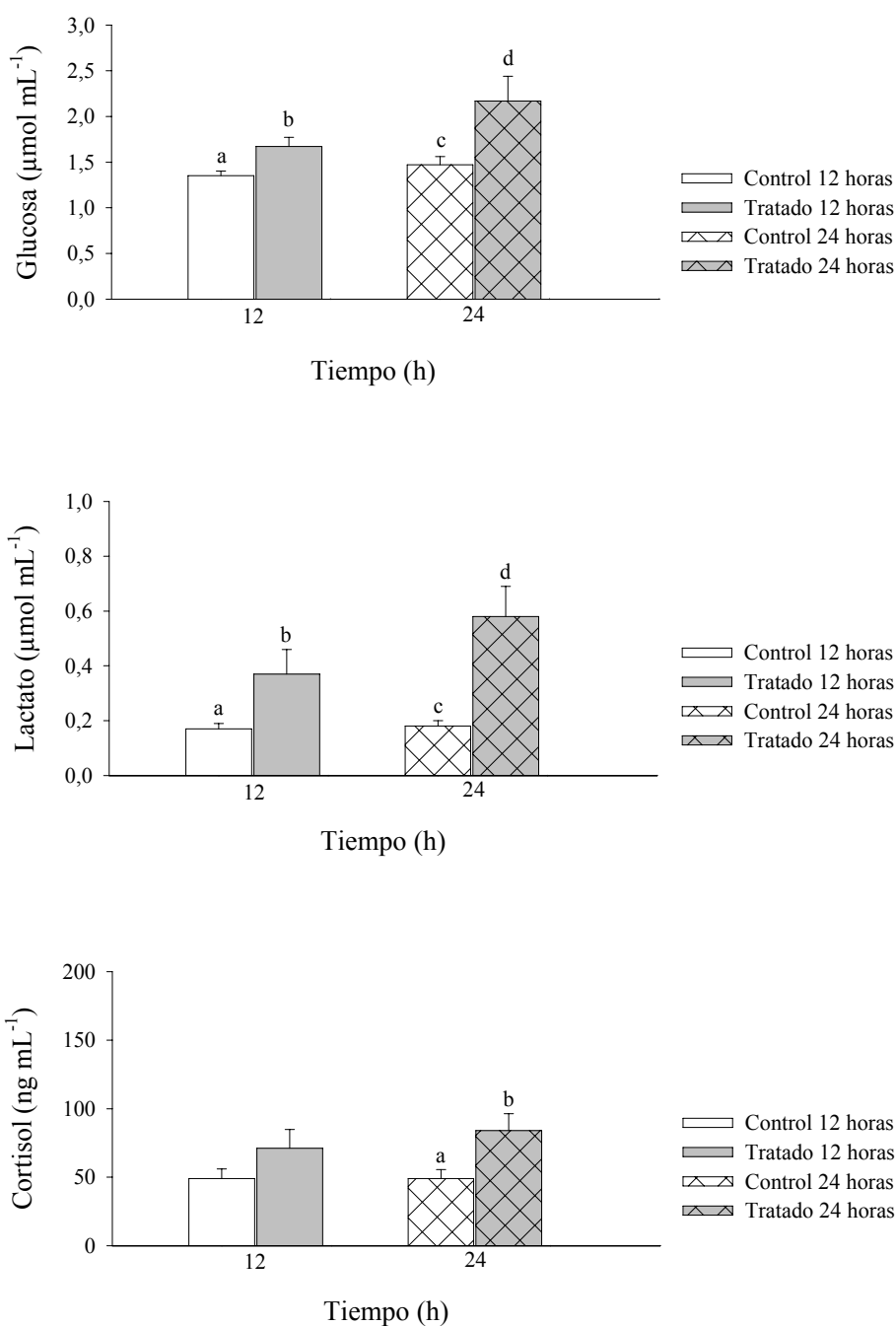


**Figura 98.** Niveles de NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de lenguado, tras un estrés agudo (persecución 3 min) en animales anestesiados con metomidato y no anestesiados. Los animales fueron sacrificados a las 2 y 24 horas después de la exposición al estrés. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 6-9 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### 5.9. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL AMONIACO SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, PLASMÁTICOS, Y SOBRE LOS NIVELES DE LOS NEUROTRANSMISORES CEREBRALES EN JUVENILES DE *Solea senegalensis*

Los datos correspondientes a los niveles del hematocrito, hemoglobina, glucosa, lactato y cortisol se muestran en la Figura 99. Se observó que la exposición al amoniaco durante 12 y 24 h incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) los niveles de la hemoglobina, glucosa, lactato y no afectó a los del hematocrito. Los niveles del cortisol solo se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en el tratamiento de 24 h.





▲  
◀ **Figura 99.** Efecto de la exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), en el lenguado *Solea senegalensis* durante 12 y 24 h, sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, lactato, cortisol) y sanguíneos (hematocrito, hemoglobina). Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Los datos correspondientes a las concentraciones de los diferentes neurotransmisores monoaminérgicos de las distintas regiones cerebrales se muestran en las Figuras: 100, 101, 102, 103, 104, 105 y 106.

Con respecto al sistema noradrenérgico se observaron disminuciones significativas ( $P < 0,05$ ) frente a su respectivo grupo control, en los niveles de la NA hipotalámica (Figura 106) después de una exposición de 12 h al amoniaco.

Con respecto al sistema dopaminérgico se observaron disminuciones significativas ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la DA, en el hipotálamo (Figura 100) en los tratamientos de 12 y 24 h, y en el telencéfalo (Figura 101) y tectum óptico (Figura 102) en el tratamiento de 12 h. Por el contrario, en ninguna de las regiones cerebrales se observaron diferencias significativas en los niveles del DOPAC (Figuras: 100, 101, 102). Sin embargo, si se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en la relación DOPAC/DA, en el tectum óptico (Figura 102) con el tratamiento de 12 h y en el hipotálamo (Figura 100) con el tratamiento de 24 h. En todos los casos las significaciones se realizaron frente a sus correspondientes grupos control.

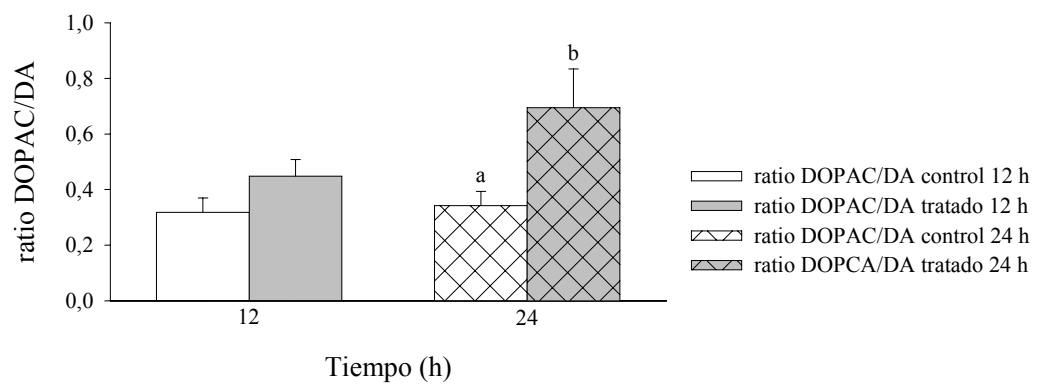
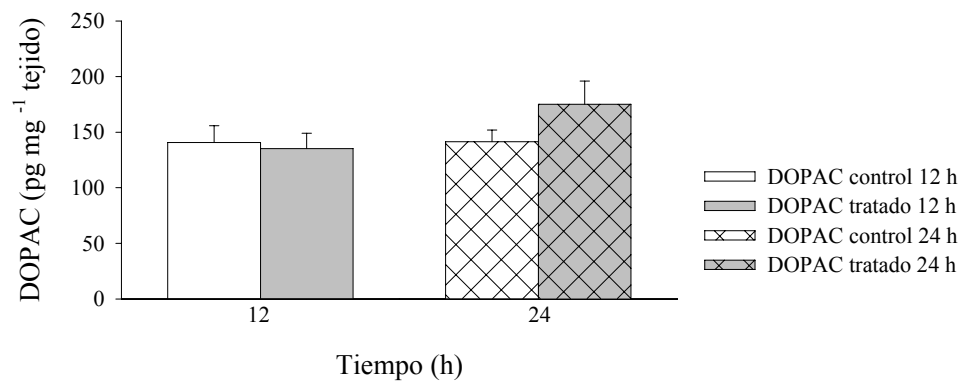
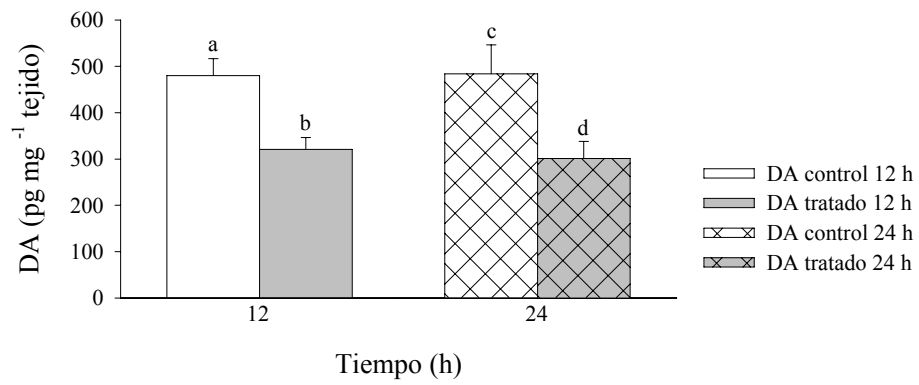
Con respecto al sistema serotoninérgico, con los tratamientos de 12 y 24 h se observaron disminuciones significativas ( $P < 0,05$ ) en los niveles de la 5HT en el hipotálamo (Figura 103) y en el tectum óptico (Figura 105), y con el de 12 h en el telencéfalo (Figura 104). Por el contrario, no se observaron modificaciones significativas en los niveles del 5HIAA en ninguna de las regiones cerebrales (Figuras 103, 104, 105). Sin embargo, si se observaron incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) en la relación 5HIAA/5HT, en el tectum óptico (Figura 105) y en el telencéfalo (Figura 104) con los tratamientos de 12 y de 24 h, y en el hipotálamo (Figura 103) con el tratamiento de 24 h. En todos los casos las significaciones se realizaron frente a sus correspondientes grupos control.

---

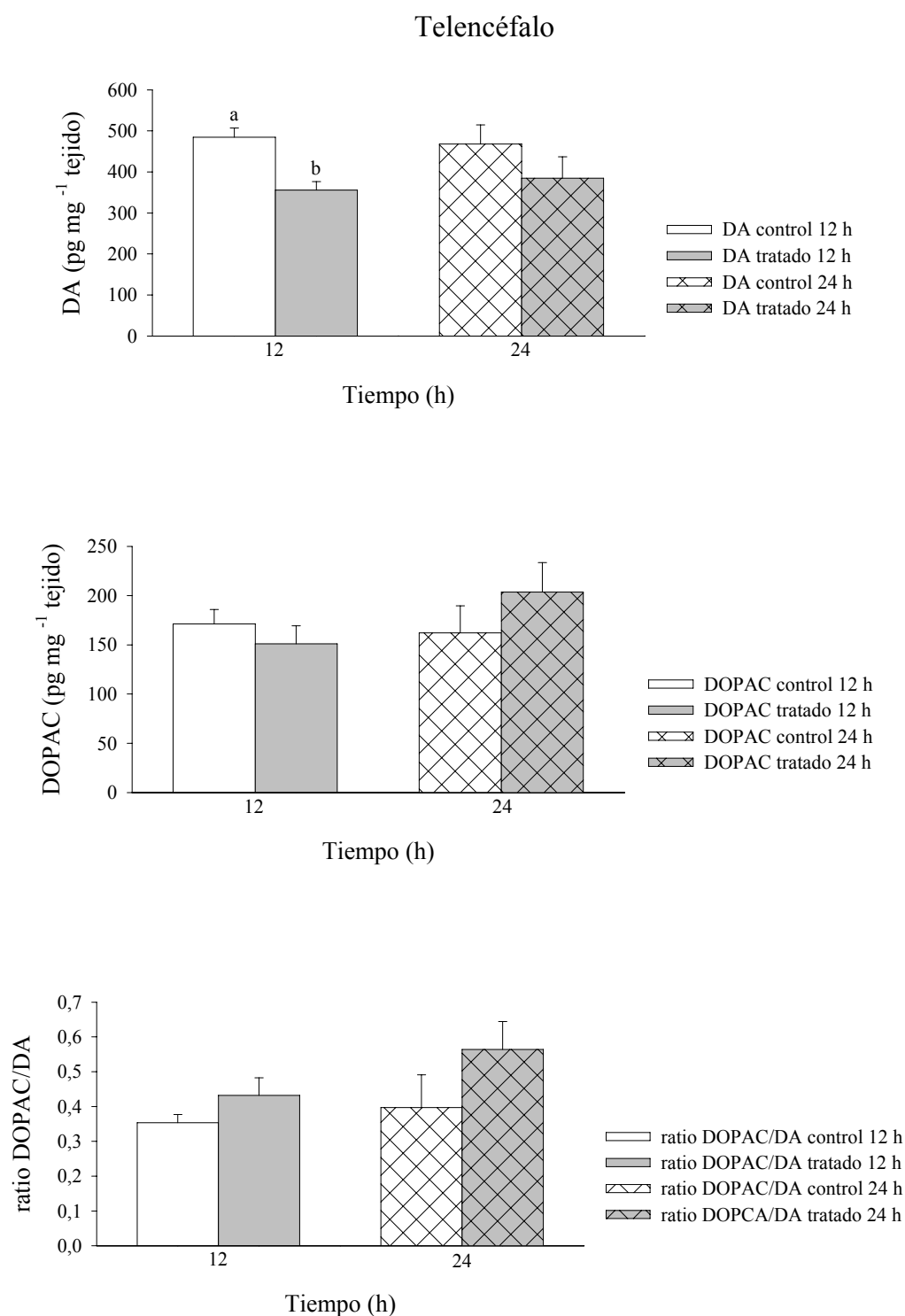
▶

**Figura 100.** Niveles de la DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoniaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Hipotálamo

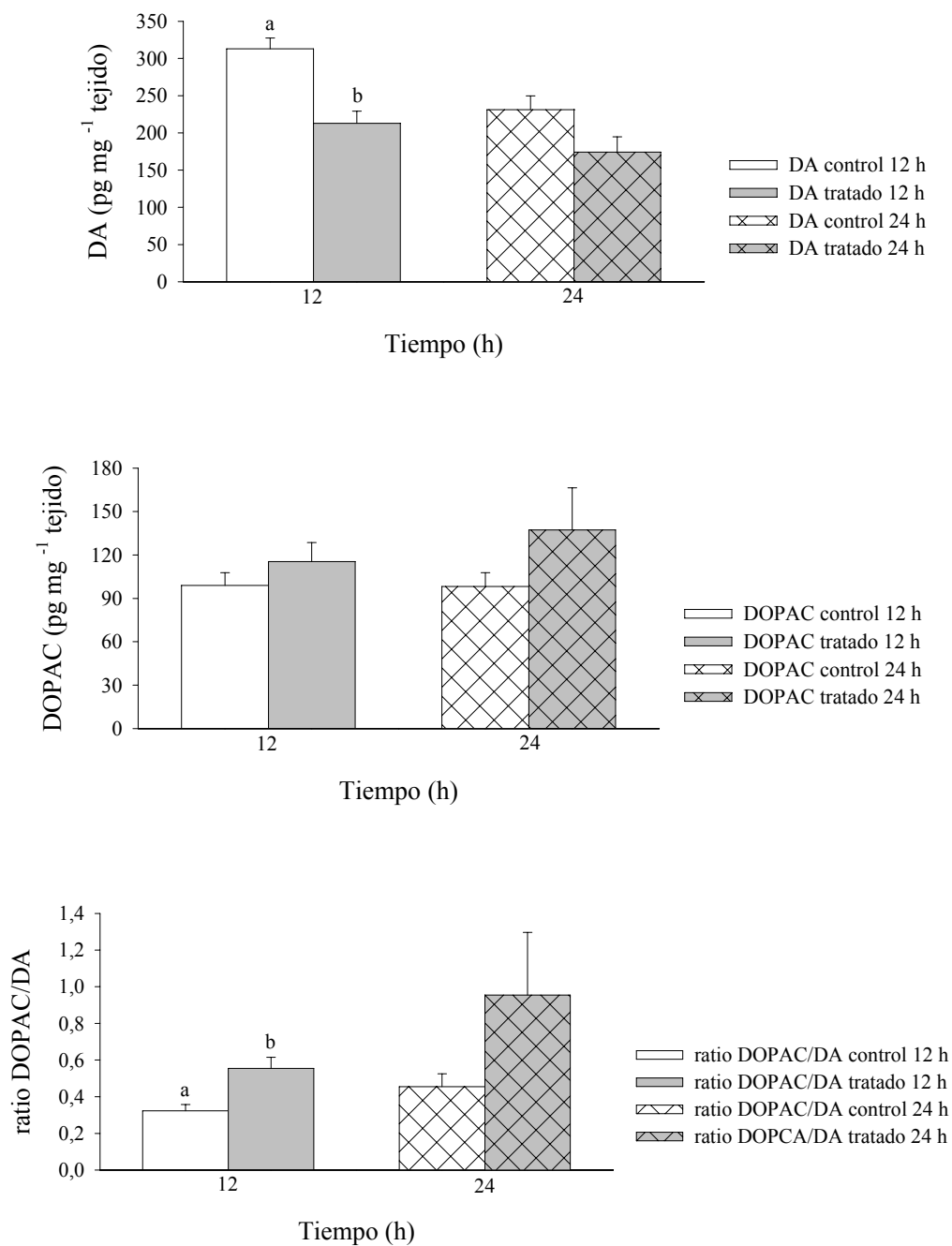






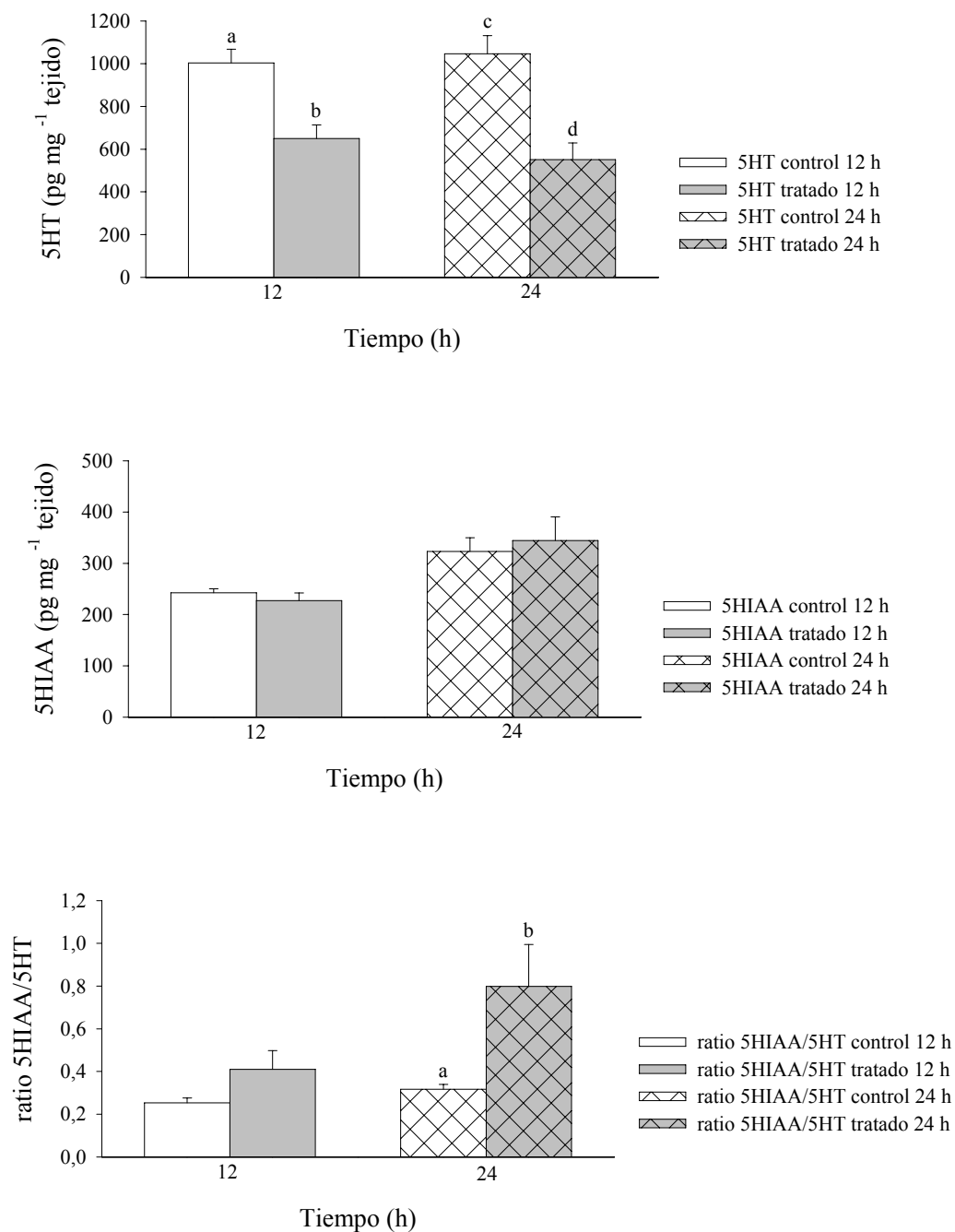
**Figura 101.** Niveles de la DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



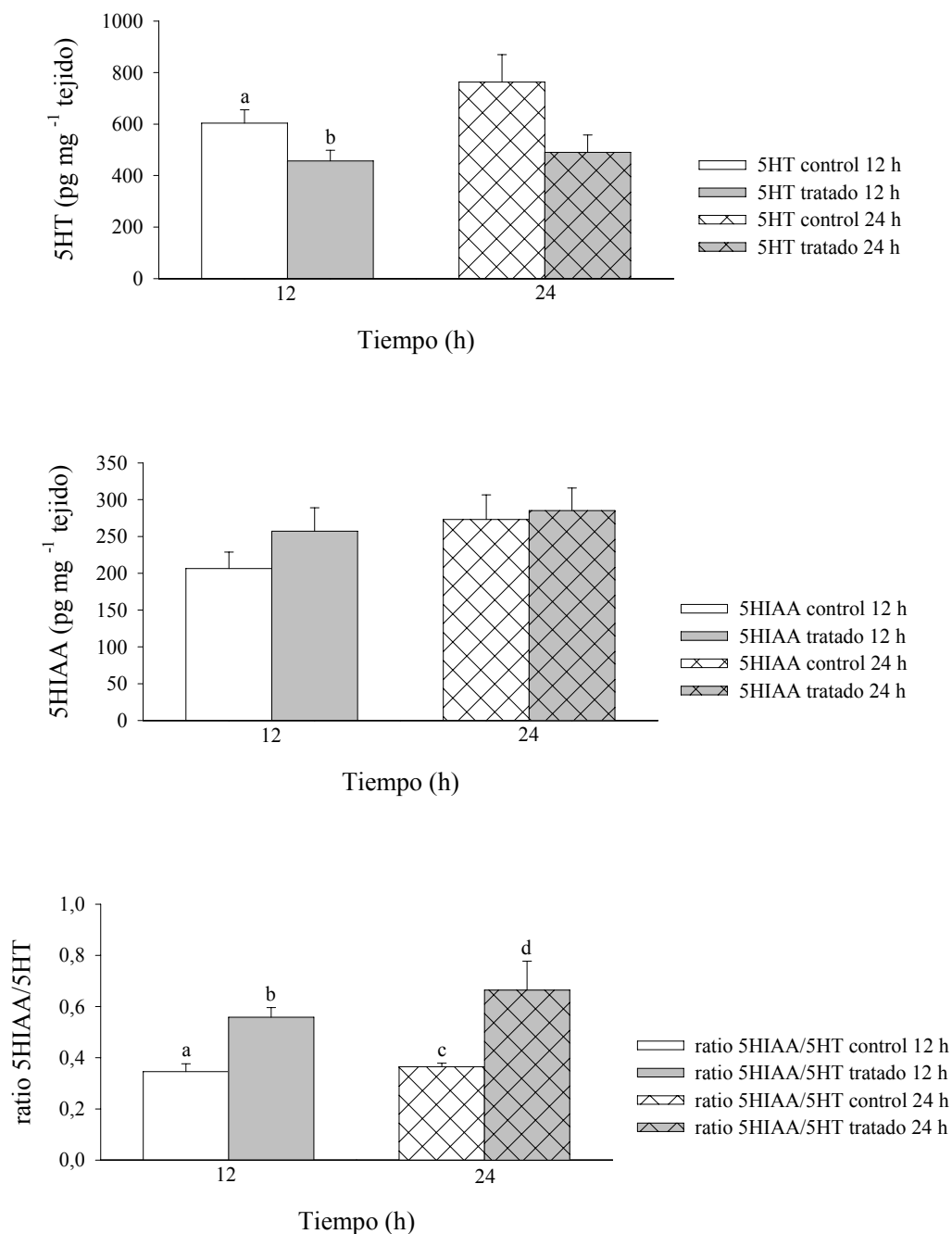
**Figura 102.** Niveles de la DA, DOPAC y relación DOPAC/DA en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Hipotálamo



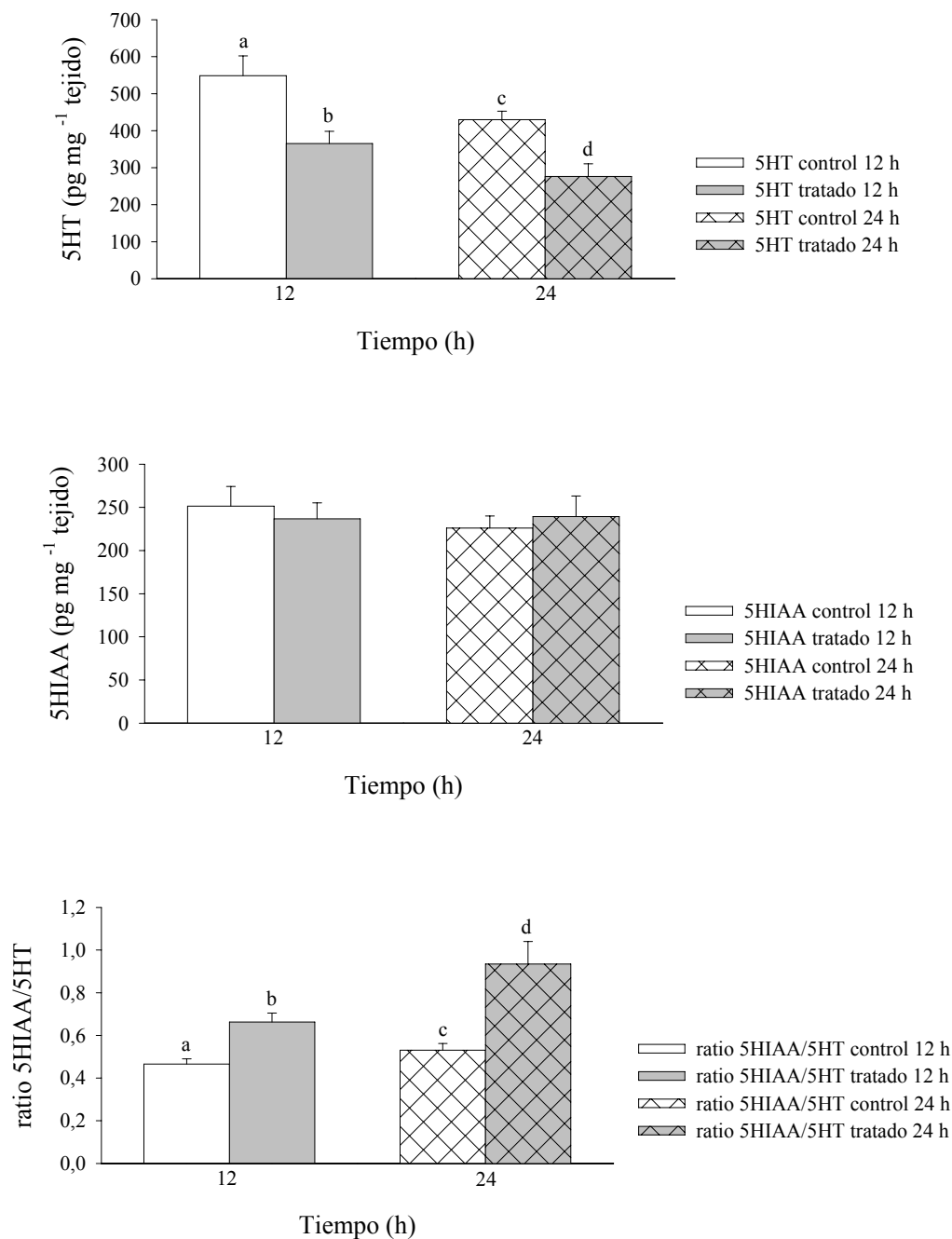
**Figura 103.** Niveles de la 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el hipotálamo de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Telencéfalo

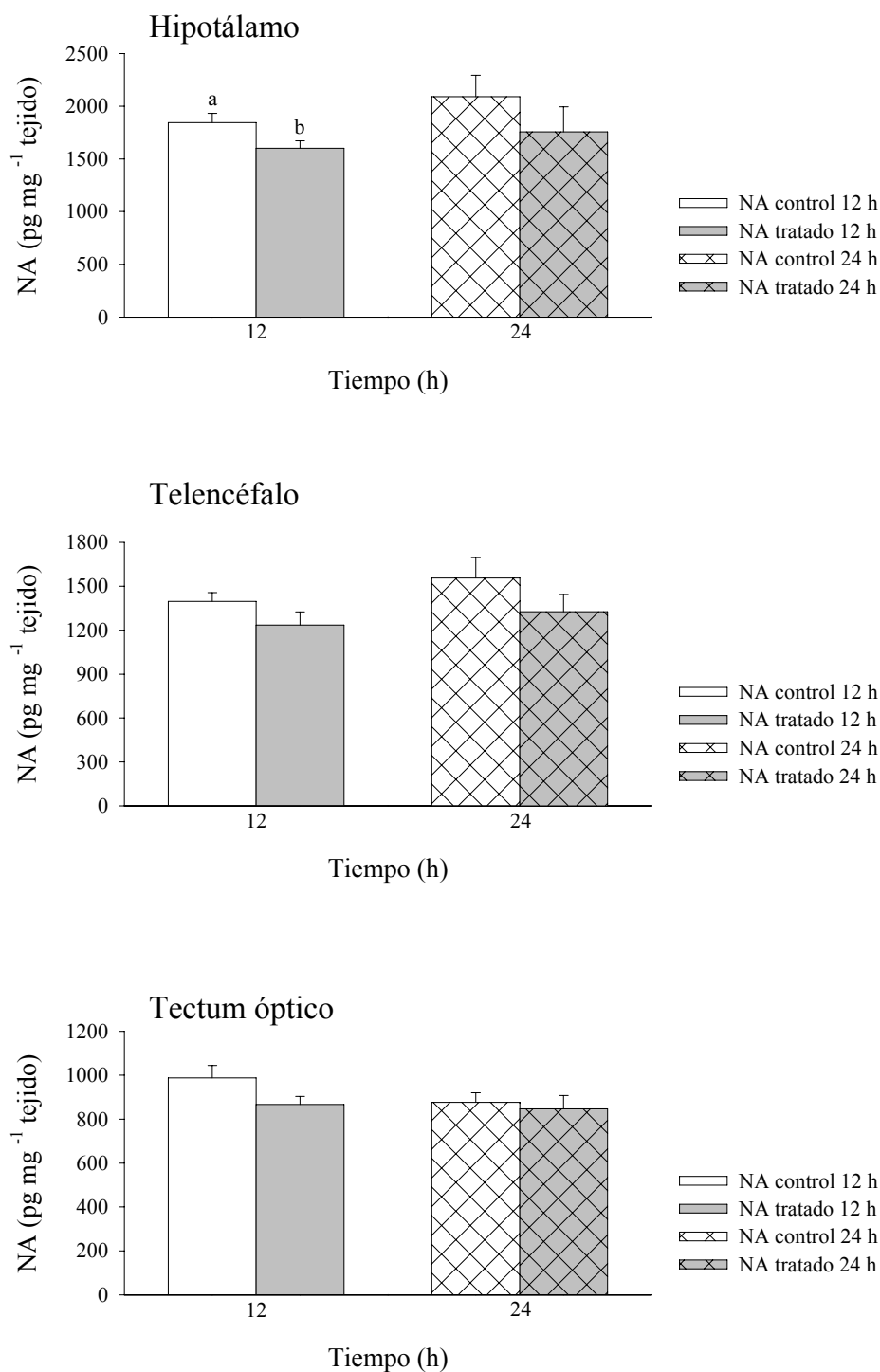


**Figura 104.** Niveles de la 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el telencéfalo de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Tectum óptico



**Figura 105.** Niveles de la 5HT, 5HIAA y relación 5HIAA/5HT en el tectum óptico de juveniles de lenguado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 106.** Niveles de la NA en distintas regiones cerebrales (hipotálamo, telencéfalo, tectum óptico) de juveniles de langostado, tras una exposición al amoníaco ( $64,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 12 y 24 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de 12 peces. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).



## 6. Discusión





## **Caracterización de los estadios de anestesia, inducción y recuperación, en el lenguado**

En este trabajo se estudió por primera vez en un pez plano (*Solea senegalensis*): i) la caracterización de los diferentes estadios de la anestesia (inducción y recuperación) y ii) los tiempos de inducción y de recuperación, asociados al uso de diferentes anestésicos de amplio uso en acuicultura.

Para el desarrollo de esta parte del trabajo se siguieron las pautas indicadas por Hikasa et al. (1986), Iwama et al. (1989) y Summerfelt y Smith (1990), para peces no planos. Una vez superadas las dificultades para evaluar el estado de equilibrio en el lenguado, se comprobó que las características propias que definen cada uno de los diferentes estadios de anestesia, inducción y recuperación, son aparentemente similares a los indicados previamente por dichos autores.

Por razones prácticas y de un modo similar a lo indicado por Iwama et al. (1989), consideramos más útil definir sólo tres etapas de inducción y tres de recuperación. En esta línea definimos el estadio II de anestesia como aquel en el cual el animal presenta una pérdida total del equilibrio y del tono muscular, una baja frecuencia de movimientos operculares y unos reflejos espinales fuertemente atenuados (Tabla 1). Estas características son comparables a las del estadio II definido por Iwama et al. (1989), a las del IV/V definido por Summerfelt y Smith (1990) y a las del estadio IV definido por Hikasa et al. (1986). Con respecto a los estadios de recuperación (Tabla 1), el estadio II de recuperación es el equivalente al III / IV definido por Hikasa et al. (1986) y al II / III definido por Iwama et al. (1989).

A partir de este momento, en el trabajo siempre se utilizará como referencia el estadio II de anestesia, porque comprobamos que es suficiente para realizar la mayoría de las tareas de rutina propias de la acuicultura, aunque en la mayoría de los casos no permitió realizar manipulaciones más invasivas como puede ser una extracción de sangre (ver más adelante).

### **Eficacia anestésica**

Se sabe que las respuestas para un mismo anestésico pueden diferir ampliamente entre especies, por lo que la caracterización de la dosis eficaz para los diferentes anestésicos en una especie determinada es una tarea muy recomendable (King et al., 2005).

En este trabajo se utilizaron como referencia unos tiempos, en el rango de los 3 minutos para alcanzar el estadio de anestesia II (tiempo de inducción) y en el de los 5 minutos para el de recuperación (tiempo de recuperación) (Marking y Meyer, 1985; Hseu et al., 1998). Siguiendo esta pauta, se observó que de los cuatro anestésicos evaluados en el lenguado, siempre encontramos como mínimo una

dosis que dio lugar a unos tiempos que están dentro de esos márgenes: la dosis de 600 mg L<sup>-1</sup> con el 2-fenoxietanol, las de 5 y 6 mg L<sup>-1</sup> con el metomidato, las de 30 y 40 mg L<sup>-1</sup> con el aceite de clavo y las de 75 y 100 mg L<sup>-1</sup> con el MS-222.

Con el 2-fenoxietanol se observó que con el aumento de la dosis disminuye progresivamente el tiempo de inducción. Con respecto al tiempo de recuperación, se observó que no hay variaciones significativas entre las tres dosis menores, mientras que con la mayor (600 mg L<sup>-1</sup>) si se observó una fuerte caída del tiempo de recuperación. En general estos resultados están de acuerdo con lo indicado por otros autores (Hseu et al., 1998; Inoue et al., 2004; Mylonas et al., 2005) en otras especies de peces no planos (*Sparus sarba*, *Brycon cephalus*, *Dicentrarchus labrax*). No obstante en algunas especies de peces (*Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo*; *Centropristis striata*) se observó que con el aumento de la dosis del anestésico también aumentaba el tiempo de recuperación (King et al., 2005; Tsantilas et al., 2006). En nuestro trabajo, la menor dosis efectiva para el 2-fenoxietanol fue la de 600 mg L<sup>-1</sup>. En otras especies de peces no planos esta se ha situado entre los 200 y los 600 mg L<sup>-1</sup> (Mattson y Ripple, 1989; Weyl et al., 1996; Hseu et al., 1998; Tort et al., 2002; Inoue et al., 2004; Mylonas et al., 2005; King et al., 2005).

Con el metomidato se comprobó que con el aumento de la dosis disminuyeron tanto los tiempos de inducción como los de recuperación, y en ambos casos las diferencias significativas sólo se encontraron con respecto a la dosis menor. Con respecto a la evolución de los tiempos de inducción, se observaron dinámicas similares por Mattson y Ripple (1989) e Iversen et al. (2003) en el *Gadus morhua* y en el *Salmo salar*. Por el contrario Mattson y Ripple (1989) no encontraron una clara relación entre la dosis y tiempo de recuperación. Aunque en este trabajo con la dosis de 4 mg L<sup>-1</sup> ya se alcanzó el tiempo de inducción requerido, al estar el tiempo de recuperación por encima de los 5 minutos se consideró que la dosis menor efectiva para el metomidato fue la de 5 mg L<sup>-1</sup>. Comparando los tiempos de inducción alcanzados con esta dosis se observó que están en el rango de lo indicado para adultos de *Oncorhynchus mykiss* (Gilderhus y Marking, 1987) y son claramente inferiores a los determinados en el *Gadus morhua* y en el *Salmo salar* (Mattson y Ripple, 1989; Iversen et al., 2003). Palić et al. (2006) con una dosis de 4 mg L<sup>-1</sup> obtuvieron resultados semejantes a los observados en este trabajo con la dosis de 5 mg L<sup>-1</sup> en el *Pimephales promelas*.

En los últimos años, el aceite de clavo se ha postulado como una alternativa efectiva para ser usado como anestésico en los peces, siendo además considerado GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (United States of America Food and Drug Administration) (Anderson et al., 1997). Con el aceite de clavo se observó que con el aumento de la dosis disminuyó el tiempo de inducción, aunque el tiempo de recuperación fue independiente de la concentración. Estos resultados son comparables a los encontrados en el *Oncorhynchus mykiss*, *Brycon cephalus*, *Salmo salar*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, y *Cyprinus Carpio* (Keene et

al., 1998; Inoue et al., 2003; Iversen et al., 2003; Mylonas et al., 2005; Hajek et al., 2006). Sin embargo, y de un modo contrario, en el *Dicentrarchus labrax* el tiempo de recuperación fue dosis-dependiente, disminuyó con el aumento de la dosis (Mylonas et al., 2005). En el presente trabajo se encontró que la menor dosis efectiva fue la de 30 mg L<sup>-1</sup>. Al no encontrar datos para comparar con la dosis de 30 mg L<sup>-1</sup>, se compararon los resultados obtenidos con la dosis de 40 mg L<sup>-1</sup>. En estas circunstancias se comprobó que los tiempos de inducción encontrados son inferiores a los observados en el *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* y *Cyprinus carpio* (Anderson et al., 1997; Iversen et al., 2003; Hajek et al., 2006), similares a los observados en el *Brycon cephalus*, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* (Inoue et al., 2003; Mylonas et al., 2005), y superiores a los observados en el *Oncorhynchus mykiss* (Keene et al., 1998).

Con respecto al MS-222, la evolución de los tiempos de inducción y de recuperación fue similar a la de los del aceite de clavo, es decir el tiempo de inducción disminuyó con el aumento de la dosis, siendo el tiempo de recuperación dosis-independiente. Resultados similares también fueron observados en el *Cyprinus carpio*, en el *Gadus morhua* y en el *Sparus sarba* (Hikasa et al., 1986; Mattson y Ripley 1989; Hseu et al., 1998). En nuestro trabajo, la menor dosis efectiva fue la de 75 mg L<sup>-1</sup>. Con esta dosis se consiguieron tiempos de inducción comparables a los indicados para el *Cyprinus carpio*, *Gadus morhua*, *Pimephales promelas* (Hikasa et al., 1986; Mattson y Ripley, 1989; Palić et al., 2006), aunque con esta misma dosis en el *Sparus sarba* se obtuvieron tiempos de inducción superiores (Hseu et al., 1998).

En resumen, comparando los resultados obtenidos en los juveniles de *Solea senegalensis* con los reportados previamente en otras especies de peces no planos, se puede concluir de un modo general que las dosis mínimas efectivas para alcanzar el estadio de anestesia II: i) son menores para el aceite de clavo, ii) similares para el metomidato y el MS-222 y iii) mayores para el 2-fenoxietanol. No obstante hay que indicar que las comparaciones son complejas y solo indicativas, dado que aparte de ser diferentes especies hay otros parámetros como el peso/tamaño y la temperatura que influyen fuertemente los tiempos de inducción y recuperación de un anestésico. Así por ejemplo, en el único pez plano (*Hippoglossus hippoglossus*), hasta donde nosotros sabemos, en el que se evaluaron anestésicos, se indicó como la menor dosis efectiva la de 10 mg L<sup>-1</sup> para el metomidato y 250 mg L<sup>-1</sup> para el MS-222 (Malmstrøm et al., 1993). Ambas claramente superiores a las indicadas en este trabajo para juveniles del *Solea senegalensis*, pero en dicho trabajo el peso de los peces estaba en el rango de los 3 kg.

Por otra parte, comparando el comportamiento de los cuatro anestésicos en el *Solea senegalensis*, se comprobó que en todos los casos, aunque con dinámicas diferentes, los tiempos de inducción siempre fueron dependientes de la dosis. Por el contrario se observaron diferencias notables entre los tiempos de recuperación,

dado que para el 2-fenoxietanol y el metomidato estos disminuyeron con el aumento de la dosis, y para el aceite de clavo y el MS-222 fueron independientes de la dosis. Los tiempos de recuperación obtenidos con el 2-fenoxietanol y el metomidato podrían estar, en parte, relacionados con el hecho de que con las dosis mayores el animal estuvo menos tiempo en contacto con el anestésico, lo que les permitiría una más rápida recuperación (Mylonas et al., 2005). En este caso el tiempo de recuperación podría ser dependiente del tiempo de exposición al anestésico. Por el contrario, para el aceite de clavo y el MS-222, los tiempos de recuperación fueron independientes tanto de la dosis como del tiempo de exposición. Evidentemente, estas diferentes respuestas dentro de una misma especie sólo pueden ser explicadas por las diferentes cinéticas, mecanismos de acción y efectos fisiológicos secundarios de estos anestésicos. En relación con este último hecho, Keene et al. (1998) justificaron los menores tiempos de recuperación para el MS-222 frente al aceite de clavo en base a su efecto antagonístico sobre el sistema cardiorrespiratorio.

### **Evaluación de la profundidad anestésica en el estadio II**

Un método eficaz para evaluar la profundidad anestésica es comprobar su utilidad ante ciertas tareas más invasivas, como puede ser una extracción de sangre. Por ello en este tercer grupo de experimentos (5.3) se intentó comprobar si algunas de las dosis caracterizadas previamente y otras mayores, pueden ser utilizadas para realizar manipulaciones más complejas como puede ser la extracción de sangre. Por ello en este experimento se determinó, en función del peso del pez, el tiempo mínimo necesario para cada anestésico que permitió una extracción de sangre (tiempo de inducción).

De un modo general, tanto para el 2-fenoxietanol como para el metomidato y aceite de clavo, con cualquiera de las dosis estudiadas, el tiempo de inducción fue peso-dependiente, es decir, aumentó en los peces de mayor peso. Por el contrario con el MS-222, no se encontró ninguna relación entre el peso corporal y el tiempo de inducción. Para los tres primeros anestésicos, nuestros resultados coincidieron plenamente con lo observado por otros autores cuando utilizaron el 2-fenoxietanol en el *Sparus sarba*, *Diplodus sargus* y *Diplodus puntazzo* (Hseu et al., 1994; Tsantilas et al., 2006), el metomidato en el *Ictalurus punctatus* (Small, 2003) y el aceite de clavo en el *Oncorhynchus nerka* (Woody et al., 2002). Por el contrario, también hay autores que utilizando el 2-fenoxietanol y el aceite de clavo no observaron una dependencia entre peso y tiempo de inducción en el *Carassius auratus* y en la *Anguilla reinhardtii* (Weyl et al., 1996; Walsh y Pease, 2002), o que encontraron una disminución del tiempo de inducción con los peces de mayor peso (*Salmo salar*) utilizando el metomidato (Olsen et al., 1995). Es evidente que cuando se comparan los resultados entre especies, estos son confusos y en algunos casos contradictorios y difíciles de explicar, aunque las diferencias interespecíficas son el primer aspecto a tomar en consideración para explicarlas. (Weyl et al., 1996; Hoskonen y Pirhonen, 2004). Sin embargo, cuando como en

este trabajo se consideró el peso/tamaño del animal, es lógico que los cambios en la proporción del área de branquias o de la piel en relación al tamaño sea un factor importante a tener en consideración (Stehly y Gingerich, 1999; Myszkowski et al., 2003). Se sabe que las branquias (principalmente) y la piel, son la principal vía de entrada de los anestésicos en los peces (Brown et al., 1972; Ferreira et al., 1984; Ross y Ross, 1999).

Un hecho importante que se pudo deducir al comparar los tiempos de inducción del experimento 5.2 y 5.3 (para una misma dosis y para los animales de pesos equivalentes) fue que con los tiempos de inducción por debajo de los 3 minutos, nunca se alcanzó una profundidad anestésica suficiente como para poder extraer sangre sin que tuviera lugar ninguna reacción refleja por parte del animal. Solamente con las siguientes dosis de algunos agentes anestésicos se consiguió inducir una anestesia lo suficientemente profunda en menos de 3 minutos (estadio II de anestesia) como para permitir una extracción de sangre: el 2-fenoxietanol ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) y el metomidato ( $6$  y  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) para peces de  $74 \pm 4 \text{ g}$ , y el 2-fenoxietanol ( $600 \text{ mg L}^{-1}$ ), metomidato ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) y MS-222 ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) para peces de  $213 \pm 15 \text{ g}$ . Con las otras dosis y agentes los peces reaccionaron a la simulación y para la extracción de sangre siempre se necesitaron tiempos de inducción mayores, en los cuales los peces ya presentaron características propias del estadio de anestesia III. Evidentemente, el estrés inducido por la repetición de medidas en un mismo animal pudo afectar el tiempo mostrado en la Tabla 3.

Por otra parte, sólo se consiguieron unos tiempos de recuperación por debajo de los 5 min con la dosis de  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol y con los animales de  $74 \pm 4 \text{ g}$ . Con respecto a la dinámica de los tiempos de recuperación se observó que las respuestas inducidas por el 2-fenoxietanol fueron peso- y dosis-independiente, para el metomidato fueron dosis-independiente y para el aceite de clavo y MS-222 fueron peso-independiente. De un modo similar, Hoskonen y Pirhonen (2004) tampoco encontraron efectos del peso sobre los tiempos de recuperación cuando ensayaron el aceite de clavo en el *Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Onchorynchus mykiss*, *Coregonus lavaretus*, *Perca fluviatilis* y *Rutilus rutilus*.

Nuevamente se evidenció que existen claras diferencias en las respuestas del *Solea senegalensis* a los diferentes anestésicos. Dentro de la misma especie y con las variables ambientales constantes, estas diferencias sólo se pueden justificar por el hecho de que los anestésicos utilizados poseen diferentes farmacodinámicas y/o diferentes mecanismos de acción. Si se considera el primer aspecto, aunque hay muy pocos trabajos, se observó que la mayor vida media (plasma half-life) para estos anestésicos se encontró en el aceite de clavo (12 h), después en el MS-222 (4 h) y en el metomidato (1,7-2 h) y finalmente la menor vida media fue para el 2-fenoxietanol (30 min) (Hunn y Allen, 1974; Hansen et al., 2003; Inoue et al., 2004; Guenette et al., 2007). Estos datos de vida media no se correlacionaron con los diferentes tiempos de recuperación que se observaron en los resultados de este experimento y el anterior. No parece por tanto que la farmacodinámica propia de

cada anestésico pueda justificar, o sólo en parte, las diferencias encontradas dentro de una misma especie. En cuanto al segundo aspecto, se sabe que para ejercer su acción anestésica, los anestésicos generales pueden actuar sobre diferentes moléculas dianas, particularmente el GABA y receptores de glutamato, aunque también sobre canales iónicos y otros receptores (Hemmings et al., 2005). En estos momentos los datos existentes sobre los mecanismos de acción de los anestésicos son escasos, no definitivos y están realizados casi exclusivamente en mamíferos, aunque nos permiten vislumbrar que los posibles mecanismos de acción de los anestésicos utilizados en este trabajo no son iguales. Se especula con que la acción del eugenol (aceite de clavo) está mediada a través de mecanismos GABAérgicos y glutaminérgicos (NMDA) (Wie et al., 1997, Aoshima y Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003), la de los análogos del metomidato (ej. el etomidate) por mecanismos GABAérgicos (Hemmings et al., 2005) y la del 2-fenoxietanol por mecanismos glutaminérgicos (NMDA) pero sin afectar a los mecanismos GABAérgicos (Mußhoff et al., 1999). Por otra parte, también se sabe que el MS-222 y el eugenol pueden actuar bloqueando la transmisión nerviosa, en el primer caso alterando las propiedades de apertura (gating) de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje y en el segundo caso las propiedades de apertura de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  dependientes del voltaje (Wang et al., 1994; Palmer y Mensinger, 2004; Li et al., 2007). Tomando en consideración estos hechos, parece muy probable que las diferentes respuestas del *Solea senegalensis* (y otros peces) a los anestésicos sólo se pueden justificar por la asociación de una serie de características y propiedades específicas para cada uno de estos anestésicos, entre las cuales las diferencias entre sus diferentes mecanismos de acción podrían jugar un papel preponderante.

### **Agentes anestésicos e índices de estrés**

En ocasiones, los anestésicos son utilizados para minimizar el estrés producido durante las manipulaciones que tienen lugar durante la realización de las diferentes tareas propias del cultivo de los peces. No obstante, también se sabe que ellos mismos, en diferente grado de intensidad, pueden actuar como factores de estrés agudo estimulando la secreción del cortisol (Thomas y Robertson, 1991) u otros parámetros sanguíneos.

Tanto los niveles del hematocrito como los de la hemoglobina son ampliamente utilizados como indicadores (respuestas secundarias) de estrés en peces (Bourne, 1984; Waring et al., 1996; Montero et al., 1999; Tort et al., 2002; Plante et al., 2003; Barcellos et al., 2004; Morales et al., 2005; Bolasina, 2006). En nuestro trabajo ninguno de los anestésicos evaluados fue capaz de modificar de un modo significativo los niveles del hematocrito ni de la hemoglobina. Tampoco se encontraron alteraciones de los niveles de estos parámetros en otros peces planos marinos (*Pleuronectes platessa*, *Limanda limanda*, *Scophthalmus maximus*) después de la exposición al MS-222 durante un periodo de 15-20 min (Bourne, 1984). Igualmente, tampoco se encontraron diferencias significativas

después de utilizar el 2-fenoxietanol o el aceite de clavo, en el *Sparus aurata* y en el *Oncorhynchus mykiss* (Tort et al., 2002). Por el contrario, en otros trabajos si se encontraron incrementos significativos: i) de los niveles del hematocrito y de la hemoglobina en el *Sparus aurata* después de la exposición (2 h) al MS-222, y de la hemoglobina después de la exposición (2 h) al 2-fenoxietanol (Molinero y Gonzales, 1995), ii) de la hemoglobina en el *Urophycis brasiliensis* después de la exposición a la benzocaina (Bolasina, 2006) y iii) del hematocrito en el *Salmo salar* después de la exposición al metomidato (1 h) (Olsen et al., 1995).

Se sabe que el bazo actúa como un reservorio de sangre y que su contracción puede aportar en circunstancias determinadas eritrocitos y hemoglobina a la sangre circulante, siempre bajo un control del sistema nervioso simpático (Kita y Itazawa, 1989). La ausencia de variaciones significativas tanto del hematocrito como de la hemoglobina nos hizo pensar que la exposición a los anestésicos, en nuestras condiciones experimentales: i) aparentemente no provocaron una liberación de las catecolaminas o ii) lo hicieron en una cantidad insuficiente como para dar lugar a una contracción del bazo lo suficientemente importante como para modificar significativamente ambos parámetros hematológicos. Soportando esta hipótesis se ha observado que en los salmónidos, en algunas circunstancias, la sedación (AQUÍ-S) o la anestesia (2-fenoxietanol) no indujeron la liberación de las catecolaminas desde las células cromafines (Gerwick et al., 1999; Rothwell et al., 2005). Evidentemente no se puede descartar una ligera liberación de catecolaminas.

Con respecto a los niveles de glucosa se detectaron incrementos significativos después de la exposición a cualquiera de los cuatro anestésicos evaluados, a partir de los 10 min con MS-222, de los 20 min con aceite de clavo y sólo puntualmente a los 30 min con el metomidato y el 2-fenoxietanol. Incrementos similares, sólo fueron detectados con la exposición al MS-222 ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 15-20 min en el *Scophthalmus maximus* (Bourne, 1984) y con el 2-fenoxietanol ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 10 min en el *Silurus glanis* (Velisek et al., 2007). Por el contrario, otros autores no encontraron ninguna modificación significativa en los niveles de la glucosa plasmática después de la exposición a: i) diferentes dosis de eugenol durante 10 min en el *Colossoma macropomum* (Roubach et al., 2005), ii) al aceite de clavo ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 4 h en el *Brycon cephalus* (Inoue et al., 2005) y al aceite de clavo ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 30 min en el *Salmo salar* (Iversen et al., 2003) y iii) al metomidato ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 30 min en el *Salmo salar* (Iversen et al., 2003).

El incremento de la glucosa plasmática es una de las respuestas secundarias al estrés más típicas, siendo el resultado de la movilización de las reservas del glucógeno hepático como consecuencia de la activación de la glucogenolisis por la acción de las catecolaminas y/o del cortisol. En cualquier caso, en este trabajo se observó que en el lenguado los cuatro anestésicos fueron capaces de provocar un incremento de los niveles de la glucosa plasmática, que al menos en parte



reflejan una activación de la glucogenolisis hepática. Evidentemente y en base a lo comentado previamente esta activación glucogenolítica no parece depender principalmente de la liberación de las catecolaminas.

De un modo general, en nuestro trabajo se observó un incremento significativo en los niveles de lactato a lo largo del tiempo después de la exposición a los anestésicos. Incrementos similares fueron descritos por diversos autores durante la anestesia con el MS-222 (Houston et al., 1971; Soivio et al., 1977), con el metomidato (Olsen et al., 1995; Nilssen et al., 1996; Iversen et al., 2003) y con el aceite de clavo (Iversen et al., 2003). Por otra parte, también se observó que la evolución de los niveles del lactato y de la glucosa fue prácticamente igual cuando se utilizaron el aceite de clavo, el MS-222 y el 2-fenoxietanol, aunque sólo coincidieron en el máximo cuando se utilizó el metomidato.

Al igual que la glucosa, el lactato es una importante fuente energética y precursor gluconeogénico, siendo sus niveles plasmáticos reflejo de respuestas metabólicas y hormonales (Suarez y Mommsen, 1987; Fattor et al., 2005). Leach y Taylor (1980) indicaron que los niveles elevados de lactato pueden tener un papel importante como una fuente de energía fácilmente disponible (gluconeogénesis), en el mantenimiento de unos niveles elevados de glucosa durante el estrés. De este modo el lactato proveniente de la glucólisis muscular podría ser usado para la síntesis de glucosa o para restituir el glucógeno hepático en los peces estresados (Vijayan et al., 1997a).

Los incrementos en los niveles sanguíneos de lactato pueden surgir cuando la disponibilidad de oxígeno es baja para el metabolismo celular aeróbico (Iversen et al., 2003). Así por ejemplo, una de las causas más comunes para incrementar los niveles del lactato plasmático es por la activación de la glucólisis en músculos hipóxicos después de un fuerte estrés natatorio. Evidentemente en nuestro trabajo, teniendo en cuenta que los anestésicos están sedando al animal y por tanto reduciendo su actividad muscular natatoria, el origen de la hipoxia deberá de ser diferente. En relación con este hecho, se sabe que diferentes anestésicos producen una reducción de la tasa de ventilación y circulación (Houston et al., 1971; Iwama et al., 1989), por lo que los niveles del lactato plasmático se pueden usar como índices del efecto de la anestesia sobre el sistema respiratorio (Olsen et al., 1995). En base a estos datos parece evidente que en el lenguado, los cuatro anestésicos evaluados están actuando como depresores del sistema respiratorio. Por otra parte, se ha comprobado que durante el estrés los niveles de las catecolaminas plasmáticas se correlacionan positivamente con los del lactato (Barton y Iwama, 1991; McDonald y Milligan, 1992; Randall y Perry, 1992; Brooks et al., 2005) y que las catecolaminas plasmáticas activan todos los mecanismos que favorecen el aporte de oxígeno a los tejidos (Reid et al., 1998). Tomando en consideración estos hechos y que los anestésicos no parecen activar profundamente la liberación de las catecolaminas, parece evidente que en el caso del estrés inducido por los anestésicos los niveles del lactato no se relacionan con los de las catecolaminas

plasmáticas y son dependientes en parte de la acción directa supresora de los anestésicos sobre el sistema respiratorio.

Por otra parte, también se ha demostrado la acción del cortisol sobre el metabolismo del glucógeno y de la glucosa, activando las rutas metabólicas que incrementan la gluconeogénesis y la glucogenolisis (Mommsen et al., 1999). El cortisol actuaría directamente sobre el hígado o indirectamente sobre el incremento de la demanda de otros tejidos, favoreciendo la movilización y el incremento de sustratos metabólicos como la glucosa y el lactato plasmáticos (Mommsen et al., 1999). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-células interrenales de la cabeza del riñón, con la consiguiente liberación de cortisol por estas células, es una de las respuestas primarias al estrés.

En este trabajo los niveles basales del cortisol ( $15,95 \pm 3,7$  ng mL<sup>-1</sup>) estuvieron en el rango de los observados en el *Solea senegalensis*,  $8,81 \pm 0,44$  ng mL<sup>-1</sup> (Tintos et al., 2006), y en otras especies de peces:  $28,89 \pm 5,19$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Rhamdia quelen* (Barcellos et al., 2004),  $13 \pm 4$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Oncorhynchus mykiss* (Davidson et al., 2000),  $5,65 \pm 0,21$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Oncorhynchus mykiss* (Tintos et al., 2006),  $26,30 \pm 1,19$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Dicentrarchus labrax* (Tintos et al., 2006),  $10 \pm 8$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Dicentrarchus labrax* (Vazzana et al., 2002), 50-100 ng mL<sup>-1</sup> en el *Leuciscus cephalus* (Pottinger et al., 2000), 31-47 ng mL<sup>-1</sup> en el *Oreochromis niloticus* (Moreira y Volpato, 2004), 5-50 ng mL<sup>-1</sup> en el *Oreochromis niloticus* (Auperin et al., 1997), 5-15 ng mL<sup>-1</sup> en el *Oreochromis niloticus* (Barcellos et al., 1999), 16-39 ng mL<sup>-1</sup> en el *Oreochromis niloticus* (Volpato y Barreto, 2001),  $3,78 \pm 0,87$  ng mL<sup>-1</sup> en el *Sparus aurata* (Molinero y Gonzales, 1995). Como se puede observar, existe una amplia variabilidad de valores para las diferentes especies y también dentro de una misma especie.

Los peces expuestos a los anestésicos que presentaron menor incremento en los niveles del cortisol fueron los tratados con el metomidato. Con este anestésico sólo se detectó un incremento, mínimo si lo comparamos con el inducido por los otros anestésicos, significativo a los 10 min de la exposición. A los 20 min los niveles ya retornaron a los valores basales, permaneciendo estables durante el resto de la exposición. Nuestros resultados coinciden plenamente con lo observado en el *Salmo salar* (Iversen et al., 2003) y en el *Centropristis striata* (King et al., 2005) utilizando similares dosis ( $5$  mg L<sup>-1</sup>) y tiempos de exposición (30 min). Realmente estos resultados son predecibles dada la reconocida capacidad del etomidato y del metomidato para reducir el cortisol plasmático en los mamíferos (Preziosi y Vacca, 1982; Fraser et al., 1984) y en los peces, *Sciaenops ocellatus* (Thomas y Robertson, 1991), *Salmo salar* (Olsen et al., 1995), *Ictalurus punctatus* (Small, 2003) y *Pimephales promelas* (Palić et al., 2006). El mecanismo exacto de como el metomidato afecta al metabolismo del cortisol aún no está plenamente establecido (Iversen et al., 2003). Pero se ha observado que el etomidato, sustancia estrechamente relacionada, afecta a las enzimas mitocondriales dependientes del citocromo P450 que catalizan la síntesis

de cortisol, especialmente a la  $11\beta$ -hidroxilasa, y al citocromo P450 SCC (Vanden Bossche et al., 1984; Wagner et al., 1984). Por los resultados observados en este trabajo, parece evidente que en los peces planos también se sigue manteniendo este mecanismo de acción del metomidato. Con respecto a los otros anestésicos las respuestas son diferentes y de mayor magnitud. Los lenguados anestesiados con el aceite de clavo y con el MS-222 presentaron unos perfiles para el cortisol similares, incrementándose progresivamente y llegando a un máximo a los 30 min de la exposición, mientras que para los peces tratados con el 2-fenoxietanol el máximo se alcanzó 10 minutos antes, es decir a los 20 min de exposición. Los resultados observados con el MS-222 coinciden con los observados en el *Ictalurus punctatus* (Small, 2003) y en el *Centropristis striata* (King et al., 2005), donde también se observó un incremento significativo del cortisol a lo largo del tiempo de exposición. No obstante hay autores que usando el 2-fenoxietanol ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) o el aceite de clavo ( $50, 100, 200 \text{ mg L}^{-1}$ ) ya observaron incrementos significativos después de 10 min de exposición en el *Sparus aurata* (Tort et al., 2002). Por el contrario, hay otros autores que en experimentos similares al nuestro no observaron ningún tipo de variación significativa en los niveles de cortisol después de la exposición al aceite de clavo ( $50$  y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) en el *Salmo salar* (Iversen et al., 2003) y al 2-fenoxietanol ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) o al aceite de clavo ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) en el *Centropristis striata* (King et al., 2005). Estos datos parecen indicar que las respuestas a los anestésicos, menos al metomidato, dependen en parte de la especie.

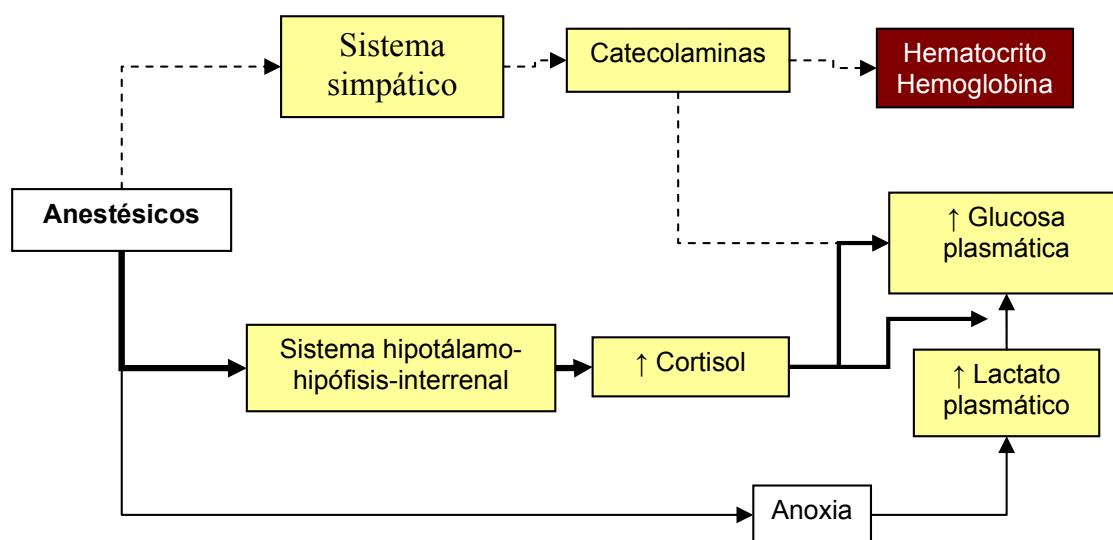
En general todos los parámetros estudiados se recuperaron 24 horas después de la exposición, con la excepción de los niveles de la glucosa plasmática en el caso de la exposición al aceite de clavo. Este hecho nos permitió deducir que la acción estresante de la exposición a los anestésicos (hasta los 30 min) desapareció totalmente a las 24 h.

En resumen, se puede indicar que todos los anestésicos inducen un fuerte incremento (entre 10 y 42 veces el valor basal) de los niveles del cortisol, con la excepción del metomidato en el que solo se detectaron incrementos de 4 veces el valor basal. La otra respuesta primaria es la liberación de las catecolaminas, que por la ausencia de variaciones en el hematocrito y en la hemoglobina parece estar atenuada y podría indicar que los anestésicos bloquearon parcialmente la actividad del sistema nervioso simpático (Tabla 5). Entre las respuestas secundarias se observaron diferencias significativas en los niveles de la glucosa y lactato, que parecen depender mayoritariamente de las acciones del cortisol y de la anoxia (Figura 107).

	Hematocrito	Hemoglobina	Glucosa	Lactato	Cortisol
Fenoxietanol	x	x	30 min	30 min	20 min
Ac. de clavo	x	x	20, 30 min	20, 30 min	20, 30 min
MS-222	x	x	10-30 min	20, 30 min	20, 30 min
Metomidato	x	x	30 min	30 min	10 min *

**Tabla 5.** Resumen de los efectos de la exposición a los anestésicos sobre los parámetros hematológicos y plasmáticos. x: ningún efecto significativo.

Finalmente, se puede concluir: i) que la exposición prolongada (30 min) a los anestésicos: 2-fenoxietanol (500 mg L<sup>-1</sup>), aceite de clavo (80 mg L<sup>-1</sup>), MS-222 (200 mg L<sup>-1</sup>) y el metomidato (6 mg L<sup>-1</sup>) indujo una serie de respuestas primarias y secundarias de estrés en el lenguado (*Solea senegalensis*). Globalmente, estos resultados confirman lo que ya había sido propuesto en otras especies de peces no planos de que los anestésicos son capaces de generar respuestas de estrés por sí mismos, y ii) que de los cuatro anestésicos evaluados el metomidato es el que parece ser el menos estresante, lo que lo hace “a priori” el más adecuado para su uso en las tareas de rutina de manipulación de peces.



**Figura 107.** Esquema hipotético del mecanismo de acción estresante de los anestésicos.

### Estudio de la capacidad antiestrés de los anestésicos frente a un estrés agudo (exposición al aire y persecución) en juveniles de *Solea senegalensis*

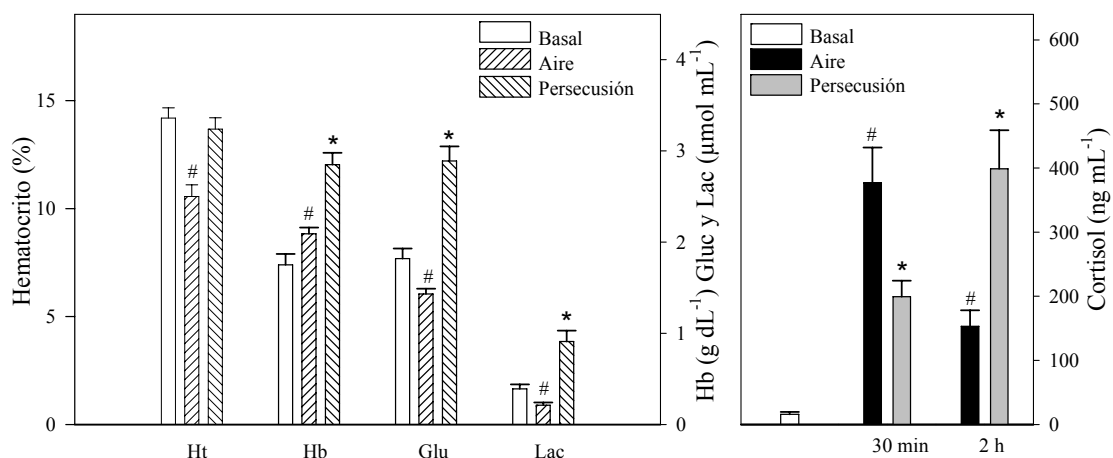
Los efectos nocivos del estrés no siempre son visibles inmediatamente después de la aplicación de un factor de estrés, sino que pueden manifestarse a medio o largo plazo (Barton y Iwama, 1991). La captura y la exposición al aire son situaciones estresantes usuales, a las que los peces son sometidos durante

ciertas operaciones de rutina propias de la acuicultura y/o de la investigación. Se ha indicado que el uso de anestésicos, previamente o durante la manipulación, podría reducir el estrés. Sin embargo las respuestas de estrés generadas por el propio anestésico, según se ha visto en este trabajo, podrían hacer que el uso de algún anestésico no fuera recomendable. Dado que existen pocos trabajos que evalúen la capacidad antiestrés de los anestésicos en los peces, el fin de este trabajo fue el de estudiar este aspecto en juveniles de *Solea senegalensis*. Para ello, se evaluaron los niveles de los siguientes parámetros indicadores de estrés: el hematocrito, la hemoglobina, la glucosa, el lactato y el cortisol, en peces estresados y estresados pretratados con el anestésico.

En primer lugar indicar que, de un modo general, las manipulaciones aplicadas a los peces (exposición al aire y persecución) originaron un perfil de variaciones similar en todos los casos, con los máximos valores a los 30 minutos. No obstante, la magnitud de este perfil fue claramente diferente entre ambos tipos de estrés dado que con la persecución: i) en todos los casos existe una clara caída de los niveles entre los 30 min y las 2 h, menos en el caso del cortisol que el máximo se encuentra a las 2 h y ii) todos los niveles observados a los 30 minutos después de la aplicación de la persecución, salvo en el caso del cortisol, son claramente superiores a los observados en el caso de la exposición al aire. A partir de estos resultados, parece evidente que sólo en el caso de la persecución, la intensidad del estímulo estresante fue lo suficientemente grande como para incrementar significativamente la mayoría de los indicadores de estrés. Por el contrario, en el caso de la exposición al aire, sólo se encontraron incrementos en el caso del cortisol y de la hemoglobina, e incluso se detectaron niveles menores que los considerados previamente como basales (Figura 108).

Comparando los resultados de la exposición al aire con el de otros autores, aun cuando las condiciones experimentales (tiempo de exposición y de muestreo) sean similares, se puso de manifiesto que sólo existen coincidencias parciales. Así en el *Sparus aurata*, además de los incrementos de los niveles del cortisol también se detectaron incrementos en los del lactato y en la glucosa (Arends et al., 1999). En el *Pseudoplatystoma corruscans* se detectaron incrementos de los niveles del cortisol y de la glucosa y caídas de los del hematocrito sin modificaciones de los niveles de la hemoglobina (Fagundes y Urbinati, 2008). Por el contrario en juveniles del *Scophthalmus maximus* no se encontraron efectos inmediatos sobre los niveles del hematocrito ni del cortisol (Mugnier et al., 1998). En condiciones de exposición al aire de diferente duración, es llamativa la semejanza de nuestros resultados con los obtenidos con otro pez plano, el *Scophthalmus maximus*, donde después de 9 min de exposición al aire no se observaron diferencias en los niveles del hematocrito, hemoglobina, glucosa y el lactato y un incremento significativo en los niveles de cortisol (Waring et al., 1996). Por otra parte, en el *Pleuronectes yokohamae* después de una exposición al aire de 10 minutos, se encontraron incrementos en los niveles del cortisol y de la glucosa (Kakuta, 2002), y en el *Dentex dentex*, 45 segundos después de la exposición al aire, también se

encontraron incrementos de los niveles del lactato y de la glucosa, pero no en el del hematocrito y de la hemoglobina (Morales et al., 2005). Finalmente indicar que coincidiendo con lo observado en este trabajo (cortisol y hemoglobina) a las 12 horas (Morales et al., 2005) o a las 24 horas (Fagundes y Urbinati, 2008; Kakuta, 2002), los parámetros de estrés tienden a recuperarse hacia los valores basales.



**Figura 108.** Niveles del Hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), glucosa (Glu) y lactato (Lac) en el lenguado, 30 min después de la aplicación del estrés (aire o persecución), y del cortisol después de 30 min y 2 h. \* ( $P < 0,001$ ) comparando el estrés de persecución frente al estrés de exposición al aire y a los basales. # ( $P < 0,05$ ) comparando el estrés de exposición al aire frente a los basales. Las muestras de los animales basales se obtuvieron a partir de peces anestesiados (n: 22-29).

En resumen, el único parámetro en el que parece haber coincidencia en la mayoría de los casos es en el incremento de los niveles del cortisol. Dado que el tiempo de duración del factor estresante (aire y persecución) fue el mismo, parece evidente que la intensidad del estímulo fue menor en el caso de la exposición al aire y ello nos permitió deducir que los juveniles del *Solea senegalensis* son peces poco sensibles a cortos periodos de anoxia. Realmente, sólo el fuerte incremento de los niveles del cortisol nos hizo sospechar de la existencia de una respuesta estresante. La similitud de las respuestas observadas con las obtenidas en otro pez plano (Waring et al., 1996) nos hace sospechar de la existencia de un patrón de respuestas al estrés diferente entre los peces planos y no planos. Este diferente patrón que se centra en la ausencia o en una baja movilización de los sustratos energéticos (glucosa y lactato), podría ser consecuencia de una adaptación de los peces con un estilo de vida de baja actividad para prevenir un exceso de movilización energética (Vijayan y Moon, 1994).

Con respecto al estrés de persecución, es evidente que los fuertes incrementos en los niveles de todos los indicadores de estrés, menos en el del hematocrito, están reflejando una fuerte respuesta de estrés, y al contrario de lo observado en el

caso de la exposición al aire, no cabe la menor duda que el estrés de persecución es percibido por el pez como un factor perturbador de elevada intensidad. En el único experimento sobre estrés de persecución que encontramos en la bibliografía, también se observó un incremento de los niveles del cortisol y de la glucosa después de una persecución de 8 min en el *Pagrus pagrus* (Rotllant y Tort, 1997).

Si comparamos los resultados con otras situaciones de estrés agudo como pueden ser: la disminución del volumen de agua o la transferencia de peces entre tanques, tanto en el *Rhamdia quelen* (Barcellos et al., 2004) como en el *Ictalurus punctatus* (Davis y Small, 2006), o el confinamiento, tanto en el *Dicentrarchus labrax* (Vazzana et al., 2002) como en el *Scophthalmus maximus* (Waring et al., 1996), el único índice de estrés que se repite en todos los casos es el incremento significativo de los niveles del cortisol.

Desde un punto de vista fisiológico el incremento de los niveles del cortisol, tanto en el caso de la exposición al aire como en el de la persecución, fue una clara consecuencia del aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, típica respuesta primaria de estrés agudo, tal y como ya se comentó en apartados anteriores. No obstante donde se encontraron diferencias claras es en las respuestas secundarias (hematocrito, hemoglobina, glucosa y lactato). Tal y como ya se comentó previamente estos parámetros de estrés son muy dependientes del aumento de la secreción de las catecolaminas desde las células cromafines, por una activación del sistema nervioso simpático (Wendelaar Bonga, 1997; Reid et al., 1998). Por lo tanto, los resultados del trabajo nos permitieron deducir que el estrés de exposición al aire de corta duración fue insuficiente para provocar una importante activación del simpático. Este hecho esta sin duda relacionado con lo comentado previamente sobre la posible adaptación energética de los peces planos (Vijayan y Moon, 1994) y la poca sensibilidad de estos peces a la hipoxia. Además, la ausencia de incrementos del lactato aun cuando los niveles del cortisol (activación de la gluconeogénesis) están elevados, viene refrendada por el hecho de que los peces planos son animales con una menor capacidad de producir y liberar lactato desde los músculos en comparación con los peces no planos (Wood et al., 1977; Turner et al., 1983; Milligan y Wood, 1987). Las ligeras caídas del hematocrito, glucosa y lactato y el incremento de la hemoglobina, se consideraron simplemente como una consecuencia de las fluctuaciones naturales tal y como se ha comentado para otras especies de peces (Moraes y Bidinotto, 2000).

Con respecto al estrés de persecución, todas las respuestas primarias y secundarias estuvieron incrementadas como consecuencia de la activación de los ejes: sistema nervioso simpático-células cromafines e hipotálamo-hipófisis-células interrenales. En este trabajo existen datos inequívocos de una activación de la glucogenolisis y gluconeogénesis. Frente a lo comentado anteriormente sobre la menor capacidad de liberar lactato desde el músculo a la sangre por parte de peces planos esto no siempre es así, dado que cuando las condiciones del estrés son extremas, como puede ser una hipoxia severa (Dalla Via et al., 1994) si se

detectaron niveles elevados de lactato, circunstancia coincidente con lo observado en este trabajo.

Una vez determinado que tanto la exposición al aire como la persecución dan lugar a respuestas de estrés de diferente magnitud en los juveniles del *Solea senegalensis*, se estudio la capacidad que tienen los diferentes anestésicos para atenuar ambos tipos de estrés. Los resultados se resumen en la Tabla 6 y coincidieron plenamente con las diferentes características de ambos tipos de estrés. En esta parte de la discusión nos centraremos en los resultados obtenidos en los tiempos de máxima respuesta al estrés, a los 30 min. En el primer caso, con un estrés de baja intensidad (exposición al aire) obviamente la capacidad antiestrés es más difícil de detectar. Se observaron bloqueos parciales o totales para los incrementos de la hemoglobina, glucosa, lactato y del cortisol, con la única excepción del aceite de clavo para el hematocrito. Estudiando el caso de la persecución, un estrés de mayor intensidad, fue más fácil detectar la capacidad antiestrés de los diferentes anestésicos y en la mayoría de las circunstancias, salvo con el 2-fenoxietanol, todos los incrementos de los índices de estrés fueron bloqueados total o parcialmente por el anestésico.

Estrés	Ht			Hb			Glu			Lactato			Cortisol		
	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h
<b>Exposición al Aire</b>															
2-Fe	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓	=
A. clavo	↑	↑	=	↑	↑	=	↓	=	=	↑	↓	↓	↓	↓	=
MS-222	↑	=	↑	↓	↓	↓	↑	=	↑	↓	↓	↓	↓	↓	=
Met.	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓	=	↓	=	=	↓	↓	=

Estrés	Ht			Hb			Glu			Lactato			Cortisol		
	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h	30 min	2 h	24 h
<b>Persecución</b>															
2-Fe	↑	↑	↑	↓	↑	=	↑	↑	↑	↓	=	↓	↑	↓	=
A. clavo	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	=
MS-222	↓	↓	↓	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑
Met.	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

**Tabla 6.** Visión global de la capacidad antiestrés de los anestésicos frente a un estrés agudo (exposición al aire o persecución). En la tabla solo constan las indicaciones de los animales estresados anestesiados frente a los no anestesiados. ↓ o ↑ = disminuciones o incrementos no significativos; ↓ o ↑ = disminuciones o incrementos significativos; = sin efecto.

En este estudio se observó que el uso del MS-222 o del aceite de clavo, según el tipo de estrés, fueron eficientes total o parcialmente en la prevención de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-células interrenales. Estos datos coinciden con la capacidad del MS-222 para bloquear la liberación de cortisol en el



*Sciaenops ocellatus* después de 2 minutos de exposición al aire (Tomas y Robertson, 1991), o del aceite de clavo en el *Ictalurus punctatus* después de un estrés de manipulación (Small, 2003). No obstante, esta potencial capacidad antiestrés no siempre se pudo conseguir dado que hay circunstancias, tanto con el MS-222 como con el aceite de clavo, en las que estos anestésicos fueron incapaces de bloquear los incrementos del cortisol: después de un estrés de manipulación y aglomeración en el *Pimephales promelas* con ambos anestésicos (Palić et al., 2006) y después de un estrés de aglomeración en el *Sparus aurata* con el MS-222 (Molinero y Gonzáles, 1995). Por lo que se observó en este trabajo y en base a los de otros autores parece posible que la capacidad antiestrés de los anestésicos pueda depender del tipo de estrés. No obstante, no se pueden descartar otros parámetros como origen de las discrepancias: diferencias entre especies, tipo y duración del estrés aplicado, diferencias entre las dosis aplicadas y tiempos de exposición al anestésico.

Donde no parece haber dudas es, en primer lugar, en la baja capacidad antiestrés del 2-fenoxietanol, donde nuestros resultados coincidieron con lo observado por Molinero y Gonzáles (1995) en el *Sparus aurata* después de un estrés de aglomeración; y en segundo lugar en la elevada efectividad del metomidato para suprimir el incremento de los niveles de cortisol en ambas situaciones de estrés. Los efectos del metomidato coincidieron con lo observado previamente en otros peces (Thomas y Robertson, 1991; Olsen et al., 1995; Small, 2003, 2004; Palić et al., 2006). La capacidad de este anestésico para suprimir la respuesta del cortisol esta relacionada con su capacidad para inhibir la síntesis (Vanden Bossche et al., 1984; Wagner et al., 1984) y la liberación (Thomas y Robertson, 1991; Olsen et al., 1995) del cortisol.

Finalmente, otro aspecto novedoso deducible de nuestros resultados es que tanto el aceite de clavo como el MS-222 y el metomidato, también tuvieron la capacidad de bloquear la actividad del simpático (la otra respuesta primaria de estrés) con la consiguiente disminución de la liberación de las catecolaminas. Tomando en consideración los resultados, en base al número y magnitud de la capacidad de bloqueo, podríamos secuenciar la eficacia antiestrés de los anestésicos estudiados del siguiente modo: metomidato > MS-222  $\approx$  aceite de clavo > 2-fenoxietanol.

### **Estudio de los efectos de un estrés agudo sobre la actividad de los sistemas monoaminérgicos cerebrales en juveniles de *Solea senegalensis*: efecto del pretratamiento con anestésicos**

Desde hace años se sabe que en los mamíferos los niveles de la serotonina (Krieger, 1978) y/o de las catecolaminas (Holzbauer y Sharman, 1972) son afectados por diferentes tipos de estrés y que estos neurotransmisores pueden estar involucrados en las respuestas cerebrales al estrés (Yuwiler, 1971; McEwen, 1995). Más recientemente se ha demostrado mediante estudios de microdiálisis

cerebral que la aplicación de un estrés agudo se correlaciona con un aumento en los niveles (Chaouloff, 1993) y en la liberación (Shimizu et al., 1992; Yoshioka et al., 1995; Adell et al., 1997; Kirby et al., 1997; Takahashi et al., 1998; Amat et al., 1998) de serotonina en diferentes regiones cerebrales. Del mismo modo también se han encontrado incrementos en el turnover y en la liberación de la dopamina (Abercrombie y Zigmond, 1989; Imperato et al., 1991; Gresch et al., 1994; Finlay et al., 1995; Finlay y Zigmond, 1997; Kawahara et al., 1999; Nakahara y Nakamura, 1999).

Frente a la amplitud de estudios que tratan en los mamíferos el efecto del estrés sobre el sistema serotoninérgico y/o catecolaminérgico, en los peces apenas existen estudios y fundamentalmente están centrados en la acción sobre el sistema serotoninérgico. Por esta razón se estudió el efecto de dos diferentes tipos de estrés agudo sobre la actividad monoaminérgica en tres regiones cerebrales.

Hipotálamo		MHPG	NA	5HT	5HIAA	5HIAA/5HT
	control	13± 2,6	1673± 98	1161±38	279±17	0,24±0,01
2 h	aire	N.D.	1853±97	1331±44	350±37	0,26±0,02
	persecución	N.D.	1835±66	1199±58	330±18	0,28±0,01
24 h	aire	N.D.	1759±56	1428±44 <sup>a#</sup>	327±27	0,23±0,02
	persecución	N.D.	1943±12	1093±35 <sup>b</sup>	361±56	0,33±0,05
Telencéfalo		MHPG	NA	5HT	5HIAA	5HIAA/5HT
	control	11±1,8	1181±61	866±49	320±16	0,38±0,02
2 h	aire	N.D.	1416±21	963±79	385±44	0,40±0,04
	persecución	N.D.	1388±97	891±3	364±17	0,41±0,02
24 h	aire	N.D.	1251±61	913±51	308±28	0,35±0,04
	persecución	N.D.	1320±69	789±43	460±56	0,41±0,03
Tectum óptico		MHPG	NA	5HT	5HIAA	5HIAA/5HT
	control	10±3,2	893±32	580±27	200±14	0,35±0,03
2 h	aire	N.D.	912±31	595±23	264±24	0,45±0,04
	persecución	N.D.	926±40	633±20	308±13 <sup>#</sup>	0,50±0,03
24 h	aire	N.D.	842±26	597±24	251±19	0,45±0,04
	persecución	N.D.	920±30	547±20	274±12 <sup>#</sup>	0,52±0,03

**Tabla 7.** Niveles del MHPG, NA, 5HT, 5HIAA, y de la relación 5HIAA/5HT, 2 y 24 h después de la aplicación del estrés (aire o persecución) (n: 22-24). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) comparando el estrés de persecución frente al estrés de exposición al aire. # Diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) frente al control (n: 10). Los niveles de los neurotransmisores son presentados en  $\text{pg mg}^{-1}$  tejido. N.D.: no detectado.

En primer lugar y de un modo sorprendente se observó que ninguno de los dos tipos de estrés modificaba significativamente los parámetros estudiados. Sólo se detectaron incrementos significativos en los niveles de la 5HT en el hipotálamo y del 5HIAA en el tectum óptico después de un estrés de exposición al aire y de

persecución, respectivamente (Tabla 7). En principio estos resultados coinciden en parte con lo observado en las truchas después de someterlas a un estrés de confinamiento durante 1 hora, en la que no se detectaron modificaciones significativas en la relación 5HIAA/5HT (índice actividad serotoninérgica, ver pag. 202) en el hipotálamo y tectum óptico, aunque si encontraron incrementos en el telencéfalo (Øverli et al., 2005). Sin embargo, a partir de los datos de nuestro trabajo sí se pudieron plantear ciertas tendencias útiles para la discusión. Así en el hipotálamo de los peces con exposición al aire se observaron incrementos de los niveles de la 5HT y del 5HIAA sin ninguna modificación de su relación, lo que puede estar reflejando un aumento de la síntesis de la serotonina, pero posiblemente sin un cambio en la actividad neuronal serotoninérgica (Commissiong, 1985). En la otra región que se puede generalizar una acción es en el tectum óptico, dado que con cualquiera de las dos formas de estrés hay una tendencia al aumento de los niveles del 5HIAA con un incremento asociado de la relación 5HIAA/5HT que puede llegar a ser de un 42% en el caso de la persecución. En este último caso si podríamos hablar de una tendencia al aumento de la actividad serotoninérgica, que en base a dicha relación ya se vislumbraba en las otras dos regiones estudiadas. Estas tendencias coinciden con lo observado en salmónidos (mayoritariamente en estrés social y disminución de la columna de agua) (McIntyre et al., 1979; Winberg et al., 1992; Winberg y Nilsson, 1993; Edwards y Kravitz, 1997; Øverli et al., 1999; Lepage et al., 2002; Cubitt et al., 2008), pero se diferencian en la magnitud que es significativamente mayor en los salmónidos. Por otra parte, existen trabajos de exposición a diferentes condiciones de anoxia e hipoxia sobre los niveles de neurotransmisores, pero son exposiciones a largo plazo y fueron realizados en la carpa (*Carassius carassius* L.), un pez tolerante a la anoxia. En estas circunstancias lo que se ha observado es una caída del metabolismo de la serotonina (Nilsson, 1989a, 1990a, 1990b); evidentemente ni los resultados ni las condiciones son comparables.

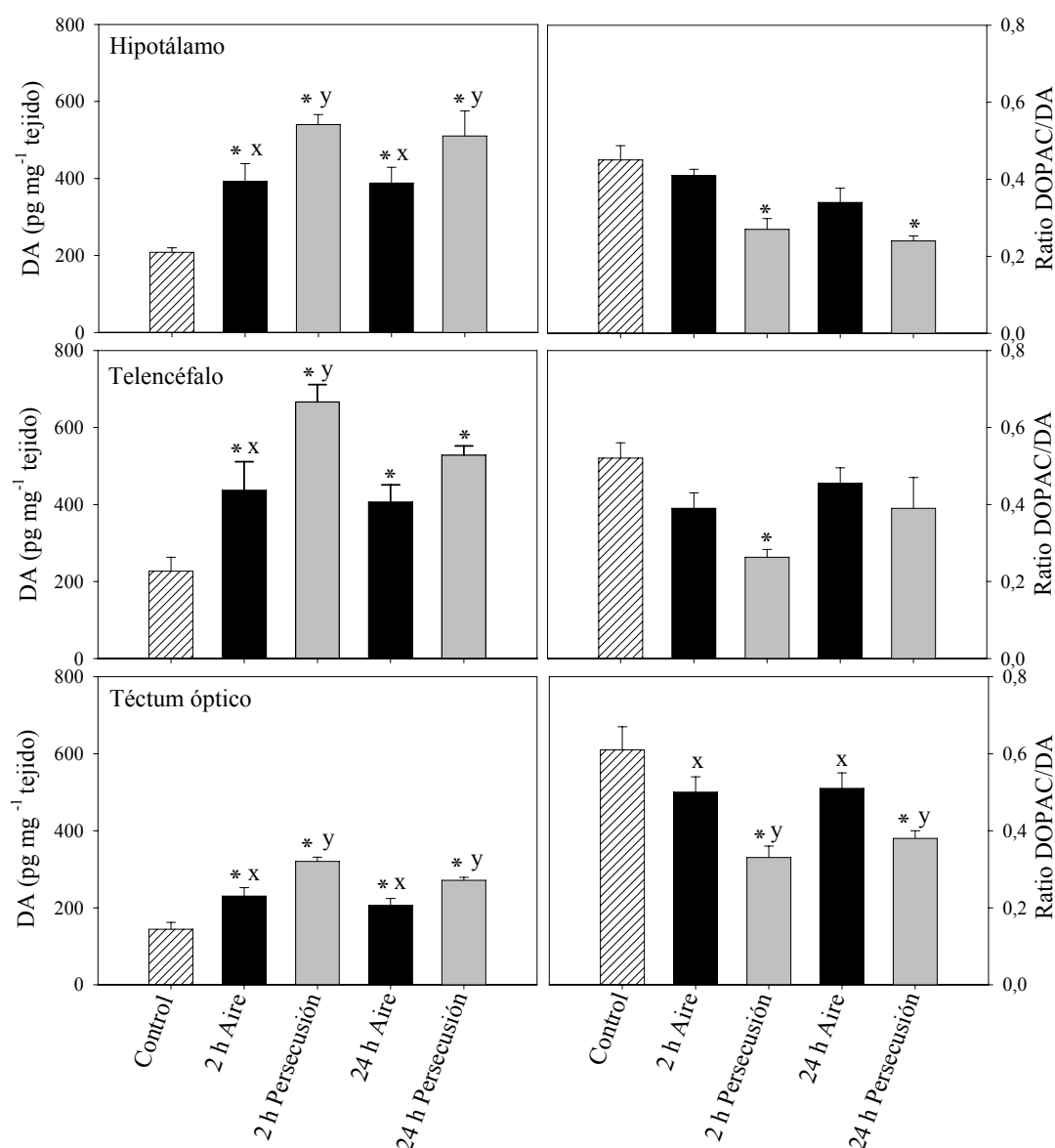
En resumen, contrariamente a lo esperado los resultados ponen de manifiesto que la acción de ambos tipos de estrés sobre el sistema serotoninérgico es poco importante y mayoritariamente no significativa. Bien es cierto que la mayoría de los trabajos donde se observó un aumento del metabolismo o de la actividad de la 5HT en los peces, se centran en un estrés relacionado con el estatus social (dominancia), agresión y otros. Estos datos ponen de manifiesto, que al igual que en los mamíferos, la actividad serotoninérgica en las diferentes estructuras cerebrales es diferente según sea el factor estresante aplicado (Adell et al., 1997; Kirby et al., 1997).

Un aspecto interesante que se puede discutir en base a los resultados de este trabajo, es el relacionado con la posible interacción entre el sistema serotoninérgico y su capacidad para activar el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal. Se ha comprobado que en la trucha arco iris la administración del 8-OH-DPAT, un agonista 5HT<sub>1A</sub>, induce un incremento a corto plazo de los niveles de cortisol (Winberg et al., 1997) y que el sistema serotoninérgico puede modular, positiva o

negativamente, la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (Lepage et al., 2002). En base a sus resultados Winberg et al. (1997) plantearon que en los peces al igual que en los mamíferos, el sistema 5HT podría jugar un importante papel en la integración de las respuestas autonómica, comportamental y neuroendocrina al estrés. No obstante si observamos los resultados de este trabajo se comprueba que en los tiempos de estudio de la actividad de los neurotransmisores, 2 y 24 h, no hay ninguna correlación con los niveles plasmáticos del cortisol. De este modo, nuestros datos no parecen indicar que esta interrelación 5HT-cortisol sea tan evidente, al menos en el lenguado. Apoyando esta idea se sabe que: i) en los mamíferos no es generalizable la correlación entre los efectos del estrés sobre el sistema serotoninérgico y su capacidad para activar el eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal (Kirby et al., 1997), y ii) en el lenguado la distribución cerebral del sistema serotoninérgico es diferente al de otros teleósteos, por ejemplo no se encuentran neuronas inmunoreactivas a la 5HT en el área preóptica y en los núcleos talámicos y hay ausencia de fibras inmunoreactivas a la 5HT en la neurohipófisis (Rodríguez-Gomez et al., 2000). Este hecho es muy importante dado que el eje endocrino involucrado en las respuestas al estrés realmente es el eje NPO-hipófisis-interrenales (Flik et al., 2006). Todo ello hace que en el lenguado aún está por determinar el posible papel de la 5HT en la regulación adenohipofisaria (Rodríguez-Gomez et al., 2000) y que no se pueda utilizar como patrón general lo observado en sólo una especie de teleósteo.

Los resultados de este trabajo sobre las acciones del estrés en el sistema dopaminérgico son totalmente inéditos (Figura 109). Se demostró un claro efecto en las tres regiones cerebrales estudiadas sobre los niveles de los parámetros del sistema dopaminérgico. En este caso se puede hablar de una respuesta global uniforme a los dos diferentes factores de estrés utilizados, destacando el incremento de los niveles de la DA y la caída de la relación DOPAC/DA en las tres regiones cerebrales estudiadas. No obstante, es patente que la acción del estrés de persecución sobre estos parámetros es de mayor magnitud que la de la exposición al aire, lo que concuerda con lo que se dedujo previamente de que el estrés de persecución es percibido por el pez como un factor perturbador de elevada intensidad y superior al de la exposición al aire. Considerando la relación DOPAC/DA como un buen índice de la actividad dopaminérgica y que el incremento de los niveles de DA es una consecuencia de la disminución de su utilización, parece evidente que los dos estrés aplicados provocan una inhibición de su actividad, mayor en el caso de la persecución. Al no existir datos en peces para comparar, sólo indicar que en los mamíferos el estrés agudo generalmente da lugar a un incremento de la liberación de DA en regiones tales como el estriado, el núcleo accumbens y la corteza frontal (Abercrombie et al., 1989; Finlay et al., 1995; Finlay y Zigmond, 1997; Kawahara et al., 1999). Estos resultados son claramente contrarios a los observados por nosotros. Con respecto al metabolismo de la NA no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas y únicamente podemos comentar que existe una tendencia general a un incremento de los niveles de la NA, lo que coincide con lo observado

en el caso de la DA. Lo más llamativo es que los niveles del MHPG (Tabla 7), metabolito de la NA, no fueron detectables en la mayoría de los análisis realizados en las regiones cerebrales estudiadas y por esta razón no se realizaron las relaciones MHPG/NA. No obstante se puede suponer que los resultados están reflejando una ligera caída de la actividad noradrenérgica, comparativamente mucho menor que la de la dopaminérgica. Nuevamente estos resultados contradicen los indicados para mamíferos, en los que diferentes tipos de estrés agudo incrementan la liberación de NA (Kalen et al., 1989; Rossetti et al., 1990; Yokoo et al., 1990; Tanaka et al., 1991).



**Figura 109.** Niveles de la DA y de la relación DOPAC/DA, 2 y 24 h después de la aplicación del estrés (aire o persecución) (n: 22-24). Diferentes letras indican diferencias

significativas ( $P < 0,005$ ) comparando el estrés de persecución frente al estrés de exposición al aire. \* Diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) frente al control (n: 10).

Considerando que la DA puede estar modulando de un modo inhibitorio la secreción de ACTH (Olivereau et al., 1988), la primera interpretación fisiológica que se puede realizar es que de algún modo la inhibición generalizada de la actividad dopaminérgica puede ser un factor mediador de la liberación de la ACTH y por tanto de la secreción del cortisol a corto plazo (2 h), dado que en nuestro trabajo se observa que con el estrés de persecución los máximos niveles de cortisol se corresponden a la máxima inhibición dopaminérgica cerebral.

No obstante se puede plantear otra posible explicación lógica a la respuesta dopaminérgica no relacionada con la regulación de la secreción del cortisol, sino con una respuesta de miedo. Se sabe que el miedo forma parte del comportamiento de adaptación a estímulos amenazantes como es el estrés de exposición al aire y en mayor medida el estrés de persecución. Se sabe que: i) en el telencéfalo de los peces existen estructuras que son funcionalmente homólogas a aquellas asociadas con el dolor y el miedo en los vertebrados superiores (Chandroo et al., 2004; Portavella et al., 2004), y ii) los peces poseen un sistema dopaminérgico similar al que en los vertebrados superiores está implicado en el control de la expresión del comportamiento asociado a las emociones y en la mediación de los mecanismos del miedo (Chandroo et al., 2004), por lo que se piensa que los mecanismos básicos cerebrales que subyacen al miedo pueden ser similares en las diferentes especies animales (Pezze y Feldon, 2004; Ashley y Sneddon, 2008). Además se sabe que en los mamíferos la DA es el neurotransmisor más importante en la modulación de los mecanismos que subyacen a los estados aversivos como el miedo, dolor o estrés (Levita et al., 2002; Pezze y Feldon, 2004; Ventura et al., 2007). Tomando con cautela todos estos hechos se podría especular con que la inhibición de la actividad dopaminérgica generalizada observada en este experimento, estaría relacionada con los mecanismos neuronales de la respuesta al miedo y/o dolor desencadenada por las traumáticas situaciones de estrés inducidas a los peces, y mayor en el caso del estrés de persecución.

Finalmente indicar que el uso de los anestésicos fue incapaz de bloquear las modificaciones significativas observadas en el caso del sistema dopaminérgico. Parece evidente que así como los anestésicos fueron capaces de bloquear, con mayor o menor eficacia, las respuestas primarias y secundarias al estrés no fueron capaces de bloquear las alteraciones del sistema dopaminérgico. Esta circunstancia soporta la hipótesis planteada previamente sobre el posible papel del sistema dopaminérgico en los mecanismos relacionados con el miedo y/o dolor. Con respecto al sistema serotoninérgico solo se consiguieron bloqueos significativos en el incremento de la actividad serotoninérgica en el hipotálamo y en el telencéfalo, 2 horas después de la exposición al aire con el aceite de clavo, y

en el hipotálamo 24 h después de la exposición al estrés de persecución con el MS-222.

### Exposición al amoníaco

Se ha observado que en diferentes especies de peces la exposición (12, 24, 96 horas) a unos niveles elevados de amoníaco provoca estrés (Jeney et al., 1992; Ortega et al., 2005; Abbas, 2006). Por el contrario existen estudios donde se comprueba que los peces son capaces de adaptarse a la exposición crónica (52 y 84 días) a bajos niveles de amoníaco ( $< 11,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) y restablecer la homeostasis (Person Le Ruyet et al., 2003; Pinto et al., 2007).

En los teleósteos, el amoníaco es el principal material de desecho nitrogenado proveniente del catabolismo de los aminoácidos (Randall y Wright, 1987). Tanto el alimento no consumido como los residuos orgánicos pueden incrementar los niveles de amoníaco en el agua de cultivo. En esta, el amoníaco está presente en la forma no ionizada ( $\text{NH}_3$ ) e ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), siendo la proporción relativa de ambas formas dependiente de la temperatura, pH y salinidad (Bower y Bidwell, 1978). La forma no ionizada es la más tóxica para los organismos acuáticos, aunque también se indicó algún nivel de toxicidad por parte de la forma ionizada (Meade, 1985). La principal vía de entrada del amoníaco no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) son las branquias, ya que puede pasar fácilmente (difusión pasiva) a través del epitelio branquial (Hampson, 1976), que a su vez es muy poco permeable al amoníaco ionizado (Alabaster y Lloyd, 1980; Sheehan y Lewis, 1986). Por esta razón en los peces, la exposición a elevadas concentraciones de amoníaco provoca un rápido e importante incremento en sus niveles plasmáticos (Avella y Bornancin, 1989; Wilson y Taylor, 1992). Pero además, se comprobó que el amoníaco no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) también puede cruzar libremente la barrera hematoencefálica y así alcanzar el cerebro (Cooper et al., 1979). Esto quiere decir que la exposición al amoníaco no ionizado no solo puede ser la causa de estrés sino también de una disfunción cerebral.

En nuestro trabajo se comprobó que la exposición al  $\text{NH}_3$  da lugar a incrementos paralelos en los niveles del hematocrito y de la hemoglobina, aunque sólo significativos en el último caso. De un modo similar también se encontraron incrementos, de estos dos parámetros, después de la exposición al amoníaco ( $500 \mu\text{M}$ ) durante 24 h en el *Oncorhynchus mykiss* (Vedel et al., 1998). No obstante, los valores de estos dos parámetros sanguíneos obtenidos por otros autores en peces sometidos a una exposición al amoníaco son confusos y contradictorios. Se observaron disminuciones de los niveles del hematocrito y de la hemoglobina en los siguientes casos: i) en el *Oreochromis niloticus* expuesto durante 96 horas (16,6% del  $\text{LC}_{50}$ ) (Ahmed et al., 1992), ii) en el *Ctenophryngodon idella* expuesto a una concentración aguda de amoníaco (Salah El-Deen, 1999), y iii) en el *Cyprinus carpio* después de una exposición al amoníaco ( $\text{LC}_{50}$ ) durante 96 h (Abbas, 2006). Por el contrario, la exposición

aguda a concentraciones subletales y letales de amoníaco no provocó ningún cambio significativo de sus niveles en el *Labeo capensis* y en el *Salmo gairdneri* (Hattingh, 1976; Smart, 1978).

Se sabe que la liberación de las catecolaminas como resultado de una respuesta al estrés (Wendelaar Bonga, 1997) da lugar a la contracción del bazo y a la liberación de los eritrocitos almacenados a la circulación (Ellis et al., 1978), provocando así un incremento en el hematocrito y hemoglobina en la sangre (Wojtaszek et al., 2002). Por lo que se puede deducir, que como consecuencia del estrés por exposición al  $\text{NH}_3$ , el incremento del hematocrito y de la hemoglobina observado en este trabajo esta reflejando una activación del sistema nervioso simpático lo suficientemente importante como para modificar dichos parámetros.

De un modo similar a lo encontrado en este trabajo, otros autores también observaron una elevación en los niveles de la glucosa y del lactato plasmáticos en peces expuestos a  $1\text{-}4\text{ mg L}^{-1}\text{ NH}_3$  (Shaffi, 1980). Esta hiperglucemia es probablemente consecuencia de la acción estimuladora de las catecolaminas y/o del cortisol sobre la glucogenolisis y la gluconeogénesis en el hígado (Wendelaar Bonga, 1997). En concordancia con este hecho se observó que peces expuestos a elevadas concentraciones de  $\text{NH}_3$  presentan una caída de los niveles del glucógeno hepático y muscular (Shaffi, 1980; Miron et al., 2008). Lo que a su vez nos permite plantear la hipótesis de que el incremento en los niveles plasmáticos de lactato estaría asociado a su uso como sustrato para la gluconeogénesis, estimulada por el cortisol (Mommensen et al., 1999). Con respecto a los niveles del cortisol siempre se observó un incremento, aunque sólo significativo 24 h después de la exposición al  $\text{NH}_3$ . Incrementos similares también fueron observados después de la exposición al  $\text{NH}_3$  durante 3,75 h, 8 h y 48 h en el *Scophthalmus maximus*, *Ictalurus punctatus*, y *Fundulus heteroclitus* respectivamente (Tomasso et al., 1981; Spotte y Anderson, 1989; Person Le Ruyet et al., 1998). Teniendo en cuenta los resultados, parece evidente que la exposición al amoníaco desencadenó en el lenguado una respuesta típica de estrés, con la activación del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, donde ambos estarían implicados en el desencadenamiento de las respuestas secundarias estudiadas en este trabajo.

Tal y como se comentó previamente el  $\text{NH}_3$  puede alcanzar fácilmente el cerebro y de este modo alterar la función cerebral. En los mamíferos se sabe que el cerebro es muy sensible al exceso de amoníaco (Guroff, 1979), afectando no solo a la transmisión nerviosa mediada por numerosos sistemas de neurotransmisores, sino también a la función mitocondrial y al metabolismo energético cerebral y a los astrocitos (Szerb y Butterworth, 1992; Kosenko et al., 1994; Butterworth, 1998; Monfort et al., 2002; Felipe y Butterworth, 2002). No obstante, aunque hay muy pocos estudios, los peces no parecen responder del mismo modo o en la misma intensidad que los mamíferos a la intoxicación por el amoníaco, así se ha comprobado que: i) son menos sensibles, más tolerantes, a la



intoxicación por el amoniaco que los mamíferos (Arillo et al., 1981; Ip et al., 2001) y ii) en el *Opsanus beta*, un pez muy tolerante al amoniaco, la función mitocondrial esta mucho menos afectada que en los mamíferos (Clémence et al., 2002).

El amoniaco es un contaminante acuático bastante común en los cultivos intensivos del que se sabe inhibe la ingesta en diversas especies de peces (Beamish y Tandler, 1990; Wicks y Randall, 2002a). Incluso autores han relacionado esta inhibición de la ingesta con alteraciones de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en la trucha arco iris (Ortega, 2005). Dado que parece evidente que una de las dianas principales del amoniaco es la función cerebral, en este trabajo se planteó estudiar el efecto de la intoxicación aguda, una exposición durante 12 y 24 h al amoniaco, sobre diversos sistemas de neurotransmisión cerebrales.

En general la exposición al amoniaco indujo una serie de modificaciones sobre el sistema dopaminérgico muy similares en todas las regiones cerebrales estudiadas (hipotálamo, telencéfalo y tectum óptico). En este patrón de modificaciones se observaron caídas de los niveles de la DA a las 12 y 24 h de exposición, ninguna alteración significativa de los niveles del DOPAC y un incremento dependiente del tiempo de exposición de la relación DOPAC/DA. Es importante indicar que no se observaron alteraciones significativas en los niveles de la NA en prácticamente ninguna de las regiones cerebrales. Curiosamente las modificaciones encontradas en el sistema serotoninérgico siguen exactamente las mismas pautas que las indicadas para el dopaminérgico, con un incremento dependiente de la exposición en la relación 5HIAA/5HT en todas las regiones estudiadas. A nivel hipotalámico la variación de los niveles de la 5HT y de la relación 5HIAA/5HT coincide plenamente con lo observado por Ortega et al. (2005), pero no coincide con lo observado en los niveles del 5HIAA y con la ausencia de acciones en el telencéfalo. Por otra parte, los resultados coinciden plenamente con lo observado por Ronan et al. (2007) en el *Pimephales promelas* 48 h después de la exposición a diferentes concentraciones de amoniaco, salvo en el caso de la NA en la que dichos autores siempre encontraron caídas significativas de los niveles de la NA. Comparativamente, en los mamíferos se observó una mayor variabilidad en los resultados de los estudios de hiperamoniemia, así: i) se han determinado incrementos en los niveles del 5HIAA sin cambios en los de la 5HT e incrementos en la relación 5HIAA/5HT (Jessy et al., 1990; Bergeron, 1990), ii) ningún cambio en los niveles de la DA y en la relación DOPAC/DA (Bugge et al., 1989; Jessy et al., 1990; Scorticati et al., 2006) y iii) se han observado incrementos (Scorticati et al., 2006), disminuciones (Bugge et al., 1989) o ningún efecto (Jessy et al., 1990) en los niveles de la NA.

Vistos nuestros resultados, inicialmente se puede deducir que el efecto de la exposición al amoniaco sobre los sistemas aminérgicos cerebrales estudiados es una acción generalizada y no región-específica. No obstante, la interpretación de

los resultados es más compleja. Se sabe que la relación 5HIAA/5HT y DOPAC/DA se utiliza rutinariamente, no solo en mamíferos sino también en peces, como un índice de la tasa de liberación del neurotransmisor (Aldegunde et al., 1999; Ruibal et al., 2002; Soengas y Aldegunde, 2004; Aldegunde y Mancebo, 2006). Con estos principios, no habría ninguna duda en concluir que los incrementos de las relaciones 5HIAA/5HT y DOPAC/DA observadas en las diferentes regiones cerebrales son el reflejo de un aumento de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica. Esta interpretación, aumento de la actividad 5HT y DA, es coincidente con lo sugerido por Ortega et al. (2003) en la trucha y por Bergeron (1990) en mamíferos.

Con respecto a esta hipótesis existen datos contundentes que la soportan. En primer lugar, hay numerosos estudios que indican que el amoniaco o la hiperamoniemia incrementan el transporte de los aminoácidos neutros (triptófano y tirosina) a través de la BBB (Mans et al., 1983; Bergeron et al., 1990; Jessy, 1990; Felipo y Butterworth, 2002) incrementando su disponibilidad en el cerebro (Curzon et al., 1973; Cummings et al., 1976; Mans et al., 1979). En relación con el incremento en el transporte de aminoácidos al cerebro se sabe que en los mamíferos la eliminación del exceso de amoniaco por el cerebro esta asociada a un incremento de la producción de glutamina cerebral (Butterworth, 1998). Un mecanismo de detoxificación cerebral similar, con el consiguiente incremento final de la glutamina cerebral, también se ha demostrado en los peces (Arilo et al., 1981; Walsh y Milligan, 1995; Vedel et al., 1998; Peng et al., 1998; Jow et al., 1999; Wicks y Randall, 2002b). Y es precisamente este incremento de la glutamina cerebral quien, al menos en los mamíferos, aumenta el transporte de los aminoácidos al cerebro con el consiguiente incremento de sus niveles cerebrales (Hawkins et al., 1973; Bachmann y Colombo, 1984). Teniendo en cuenta que el transporte de aminoácidos neutros al cerebro tiene unas características similares al de mamíferos (Aldegunde et al., 1998) no es nada aventurado pensar que la glutamina cerebral proveniente de la detoxificación del amoniaco esté favoreciendo el paso de los aminoácidos triptófano y tirosina al cerebro en el lenguado. Con respecto al triptófano, de modo similar a lo observado en los mamíferos, en los peces el aumento de la disponibilidad del triptófano en el cerebro incrementa la síntesis cerebral de la 5HT (Aldegunde et al., 2000). Por otra parte, la relación entre el incremento de la tirosina y la síntesis de catecolaminas en el cerebro es más controvertida. Se sabe que en condiciones fisiológicas normales la tirosina hidroxilasa, aunque no completamente, presenta un grado de saturación elevado (desde sólo un 50% a la casi totalidad) por su sustrato, la tirosina (Morgenroth et al., 1976). Por esta razón la tirosina hidroxilasa es el factor limitante de la síntesis de DA (Cooper et al., 2002), por lo que la administración de tirosina no debería de afectar a la síntesis/liberación de la DA. Sin embargo este principio no parece cumplirse en todas las circunstancias dado que: i) hay autores que indican que el aumento de la disponibilidad de la tirosina puede ser uno de los factores que controlan la síntesis de las catecolaminas cerebrales (Gibson y Wurtman, 1977), y ii) hay autores que demuestran que el

aumento de la disponibilidad de tirosina puede aumentar la síntesis y liberación de la DA cuando la actividad de las neuronas dopaminérgicas esta incrementada (Melamed et al., 1980) o cuando el incremento de la tirosina se asocia con la administración de drogas que activan la síntesis y liberación de la DA (Scally et al., 1977; Jaskiw et al., 2004). Evidentemente en este trabajo no se puede hablar de condiciones fisiológicas normales, dado que los animales están expuestos al amoníaco, y se ha indicado que en los mamíferos este puede incrementar la excitabilidad neuronal (Butterworth, 1998) y alterar el almacenamiento y liberación “in vivo” de la 5HT y/o DA (Bergqvist et al., 1996; Butterworth, 1998; Anderzhanova et al., 2003). Ambas premisas, según lo indicado previamente, sustentan la posibilidad de que el aumento de la disponibilidad de la tirosina pueda favorecer el incremento de la síntesis y liberación de la DA.

En relación con la acción liberadora promovida por el amoníaco, se ha demostrado que la alcalinización causada por el amoníaco induce el vaciado al citoplasma de las aminas almacenadas en las vesículas y su posterior liberación (no exocitótica) a la hendidura sináptica por medio de un mecanismo de retrotransporte (Butterworth, 1998). Por otra parte, y recordando lo comentado previamente de que la exposición al amoníaco afecta a la permeabilidad de la BBB (barrera hematoencefálica) y al transporte de aminoácidos neutros, indicar que estos cambios podrían ser suficientes para que no tuviera lugar una competencia entre los aminoácidos neutros para su transporte al cerebro. En resumen existen una serie de mecanismos, no excluyentes entre si, promovidos por la intoxicación con el amoníaco (aumento de la síntesis de la 5HT y DA por aumento de la disponibilidad de sus precursores y aumento de su liberación por una acción directa) que soportan nuestra interpretación de que el incremento de las relaciones metabolito/neurotransmisor observadas en este trabajo están reflejando un aumento de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica.

No obstante y retomando el concepto de que la relación 5HIAA/5HT y DOPAC/DA se utiliza rutinariamente como un índice de la tasa de liberación del neurotransmisor, no podemos obviar que la monoamina oxidasa (MAO A) es la enzima involucrada en la desaminación oxidativa de estos neurotransmisores. Por ello cualquier modificación de su actividad podría hacer perder peso a la información que se deduce de esas relaciones. En relación con este hecho son muy pocos los trabajos que estudiaron el posible efecto del amoníaco sobre la actividad MAO, todos ellos en mamíferos y por desgracia poco comparables, observándose que 11 min después de la administración de acetato de amonio se detectó un incremento de la actividad MAO A en las mitocondrias no sinápticas (Kosenko et al., 2003). Por el contrario también se observó que la administración de cloruro de amonio disminuye la actividad MAO A en diversas regiones cerebrales (Sadadivudu y Murthy, 1978) o que la hiperamonemia no altera la actividad MAO A (Rao *et al.*, 1994). En cualquier caso, en nuestro trabajo la caída de los niveles de la 5HT descarta una inhibición de la actividad MAO y sólo podría explicarse por un aumento de su actividad. No obstante, si esto fuera así tendría

que detectarse no sólo una caída de los niveles de la 5HT sino también un aumento de los niveles del 5HIAA en la misma proporción, cosa que no ocurre. Curiosamente en el único trabajo con exposición crónica al amoniaco (hiperamoniemia) no se observó ningún efecto sobre la actividad MAO. En resumen seguimos considerando que las relaciones están reflejando un aumento de la actividad de dichos sistemas de neurotransmisores.

Recientemente se ha sugerido la posibilidad de que la caída de los niveles de la 5HT y DA por la acción del amoniaco sea consecuencia de una disminución de la capacidad de hidroxilación del triptófano y de la tirosina (Ronan et al., 2007). Esta hipótesis se basa en el hecho de que las enzimas involucradas en la síntesis de las monoaminas, la triptófano y la tirosina hidroxilasa, requieren del oxígeno molecular y de un cofactor pteridínico como fuente de electrones. De este modo, la posible disminución de la disponibilidad del oxígeno como consecuencia del estrés disminuiría su actividad y por tanto la síntesis de las monoaminas. No obstante esta hipótesis debe descartarse en base a los siguientes razonamientos: i) la caída de la síntesis de la 5HT y DA implicaría la caída de la síntesis de los metabolitos con la consiguiente caída de sus niveles, hecho que no ocurre en este trabajo, ii) en los mamíferos se sabe que en condiciones de anoxia o hipoxia disminuye la hidroxilación del triptófano (Davis y Carlsson, 1973; Davis et al., 1973) y que dicha tasa de hidroxilación varía proporcionalmente con la  $PO_2$  tisular (Carlsson et al., 1977). Sin embargo, la hidroxilación de la tiroxina no sigue las mismas pautas de dependencia del oxígeno (Carlsson et al., 1977). A pesar de estas diferencias, en este trabajo, tanto la 5HT como la DA sufren variaciones similares, siendo lo más chocante que los niveles de la NA regulados por la misma enzima que los de la DA, la tirosina hidroxilasa, no se ven significativamente afectados, iii) Nilsson (1990a) postula que la síntesis de los neurotransmisores aminérgicos cerebrales en los peces es mucho menos sensible a la anoxia que en el caso de los mamíferos. Basa su hipótesis en el hecho demostrado de que la síntesis cerebral de la 5HT y de las catecolaminas es mucho más lenta en el cerebro de los peces y por tanto menos vulnerable. Esta hipótesis se soporta claramente en los siguientes trabajos de exposición (horas a días) a situaciones extremas de anoxia en la carpa: después de 22 h de anoxia los niveles de la 5HT cayeron sólo un 15% con una caída drástica (80-90%) del 5HIAA (Nilsson, 1989a); después de una semana de anoxia los niveles de la DA y NA cayeron sólo un 17 % (Nilsson, 1989b), y 17 días después de la anoxia los niveles cerebrales de 5HT, DA y NA no sufrieron caídas notables (Nilsson, 1990b). Aun siendo la carpa un pez tolerante a la anoxia se observa que los perfiles de las variaciones no son ni similares a los observados en este trabajo, y iv) consideramos que en los peces sometidos a nuestras condiciones experimentales nunca va a tener lugar una situación de anoxia, como máximo de hipoxia ligera. Tal y como se ha visto anteriormente, la exposición al amoniaco activa el sistema nervioso simpático, cuya primera función es la de aumentar el aporte de oxígeno a los tejidos (Reid et al., 1998), fundamentalmente al cerebro. Evidentemente la mayoría del lactato plasmático detectado proviene fundamentalmente del músculo

e hígado (Miron et al., 2008) y no del cerebro. Teniendo en cuenta el hecho de que, de existir, la hipoxia en el cerebro sería poco intensa y de que la síntesis de las monoaminas presenta una baja sensibilidad a la hipóxia, parece evidente que esta posible vía de acción del amoniaco asociada a la hipoxia cerebral es muy poco probable.

En resumen, por todo lo expuesto se puede concluir que la exposición al amoniaco estimula la actividad cerebral de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en el lenguado *Solea senegalensis*.

## 7. Conclusiones



1. Las características que definen a cada uno de los diferentes estadios de la anestesia, inducción y recuperación, son similares a las indicadas previamente para otros peces no planos.
2. Las mínimas dosis efectivas, con las que se consiguieron tiempos de inducción y de recuperación inferiores a los 3 y 5 min respectivamente, fueron las siguientes: 600 mg L<sup>-1</sup> para el 2-fenoxietanol, 5 mg L<sup>-1</sup> para el metomidato, 30 mg L<sup>-1</sup> para el aceite de clavo y 75 mg L<sup>-1</sup> para el MS-222.
3. Los tiempos de inducción siempre fueron dependientes de la dosis, disminuyendo con su aumento. No obstante, los tiempos de recuperación no fueron siempre dependientes de la dosis.
4. Solo en los siguientes casos se alcanzó, en menos de 3 minutos (estadio II de anestesia), una profundidad anestésica que permitió una extracción de sangre: con el 2-fenoxietanol (600 mg L<sup>-1</sup>) y el metomidato (6 y 8 mg L<sup>-1</sup>) para peces de 74 ± 4 g, y con el 2-fenoxietanol (600 mg L<sup>-1</sup>), metomidato (8 mg L<sup>-1</sup>) y MS-222 (200 mg L<sup>-1</sup>) para peces de 213 ± 15 g.
5. La exposición prolongada al 2-fenoxietanol (500 mg L<sup>-1</sup>), aceite de clavo (80 mg L<sup>-1</sup>), MS-222 (200 mg L<sup>-1</sup>) y al metomidato (6 mg L<sup>-1</sup>) provocó una serie de respuestas primarias y secundarias de estrés, con una clara tendencia a la recuperación de los valores basales a las 24 horas.
6. Los datos permiten deducir que los cuatro anestésicos activaron, aunque con diferente grado de intensidad, el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal; pero ninguno activó de un modo importante la otra respuesta primaria de estrés, el sistema nervioso simpático. De todos ellos el metomidato es el agente anestésico menos estresante.
7. Al evaluar el estrés de exposición al aire y el de persecución se observaron diferencias importantes, entre las que destaca el hecho de que el estrés de exposición al aire no indujo una importante activación del sistema nervioso simpático (eje hipotálamo-simpático-células cromafines). Parece evidente que la capacidad estresante de la exposición al aire es inferior a la de la persecución.
8. Las evidencias sugieren que la liberación de las catecolaminas (activación del sistema nervioso simpático) sólo tiene lugar bajo condiciones de un estrés intenso.
9. En base a la capacidad de bloquear los indicadores de estrés evaluados, podríamos secuenciar la eficacia antiestrés de los anestésicos del siguiente modo: metomidato > MS-222 ≈ aceite de clavo > 2-fenoxietanol.



10. Los resultados (acción estresante y eficacia antiestrés) nos permiten concluir que “a priori” el metomidato es el agente anestésico más adecuado para su uso en las manipulaciones rutinarias del cultivo del lenguado.
11. Ninguna de las dos clases de estrés alteró de un modo importante la actividad del sistema serotoninérgico. Los resultados ponen en duda su capacidad para activar el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal durante el estrés, en el lenguado.
12. En el caso del sistema dopaminérgico, la respuesta a los dos diferentes factores de estrés utilizados fue global y uniforme: una caída de la actividad dopaminérgica, mayor en el caso del estrés de persecución. Consideramos que esta inhibición generalizada forma parte de los mecanismos neuronales de la respuesta al miedo y/o al dolor desencadenada por las traumáticas situaciones de estrés inducidas a los peces.
13. Ninguno de los anestésicos evaluados fue capaz de bloquear las alteraciones del sistema dopaminérgico inducidas por el estrés.
14. La exposición al amoníaco estimuló en el lenguado la actividad del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, con las consiguientes consecuencias (respuestas secundarias). Parece evidente que el lenguado percibe la exposición al amoníaco como un estrés de elevada intensidad.
15. La respuesta de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico a una exposición al amoníaco fue global y uniforme: una estimulación de la actividad cerebral de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico.

## 8. Bibliografía



- Aas-Hansen, O., H. K. Johnsen, M. M. Vijayan, E. H. Jorgensen. 2003. Development of seawater tolerance and concurrent hormonal changes in fed and fasted Arctic charr at two temperature regimes. *Aquaculture*, 222: 135-148.
- Abbas, H. H. 2006. Acute toxicity of ammonia to common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*) at different pH levels. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 2215-2221.
- Abercrombie, E. D., K. A. Keefe, D. S. DiFrischia, M. J. Zigmond. 1989. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 52: 1655-1658.
- Abercrombie, E. D., y M. J. Zigmond. 1989. Partial injury to central noradrenergic neurons: reduction of tissue norepinephrine content is greater than reduction of extracellular norepinephrine measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience*, 9: 4062-4067.
- Adell, A., J. M. Casanovas, F. Artigas. 1997. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*, 36: 735-741.
- Ahmed, N. A., S. S. El-Serafy, A. A. M. El-Shafey, N. A. H. Abdelhamide. 1992. Effect of ammonia on some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Proceedings of the Zoological Society, Arab Republic of Egypt*, 23: 155-160.
- Alabaster, J. S., y R. Lloyd. 1980. Water quality criteria for freshwater fish, 2nd edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Butterworth's, London. p. 361.
- Aldegunde M., y M. Mancebo. 2006. Effect of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Peptides*, 27: 719-727.
- Aldegunde, M. 1998. El sistema serotoninérgico cerebral en vertebrados e invertebrados. *Revista Real Academia Galega de Ciencias* vol. XVII: 121-178.
- Aldegunde, M., J. Garcia, J. L. Soengas, G. Rozas. 1998. Uptake of tryptophan into brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology*, 282: 285-289.
- Aldegunde, M., J. L. Soengas, C. Ruibal, M. D. Andrés. 1999. Effects of chronic exposure to  $\gamma$ -HCH (lindane) on brain serotonergic and gabaergic systems, and serum cortisol and thyroxine levels of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 325-330.
- Aldegunde, M., J. L. Soengas, G. Rozas. 2000. Acute effects of L-tryptophan on tryptophan hydroxylation rate in brain regions (hypothalamus and medulla) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology*, 286: 131-135.
- Amat, J., P. Matus-Amat, L. R. Watkins, S. F. Maier. 1998. Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of

- 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Research*, 797: 12-22.
- Anderson, W. G., R. S. McKinley, M. Colavecchia. 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17: 301-307.
- Anderzhanova E., S. S. Oja, P. Saransaari, J. Albrecht. 2003. Changes in the striatal extracellular levels of dopamine and dihydroxyphenylacetic acid evoked by ammonia and N-methyl-d-aspartate: modulation by taurine. *Brain Research*, 977: 290-293.
- Anguis, V., y J. P. Cañavate. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Aoshima, H., y K. Hamamoto. 1999. Potentiation of GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 64: 743-748.
- Apromar. 2008. La Acuicultura Marina de Peces en España 2008. En: Informes anuales, p. 47.
- Aragão, C., J. Corte-Real, B. Costas, M. T. Dinis, L. E. C. Conceição. 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids*, 34: 143-148.
- Arellano, J. M., y C. Sarasquete. 2005. Atlas Histológico del lenguado Senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 15-34.
- Arends, R. J., J. M. Mancera, J. L. Muñoz, S. E. Wendelaar Bonga. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* 163: 149-157.
- Arillo A., C. Margiocco, F. Melodia, O. Mensi, G. Schenone. 1981. Ammonia toxicity mechanisms in fish: studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 316-325.
- Arsenault, J. T. M., W. L. Fairchild, D. L. MacLatchy, L. Burrige, K. Haya, S. B. Brown. 2004. Effect of 4-nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol exposures during parr-smolt transformation on growth and plasma IGF-1 of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology*, 66: 255-265.
- Ashley, P. J., y L. U. Sneddon. 2008. Pain and fear in fish. En: Fish welfare. Editado por E. J. Branson. Blackwell Publishing, Uk, pp. 49-77.
- Auperin, B., J. E. Baroiller, M. J. Ricordel, A. Fostier, P. Prunet. 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 108: 35-44.
- Avella, M., y M. Bornancin. 1989. A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*, 142: 155-175.
- Ayson, F. G. 1989. The effect of stress on spawning of brood fish and survival of larvae of the rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture*, 80: 241-246.

- Bachmann, C., y J. P. Colombo. 1984. Increase of tryptophan and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain of ornithine carbamoyl transferase deficient sparse-fur mice. *Pediatric Research*, 18: 372-375.
- Barcellos, L. J. G., L. C. Kreutz, C. de Souza, L. B. Rodriguez, I. Fioreze, R. M. Quevedo, L. Cericato, A. B. Soso, M. Fagundes, J. Conrad, L. A. Lacerda, S. Terra. 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, 237: 229-236.
- Barcellos, L. J. G., S. Nicolaiewsky, S. M. G. de Souza, F. Lulhier. 1999. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. 1999. *Aquaculture Research*, 30: 437-444.
- Barton, B. A. 1997. Stress in finfish: past, present and future - a historical perspective. En: *Fish stress and health in aquaculture*. Editado por G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, C. B. Schreck. Cambridge University Press, USA, pp. 1-33.
- Barton, B. A. 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular referente to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- Barton, B. A., y G. K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Bastos-Ramos, W. P., N. M. F. M. Gonçalves, M. Bacila. 1998. Anesthesia and analgesia in antarctic fish: an experimental approach. *Archives of Veterinary Science*, 3: 95-100.
- Basu, N., A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Shulte, G. K. Iwama. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295: 173-183.
- Beamish, F. W. H., y A. Tandler. 1990. Ambient ammonia, diet and growth in lake trout. *Aquatic Toxicology*, 17: 155-166.
- Berg, H., C. Modig, P. E. Olsson. 2004. 17beta-estradiol induced vitellogenesis is inhibited by cortisol at the post-transcriptional level in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, doi:10.1186/1477-7827-2-62.
- Bergeron, M., M. S. Swain, T. A. Reader, L. Grondin, R. F. Butterworth. 1990. Effect of Ammonia on brain serotonin metabolism in relation to function in the portacaval shunted rat. *Journal of Neurochemistry*, 55: 222-229.
- Bergqvist, P. B., S. Hjorth, R. M. Audet, G. Apelqvist, F. Bengtsson, R. F. Butterworth. 1996. Ammonium acetate challenge in experimental chronic hepatic encephalopathy induces a transient increase of brain 5-HT release in vivo. *European Neuropsychopharmacology*, 6: 317-322.
- Bernier, N. J., N. Bedard, R. E. Peter. 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor

- gene expression in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 135: 230-240.
- Bernier, N. J., X. Lin, R. E. Peter. 1999. Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and Urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*, 116: 461-477.
- Billard, R., C. Bry, C. Gillet. 1981. Stress, environment and reproduction in teleost fish. En: *Stress and fish*. Editado por A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 185-208.
- Binuramesh, C., M. Prabakaran, D. Steinhagen, R. D. Michael. 2005. Effect of chronic confinement stress on the immune responses in different sex ratio groups of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, 250: 47-59.
- Björnsson, B. T., V. Johansson, S. Benedet, I. E. Einarsdottir, J. Hildahl, T. Agustsson, E. Jönsson. 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27: 227-242.
- Bolasina, S. N. 2006. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, 14: 569-575.
- Bourne, P. K. 1984. The use of MS 222 (Tricaine methanesulphonate) as an anaesthetic for routine blood sampling in three species of marine teleosts. *Aquaculture*, 36: 313-321.
- Bower, C. E., y J. P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 1012-1016.
- Breazile, J. E. 1988. The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and therapeutics. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 4: 441-479.
- Brodeur, J. C., K. B. Woodburn, G. A. Klecka. 2005. Potentiation of the vitellogenic response to 17 alpha-ethinylestradiol by cortisol in the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1125-1132.
- Brooks G. A., T. D. Fahey, K. M. Baldwin. 2005. *Exercise physiology: human bioenergetics and its applications* (4th ed.). McGraw-Hill, New York.
- Brown, E. A. B., J. E. Franklin, E. Pratt, E. G. Trams. 1972. Contributions to the pharmacology of quinaldine uptake and distribution in the shark and comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 42: 223-231.
- Brown, J. A., D. Edwards, C. Whitehead. 1989. Cortisol and thyroid hormone responses to acid stress in the brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology*, 35: 73-84.
- Brown, L. A. 1992. Anesthesia and restraint. En: *Fish Medicine*. Editado por M. K. Stoskopf. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 79-90.
- Brown, S. B., D. L. MacLatchy, T. J. Hara, J. G. Eales. 1991. Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 81: 207-216.
- Brown, S. B., J. G. Eales, R. E. Evans, T. J. Hara. 1984. Interrenal, thyroidal, and carbohydrate responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 36-45.
- Bugge, M., F. Bengtsson, A. Nobin, B. Jeppsson, B. Hultberg, T. Jonung, P. Herlin. 1989. The effect of ammonia infusion on brain monoamine metabolism in portacaval-shunted rats. *Research in Experimental Medicine*, 189: 101-111.
- Burka, J. F., K. L. Hammell, T. E. Horsberg, G. R. Johnson, D. J. Rainnie, D. J. Speare. 1997. Drugs in salmonid aquaculture - A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20: 333-349.
- Butterworth, R. F. 1998. Effects of hyperammonaemia on brain function. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21: 6-20.
- Campbell, P. M., T. G. Pottinger, J. P. Sumpter. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 47: 1140-1150.
- Campbell, P. M., T. G. Pottinger, J. P. Sumpter. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduced the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.
- Cañavate, J. P. 2007. Análisis del potencial del cultivo de soleidos. En: XI Congreso Nacional de Acuicultura. Tomo II. Editado por A. C. Eiroa, A. G. Díaz, C. P. Acosta. Vigo, pp. 1333-1336.
- Cañavate, J. P., y C. Fernández-Díaz. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*, 255-263.
- Carlsson A, T. Holmin, M. Lindqvist, B. K. Siesjö. 1977. Effect of hypercapnia and hypocapnia on tryptophan and tyrosine hydroxylation in rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, 99: 503-509.
- Carragher, J. F., J. P. Sumpter, T. G. Pottinger, A. D. Pickering. 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *General and Comparative Endocrinology*, 76: 310-321.
- Carragher, J. F., y J. P. Sumpter. 1990a. Corticosteroid physiology in fish. *Progress in Comparative Endocrinology*, 342: 487-492.
- Carragher, J. F., y J. P. Sumpter. 1990b. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 77: 403-407.
- Carragher, J. F., y N. W. Pankhurst. 1991. Stress and reproduction in a commercially important marine fish, *Pagrus auratus* (Sparidae). En: *Reproductive physiology of fish*. Editado por A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime, M. S. Rolfe. Sheffield: FishSymp 91, pp. 253-255.
- Castranova, D. A., W. King, L. C. Woods III. 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and



- low cortisol responsive domesticated male striped bass. *Aquaculture*, 246: 413-422.
- Chandroo, K. P., I. J. H. Duncan, R. D. Moccia. 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86: 225-250.
- Chaouloff, F. 1993. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews*, 18: 1-32.
- Cho, G. K., y D. D. Heath. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31: 537-546.
- Chrousos, G. P., y P. W. Gold. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of the American Medical Association*, 267: 1244-1252.
- Clearwater, S. J. 1992. Reproductive biology and response to capture stress of red gurnard *Chelidonichthys kumu* (Family: Triglidae). MSc Thesis, University of Auckland, Auckland.
- Clearwater, S. J., y N. W. Pankhurst. 1997. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *Journal of Fish Biology*, 50: 429-441.
- Cleary, J. J., N. W. Pankhurst, S. C. Battaglione. 2000. The effect of capture and handling stress on plasma steroid levels and gonadal condition in wild and farmed snapper *Pagrus auratus* (Sparidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 558-569.
- Clémence, M. V., Y. Wang, P. J. Walsh, M. A. Pérez-Pinzón. 2002. Comparison of the effects of ammonia on brain mitochondrial function in rats and gulf toadfish. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283: R598-R603.
- Commissiong, J. W. 1985. Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. *Biochemical Pharmacology*, 34: 11217-1131.
- Conceição, L. E. C., L. Ribeiro, S. Engrola, C. Aragão, S. Morais, M. Lacuisse, F. Soares, M. T. Dinis. 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 268: 64-81.
- Consten, D., E. D. Keuning, J. Bogerd, M. A. Zandbergen, J. G. D. Lambert, J. Komen. 2002. Sex steroids and their involvement in the cortisol-induced inhibition of pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio* L. *Biology of Reproduction*, 67: 465-472.
- Consten, D., J. Bogerd, J. Komen, J. G. D. Lambert, H. J. Goos. 2001. Long-term cortisol treatment inhibits pubertal development in male common carp, *Cyprinus carpio*. *Biology of Reproduction*, 64: 1063-1071.
- Contreras-Sánchez, W. M., C. B. Schreck, M. S. Fitzpatrick, C. B. Pereira. 1998. Effects of Stress on the Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 58: 439-447.

- Cook, A. F., y R. E. Peter. 1984. The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 54: 109-113.
- Cooper, A. J., J. M. McDonald, A. S. Gelbard, R. F. Gledhill, T. E. Duffy. 1979. The metabolic fate of <sup>13</sup>N-labeled ammonia in rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 4982-4992.
- Cooper, J. R., F. E. Bloom, R. H. Roth. 2002. *The biochemical basis of neuropharmacology*, Oxford Univ. Press, New York.
- Costas, B., C. Aragão, J. M. Mancera, M. T. Dinis, L. E. C. Conceição. 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research*, 39: 1-9.
- Coyle, S. D., R. M. Durborow, J. H. Tidwell. 2004. *Anesthetics in aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center, publicación n° 3900.
- Cubitt K. F., S. Winberg, F. A. Huntingford, S. Kadri, V. O. Crampton, Ø. Øverli. 2008. Social hierarchies, growth and brain serotonin metabolism in atlantic salmon (*Salmo salar*) kept under commercial rearing conditions. *Physiology and Behavior*, 94: 529-535.
- Cummings M. G., J. H. James, P. B. Soeters, J. M. Keane, J. Foster, J. E. Fischer. 1976. Regional brain study of indoleamine metabolism in the rat in acute hepatic failure. *Journal of Neurochemistry*, 27: 741-746.
- Curzon G., B. D. Kantamaneni, A. Winch, A. Rojas-Bueno, I. M. Murray-Lyon, R. Williams. 1973. Plasma and brain tryptophan changes in experimental acute hepatic failure. *Journal of Neurochemistry*, 21: 137-145.
- Dalla Via, J., G. van den Thillart, O. Cattani, A. de Zwaan. 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood liver and muscle. *Marine Ecology Progress series*, 111: 17-27.
- Davidson, G. W., P. S. Davie, G. Young, R. T. Fowler. 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-S™. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31: 105-114.
- Davis J. N., y A. Carlsson, V. MacMillan, B. K. Siesjö. 1973. Brain tryptophan hydroxylation: dependence on arterial oxygen tension. *Science*, 182:72-4.
- Davis, J. N., A. Carlsson. 1973. Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanaesthetized rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 20: 913-915.
- Davis, K. B., y B. C. Small. 2006. Rates of cortisol increase and decrease in channel catfish and sunshine bass exposed to an acute confinement stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 143: 134-139.
- De Boeck, G., D. Alsop, C. Wood. 2001. Cortisol effects on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion, and whole-body composition in juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74: 858-868.
- De Pedro, N., M. J. Delgado, M. Alonso-Bedate. 2001. Fasting and hypothalamic acetylcholinamines in goldfish. *Journal of Fish Biology*, 58: 1404-1413.

- Deane, E. E., y N. Y. S. Woo. 2003. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Sciences*, 72: 805-818.
- Desoutter, M., 1990. Soleidae. En: Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Editado por J. C. Quero, J. C. Hureau, C. Karrer, A. Post, L. Saldanha. Vol. 2. JNICT, Lisbon; SEI, Paris; y UNESCO, Paris, pp. 1037-1049.
- Deutch, A. Y., y R. H. Roth. 2004. Pharmacology and biochemistry of synaptic transmission: Classic transmitter. En: From molecules to networks - An introduction to cellular and molecular neuroscience. Editado por J. H. Byrne y J. L. Roberts. Elsevier Academic Press, USA, pp. 245-278.
- Dinis, M. T., L. Ribeiro, F. Soares, C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176: 27-38.
- Donaldson, E. M. 1981. The Pituitary-interrenal Axis as an indicator of Stress in fish. En: Stress and fish. Editado por A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 11-47.
- Doyon, C., J. Leclair, V. L. Trudeau, T. W. Moon. 2006. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 146: 126-135.
- Doyon, C., V. L. Trudeau, T. W. Moon. 2005. Stress elevates corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein mRNA levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology*, 186: 123-130.
- Duan, C. 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 37: 491-503.
- Edwards, D. H., y E. A. Kravitz. 1997. Serotonin, social status and aggression. *Current Opinion in Neurobiology*, 7: 812-819.
- Ellis, A. E., R. J. Roberts, P. Tytler. 1978. The anatomy and physiology of teleosts, En: Fish pathology. Editado por R. J. Roberts. Bailliere Tindall, London, pp. 13-54.
- Engrola, S., L. E. C. Conceição, L. Dias, R. Pereira, L. Ribeiro, M. T. Dinis. 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*, 38: 696-707.
- Fagundes M., y E. C. Urbinati. 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, 276: 112-119.
- FAO. 2005. National Aquaculture Sector Overview. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department[[www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_spain/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_spain/es)]. Rome.
- Farbridge, K. J., y J. F. Laetherland. 1992. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10: 67-73.
- Fattor J. A., B. F. Miller, K. A. Jacobs, G. A. Brooks. 2005. Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the

- “lactate clamp”. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288: E143–E147.
- Feder, M. E., y G. E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243-282.
- Felipo, V., y R. F. Butterworth. 2002. Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*, 67: 259-279.
- Fernández-Díaz, C., M. Yufera, J. P. Cañavate, F. J. Moyano, F. J. Alarcón, M. Díaz. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of fish Biology*, 58: 1086-1097.
- Ferreira, J. T., H. J. Shoonbee, G. L. Smit. 1984. The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species. *Journal of Fish Biology*, 25: 35-41.
- Finlay, J. M., M. J. Zigmond, E. D. Abercrombie. 1995. Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience*, 64: 619-628.
- Finlay, J. M., y M. J. Zigmond. 1997. The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. *Neurochemical Research*, 22: 1387-1394.
- Flik, G., H. M. Peter, E. H. Vand den Burg, J. R. Metz, M. O. Huising. 2006. CRF and stress in Fish. *General and Comparative Endocrinology*, 146: 36-44.
- Flores Quintana, C. 2002. Respuestas neuroendocrinas al estrés en peces teleósteos. *Revista de Ictiología*, 10: 57-78.
- Foo, J. T. W., y T. J. Lam. 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 145-158.
- Fraser, R., I. Watt, C. E. Gray, McA. I. Ledingham, A. F. Lever. 1984. The effect of etomidate on adrenocortical function in dogs before and during hemorrhagic shock. *Endocrinology*, 115: 2266-2270.
- Frazer, A., y J. G. Hensler. 1998. Serotonin, in *Basic Neurochemistry - molecular, cellular, and medical aspects*. Editado por G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, M. D. Uhler. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 263-292.
- Fryer, J. N. 1989. Neuropeptides regulating the activity of goldfish corticotropes and melanotropes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 21-27.
- FSBI. 2002. Fish Welfare. Briefing Paper 2, Fisheries Society of the British Isles, Granta Information Systems, Cambridge, pp.1-25.
- García-Gómez, A., F. Gándara, T. Raja. 2002. Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18: 21-23.
- García-López, A., E. Pascual, C. Sarasquete, G. Martínez-Rodríguez. 2006. Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea*

- senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture*, 261: 789-798.
- Gau, N. 1984. Lactic acid. En: *Clinical chemistry*. Editado por L. A. Kaplan y A. J. Pesce. The C. V. Mosby Company, Sant Louis, pp. 418 y 1040-1042.
- Gerwick L., N. E. Demers, C. J. Bayne. 1999. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 124: 329-334.
- Gibson, C. J., y R. J. Wurtman. 1977. Physiological control of brain catechol synthesis by brain tyrosine concentration. *Biochemical Pharmacology*, 26: 1137-1142.
- Gilchrist, B. J., D. J. Tipping, L. Hake, A. Levy, B. I. Baker. 2001. Differences in Arginine Vasotocin Gene Transcripts and cortisol secretion in trout with high or low endogenous melanin-concentrating hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 407-411.
- Gilchrist, B. J., D. R. Tipping, L. Hake, A. Levy, B. I. Baker. 2000. The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Neuroendocrinology*, 12: 795-801.
- Gilderhus, P. A., y L. L. Marking. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7: 288-292.
- Goos, H. J. Th., y D. Consten. 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197: 105-116.
- Green, J. A., B. I. Baker, H. Kawauchi. 1991. The effect of rearing rainbow trout on black or white backgrounds on their secretion of melanin-concentrating hormone and their sensitivity to stress. *Journal of endocrinology*, 128: 267-274.
- Gregory, T. R., y C. M. Wood. 1999. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72: 286-295.
- Gresch, P. J., A. F. Sved, M. J. Zigmond, J. M. Finlay. 1994. Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in the medial prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 63: 575-583.
- Guenette, S. A., F. Beaudry, J. F. Marier, P. Vachon. 2006. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 265-270.
- Guenette, S. A., F. C. Uhlend, P. Hélie, F. Beaudry, P. Vachon. 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266: 262-265.
- Guerriero, G., y G. Ciarcia. 2006. Stress biomarkers and reproduction in fish. En: *Fish endocrinology*. Editado por M. Reinecke, G. Zaccane, B. G. Kapoor. Science Publisher, USA, pp. 665-692.

- Guroff, G. 1979. Effects on inborn errors of metabolism on the nutrition of the brain. 1979. En: Nutrition and the brain. Editado por R. J. Wurtman y J. J. Wurtman. Raven Press, New York, pp. 29-77.
- Haddy, J. A., y N. W. Pankhurst. 1999. Stress-induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black bream. *Journal of Fish Biology*, 55: 1304-1316.
- Hajek, G. J., B. Kłyszczko, R. Dziaman. 2006. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 36: 93-97.
- Hampson, B. L. 1976. Ammonia concentration in relation to ammonia toxicity during a rainbow trout rearing experiment in a closed freshwater-seawater system. *Aquaculture*, 9: 61-70.
- Hansen, M. K., U. Nymoén, T. E. Horsberg. 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of metomidate in turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26: 95-103.
- Hattingh, J. 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the fresh water fish, *Labeo capensis* (Smith). *Journal of Fish Biology*, 10: 191-195.
- Hawkins R. A., A. L. Miller, R. C. Nielsen, R. L. Veech. 1973. The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo. *Biochemical Journal*, 134: 1001-1008.
- Hemmings, H. C. Jr., M. H. Akabas. P. A. Goldstein. J. R. Trudell, B. A. Orser, N. L. Harrison. 2005. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26: 503-510.
- Hernández-Rauda, J. R., Metabolismo de las aminos biogenas hipofisarias y cerebrales en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, y la pargueta, *Latjanus argentiventris*: cambios durante el desarrollo gonadal y regulacion por esteroides gonadales. 1998. Tesis doctoral: Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Higgs, D. A., U. H. M. Fagerlund, J. G. Eales, J. R. McBride. 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry Physiology B*, 73: 143-176.
- Hikasa, Y., K. Takase, T. Ogasawara, S. Ogasawara. 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 48: 341-351.
- Hobby, A. C., N. W. Pankhurst, J. A. Haddy. 2000. The effect of short term confinement stress on binding characteristics of sex steroid binding protein (SBP) in female black bream (*Acanthopagrus butcheri*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 125: 85-94.
- Hofmann, G., B. A. Buckley, S. Airaksinen, J. E. Keen, G. N. Somero. 2000. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family nototheniidae). *Journal of Experimental Biology*, 203: 2331-2339.

- Holzbauer, M., y D. F. Sharman. 1972. The distribution of catecholamines in vertebrates. En: Catecholamines. Editado por H. Blaschko y E. Muscholl. Springer-Verlag Berlin, New York, pp. 110-185.
- Hoskonen, P., y J. Pirhonen. 2004. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperature-zone fishes. *Journal of Fish Biology*, 64: 1136-1142.
- Houston, H. A., J. A. Madden, R. J. Woods, H. M. Miles. 1971. Some physiological effects of handling and tricaine methane-sulphonate anesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28: 625-633.
- Hseu, J. R., S. L. Yeh, Y. T. Chu, Y. Y. Ting. 1994. The anesthetic effect of 2-phenoxyethanol in goldlined sea bream (*Sparus sarba*). *Journal of Taiwan Fisheries Research*, 2: 41-49.
- Hseu, J. R., S. L. Yeh, Y. T. Chu, Y.Y. Ting. 1998. Comparison of efficacy of five anesthetic goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*, 9: 35-41.
- Hunn, J. B., y J. L. Allen. 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Annual Reviews in Pharmacology*, 14: 47-55.
- Imperato, A., S. Puglisi-Allegra, P. Casolini, L. Angelucci. 1991. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Research*, 538: 111-117.
- Inoue, L. A. K. A., L. O. B. Afonso, G. K. Iwama, G. Moraes. 2005. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. *Acta Amazonica*, 35: 289-295.
- Inoue, L. A. K. A., C. S. Neto, G. Morais. 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33: 943-947.
- Inoue, L. A. K. A., C. S. Neto, G. Morais. 2004. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. *Ciência Rural*, 34: 563-565.
- Ip Y. K., S. F. Chew, D. J. Randall. 2001. Ammonia toxicity, tolerance and excretion. En: *Fish Physiology (XX). Nitrogen Excretion*. Editado por P. A. Wright y P. M. Anderson. Academic Press, New York, pp. 109-148.
- Iversen, M., B. Finstad, R. S. MacKinley, R. A. Eliassen. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-ST<sup>TM</sup> and Benzoak<sup>®</sup> as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221: 549-566.
- Iwama, G. K., J. C. McGeer, M. P. Pawluck. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 67: 2065-2073.
- Iwama, G. K., L. O. B. Afonso, A. Todgham, P. Ackerman, K. Nakano. 2004b. Are hsp's suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207: 15-19.
- Iwama, G. K., L. O. B. Afonso, M. M. Vijayan. 2004a. Stress in Fish. *AquaNet Workshop on Fish Welfare*. Campbell River, B. C. Canada, pp. 1-9.

- Iwama, G. K., M. M. Vijayan, R. B. Forsyth, P. A. Ackerman. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39: 901-909.
- Iwama, G. K., P. T. Thomas, R. B. Forsyth, M. M. Vijayan. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Biomedical and Life Sciences*, 8: 35-56.
- Janz, D. M., y L. P. Weber. 2000. Endocrine system. En: *The laboratory fish*. Editado por G. K. Ostrander. Academic Press, USA, pp. 415-439.
- Jaskiw, G. E., C. Simpson, R. Bongiovanni, B. K. Yamamoto. 2004. Tyrosine augments clozapine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex of the rat in vivo: effects of access to food. *Neuroscience Letters*, 357: 5-8.
- Jeney, Z., J. Nemcsók, G. Jeney, J. Oláh. 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). I. effect of ammonia on adrenaline and noradrenaline levels in different organs. *Aquaculture*, 104: 139-148.
- Jessy J., A. M. Mans, M. R. DeJoseph, R. A. Hawkins. 1990. Hyperammonaemia causes many of the changes found after portacaval shunting. *Biochemical Journal*, 272: 311-317.
- Jow, L. Y., S. F. Chew, C. B. Lim, P. M. Anderson, Y. K. Ip. 1999. The marble goby *Oxyeleotris marmoratus* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure. *Journal of Experimental Biology*, 202: 237-245.
- Kajimura, S., T. Hirano, N. Visitacion, S. Moriyama, K. Aida. 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Endocrinology*, 178: 91-99.
- Kakuta, I. 2002. Interrenal stress responsiveness of marbled sole, *Pleuronectes yokohamae*, Inhabiting Tokyo bay. *Environmental Toxicology*, 17: 1-6.
- Kalén P., E. Rosengren, O. Lindvall, A. Bjfrklund. 1989. Hippocampal noradrenaline and serotonin release over 24 hours as measured by the dialysis technique in freely moving rats: correlation to behavioural activity state, effect of handling and tail-pinch. *European Journal of Neuroscience*, 1: 181-187.
- Kawahara, Y., H. Kawahara, B. H. C. Westerink. 1999. Comparison of effects of hypotension and handling stress on the release of noradrenaline and dopamine in the locus coeruleus and medial prefrontal cortex of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 360: 42-49.
- Keene, J. L., y D. L. G. Noakes, R. D. Moccia, C. G. Soto. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29: 89-101.
- Kelsall, C. J., y R. J. Balment. 1998. Native Urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *Platichthys flesus*. *General and Comparative Endocrinology*, 112: 210-219.
- King, W. V., B. Hooper, S. Hillsgrove, C. Benton, D. L. Berlinsky. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in



- black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research*, 36: 1442-1449.
- Kirby, L. G., J. M. Chou-Green, K. Davis, I. Lucki. 1997. The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*, 760: 218-230.
- Kita, J., y Y. Itazawa. 1989. Release of erythrocytes from the spleen during exercise and splenic constriction by adrenaline infusion in the rainbow trout. *Japanese Journal of Ichthyology*, 36: 48-52.
- Kosenko E., N. Venediktova, Y. Kaminsky, C. Montoliu, V. Felipo. 2003. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Research*, 981: 193-200.
- Kosenko E., Y. Kaminsky, E. Grau, M. D. Miñana, G. Marcaida, S. Grisolia, V. Felipo. 1994. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Neurochemistry*, 63: 2172-2178.
- Kreinberg, H. 2000. Stress and anesthesia. En: *The laboratory fish*. Editado por G. K. Ostrander. Academic Press, New York, pp. 503-511.
- Krieger, D. T. 1978. Endocrine processes and serotonin. En: *Serotonin in health and diseases*. Volume III: The central nervous system. Editado por W. B. Essman. Spectrum Publications Inc., New York, pp. 51-67.
- Kruk, Z. L., y C. J. Pycock. 1991. 5-hydroxytryptamine. En: *Neurotransmitters and drugs*. Editado por Z. L. Kruk y C. J. Pycock. Chapman & Hall, UK, pp. 116-132.
- Kuhar, M. J., P. R. Couceyro, P. D. Lambert. 1998. Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry*. Editado por G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, M. D. Uhler. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 243-261.
- Lacoste, A. 2001. Neuroendocrinologie et neuroimmunologie du stress chez un modèle invertébré, l'huître *Crassostrea gigas*. Tesis doctoral: Université Pierre et Marie-Curie. Paris.
- Leach, G. J., y M. H. Taylor. 1980. The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, 42: 219-227.
- Lepage, O., O. Overli, E. Petersson, T. Järvi, S. Winberg. 2000. Differential stress coping in wild and domesticated sea trout. *Brain Behavior and Evolution*, 56: 259-268.
- Lepage, O., O. Tottmar, S. Winberg. 2002. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 205: 3679-3687.
- Lethimonier, C., G. Flouriot, O. Kah, B. Ducouret. 2002. The glucocorticoid receptor represses the positive autoregulation of the trout estrogen receptor gene by preventing the enhancer effect of a C/EBP $\beta$ -like protein. *Endocrinology*, 143: 2961-2974.
- Lethimonier, C., G. Flouriot, Y. Volataire, O. Kah, B. Ducouret. 2000. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol

- receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biology of Reproduction*, 62: 1763-1771.
- Levita L., J. W. Dalley, T. W. Robbins. 2002. Nucleus accumbens dopamine and learned fear revisited: a review and some new findings. *Behavioural Brain Research*, 137: 115-127.
- Li, H. Y., C. K. Park, S. J. Jung, S. Y. Choi, S. J. Lee, K. Park, J. S. Kim, S. B. Oh. 2007. Eugenol inhibits K<sup>+</sup> currents in trigeminal ganglion neurons. *Journal of Dental Research*, 86: 898-902.
- Liebert, A. M., y C. B. Schreck. 2006. Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-I, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*, 148: 195-202.
- Malmstrøm, T., R. Salte, H. M. GjØen, A. Linseth. 1993. A practical evaluation of metomidate and MS-222 as anaesthetics for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 113: 331-338.
- Mancebo, M., G. Rozas, J. J. Perez, M. Aldegunde. 2005. Chronic cortisol alters the central serotonergic system in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Proceedings of the V Congreso da AIEC. Faro, Portugal*, pp. 169-172.
- Mans A. M., S. J. Saunders, R. E. Kirsch, J. F. Biebuyck. 1979. Correlation of plasma and brain amino acid and putative neurotransmitter alterations during acute hepatic coma in the rat. *Journal of Neurochemistry*, 32: 285-292.
- Mans, A. M., J. F. Biebuyck, R. A. Hawkins. 1983. Ammonia selectively stimulates neutral amino acid transport across blood-brain barrier. *American Journal of Physiology Cellular Physiology*, 245: C74-C77.
- Marking, L. L., y F. P. Meyer. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10: 2-5.
- Mattson, N. S., y T. H. Ripple. 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83: 89-94.
- Mazeaud, M. M., F. Mazeaud, E. M. Donaldson. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- Mazeaud, M. M., y F. Mazeaud. 1981. Adrenergic Responses to stress in fish. En: *Stress and fish*. Editado por A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 49-75.
- McCormick, S. D., J. M. Shrimpton, J. B. Carey, M. F. O'Dea, K. E. Sloan, S. Moryama, B. Th. Björnsson. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 168: 221-235.
- McDonald, D. G., y C. L. Milligan. 1992. Chemical properties of the blood. En: *Fish Physiology*. Editado por W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell. Academic Press, San Diego, pp. 55-133.
- McEwen, B.S. 1995. Neuroendocrine interactions. En: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Editado por F. E. Bloom y D. J. Kupfer. Raven Press, Ltd., New York, pp. 705-718.

- McIntyre, D. C., L. M. Healy, M. Saari. 1979. Intraspecies aggression and monoamine levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. Behavioral and Neural Biology, 25: 90-98.
- Meade J. W. 1985. Allowable ammonia for fish culture. The Progressive Fish-Culturist, 47: 135-145.
- Melamed, E., F. Hefti, R. J. Wurtman. 1980. Tyrosine administration increases striatal dopamine release in rats with partial nigrostriatal lesions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77: 4305-4309.
- Milligan, C. L., y C. M. Wood. 1987. Muscle and liver intra-cellular acid-base status after strenuous activity in the inactive, benthic starry flounder (*Platichthys stellatus*). Physiological Zoology, 60: 54-68.
- Miron, D. S., B. Moraes, A. G. Becker, M. Crestani, R. Spanevello, V. L. Loro, B. Baldisserotto. 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Aquaculture, 277: 192-196.
- Miura, C., T. Miura, M. Yamashita, K. Yamauchi, Y. Nagahama. 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese ell testis. Development, Growth and Differentiation, 38: 257-262.
- Molinero, A., y J. Gonzales. 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. Comparative Biochemistry and Physiology A, 111: 405-414.
- Mommsen, T. P. 2001. Paradigms of growth in fish. Comparative Biochemistry and Physiology B, 129: 207-219.
- Mommsen, T. P., M. M. Vijayan, T. M. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9: 211-268.
- Monfort P., E. Kosenko, S. Erceg, J.-J. Canales, V. Felipe. 2002. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. Neurochemistry International, 41: 95-102.
- Montero, D., M. S. Izquierdo, L. Tort, L. Robaina, J. M. Vergara. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiology and Biochemistry, 20: 53-60.
- Moraes, G., y P. M. Bidinotto. 2000. Metabolic impact of handling on *Pseudoplatystoma coruscans*, a widespread teleost fish. International Congress on Biology of fish, Aberdeen. Fish Biology, pp. 89-100.
- Morales, A. E., G. Cardenete, E. Abellán, L. García-Rejón. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, 36: 33-40.
- Moreira, P. S. A., y G. L. Volpato. 2004. Conditioning of stress in Nile tilapia. Journal of Fish Biology, 64: 961-969.
- Morgan, M. J., C. E. Wilson, L. W. Crim. 1999. The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. Journal of Fish Biology, 54: 477-488.

- Morgenroth, V. A., J. R. Walters, R. H. Roth. 1976. Dopaminergic neurons-alteration in the kinetic properties of tyrosine hydroxylase after cessation of impulse flow. *Biochemical Pharmacology*, 25: 655-661.
- Moriyama, S., P. Swanson, M. Nishii, A. Takahashi, H. Kawauchi, W. W. Dickhoff, E. M. Plisetskaya. 1994. Development of a homologous radioimmunoassay for coho salmon insulin-like growth factor-I. *General and Comparative Endocrinology*, 96: 149-161.
- Mugnier, C., A. Fostier, S. Guezou, J. L. Gaignon, L. Quemener. 1998. Effect of some repetitive factors on turbot stress response. *Aquaculture International*, 6: 33-45.
- Mußhoff, U., M. Madeja, N. Binding, U. Witting, E. J. Speckmann. 1999. Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. *Archives of Toxicology*, 73: 55-59.
- Mylonas, C. C., G. Cardinaletti, I. Sigelaki, A. Polzonetti-Magni. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246: 467-481.
- Myszkowski, B. L., R. Kamiński, J. Wolnicki. 2003. Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 142-145.
- Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 4: 209-222.
- Nakahara, D., y M. Nakamura. 1999. Differential effect of immobilization stress on in vivo synthesis rate of monoamines in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of conscious rats. *Synapse*, 32: 238-242.
- Nelson, J. S., 1994. Fishes of the world. Tercera edición. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 441.
- Nilssen, K. J., I. E. Einarsdóttir, M. Iversen. 1996. Metomidate anaesthesia in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). En: Production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). A study of some Physiological and immunological responses to rearing routines. Tesis doctoral, NTNU, Trondheim, Norway.
- Nilsson, G. E. 1989a. Effects of anoxia on serotonin metabolism in crucian carp brain. *Journal of Experimental Biology*, 141: 419-428.
- Nilsson, G. E. 1989b. Effects of anoxia on catecholamine levels in brain and kidney of the crucian carp. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 257: R10-R14.
- Nilsson, G. E. 1990a. Turnover of serotonin in brain of an anoxia-tolerant vertebrate, the crucian carp. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258: 1308-1312.
- Nilsson, G. E. 1990b. Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *Journal of Experimental Biology*, 150: 295-320.

- Ocampo, A. A., y L. O. Camberos. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. *Veterinaria México*, 30: 337-344.
- Olivereau, M., J. M. Olivereau, J. F. Lambert. 1988. Cytological responses of the pituitary (rostral pars distalis) and immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) in the goldfish treated with dopamine antagonists. *General and Comparative Endocrinology*, 71: 506-515.
- Olmedo, M., J. B. Peleteiro, R. Cal, F. Linares. 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. En: IX Congreso Nacional de Acuicultura. Junta de Andalucía, Cádiz, España, pp. 383-385.
- Olsen, Y. A., I. E. Einarsdottir, K. J. Nilssen. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134: 155-168.
- Ortega, V. A., K. J. Renner, N. J. Bernier. 2005. Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1855-1866.
- Ortega, Van A., K. J. Renner, N. J. Bernier. 2003. Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *The Journal of experimental Biology*, 208: 1855-1866.
- Ortuño, J., M. A. Esteban, J. Meseguer. 2002. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 49-59.
- Øverli, Ø., C. A. Harris, S. Winberg. 1999. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behavior and Evolution*, 54: 263-275.
- Øverli, Ø., S. Winberg, T. G. Pottinger. 2005. Behavioural and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout - a review. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 463-474.
- Øverli, Ø., T. G. Pottinger, T. R. Carrick, E. Øverli, S. Winberg. 2001. Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behaviour Evolution*, 57: 214-224.
- Palić, D., D. M. Herolt, C. B. Andreasen, B. W. Menzel, J. A. Roth. 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture*, 254: 675-685.
- Palmer, L. M., y A. F. Mensinger. 2004. Effect of the anesthetic tricaine (MS-222) on nerve activity in the anterior lateral line of the oyster toadfish, *Opsanus tau*. *Journal of Neurophysiology*, 92: 1034-1041.
- Pankhurst, N. W. 2001. Stress inhibition of reproductive endocrine processes in a natural population of the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *Marine and Freshwater Research*, 52: 753-761.

- Pankhurst, N. W., y G. Van der Kraak. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Editado por G. Iwama, A. Pickering, J. Sumpter, C. Schreck. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 73-93.
- Pankhurst, N. W., y G. Van der Kraak. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, 117: 225-237.
- Parikh, V. N., T. Clement, R. D. Fernald. 2006. Physiological consequences of social descent: studies in *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Endocrinology*, 190: 183-190.
- Peng, K. W., S. F. Chew, C. B. Lim, S. S. L. Kuah, K. W. Kok, Y. K. Ip. 1998. The mudskippers *Periophthmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH<sub>3</sub> concentrations of 446 and 36 µM, respectively. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19: 59-69.
- Pérez-Sánchez, J., y P. Y. Le Bail. 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture*, 177: 117-128.
- Perry, S. F., R. Fritsche, R. Kinkead, S. Nilsson. 1991. Control of catecholamine release in vivo and in situ in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 155: 549-566.
- Person Le Ruyet, J., A. Lamers., A. Le Roux, A. Sévère, G. Boeuf, N. Mayer-Gostan. 2003. Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *Journal of Fish Biology*, 62: 879-894.
- Person Le Ruyet, J., G. Boeuf, J. Zambonino Infante, S. Helgason, A. Le Roux. 1998. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 119: 511-518.
- Pezze, M. A., y J. Feldon, 2004. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*, 74: 301-320.
- Pickering, A. D. 1990. Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish. *Progress in Clinical and Biological Research*, 342: 473-479.
- Pickering, A. D. 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111: 51-63.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger, J. Carragher, J. P. Sumpter. 1987. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 68: 249-259.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger, J. P. Sumpter, J. F. Carragher, P. Y. Le Bail. 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 83: 86-93.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger, P. J. Christie. 1982. Recovery of the brown trout *Salmo trutta* L. from acute handling stress: A time course study. *Journal of Fish Biology*, 20: 229-244.

- Pickering, A. D., y P. Christie. 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 44: 487-496.
- Pickering, A. D., y T. G. Pottinger. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 253-258.
- Pierce, A. L., H. Fukada, W. W. Dickhoff. 2005. Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *Journal of Endocrinology*, 184: 341-349.
- Pierson, P. M., M. E. Guibolini, B. Lahlou. 1996. A V1-type receptor for mediating the neurohypophysial hormone induced ACTH release in trout pituitary. *Journal of Endocrinology*, 149: 109-115.
- Pinto, W., C. Aragão, F. Soares, M. T. Dinis, L. E. C. Conceição. 2007. Growth, stress responses and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. *Aquaculture Research*, 38: 1198-1204.
- Pirhonen, J., y C. B. Schreck. 2003. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220: 507-514.
- Planas, J. V., y P. Swanson. 1995. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. *Biology of the Reproduction*, 52: 697-704.
- Plante, S., C. Audet, Y. Lambert, J. de la Noüe. 2003. Comparison of stress responses in wild and captive winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) broodstock. *Aquaculture Research*, 34: 803-812.
- Portavella, M., B. Torres, C. Salas, M. R. Papini. 2004. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, 362: 75-78.
- Pottinger, T. G. 1999. The impact of stress on animal reproductive activities. En: *Stress Physiology in Animals*. Editado por H. M. Balm. Academic Press, England, pp. 131-177.
- Pottinger, T. G. 2008. The stress response in fish - Mechanisms, effects and measurement. En: *Fish welfare*. Editado por E. J. Branson. Blackwell Publishing, USA, pp. 32-48.
- Pottinger, T. G., P. M. Campbell, J. P. Sumpter. 1991. Stress induced disruption of the salmonid liver gonad axis. En: *Reproductive Physiology of fish*. Editado por A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime, M. S. Rolfe. FishSimp 91, Sheffield, pp. 114-116.
- Pottinger, T. G., P. Prunet, A. D. Pickering. 1992. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *General and Comparative Endocrinology*, 88: 454-460.
- Pottinger, T. G., T. R. Carrick, A. Apleby, W. E. Yeomans. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: Is the chub, *Leuciscus*

- cephalus*, a cortisol-resistant teleost? General and Comparative Endocrinology, 120: 108-117.
- Pottinger, T. G., y A. D. Pickering. 1990. The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology, 80: 264-273.
- Pottinger, T. G., y T. R. Carrick. 2000. Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. Aquaculture Research, 31: 367-375.
- Preziosi, P., y M. Vacca. 1982. Etomidate and the corticotrophic axis. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie, 256: 308-310.
- Pucéat, M., D. Garin, A. Fréminet. 1989. Inhibitory effect of anaesthesia with 2-phenoxyethanol as compared to MS222 on glucose release in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology A, 94: 221-224.
- Randall, D. J., y P. A. Wright. 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. Fish Physiology Biochemistry, 3: 107-120.
- Randall, D. J., y S. F. Perry. 1992. Catecholamines. En: Fish Physiology. Editado por W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell. Academic Press, London, pp. 255-299.
- Rand-Weaver, M., T. G. Pottinger, J. P. Sumpter. 1993. Plasma somatolactin concentrations in fish are elevated by stress. Journal of Endocrinology, 138: 509-515.
- Rao, V. L. R., I. A. Qureshi, R. F. Butterworth. 1994. Activities of monoamine oxidase-A and -B are altered in the brains of congenitally hyperammonemic sparse-fur (spf) mice. Neuroscience Letters, 170: 27-30.
- Redding, J. M., A. de Luze, J. Leloup-Hatey. 1986. Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in european eel, *Anguilla anguilla*. Comparative Biochemistry and Physiology A, 83: 409-413.
- Reid, S. G., M. M. Vijayan, S. F. Perry. 1996. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Comparative Physiology B, 165: 665-676.
- Reid, S. G., N. J. Bernier, S. F. Perry. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. Comparative Biochemistry and Physiology C, 120: 1-27.
- Ribeiro, L., C. Sarasquete, M. T. Dinis. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. Aquaculture, 171: 293-308.
- Roche, H., y G. Bogé. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. Marine Environmental Research, 41: 27-43.
- Rodríguez, R. B. 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en Golfo de Cadiz. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, España.
- Rodríguez, R. B., y B. F. Souto. 2003. Engorde del lenguado senegales (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en Galicia con temperatura controlada. En: IX



- Congreso Nacional de Acuicultura. Junta de Andalucía, Cádiz, España, pp. 407-409.
- Rodríguez-Gómez, F. J., M. C. Rendón-Unceta, C. Sarasquete, J. A. Muñoz-Cueto. 2000. Distribution of serotonin in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*: an immunohistochemical study. *Journal of chemical Neuroanatomy*, 18: 103-115.
- Ronan P. J., P. M. Gaikowski, S. J. Hamilton, K. J. Buhl, C. H. Summers. 2007. Ammonia causes decreased brain monoamines in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Brain Research*, 1147: 184-191.
- Ross, L. G., y B. Ross. 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Blackwell Science, Oxford, pp. 5-88.
- Rossetti Z. L., C. Portas, L. Pani, S. Carboni, G. Gessa. 1990. Stress increases noradrenaline release in the rat frontal cortex: prevention by diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 176: 229-231.
- Rothwell, S. E., S. E. Black, A. R. Jerrett, M. E. Forster. 2005. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 140: 289-298.
- Rotllant, J., y L. Tort. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 51: 21-28.
- Roubach, R., L. C. Gomez, F. A. L. Fonseca, A. L. Val. 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36: 1056-1061.
- Roy, R. L., S. M. Ruby, D. R. Idler, Y. So. 1990. Plasma vitellogenin levels in pre spawning rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acid exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19: 803-806.
- Ruibal, C. 2003. Papel de la glucosa, la insulina y el neuropéptido Y en el control de la ingesta de alimentos en la trucha arco iris (*oncorhynchus mykiss*): relación con los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico cerebrales. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Ruibal, C., J. Soengas, M. Aldegunde. 2002. Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in plasma glucose levels. *Journal of Comparative Physiology A*, 188: 479-484.
- Sadadivudu, B., y R. K. C. Murthy. 1978. Effects of ammonia on monoamine oxidase and enzymes of GABA metabolism in mouse brain. *Archives Of Physiology and Biochemistry*, 86: 67-82.
- Sakai, N., N. Suzuki, Y. Nagahama. 1996. Distribution of the site of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the spermiating amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testis. *Biomedical Research*, 17: 473-477.
- Salah El-Deen, M. A. 1999. Toxicological and physiological effects of ammonia on grass carp *Ctenopharyngodon idella* at different pH levels. *Egyptian Journal of Zoology*, 33: 219-235.

- Sánchez-Muros, M. J., y E. Gómez-Milán. 2001. Efecto del estrés en los peces. En: Universidad Internacional del Mar: Acuicultura II. Editado por S. Zamora y F. J. Martínez. Universidad de Murcia, pp. 57-69.
- Scally, M. C., I. Ulus, R. J. Wurtman. 1977. Brain tyrosine level controls striatal dopamine synthesis in haloperidol-treated rats. *Journal of Neural Transmission*, 41: 1-6.
- Schreck, C. B., B. L. Olla, M. W. Davis. 1997. Behavioral responses to stress. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Editado por G. Iwama, A. Pickering, J. Sumpter, C. Schreck. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 145-170.
- Schreck, C. B., W. Contreras-Sánchez, M. S. Fitzpatrick. 2001. Effects of stress on fish reproduction gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24.
- Schulz, R. W., H. F. Vischer, J. E. B. Cavaco, E. M. Santos, C. R. Tyler, H. J. Th. Goos, J. Bogerd. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 129: 407-417.
- Schulz, R. W., y T. Miura. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
- Scorticati, C., J. C. Perazzo, V. Rettori, S. M. McCann, A. Laurentiis. 2006. Role of Ammonia and nitric oxide in the decrease in plasma prolactin levels in prehepatic portal hypertensive male rats. *Neuroimmunomodulation*, 13:152-159.
- Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32.
- Shaffi, S. A. 1980. Ammonia toxicity: metabolic disorder in nine freshwater teleosts. *Toxicology Letters*, 6: 349-356.
- Sheehan, R. J., y W. M. Lewis. 1986. Influence of pH and ammonia salts on ammonia toxicity and water balance in young channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 819-899.
- Shimizu, N., S. Take, T. Hori, Y. Oomura. 1992. In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats. *Brain Research Bulletin*, 28: 727-734.
- Small, B. C. 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218: 177-185.
- Small, B. C., 2004. Effect of isoegenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*, 238: 469-481.
- Smart, G. 1978. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish: Gas exchange in rainbow trout, *Salmo gairdneri* exposed to acutely lethal concentrations. *Journal of Fish Biology*, 12: 93-104.
- Smart, S. R. 1981. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. En: *Stress and fish*. Editado por A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 277-293.

- Soengas, J. L., y M. Aldegunde. 2004. Brain glucose and insulin: effects on food intake and brain biogenic amines of rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology A*, 190: 641-649.
- Soivio A., K. Nyholm, M. Huhti. 1977. Effects of anaesthesia with MS-222, neutralized MS-222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology* 10: 91-101.
- Solé, M., J. Potrykus, C. Fernández-Díaz, J. Blasco. 2004. Variations on stress defences and metallothionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30: 57-66.
- Some, M., y A. Helander. 2002. Urinary excretion patterns of 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 5-hydroxytryptophol in various animal species: implications for studies on serotonin metabolism and turnover rate. *Life Sciences*, 71: 2341-2349.
- Spieler, R. E. 1979. Diel rhythms of circulating prolactin, cortisol, thyroxine, and triiodothyronine levels in fishes: a review. *Review of Canadian Biology*, 38: 301-315.
- Spotte, S., y G. Anderson. 1989. Plasma cortisol changes in seawater-adapted mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) exposed to Ammonia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 2065-2069.
- Stacey, N. E., D. S. Mackenzie, T. A. Marchand, A. L. Kyle, R. E. Peter. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker *Catostomus commersoni*. I. gonadotropin, growth hormone and thyroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 56: 333-348.
- Stehly, G. R., W. H. Gingerich. 1999. Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture Research*, 30: 365-372.
- Strange, R. J., C. B. Schreck, J. T. Golden. 1977. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 213-218.
- Suarez, R. K., y T. P. Mommsen. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 1869-1882.
- Summerfelt, R. C., y L. S. Smith. 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. En: *Methods for Fish Biology*. Editado por C. B. Schreck, y P. B. Moyle. American Fisheries Society, USA, pp. 213-272.
- Sumpter, J. P. 1992. Control of growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 299-320.
- Sumpter, J. P. 1997. The endocrinology of stress. En: *Fish stress and health in aquaculture*. Editado por G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, C. B. Schreck. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 95-118.
- Sumpter, J. P., H. M. Dye, T. J. Benfey. 1986. The effects of stress on plasma ACTH, alpha-MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 62: 377-385.
- Sumpter, J. P., J. F. Carragher, T. G. Pottinger, A. D. Pickering. 1987. The interactions of stress and reproduction in trout. En: *Proceedings of international symposium of reproductive physiology of fish*. Editado por D.

- R. Idler, L. W. Crim, J. M. Walsh. St John's Newfoundland: Memorial University Press, pp. 299-302.
- Sundararaj, B. I., S. W. Goswami, V. J. Lamba. 1982. Role of testosterone, estradiol-17 $\beta$ , and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General and Comparative Endocrinology*, 48: 390-397.
- Szerb, J. C., y R. F. Butterworth. 1992. Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 29: 135-153.
- Takahashi, A., T. Ogasawara, H. Kawauchi, T. Hirano. 1991. Effects of stress and fasting on plasma growth hormone levels in the immature rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 231-235.
- Takahashi, H., Y. Takada, N. Nagai, T. Urano, A. Takada. 1998. Extracellular serotonin in the striatum increased after immobilization stress only in the nighttime. *Behavioural Brain Research*, 91: 185-191.
- Tam, W. H., J. N. Fryer, B. Valentine, R. J. J. Roy. 1990. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity and plasma levels of estrogens and vitellogenin in brook trout exposed to low environmental pH. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 2468-2476.
- Tam, W. H., L. Birkett, R. Makaran, P. D. Payson, D. K. Whitney, C. K. C. Yu. 1987. Modification of Carbohydrate Metabolism and liver vitellogenic function in brook trout *Salvelinus fontinalis* by exposure to low pH. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 630-635.
- Tanaka T., H. Yokoo, K. Mizoguchi, M. Yoshida, A. Tsuda, M. Tanaka. 1991. Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain Research*, 544: 174-176.
- Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers, L. E. Underwood. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews*, 15: 80-101.
- Thissen, J. P., L. E. Underwood, J. M. Ketelslegers. 1999. Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury. *Nutrition Reviews*, 57: 167-176.
- Thomas, P. 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 9-28.
- Thomas, P., y L. Robertson. 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anaesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96: 69-86.
- Tintos, A., J. M. Míguez, J. M. Mancera, J. L. Soengas. 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*, 68: 251-263.
- Tison, F., E. Normand, M. Jaber, I. Aubert, B. Blonch. 1991. Aromatic L-aminoacid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in

- dopaminergic and serotonergic cell of the rat brainstem. *Neuroscience Letter*, 127: 203-206.
- Tomasso, J. R., K. B. Davis, B. A. Simco. 1981. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1106-1112.
- Tort, L., M. Puigcerver, S. Crespo, F. Padrós. 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, 33: 907-910.
- Trenzado, C. E., T. R. Carrick, T. G. Pottinger. 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology*, 133: 332-340.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6: 24-27.
- Tsantilas, H., A. D. Galatos, F. Athanassopoulou, N. N. Prassinou, K. Kousoulaki. 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture*, 253: 64-70.
- Tubío, R. I. C., J. L. Soengas, M. Aldegunde. 2002. Hyperglycemia induced by serotonin in rainbow trout: Effect mediated by epinephrine. En: *Proceedings of the 21<sup>st</sup> conference of European Comparative Endocrinologists*. Editado por R. Keller, H. Dirksen, D. Sedlmeier, H. Vaudry. Munduzzi Editore, Bonn, pp. 133-136.
- Turner, J. D., C. M. Wood, H. Hobe. 1983. Physiological consequences of severe exercise in the inactive benthic flathead sole (*Hippoglossoides elassodon*): a comparison with the active pelagic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*, 104: 269-288.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter, N. R. Bromage. 1988a. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology*, 246: 171-179.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter, N. R. Bromage. 1988b. Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology*, 248: 199-206.
- Tyler, C. R., T. G. Pottinger, E. Santos, J. P. Sumpter, S. A. Price, S. Brooks, J. J. Nagle. 1996. Mechanisms controlling egg size and number in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*, 54: 8-15.
- Tyler, C. R., y J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6: 287-318.
- Van der Boon, J., G. Van den Thillart, A. D. F. Addink. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 100: 47-53.
- Van der Kraak, G., M. E. Munkittrick, M. E. McMaster, C. B. Portt, J. P. Chang. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115: 224-233.

- Vanden Bossche, H., G. Willemsens, W. Cools, D. Bellens. 1984. Effects of etomidate on steroid biosynthesis in subcellular fractions of bovine adrenals. *Biochemical Pharmacology*, 33: 3861-3868.
- Varzana, M., M. Cammarata, E. L. Cooper, N. Parrinello. 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210: 231-243.
- Vedel, N. E., B. Korsgaard, F. B. Jenson. 1998. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 41: 325-342.
- Velisek, J., T. Wlasow, P. Gomulka, Z. Svobodova, L. Novotny. 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L). *Veterinarni Medicina*, 52:103-110.
- Ventura R., C. Morrone, S. Puglisi-Allegra. 2007. Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, 104: 5181-5186.
- Vijayan, M. M., C. Pereira, E. G. Grau, G. K. Iwama. 1997a. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 116: 89-95.
- Vijayan, M. M., C. Pereira, R. B. Forsyth, C. J. Kennedy, G. K. Iwama. 1997b. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Life Sciences*, 61: 117-127.
- Vijayan, M. M., J. S. Ballantyne, J. F. Leatherland. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88: 371-381.
- Vijayan, M. M., y J. F. Leatherland. 1989. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, 67: 2746-2750.
- Vijayan, M. M., y J. F. Leatherland. 1990. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of Endocrinology*, 124: 311-318.
- Vijayan, M. M., y T. W. Moon. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 379-386.
- Volpato, G. L., y R. E. Barreto. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1041-1045.
- Von Bohlen und Halbach, O., y R. Dermietzel. 2002. Neurotransmitters. En: *Neurotransmitters and neuromodulators. Handbook of receptors and biological effects*. Editado por D. J. Ballantyne. Wiley-UCH, Weinheim, pp. 40-107.

- Wagner, R. L., P. F. White, P. B. Kan, M. H. Rosenthal, D. Feldman. 1984. Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *New England Journal of Medicine*, 310: 1415-1421.
- Walsh, C. T., y B. C. Pease. 2002. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research*, 33: 627-635.
- Walsh, P. J., y C. L. Milligan. 1995. Effects of feeding and confinement on nitrogen metabolism and excretion in the gulf toadfish *Opsanus beta*. *Journal of Experimental Biology*, 198: 1559-1566.
- Wang, G. K., W. M. Mok, S. Y. Wang. 1994. Charged tetracaine as an inactivation enhancer in batrachotoxin-modified Na<sup>+</sup> channels. *Biophysical Journal*, 67: 1851-1860.
- Waring, C. P., R. M. Stagg, M. G. Poxton. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *Journal of Fish Biology*, 48: 161-173.
- Washburn, B. S., J. J. Moreland, A. N. Slaughter, I. Werner. 2002. Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 557-560.
- Wedemeyer, G. A., B. A. Barton, D. J. MacLeay. 1990. Stress and acclimation. En: *Methods for Fish Biology*. Editado por C. B. Schreck y P. B. Moyle. American Fisheries Society, USA, pp. 451-489.
- Wedemeyer, G. A., y D. J. MacLeay. 1981. Methods for Determining the Tolerance of Fishes to Environmental Stressors. En: *Stress and fish*. Editado por A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 247-275.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.
- Weyl, O., H. Kaiser, T. Hecht. 1996. On the efficacy and mode of action of 2-Phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L), at different temperatures and concentrations. *Aquaculture Research*, 27: 757-764.
- White, S. A., T. Nguyen, R. D. Fernald. 2002. Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2567-2581.
- Wicks, B. J., y D. J. Randall. 2002a. The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 59: 71-82.
- Wicks, B. J., y D. J. Randall. 2002b. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 132: 275-285.
- Wie, M. B., M. H. Won, K. H. Lee, J. H. Shin, J. C. Lee, H. H. Suh, D. K. Song, Y. H. Kim. 1997. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 225: 93-96.
- Wilson, R. W., y E. W. Taylor. 1992. Transbranchial ammonia gradients and acid-base responses to high external ammonia concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to different salinities. *Journal of Experimental Biology*, 166: 95-112.

- Winberg, S., A. Nilsson, P. Hylland, V. Söderstöm, G. E. Nilsson. 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters*, 230: 113-116.
- Winberg, S., G. E. Nilsson, K. H. Olsén. 1992. The effect of stress and starvation on brain serotonin utilization in arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Experimental Biology*, 165: 229-239.
- Winberg, S., y G. E. Nilsson. 1993. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106: 597-614.
- Wojtaszek, J., D. Dziewulska-Szwajkowska, M. Łozińska-Gabska, A. Adamowicz, A. Dżugaj. 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology*, 125: 176-183.
- Wood, C. M., B. R. McMahon, D. G. McDonald. 1977. An analysis of changes in blood pH following exhausting activity in the starry flounder. *Platichthys stellatus*. *Journal of Experimental Biology*, 69: 173-185.
- Woody, C. A., J. Nelson, K. Ramstad. 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, 60: 340-347.
- Woolsey, J., M. Holcomb, R. L. Ingermann. 2004. Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. *North American Journal of Aquaculture*, 66: 35-41.
- Yang, B. H., Z. G. Piao, Y. B. Kim, C. H. Lee, J. K. Lee, J. S. Kim, S. B. Oh. 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of Dental Research*, 82: 781-785.
- Yokoo H., M. Tanaka, T. Tanaka, A. Tsuda. 1990. Stress-induced increase in noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracranial microdialysis. *Experientia*, 46: 290-292.
- Yoshioka, M., M. Matsumoto, H. Togashi, H. Saito. 1995. Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 51: 515-519.
- Yuwiler, A. 1971. Stress. En: *Handbook of neurochemistry*. Volume VI, Alterations of chemical equilibrium in the nervous system. Editado por A. Lajtha. Plenum Press, New York, pp. 103-171.
- Zarate, J., y T. M. Bradley. 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture*, 223: 175-187.
- Zohar, J., y C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.
- Zohar, Y. 1980. Dorsal aorta catheterization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): I. Its validity in the study of blood gonadotropin patterns. *Reproduction, Nutrition, Development*, 20: 1811-1823.
- Zohar, Y., M. Harel, S. Hassin, A. Tandler. 1995. Gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). En: *Broodstock management and egg and larval quality*. Editado por N. R. Bromage y R. J. Roberts. Blackwell Science, Oxford, pp. 94-117.



