

ACTUALIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS EN BIENESTAR ANIMAL EN EXPERIMENTACIÓN CON PECES DE INTERÉS EN ACUICULTURA

Sedación y anestesia en peces

Ismael Jerez Cepa

Profesor del Departamento de Biología

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca

¿Qué tenemos que tratar sobre sedación y anestesia?

1. Aspectos legales
2. Conceptos generales (I y II)
3. Aplicación en peces



1. Sedación y anestesia: Aspectos legales

20.10.2010

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

L 276/33

DIRECTIVAS

DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 22 de septiembre de 2010

relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos

(Texto pertinente a efectos del EEE)

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea y, en particular, su artículo 114,

del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos ⁽⁴⁾. Al convertirse en Parte en ese Convenio, la Comunidad reconoció la importancia de la protección internacional de los animales utilizados para fines científicos y de su bienestar.



¿Qué dice la Directiva 2010/63/UE sobre la sedación y la anestesia?

DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1. Objeto y ámbito de aplicación

2. La presente Directiva se aplicará cuando se utilicen o se prevea utilizar animales en procedimientos o se críen animales específicamente para que sus órganos o tejidos puedan utilizarse con fines científicos.

La presente Directiva se aplicará hasta que los animales contemplados en el anterior párrafo hayan sido sacrificados, realojados o reintegrados a un hábitat o sistema zootécnico conveniente.

La eliminación del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero mediante la utilización satisfactoria de analgesia, anestesia u otros métodos no excluirá del ámbito de aplicación de la presente Directiva la utilización de un animal en procedimientos.





¿Qué dice la Directiva 2010/63/UE sobre la sedación y la anestesia?

DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 14. Anestesia

1. Los Estados miembros velarán por que los procedimientos se realicen, salvo si ello es inadecuado, con anestesia general o local o que se utilicen analgésicos u otros métodos adecuados para asegurarse de que el dolor, el sufrimiento y la angustia se reducen al mínimo.

Los procedimientos que impliquen lesiones graves que puedan causar dolores severos no se llevarán a cabo sin anestesia.

2. Al decidir lo adecuado de utilizar la anestesia se tendrá en cuenta lo siguiente:

- a) si se considera que la anestesia es más traumática para el animal que el procedimiento en sí, y
- b) si la anestesia es incompatible con la finalidad del procedimiento.





¿Qué dice la Directiva 2010/63/UE sobre la sedación y la anestesia?

DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 14. Anestesia

3. Los Estados miembros velarán por que **no se suministre a los animales ningún medicamento para detener o restringir sus manifestaciones de dolor sin una dosis adecuada de anestesia o analgésicos.**

En dichos casos, debe proporcionarse una justificación científica acompañada de una descripción del tratamiento por anestesia o analgesia.

4. Si un animal puede sufrir dolor cuando hayan desaparecido los efectos de la anestesia, se tratará con analgésicos de anticipación y postoperatorios u otro método adecuado para calmar el dolor siempre que sea compatible con los fines del procedimiento.
5. Tan pronto como se haya conseguido la finalidad del procedimiento, se tomarán las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento del animal.



¿Y en el RD 53/2013?

I. DISPOSICIONES GENERALES

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

1337

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

El Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea incluye, dentro de las disposiciones de aplicación general, en su artículo 13, la obligación de la Unión y de los Estados miembros de tener plenamente en cuenta el bienestar de los animales cuando formulen y apliquen algunas políticas, tales como la política de investigación, de desarrollo tecnológico y de mercado interior. En este ámbito, el 22 de septiembre de 2010, el Parlamento Europeo y el Consejo adoptaron la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, que debe ser incorporada al ordenamiento jurídico español.

**Prácticamente lo mismo,
pero a la española**



¿Qué dice el Real Decreto 53/2013 sobre la sedación y la anestesia?

CAPÍTULO V: Procedimientos y proyectos *Sección 1.ª Procedimientos*

Artículo 26. Anestesia y analgesia durante el procedimiento

1. Los procedimientos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local, salvo que se considere que es inapropiada porque:
 - a) Es más traumática para el animal que el procedimiento en sí.
 - b) Es incompatible con los fines del procedimiento.
2. Deberán utilizarse analgésicos u otros métodos idóneos para garantizar, en la medida de lo posible, que el dolor, el sufrimiento, la angustia o la lesión sean mínimos. Su aplicación, cuando proceda, debe ser realizada o supervisada por un veterinario.
3. Los procedimientos que impliquen lesiones graves que puedan causar dolores intensos no se llevarán a cabo sin anestesia.



¿Qué dice el Real Decreto 53/2013 sobre la sedación y la anestesia?



CAPÍTULO V: Procedimientos y proyectos *Sección 1.ª Procedimientos*

Artículo 26. Anestesia y analgesia durante el procedimiento

4. No se suministrará a un animal ningún medicamento que impida o restrinja sus manifestaciones de dolor, salvo que haya recibido una dosis adecuada de anestesia o analgesia. En caso de que se suministre ese tipo de medicamentos deberá proporcionarse una justificación científica acompañada de una descripción del tratamiento por anestesia o analgesia, que estará a disposición del órgano competente.
5. Siempre que sea compatible con los fines del procedimiento, cuando se prevea que un animal va a sufrir dolor después de haberse recuperado de la anestesia, se le aplicará un tratamiento analgésico preventivo y paliativo, u otro método adecuado para calmar el dolor.

Además no podemos olvidar...

SOBREDOSIS DE ANESTÉSICO PARA EUTANASIA EN PECES

|  | BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO | | | | | | | | |  |
|---|------------------------------|----------|----------|------|----------|---------|--|----------------------|----------|---|
| Núm. 34 | Viernes 8 de febrero de 2013 | | | | | | Sec. I. Pág. 11415 | | | |
| 3. Cuadro. | | | | | | | | | | |
| Animales, Observaciones/ métodos | Peces | Anfibios | Reptiles | Aves | Roedores | Conejos | Perros, gatos, hurones y zorros | Grandes mamíferos | Primates | |
| Sobredosis de anestésico. | (1) | (1) | (1) | (1) | (1) | (1) | (1) | (1) | (1) | |
| Pistola de clavija perforadora. | X | X | (2) | X | X | X | X | X | X | |
| Dióxido de carbono. | X | X | X | X | (3) | X | X | X | X | |
| Dislocación cervical. | X | X | X | (4) | (5) | (6) | X | X | X | |
| Conmoción cerebral / Golpe contundente en la cabeza. | X | X | X | (7) | (8) | (9) | (10) | X | X | |
| Decapitación. | X | X | X | (11) | (12) | X | X | X | X | |
| Aturdimiento eléctrico. | (13) | (13) | X | (13) | X | (13) | (13) | (13) | X | |
| Gases inertes (Ar, N ₂). | X | X | X | X | X | X | X | (14) | X | |
| Disparo con rifles, pistolas y municiones adecuados. | X | X | (15) | X | X | X | (16) | (15) | X | |

Requisitos:

1) Debe utilizarse, en su caso, previa sedación del animal.

En resumen...

La **SEDACIÓN** y la **ANESTESIA** son igualmente **aspectos fundamentales** tanto en la Directiva 2010/63/EU como, obviamente, en el RD 53/2013, pues están directamente ligados a reducir el sufrimiento, el dolor y la angustia.

De cara a trabajar con animales de experimentación, no hay que olvidar que:

1. Los **procedimientos siempre se deben realizar con anestesia general o local**, salvo que se considere que es inapropiado.
2. Estos compuestos se emplearán para **garantizar**, en la medida de lo posible, que el **dolor, el sufrimiento, la angustia o la lesión sean mínimos**.
3. Se debe **administrar el tipo y la cantidad adecuada de anestésico**. No se suministrará ningún medicamento que impida o restrinja sus manifestaciones de dolor, salvo que haya recibido una dosis adecuada de anestesia o analgesia.
4. También se debe administrar como **analgésico preventivo o paliativo tras la recuperación** del procedimiento si se prevé la existencia de dolor.
5. La **sobredosis de anestésico** es un método aprobado para la **eutanasia en peces**. Es necesario la sedación previa del animal.

2. Sedación y anestesia: Conceptos generales I

SEDACIÓN, ANESTESIA y ANALGESIA
¿SON LO MISMO?



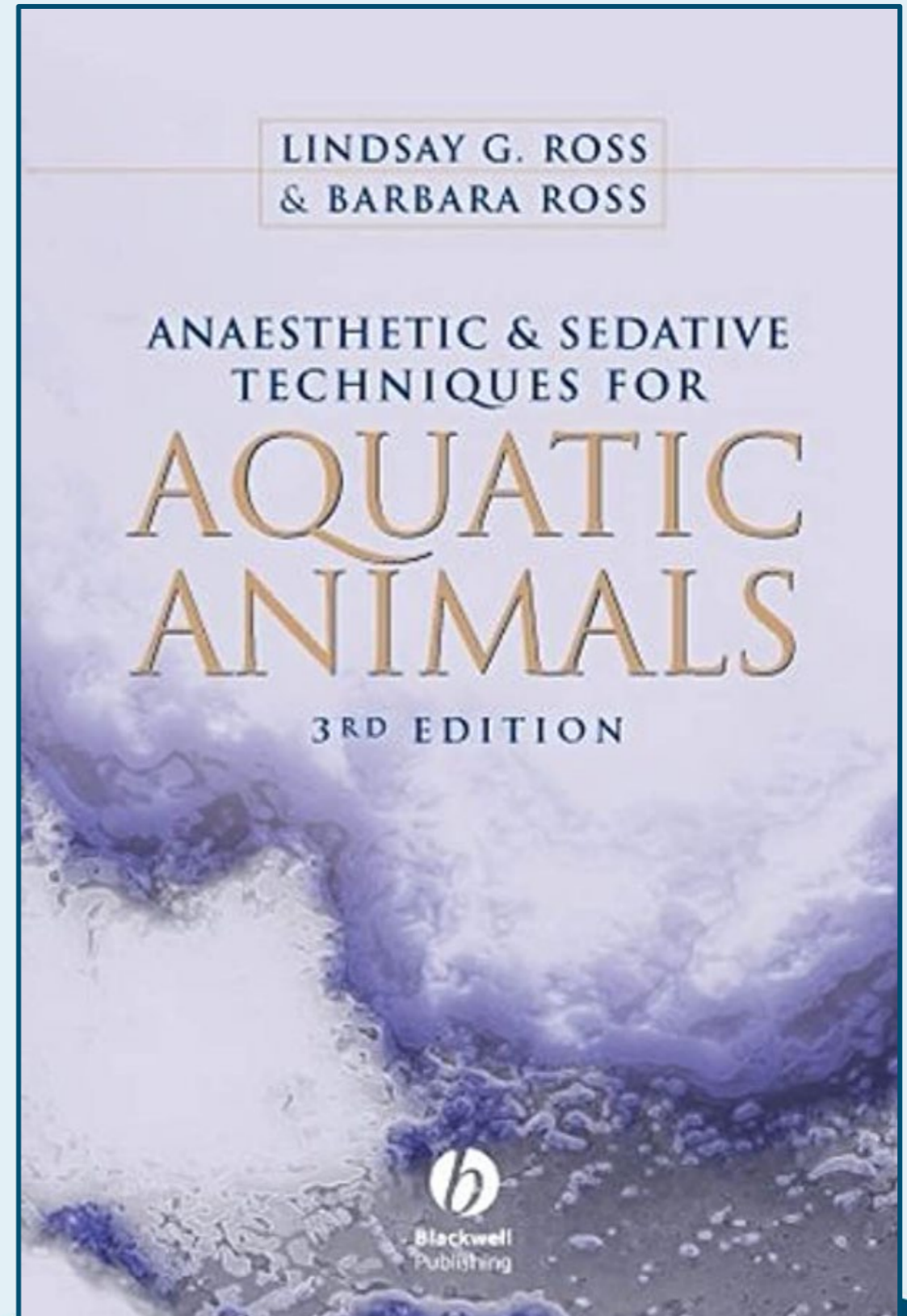
2. Sedación y anestesia: Conceptos generales I

Información tomada de:

*Anaesthetic and Sedative Techniques
for Aquatic Animals*
(2008)

Edited by:
Lindsay G. Ross and Barbara Ross

ISBN: 978-1-4051-4938-9



ANESTESIA GENERAL y SEDACIÓN

La palabra anestesia deriva de un concepto griego significa pérdida de sensibilidad o insensibilidad. Esto puede darse de diferentes maneras, por lo que es necesario concretar.

En términos generales, **la sedación** (definida como un efecto calmante) es un **estado preliminar de anestesia** en un continuo en el que **se induce somnolencia, con percepción sensorial embotada** y quizás con **algo de analgesia** (insensibilidad al dolor), pero en el que **no hay una gran pérdida de percepción sensorial o de equilibrio**.

La **anestesia general completa** puede definirse como *“una pérdida generalizada y reversible de la percepción sensorial acompañada de un estado de sueño inducido por fármacos o por medios físicos”*. *“La anestesia general implica un estado de depresión general del SNC que implica hipnosis, analgesia, supresión de la actividad refleja y relajación de los músculos voluntarios”*.



Adaptado de Ross y Ross 2008. Elaboración propia

ANESTESIA GENERAL y SEDACIÓN

El término **narcosis** también se usa con frecuencia al hablar de anestesia y agentes anestésicos. Un narcótico se define como un "*agente que induce el sueño cuyo efecto varía según la fuerza y la cantidad del agente narcótico administrado*". En experimentación animal, la anestesia suele asumir que la recuperación ocurrirá o podría ocurrir, mientras que la **narcosis puede usarse cuando no se anticipa la recuperación**. Es evidente que existe una gran superposición en el uso de estos términos y la narcosis y la anestesia son esencialmente sinónimos.

Table 4.1 Methods used to produce general or local anaesthesia.

| Method | Technique |
|------------------|--|
| Physical | Hypothermia Electrical stimulation <i>Acupuncture</i> <i>Pressure</i> |
| Chemical (drugs) | Inhalation Parenteral: Intravenous Intraperitoneal Intramuscular Oral (enteral) <i>Rectal</i> |
| Psychological | <i>Suggestion/Distraktion</i> <i>Hypnosis</i> |

Adapted from Heavner 1981.
Techniques in bold italics have *not* been shown to be effective in aquatic animals.

La **anestesia general** y la **sedación** se pueden inducir mediante una variedad de técnicas que incluyen métodos físicos, químicos y psicológicos. Algunas de estas técnicas se aplican a los animales acuáticos, aunque otras casi con certeza no lo hacen.

Tomado de Ross y Ross 2008

ANESTESIA LOCAL

La **anestesia local** se puede definir como una técnica para producir pérdida reversible de la sensibilidad en una **región discreta del cuerpo sin afectar la conciencia**.

Normalmente, se trata una pequeña parte del cuerpo, pero en la anestesia local puede estar involucrada una parte más grande del cuerpo. Los **fármacos anestésicos locales** se administran **directamente en la zona** donde se necesita que actúen y no es necesario que sean absorbidos por el torrente sanguíneo para que sean efectivos.

Se administran mediante inyección o aplicando el fármaco en la superficie, generalmente la piel, un procedimiento conocido técnicamente como **bloqueo tópico**. Los anestésicos locales producen su efecto al bloquear la propagación de los potenciales de acción en los receptores y los nervios en el sitio seleccionado y cerca del mismo, previniendo de manera efectiva la transmisión de cualquier estímulo doloroso al sistema nervioso central y bloqueando la acción muscular.

Además del uso de fármacos, la anestesia local también se puede producir mediante el uso de hipotermia aplicada localmente, corriente eléctrica, acupuntura, aplicación de presión e incluso hipnosis aunque, claramente, muchos de estos métodos no serían efectivos en animales acuáticos.

ANALGESIA

La analgesia es el alivio del dolor. Es un bloqueo de la percepción del dolor con o sin retención de otras habilidades sensoriales y con o sin control continuo de la función motora. Por lo general, no da como resultado la pérdida del equilibrio. En los animales se refleja en una respuesta reducida a los estímulos nocivos. Nuevamente, debido a la naturaleza y definición del dolor en sí mismo, y debido a que los animales no pueden expresar la sensación de dolor de la misma manera que los humanos, la analgesia en animales puede ser difícil de juzgar. Se complica aún más por el hecho de que la respuesta a estímulos normalmente nocivos puede cambiar y se pueden aprender nuevas respuestas.

En general, se puede considerar que el alivio del dolor o la analgesia en animales acuáticos ha ocurrido cuando el sujeto ya no responde, o tiene una respuesta marcadamente reducida, a estímulos normalmente nocivos después de la sedación o la anestesia.

Los signos físicos y las respuestas motoras se han utilizado como indicadores de analgesia. Dado que los equipos clínicos fisiológicos se han vuelto más pequeños, más asequibles y más fiables, muchos estudios modernos que evalúan la analgesia incluyen la monitorización del electroencefalograma.

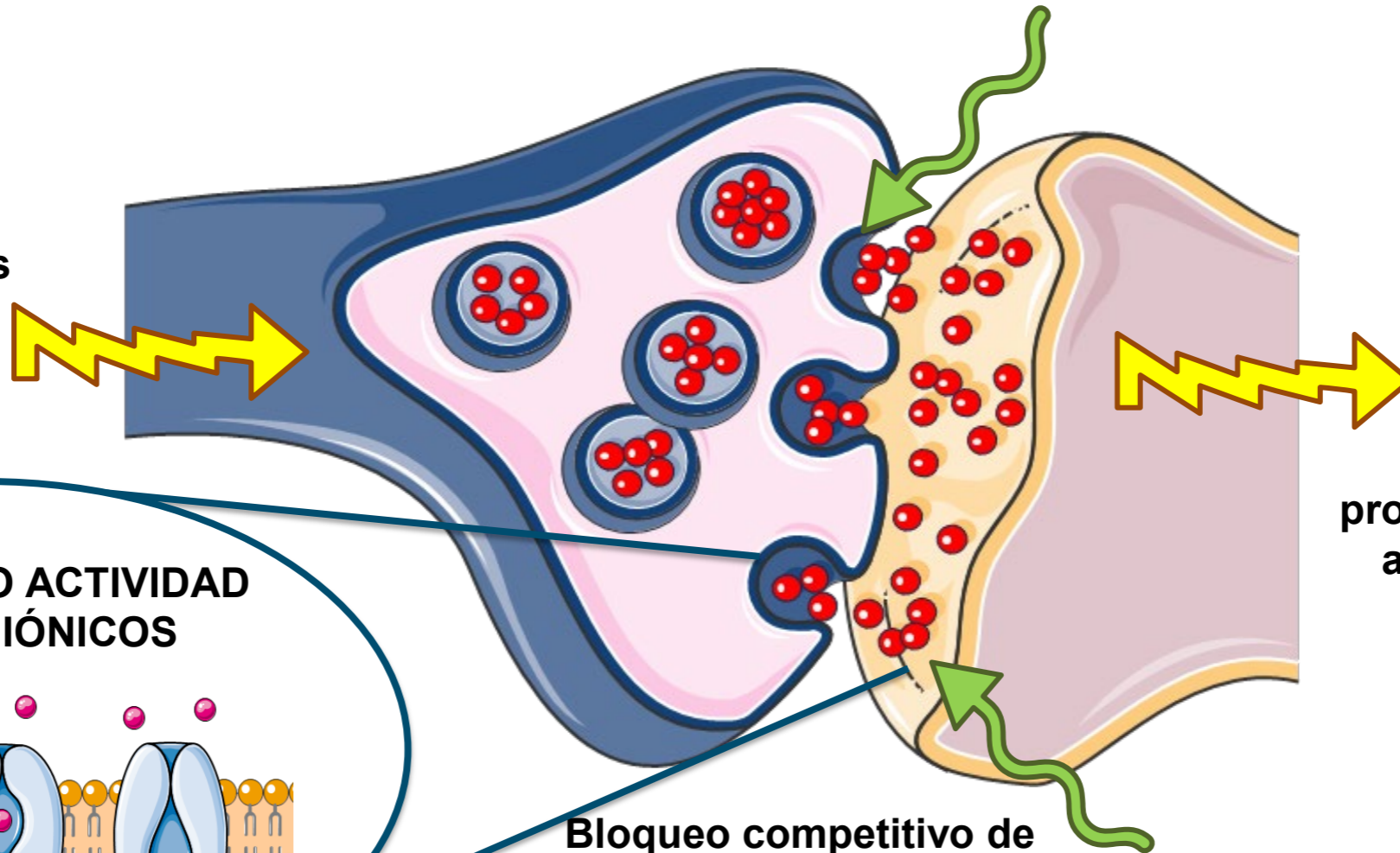


MECANISMOS DE ANESTESIA

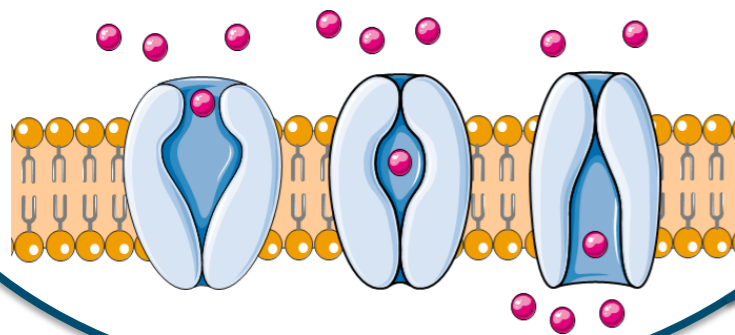
Posibles mecanismos de acción de los compuestos anestésicos

Estabilización de la membrana sináptica y bloqueo de la liberación del transmisor

Estabilizando la propagación en los axones aferentes



MODIFICANDO ACTIVIDAD CANALES IÓNICOS



Bloqueo competitivo de los sitios receptores

Adaptado de Ross y Ross 2008. Elaboración propia

ETAPAS DE LA ANESTESIA

Cuando la inducción es lenta, se puede observar una **serie de etapas de, primero, sedación y luego anestesia**, que ocurren en la mayoría de los animales. Las etapas progresivas de sedación y anestesia fueron adaptadas y descritas por primera vez para peces por McFarland (1959).

Table 4.3 Stages of anaesthesia in fish.

| Stage | Plane | Description | Physiological and behavioural signs |
|-------|-------|----------------------|---|
| I | 1 | Light sedation | Responsive to stimuli but motion reduced, ventilation decreased |
| | 2 | Deep sedation | As Stage I Plane 1: some analgesia, only receptive to gross stimulation |
| II | 1 | Light anaesthesia | Partial loss of equilibrium; good analgesia |
| | 2 | Deeper anaesthesia | Total loss of muscle tone, total loss of equilibrium, ventilation almost absent |
| III | | Surgical anaesthesia | As Stage II, Plane 1: total loss of reaction to even massive stimulation |
| IV | | Medullary collapse | Ventilation ceases, cardiac arrest, eventual death; overdose |

After McFarland (1959).

ETAPAS DE LA ANESTESIA

A efectos prácticos, la anestesia se reduce a tres fases obvias, inducción, mantenimiento y recuperación:

- **INDUCCIÓN:** Durante la inducción el animal es expuesto al agente anestésico para lograr la etapa deseada. La **inducción suele ir acompañada de hiperactividad**, por lo general una respuesta de sólo unos segundos a la sensación o a las propiedades ligeramente irritantes del fármaco. En general, **la inducción debe ser rápida y sin hiperactividad marcada**, aunque suele haber alguna. El animal presentará una **sucesión de los signos**, entre los que destacan la **ataxia y la pérdida del reflejo de enderezamiento**, pasando finalmente a la **anestesia quirúrgica sin reacción a ningún estímulo**.
- **MANTENIMIENTO:** **prolongar la etapa alcanzada de manera estable** sin detrimento de la salud del animal. Debe transcurrir sin incidentes y lo más probable es que sea eficaz con una dosis reducida del fármaco. En este estado, es necesario **controlar el entorno del animal anestesiado y atender las necesidades fisiológicas, como el suministro de oxígeno y la eliminación de gases de desecho y metabolitos**.

ETAPAS DE LA ANESTESIA

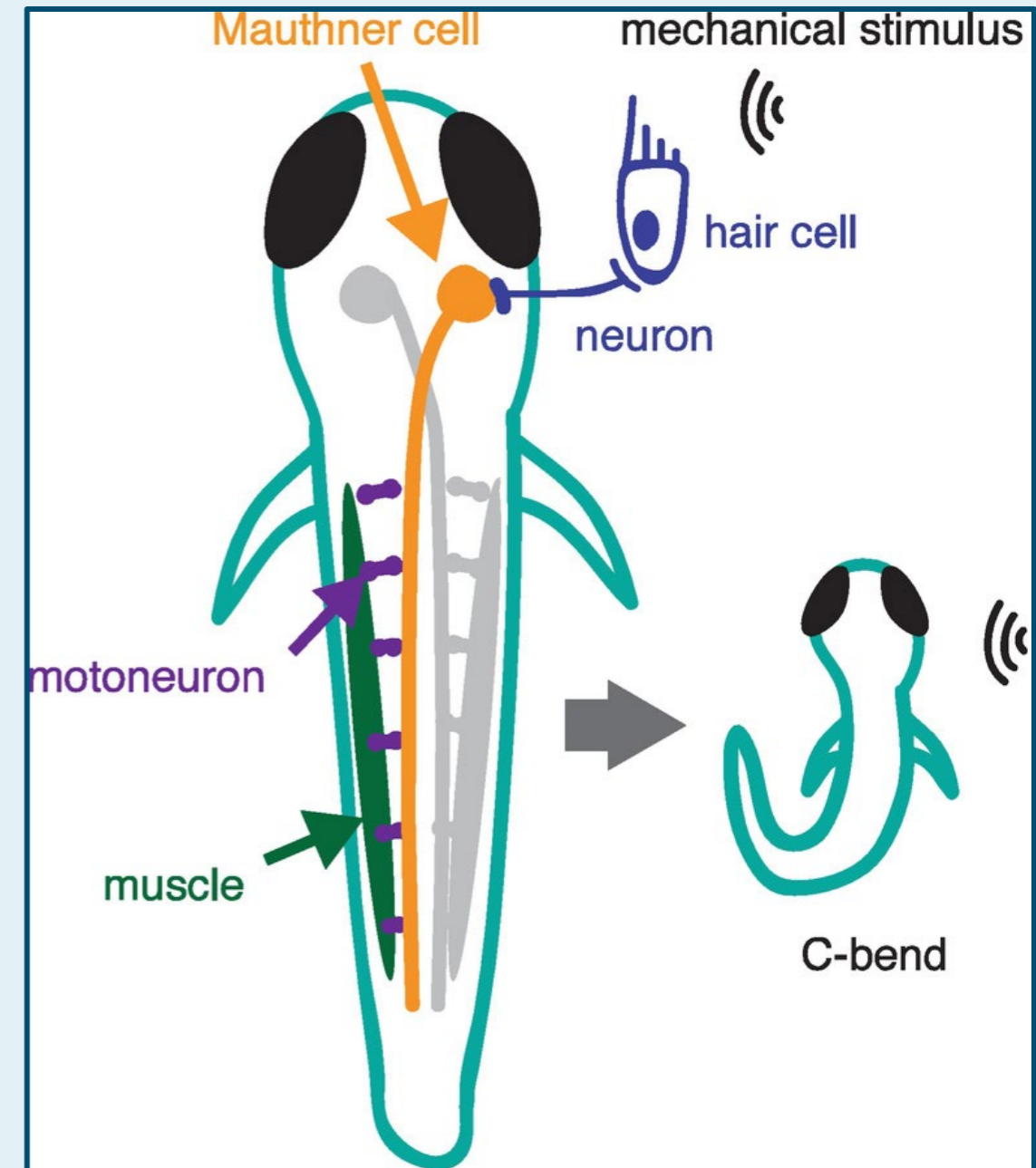
Es habitual **monitorear el estado de los animales durante el mantenimiento**. Esto se logra ya sea visualmente o mediante la medición de la tasa de ventilación o la monitorización de ECG o EEG. La sobreexposición puede ir acompañada de un "encendido" de los opérculos, que puede repetirse varias veces (Klontz y Smith, 1968). Se deben tomar medidas inmediatas para recuperar al animal.



ETAPAS DE LA ANESTESIA

- **RECUPERACIÓN:** La fase de recuperación implica la **retirada del agente anestésico y la vuelta al estado normal**. La recuperación inicial puede tardar **desde unos pocos segundos hasta unos minutos**, pero en general debe ser **rápida y sin alteración del comportamiento u otros efectos secundarios**, aunque normalmente habrá algo de temblor muscular.

El animal intentará enderezarse y comenzará a responder al ruido u otros estímulos sensoriales. En los peces, a menudo se puede promover el enderezamiento completo golpeando el tanque de retención que estimula los **axones de Mauthner**. El tiempo para una recuperación completa puede ser de minutos a días y dependerá de las especies y drogas utilizadas.



Tomado de Ozdemir et al. 2020

DOSIS, TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EFECTO ALCANZADO

Como ya se ha descrito, el efecto anestésico real logrado dependerá de:

- i. la **dosis** o nivel de agente utilizado,
- ii. y la **duración de la exposición** a ese agente.

Si el agente es suficientemente fuerte, el animal pasará rápida e indistinguiblemente por todas las etapas posibles de la anestesia. A concentraciones más bajas, se puede lograr una condición en la que la tasa de eliminación sea igual a la tasa de absorción y luego se puede mantener un estado aproximadamente estable.

Comprender esta **relación entre dosis, tiempo de exposición y etapa anestésica alcanzada** es muy importante para asegurar un buen control de un procedimiento y es particularmente importante en la anestesia de baño que se usa frecuentemente con animales acuáticos.

El **grado y la naturaleza de la analgesia lograda y la facilidad de recuperación también son extremadamente importantes**. Desafortunadamente, las descripciones adecuadas de todas estas características rara vez están disponibles para la mayoría de los agentes.



DOSIS, TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y EFECTO ALCANZADO

La **evaluación de la analgesia es muy importante**, pero rara vez se realiza. En la mayoría de los casos, se supone que la analgesia es eficaz porque el animal está inmovilizado.

Esta puede ser una suposición razonable con algunas clases de fármacos anestésicos, pero **no se puede confiar** en ella en todos los casos. En consecuencia, siempre se debe realizar una evaluación adecuada de la analgesia cuando se investigan nuevos agentes para animales acuáticos. Los animales pueden estar inmovilizados pero no libres de dolor.

Algunos estudios recientes han utilizado indicadores fisiológicos más apropiados, como el EEG, para evaluar la actividad cerebral. Estas técnicas son indicadores más confiables de las respuestas del sistema nervioso periférico y central a un agente anestésico.

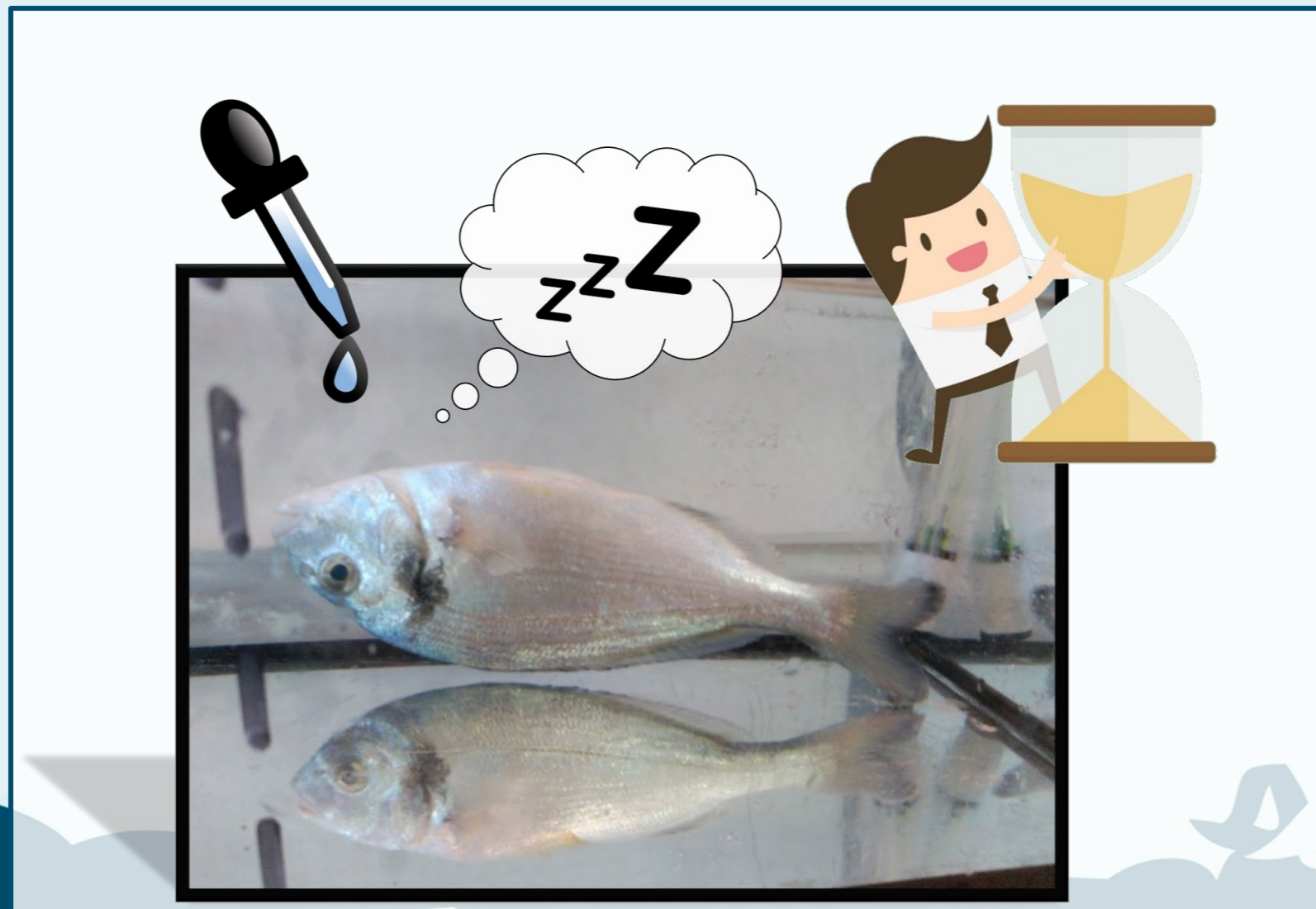


MENSAJE PARA LLEVAR AL LABORATORIO:

1. Una **comprensión básica de la naturaleza de la anestesia** y cómo inmoviliza y ayuda a suprimir el dolor **es esencial** para que los usuarios puedan comprender y controlar el proceso.
2. La **comprensión de la naturaleza de la anestesia permite** a los trabajadores juzgar la inducción, la profundidad de la anestesia y de la analgesia, y poder **adaptar el esquema básico a nuevas especies y circunstancias**.
3. Es importante **utilizar sedación o anestesia suficiente para el fin, evitando la sobredosis**; algo relativamente común entre los practicantes. Muchos accidentes ocurren cuando los trabajadores implementan métodos probados de manera inadecuada, por lo que instamos a todos los que tengan la intención de llevar a cabo la sedación o anestesia animal, de cualquier tipo, a una experimentación previa juiciosa.
4. **La anestesia y la sedación** son solo parte de la caja de herramientas de la experimentación con animales acuáticos, pero **si se manejan mal pueden arruinarlo todo**.

2. Sedación y anestesia: Conceptos generales II

- ✓ **CARACTERÍSTICAS DE LOS ANESTÉSICOS**
- ✓ **FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR SU EFECTIVIDAD**



CARACTERÍSTICAS DE LOS ANESTÉSICOS

En términos generales, existen tres enfoques principales para la sedación y la anestesia de los peces:

- i. el uso de fármacos y gases,
- ii. la inducción de hipotermia,
- iii. y la exposición a la corriente eléctrica.

Algunas de las propiedades requeridas de un agente anestésico son comunes a todos los métodos en uso actual, aunque en algunos casos se necesitarán consideraciones especiales o medidas de seguridad específicas.

Es poco probable que cualquier agente, ya sea existente o aún por descubrir, pueda cumplir con todos los requisitos previos ideales.



DECÁLOGO DEL BUEN ANESTÉSICO

- I. *Fácil de administrar.*
- II. *Efectivo a una dosis de exposición baja.*
- III. *Proporciona una sedación y una anestesia predecibles.*
- IV. *Proporciona una buena analgesia.*
- V. *Induce el estado deseado de una manera rápida.*
- VI. *Es fácil de mantener en el estado deseado.*
- VII. *Es fácil revertir el proceso.*
- VIII. *Recuperación rápida sin incidentes.*
- IX. *Tiene un amplio margen de seguridad.*
- X. *Bajo coste.*



CARACTERÍSTICAS DE LOS ANESTÉSICOS

TIEMPO DE INDUCCIÓN



- Anestesia o sedación rápidas.
- Con un mínimo de hiperactividad u otro estrés acompañante.
- Fácil de administrar, sin procedimientos complejos.
- Debe ser fácil mantener a los animales en el estado elegido.
- Debe proporcionar una inmovilización adecuada y una analgesia eficaz.

TIEMPO DE RECUPERACIÓN



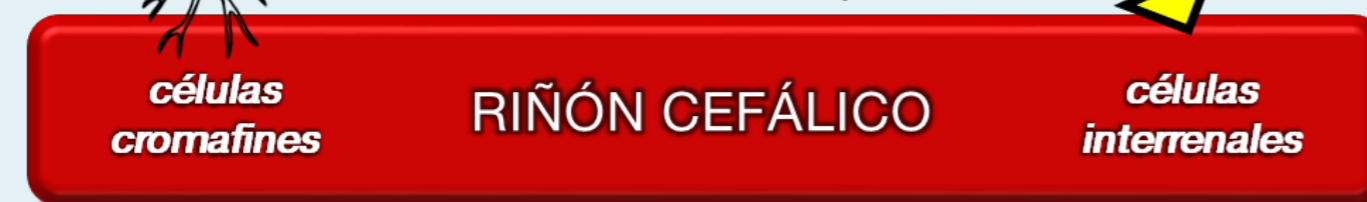
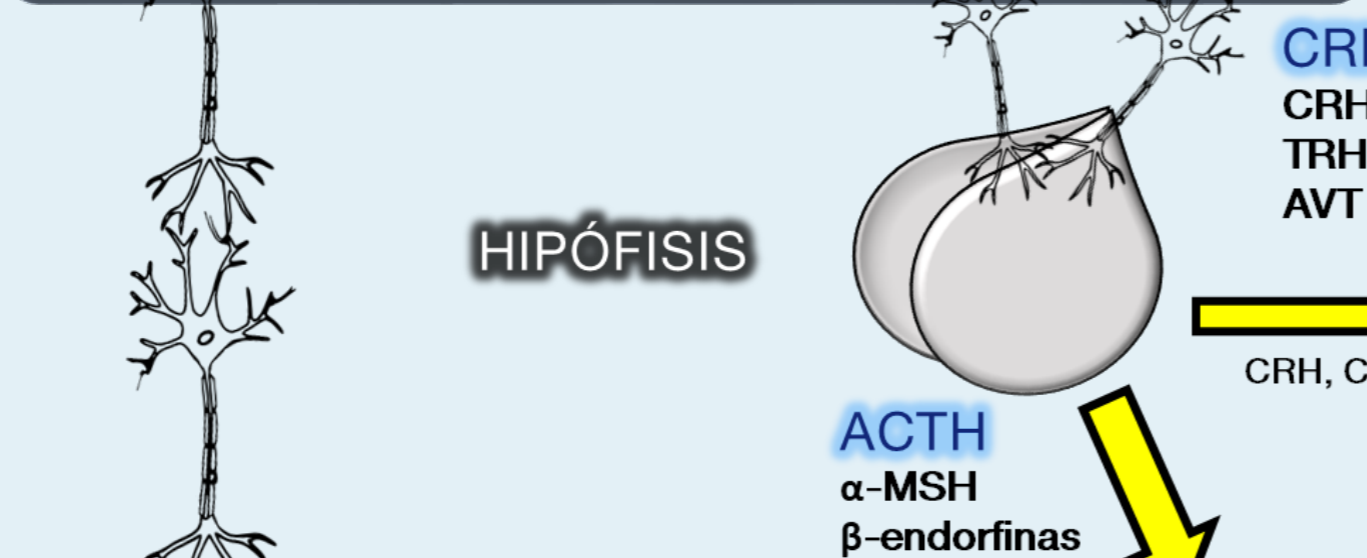
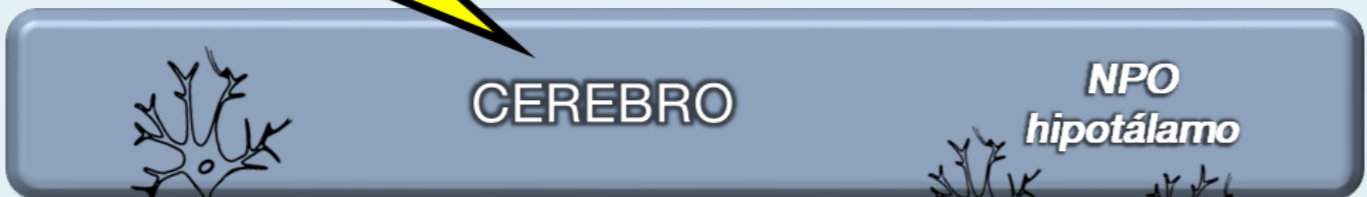
- Recuperación rápida, en el menor tiempo posible en agua limpia.
- Sin incidentes.
- Sin ataxia prolongada.
- Sin otros efectos o características indeseables como parálisis parciales.

AGENTE ESTRESANTE

REGULACIÓN ENDOCRINA DEL ESTRÉS

Eje Hipotalámico-Hipofisario-Interrenal
(HPI en inglés)

Eje Cerebro-Simpático-Cromafín
(BSC en inglés)



catecolaminas
CRH, CRHBP, ACTH

Circulación Periférica

CORTISOL

Circulación Periférica

¿POR QUÉ
<3 min?



CARACTERÍSTICAS DE LOS ANESTÉSICOS

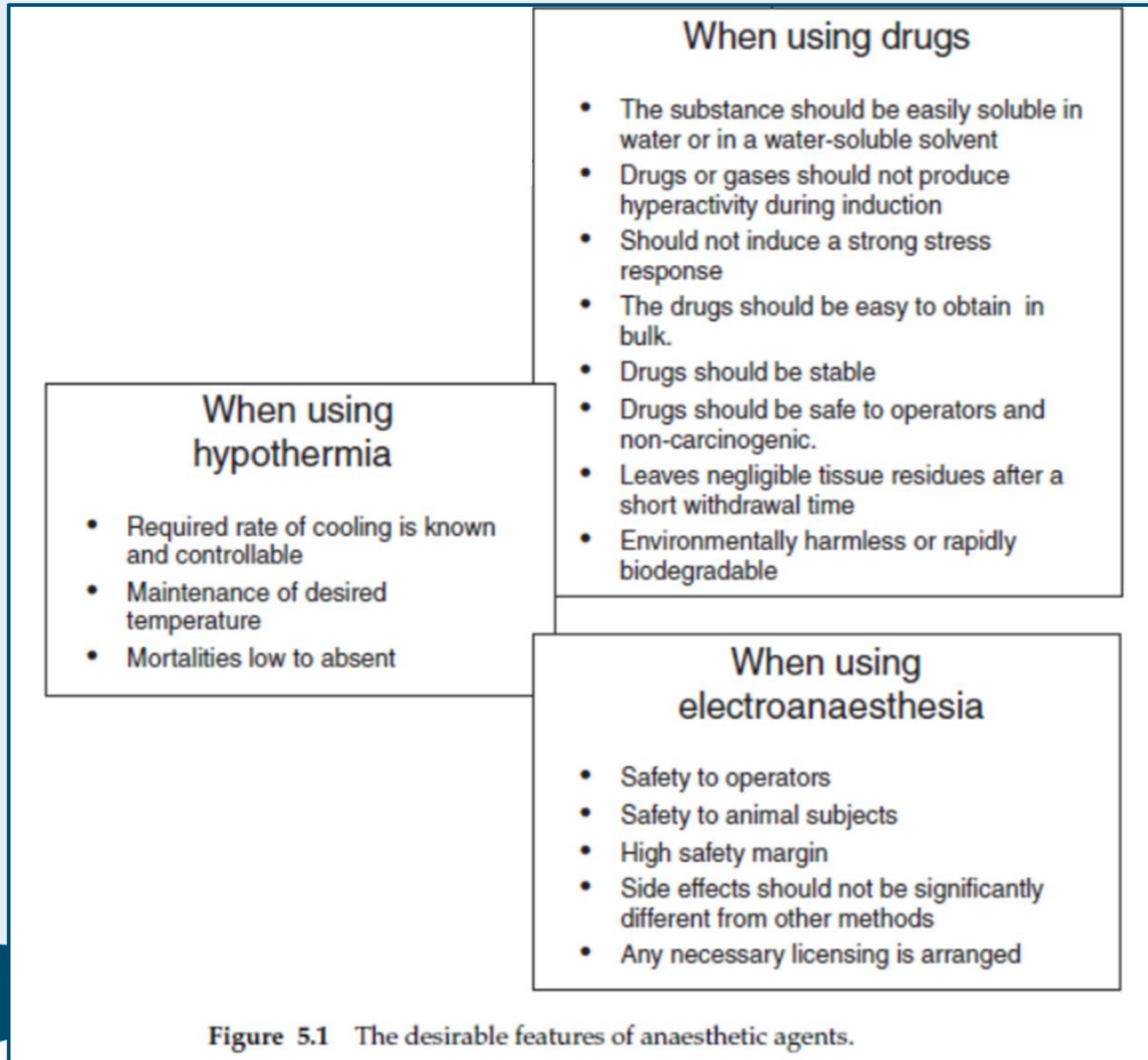


Figure 5.1 The desirable features of anaesthetic agents.

Tomado de
Ross y Ross 2008

FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR SU EFECTIVIDAD

BIÓTICOS



VS

AMBIENTALES



FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR SU EFECTIVIDAD

Table 7.1 Factors affecting the efficacy of anaesthetics for fish..

| Factor group | Factor | Probable mechanisms |
|---------------|--|---|
| Biological | Species Strain or genetic variant Size and/or weight Sex and sexual maturity Lipid content Body condition Disease status Stress | <ul style="list-style-type: none">• Differences in body design and habit• Gill area to body weight ratio• Physiological variability• Differences in enzymes• Change in metabolic rate• Lipid content of body, especially of gonads• Use of lipophilic drugs• Oily fish or older specimens• Exhausted animals, post-spawners• Weakened or exhausted animals |
| Environmental | Temperature pH Salinity Mineral content of environment | <ul style="list-style-type: none">• Q_{10} as in all ectotherms (poikilotherms)• pK_a effects and ionisation of molecules• Buffering effects• Calcium antagonism |

Tomado de Ross y Ross 2008

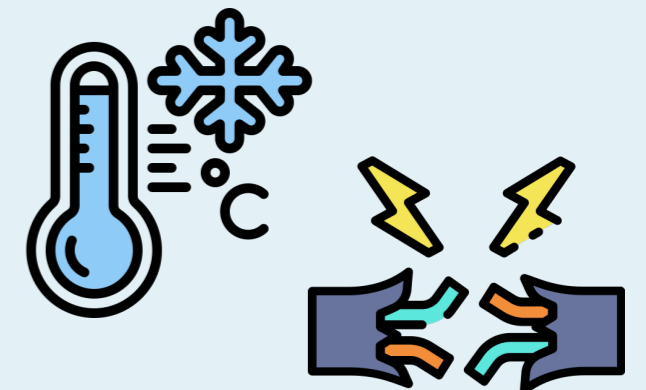
MENSAJE PARA LLEVAR AL LABORATORIO:

1. Las **características deseables** de un agente anestésico son una **lista de deseos**, un conjunto quizás inalcanzable de parámetros ideales.
2. Sin embargo, **muchos fármacos cumplen la mayoría de estas características y** tienden a ser los de uso más amplio.
3. Aunque es útil que los operadores estén al tanto de los **factores bióticos y abióticos que afectan a la sedación y anestesia**, no siempre es posible **tenerlos en cuenta todos de manera predecible**.
4. Los efectos acumulativos de estas variaciones se observan a menudo cuando se anestesian lotes de peces de diferentes especies, cuando con frecuencia resulta obvio que algunos individuos responden de manera muy diferente a la mayoría de sus compañeros, tanto de su propia especie como de otras.

3. Sedación y anestesia: Aplicación en peces

Básicamente, en peces existen 3 vías de aplicación:

- **INHALACIÓN** (fármacos disueltos / gases)
- **VÍA PARENTERAL** (inyección) y **ORAL**
- **MÉTODOS NO-QUÍMICOS** (hipotermia y electroanestesia)



INHALACIÓN



Esta **es la técnica más utilizada** y depende de que el fármaco anestésico se encuentre en solución acuosa. **La solución del fármaco es ventilada (es decir, inhalada)** por los peces y las moléculas del fármaco se difunden rápidamente en los espacios sanguíneos de las laminillas secundarias, que drenan en la sangre arterial eferente desde donde es una ruta muy corta hacia el sistema nervioso central.

Este **proceso es análogo a la anestesia gaseosa en los vertebrados terrestres**. Al regresar al agua limpia, los fármacos, o sus metabolitos, se excretan con mayor frecuencia a través de las branquias y, en mucha menor medida, por la piel. Algunos materiales también pueden excretarse por vía renal, ya sea intactos o como metabolitos.

Hay ciertas especies de peces, algunas de las cuales son importantes en la acuicultura, que pueden respirar aire, lo que hace que esta técnica sea insatisfactoria.

INHALACIÓN



COMPUESTOS MÁS USADOS

Widely used drugs for inhalation anaesthesia

MS222

Benzocaine

Clove oil

AQUI-S®

Quinaldine and quinaldine sulphate

2-Phenoxyethanol

Metomidate

Etomidate

Less widely used drugs for inhalation anaesthesia

4-Styrylpyridine

Barbiturates

Amylobarbitone

Quinalbarbitone

Pentothal

Chloral hydrate

Chlorbutanol

Chloroform

Diethyl ether

Lidocaine

Methyl pentynol

Piscaine

Propanidid

Propoxate

Sodium cyanide

Tertiary amyl alcohol (TAA)

Tertiary butyl alcohol (TBA)

Tribromoethanol (TBE)

Urethane

Inhalation anaesthesia using plant extracts

COMPUESTOS MENOS USADOS

INHALACIÓN



Mantenimiento de la calidad del agua durante la anestesia por inhalación

La calidad del agua debe controlarse cuidadosamente durante la anestesia por inhalación, particularmente cuando se maneja un gran número de animales y cuando se reutilizan baños de anestésico. Esto es parte del manejo general del procedimiento anestésico y el mantenimiento del nivel de anestesia cuando se continúa por más de un breve período.

Los principales problemas son los que tienen todos los animales acuáticos: control de temperatura, concentración de oxígeno disuelto, niveles de amoníaco y acumulación de materia fecal y otros sólidos en los baños.

En la medida de lo posible, los baños de almacenamiento y los recipientes de recuperación deben utilizar agua de la que proceden los animales ya la temperatura a la que están aclimatados. Si es necesario, se pueden usar pequeños calentadores y enfriadores eléctricos, aunque esto rara vez será el caso para procedimientos cortos. El enfriamiento también se puede efectuar con hielo, aunque es mejor usar hielo en bolsas para evitar el contacto y la mezcla del hielo derretido y el medio. Los contenedores de almacenamiento, el baño anestésico y el recipiente de recuperación deben estar equipados con difusores o difusores para mejorar la aireación y oxigenación del agua.

INHALACIÓN



El procedimiento básico

Para procedimientos simples, generalmente es **posible sumergir los peces directamente en una concentración adecuada de fármaco para mantener la ventilación espontánea.**

Este enfoque se usa ampliamente en la piscicultura y para la mayoría de los estudios de laboratorio.

DOSIS vs. CONCENTRACIÓN ¿Cuál es correcto?

Pero también...

- ***Aplicación directa en las branquias.***
- ***Anestesia por inhalación con ventilación artificial.***



The water of the anaesthetic bath is constantly circulating through the gills during the procedure



YouTube – Carp mouth surgery

INHALACIÓN de GASES



La anestesia gaseosa como tal es virtualmente imposible en peces. Los filamentos primarios y las laminillas secundarias de las branquias colapsan y se pliegan cuando se mantienen fuera del agua, lo que aumenta la distancia de difusión y disminuye el área de intercambio tanto que las vuelve virtualmente ineficaces.

Solo en peces que son capaces de respirar por aire, como el bagre que tiene estructuras modificadas para la absorción de gas que no colapsan en el aire, las anguilas de lodo y los peces con pulmones modificados, podría considerarse factible la anestesia gaseosa. Cabe señalar, sin embargo, que incluso en estos casos no se han probado o testado. En consecuencia, solo aquellos gases que son relativamente solubles en agua pueden considerarse para la mayoría de los peces.

La anestesia reversible usando gases es posible en peces, pero de importancia relativamente menor. Hay dos excepciones importantes a esto. El dióxido de carbono, puede ser una alternativa útil y de costo relativamente bajo en lugares aislados o cuando no se pueden obtener otros medicamentos. También existen otros gases de hidrocarburos fluorinados como: *Halotano*, *Fluorotano*, *Fluotano*, *Rhodialotano*, *Ftorotano*, *Ftuorotano* y *Narcotano*.

VÍA PARENTERAL



En algunas circunstancias, particularmente para cirugía o procedimientos prolongados, se puede considerar la anestesia mediante inyección de fármacos. Estas técnicas requieren un aparato de ventilación artificial ligeramente menos especializado que el requerido para la anestesia por inhalación ya que no es necesario recircular una solución anestésica.

Por lo general, los peces se sedan rápidamente con anestesia por inhalación para minimizar el estrés de manejo, luego se pesa el animal, se calcula la dosis y luego se inyecta. Por lo tanto, a menos que el manejo inicial del animal se realice sin anestesia, normalmente se utilizarán dos fármacos. Los fármacos también pueden administrarse por vía oral, aunque el resultado es mucho menos satisfactorio.

Widely used drugs for injection anaesthesia

Alphaxolone–alphadolone (Saffan)

Ketamine (Vetalar)

Nembutal (sodium pentobarbitone)

Propanidid (Epontol)

Less widely used drugs for injection anaesthesia

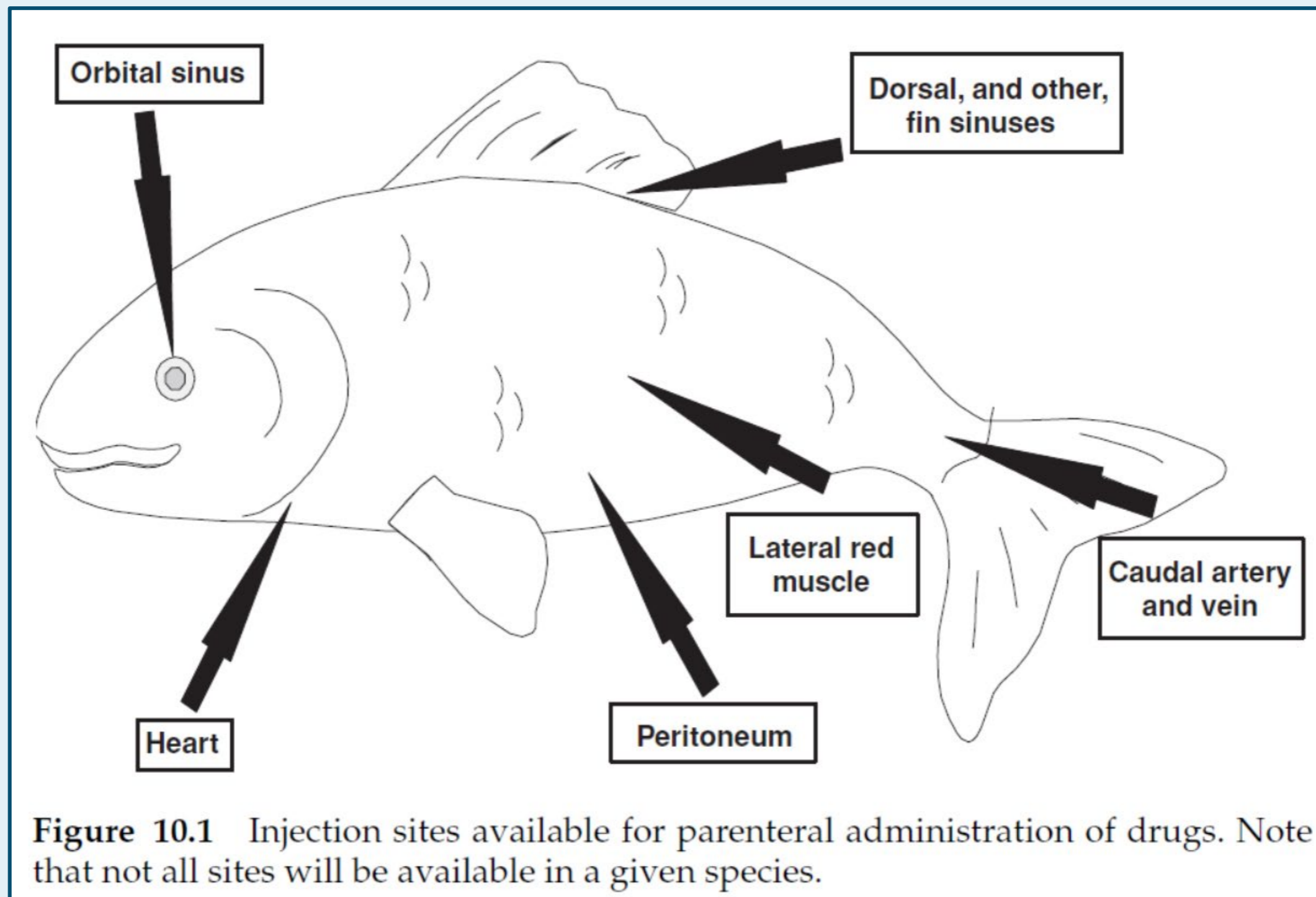
Etorphine–acylpromazine (Immobilon)

Xylazine (Rompun)

Lignocaine (Xylocaine, Lidocaine)

Procaine (Novocaine)

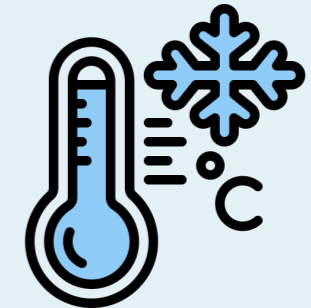
VÍA PARENTERAL



Tomado de Ross y Ross 2008

HIPOTERMIA y ELECTROANESTESIA

La hipotermia es un medio eficaz para calmar a los animales. Si bien no proporciona anestesia real, sí se da de manera efectiva es adecuado para el transporte.



La electroanestesia proporciona una buena sedación y anestesia aparentes a corto plazo, aunque esto no es una verdadera anestesia. Si bien esto permite la manipulación y los procedimientos menores, los datos disponibles hasta la fecha sugieren que cualquier analgesia aparente solo es efectiva durante un período limitado. La técnica tiene algunos problemas de seguridad inherentes, aunque estos pueden abordarse en parte electrónicamente y mejorarse aún más mediante la adopción de un protocolo de trabajo.



ACTUALIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS EN BIENESTAR ANIMAL EN EXPERIMENTACIÓN CON PECES DE INTERÉS EN ACUICULTURA



Anestésicos en experimentación

Ismael Jerez Cepa

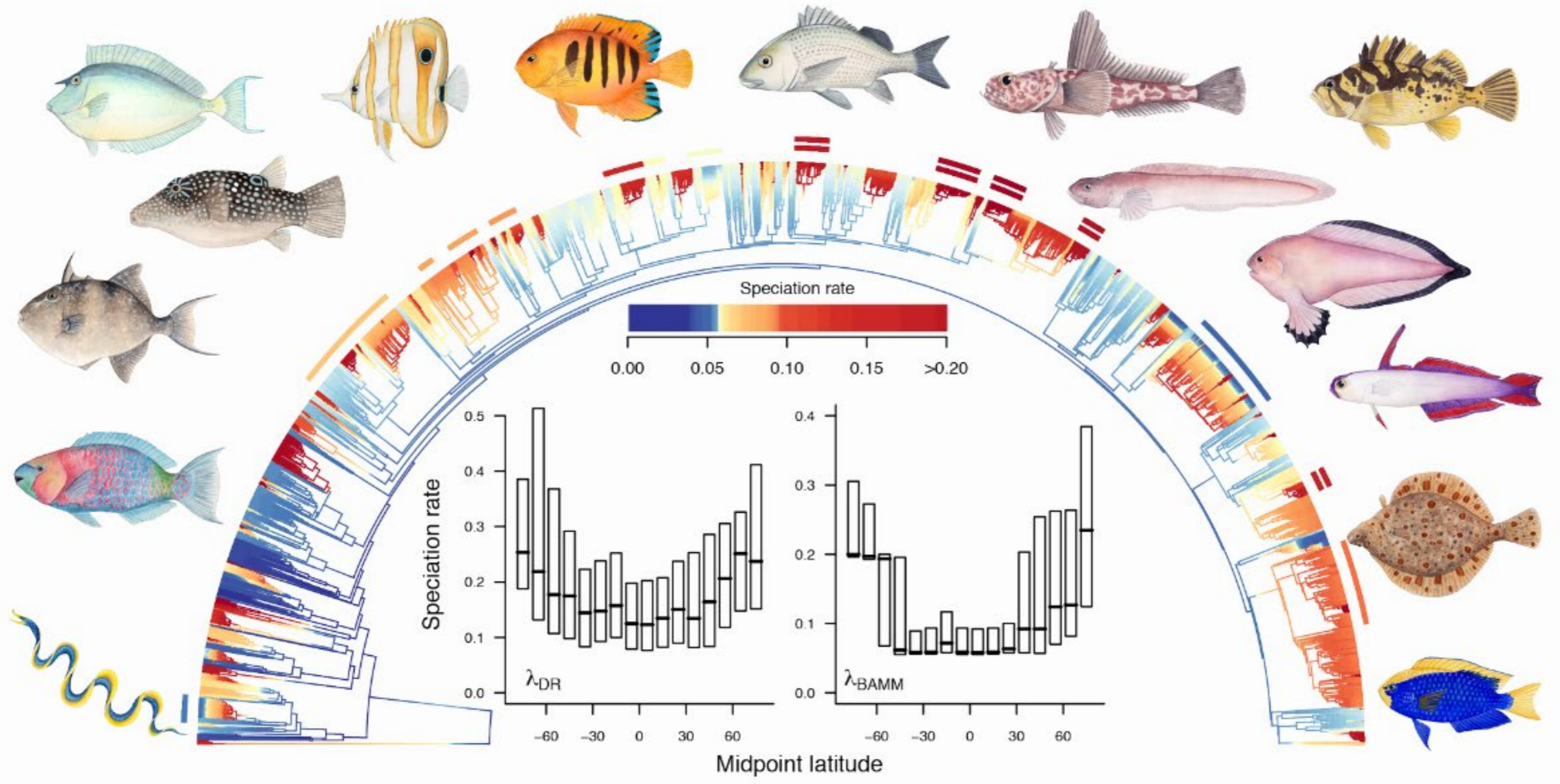
Profesor del Departamento de Biología

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca

**Universidad
de Cádiz**

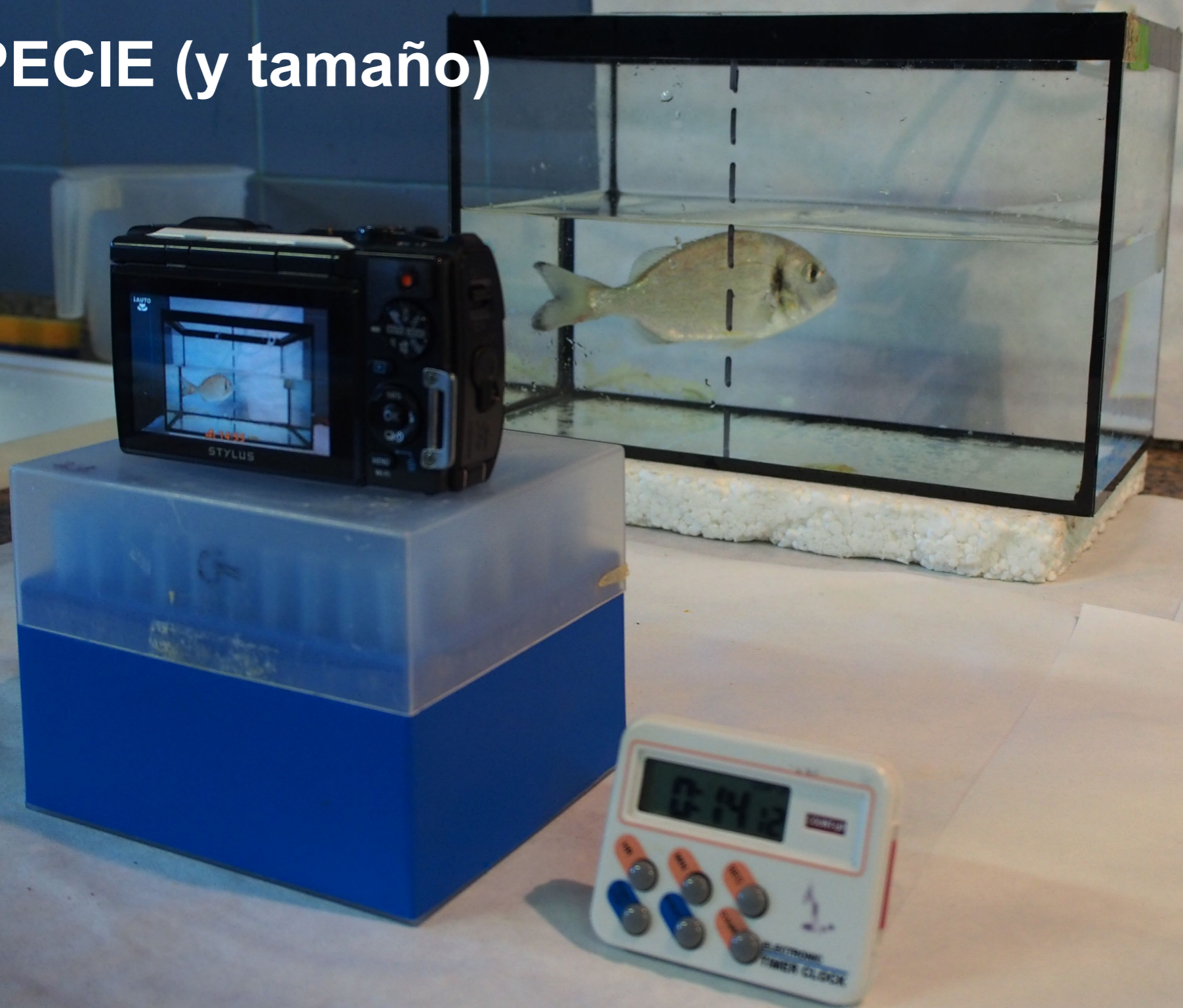


<https://fishtreeoflife.org/>

¡ 33.000 species !

Por tanto es necesario...

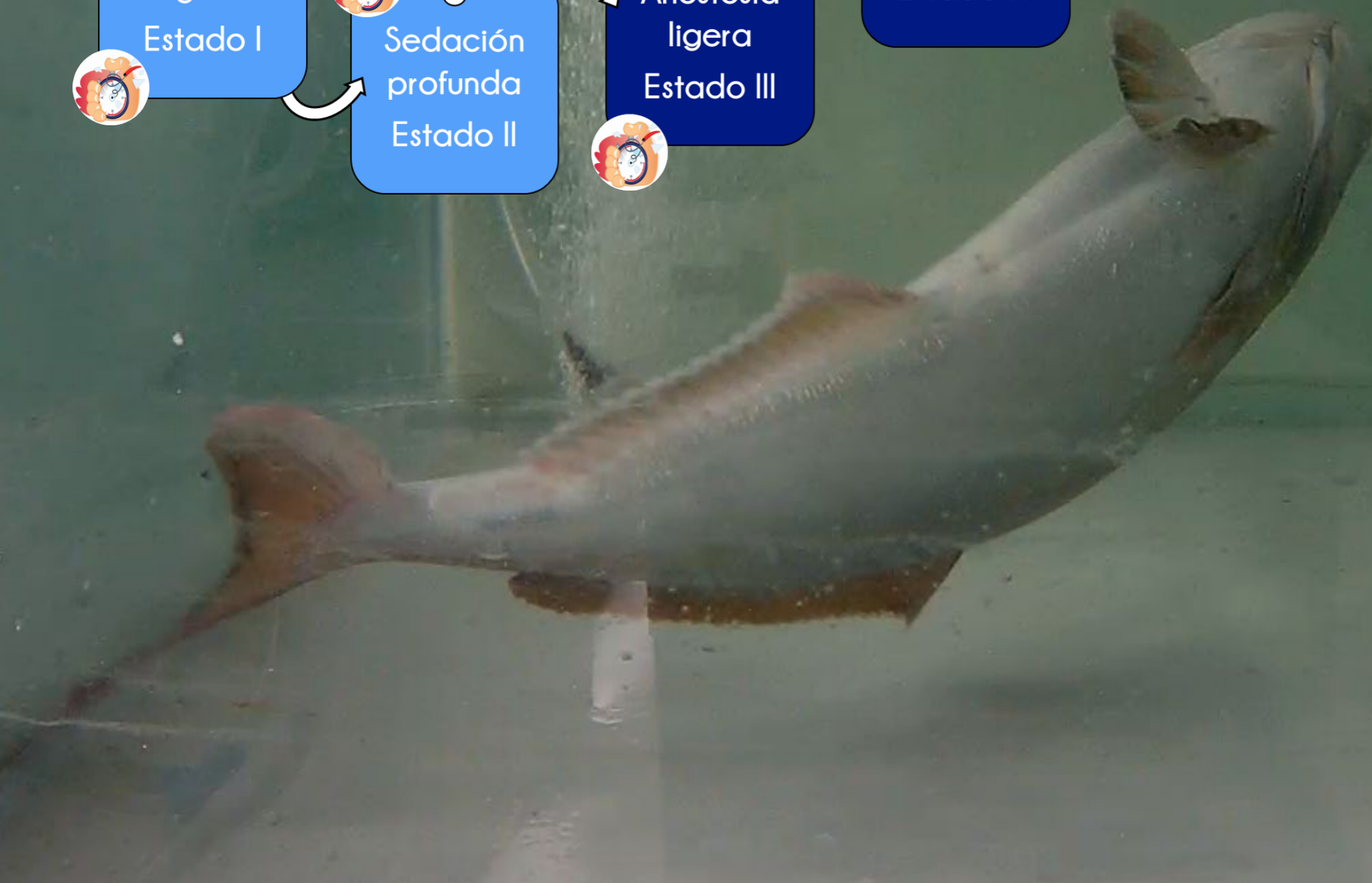
**CARACTERIZAR CADA
ANESTÉSICO PARA CADA
ESPECIE (y tamaño)**

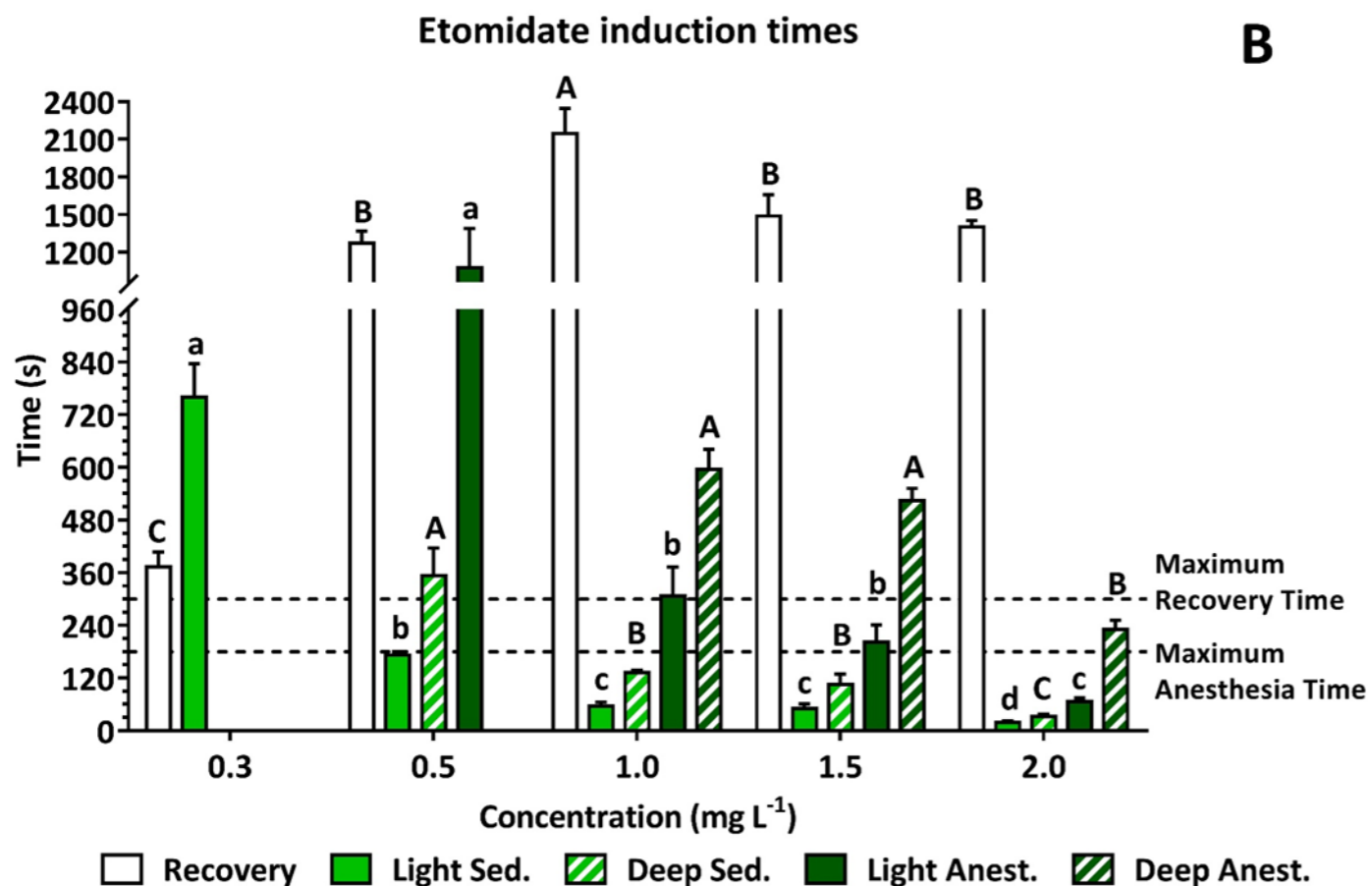
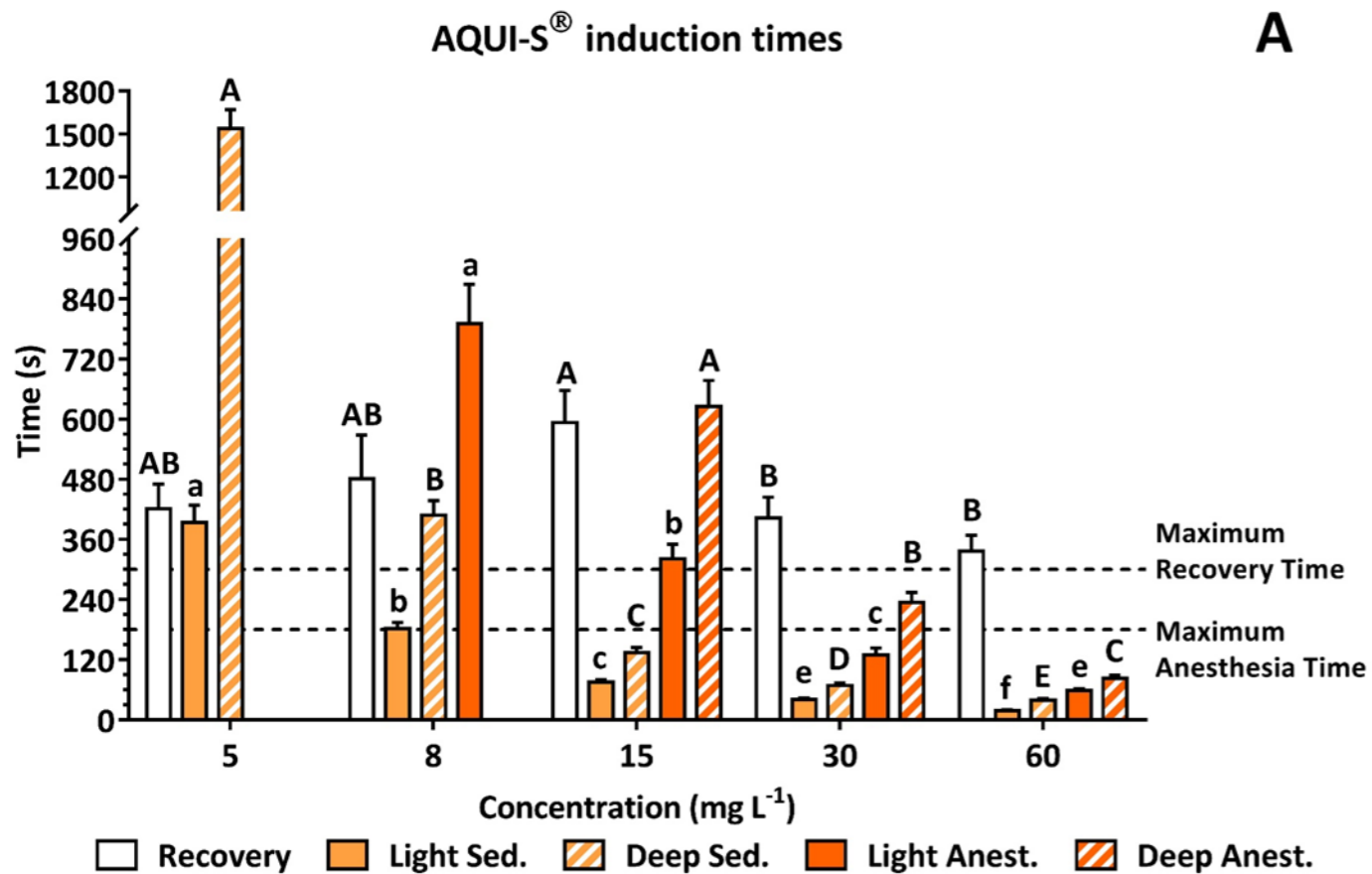


Tiempos de Inducción

modificado de Ross y Ross (2008)

"Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals"





CURVAS DE INDUCCIÓN

✓ **Sedación**

✓ **Anestesia**

✓ **Recuperación**

Tomado de
Jerez-Cepa et al. 2021

Transport and Recovery of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) under Sedation doses of:

Clove Oil
(2.5 mg L⁻¹)

MS-222
(5 mg L⁻¹)

After stress

Recovery

cortisol ↑

returned to basal

TAG ↓

amino acids ↓

glycolysis (PK activity) ↑

gluconeogenesis from amino acids ↑
(ALT ↑, AST ↓, FBP ↑ activities)

amino acids ↓

plasma parameters

After stress

Recovery

cortisol =

remained basal

TAG ↓

TAG ↑

glycogen ↓

glycolysis (PK activity) ↑

amino acids ↓

lipid storage ↑
(TAG ↑)
(G6PDH activity ↑)



sampling

recovering period

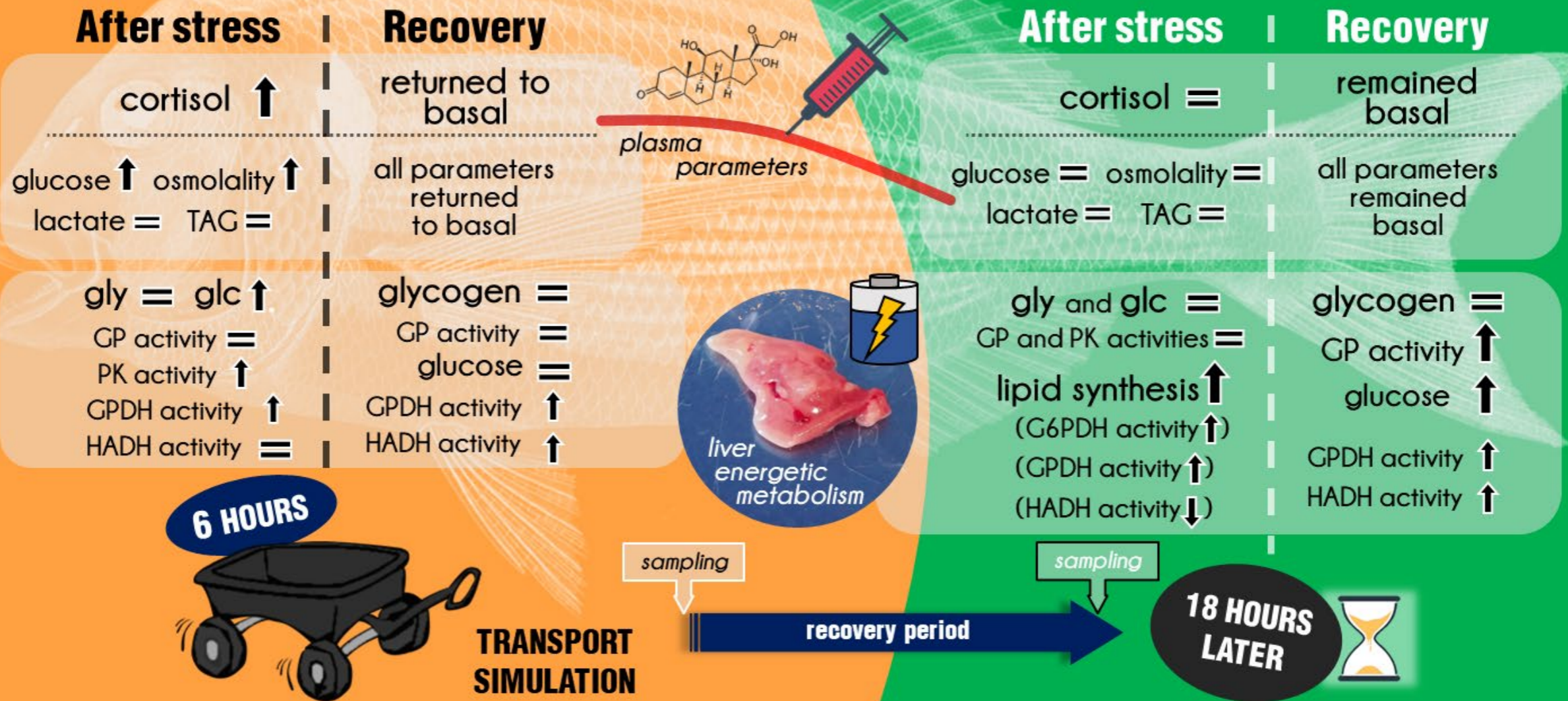
sampling



Transport and Recovery of *Gilthead Seabream* (*Sparus aurata*) under Sedative Concentrations of:

AQUI-S®
(2.0 mg L⁻¹)
as active isoeugenol

Etomidate
(0.15 mg L⁻¹)



RESPUESTA DIFERENCIAL



PROCESOS DE MANEJO (ANESTESIA)

AQUI-S®



MS-222



ACEITE
de CLAVO



ETOMIDATO

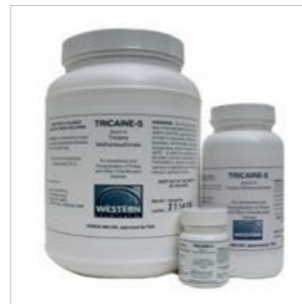


TRANSPORTE (SEDACIÓN)

ETOMIDATO



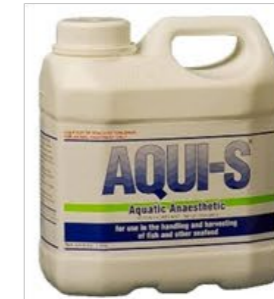
MS-222



ACEITE
de CLAVO



AQUI-S®



Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive?

Gareth D. Readman^{1,2*}, Stewart F. Owen¹, Joanna C. Murrell², Toby G. Knowles²

1 Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca, Freshwater Quarry, Brixham, Devon, United Kingdom, **2** School of Veterinary Science, University of Bristol, Langford House, Langford, North Somerset, United Kingdom

Abstract

This study addresses a fundamental question in fish welfare: are the anaesthetics used for fish aversive? Despite years of routine general use of many agents, within both scientific research and aquaculture, there is a paucity of information regarding their tolerance and associated behavioural responses by fish. This study examined nine of the most commonly used fish anaesthetic agents, and performed preference tests using adult mixed sex zebrafish (*Danio rerio*), the most commonly held laboratory fish. Video tracking software quantified swimming behaviour related to aversion for each anaesthetic at 50% of its standard recommended dose compared with clean water in a flow-through chemotaxic choice chamber. Results suggest that several commonly used anaesthetics were aversive, including two of the most commonly recommended and used: MS222 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulphate) and benzocaine. For ethical best practice, it is recommended that compounds that are aversive, even at low concentration, should no longer be used routinely for anaesthesia or indeed the first step of humane euthanasia of adult zebrafish. Two agents were found not to induce aversive behavioural responses: etomidate and 2,2,2 tribromoethanol. For the millions of adult zebrafish used in laboratories and breeding worldwide, etomidate appears best suited for future routine humane use.

**RESPUESTAS
ESPECÍFICAS
de RECHAZO**

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

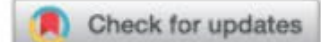
OPEN

Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia

Gareth D. Readman¹, Stewart F. Owen², Toby G. Knowles³ & Joanna C. Murrell³

Received: 24 January 2017
Accepted: 20 June 2017
Published online: 2 August 2017

There is a need to ensure that the care and welfare for fish maintained in the laboratory are to the highest standards. This extends to the use of anaesthetics for both scientific study, humane killing and euthanasia at end of life. An anaesthetic should not induce negative behaviours and fish should not seek to avoid the anaesthetic. Surprisingly little information is available to facilitate a humane choice of anaesthetic agent for fish despite over 100 years of use and the millions of fish currently held in thousands of laboratories worldwide. Using a chemotaxic choice chamber we found different species specific behavioural responses among four closely related fish species commonly held in the laboratory, exposed to three widely used anaesthetic agents. As previously found for zebrafish (*Danio rerio*), the use of MS-222 and benzocaine also appears to induce avoidance behaviours in medaka (*Oryzias latipes*); but etomidate could provide an alternative choice. Carp (*Cyprinus carpio*), although closely related to zebrafish showed avoidance behaviours to etomidate, but not benzocaine or MS-222; and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) showed no avoidance to the three agents tested. We were unable to ascertain avoidance responses in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and suggest different test paradigms are required for that species.



A Review of Three Commonly Used Fish Anesthetics

Josef Priborsky and Josef Velisek

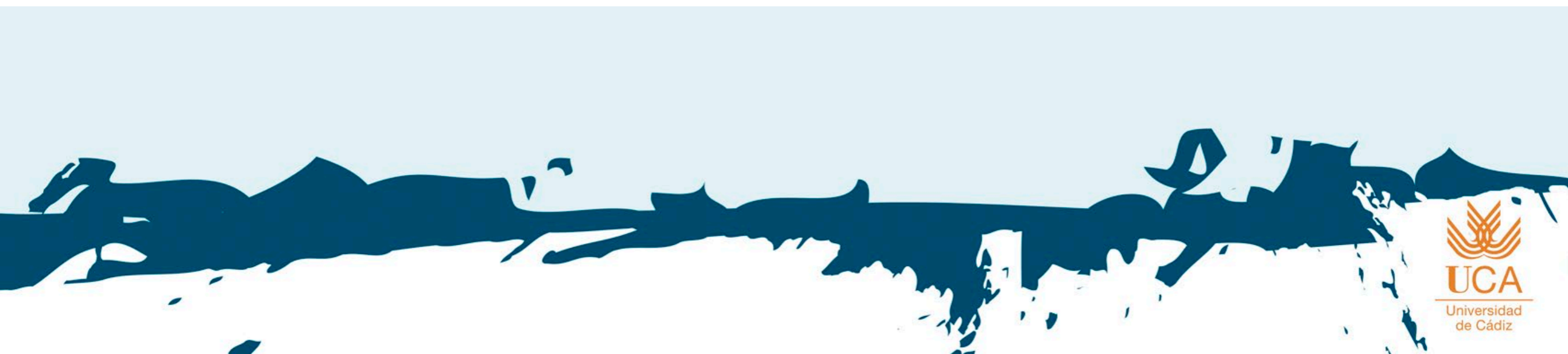
Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic

ABSTRACT

Anesthesia plays a critical role in prevention of mechanical injuries and manipulation stress in fish. Commercially reared fish are subjected to confinement and handling including netting, weighing, sorting, vaccination, and transport. In research, fish may also undergo surgical procedures ranging from tagging, blood sampling, and small incisions for invasive procedures. In these situations, treatment with anesthetic agents may be necessary to ensure the welfare of the fish. In this review, we provide information on optimal dosage and effects on fish physiology of three widely-used anesthetics worldwide: clove oil, tricaine methane sulphate, and 2-phenoxyethanol. These anesthetics are effective and have been widely used with many species of fish.

KEYWORDS

Anesthesia; fish; tricaine methane sulphate; clove oil; 2-phenoxyethanol



A meta-analytic review of monoterpene for fish anaesthesia

Luís Félix^{1,2} | Raquel Vieira^{1,2} | Sandra M. Monteiro^{1,2,3} | Carlos Venâncio^{1,2,4}

¹Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), University of Trás-os-Montes and Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

²Institute for Innovation, Capacity Building and Sustainability of Agri-food Production (Inov4Agro), UTAD, Vila Real, Portugal

³Life Sciences and Environment School (ECVA), UTAD, Vila Real, Portugal

⁴Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), UTAD, Vila Real, Portugal

Correspondence

Luís Félix, Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal.
Email: lfelix@utad.pt

Funding information

Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Grant/Award Number: 2021.00458. CEECIND, SFRH/BD/144904/2019 and UIDB/04033/2020

Abstract


The use of anaesthetic agents has been increasing to address the welfare needs of different fish species in scientific and aquaculture practices. MS-222 is the most used synthetic anaesthetic but some limitations and side effects have been reported. Natural substances have been used as potential substitutes with clove oil playing an important role due to its eugenol content. Yet, other monoterpenes have shown anaesthetic properties in different fish species. As such, a quantitative assessment has been conducted to explicitly relate and summarise the use of monoterpenes with described anaesthetic properties in fish. A combined PubMed, Web of Science, Scopus, PubMed Central and Europe PMC electronic database search was performed, from January 2002 to August 2022, following the PRISMA guidelines. Out of 1555 articles retrieved from the literature search, 30 English reports met the criteria for inclusion in the meta-analysis through a generic inverse-variance method (random-effects model) and according to the fish age. The findings show a total of 10 different monoterpenes with high homogeneity and effectiveness in inducing anaesthesia and recovery according to the fish anaesthetic criteria. Further subgroup analysis showed these effects were independent of fish age. Meta-regression of the included studies revealed an inverse linear association between anaesthesia induction and recovery time and water bath temperature while no further correlation was found with other confounding factors (body weight, water pH and dissolved oxygen levels). Although further studies will be required, this meta-analysis provides robust evidence that different monoterpenes serve as an attractive and effective alternative for fish anaesthesia although water bath temperature also played an important role in anaesthesia outcome.

KEYWORDS

anaesthesia, fish, monoterpene, natural products, systematic review



Application of herbal anaesthetics in aquaculture

Seyyed Morteza Hoseini¹ , Ali Taheri Mirghaed² and Morteza Yousefi³

1 Inland Waters Aquatic Stocks Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran

2 Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3 Department of Veterinary Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

Correspondence

Seyyed Morteza Hoseini, Inland Waters Aquatic Stocks Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, 1419963111, Gorgan, Iran. Email: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com and

Ali Taheri Mirghaed, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, 1419963111, Tehran, Iran. Email: mirghaed@ut.ac.ir

Received 8 September 2017; accepted 31 January 2018.

Abstract

Anaesthesia is a widely used tool in fish handling, sampling and surgery in aquaculture; thus, fish anaesthesiology has been studied for a long time. In this case, there are several common anaesthetics in aquaculture, namely tricaine methane-sulfonate (a chemical agent) and clove oil (a natural agent). Recently, there was an increasing interest to use herbal materials (other than clove oil) in fish anaesthesia. In this review, current knowledge about the use of herbal anaesthetics has been summarized. To date, essential oils/extracts of different plants have been studied for fish anaesthesia; most of them belong to *Lamiaceae*, *Verbenaceae*, *Lauraceae* and *Myrtaceae*. In addition, menthol, linalool, myrcene, cineole, globulol, spathulenol, guaiol, caryophyllene oxide, terpinen-4-ol and dehydrofukinone are herbal compounds that their anaesthetic effects have been studied in fish. Compared with clove oil and eugenol as the most common herbal anaesthetic, all tested herbal materials are less efficacious to anaesthetize fish. Some plants' essential oil/extract, namely *Aloysia triphylla*, *Myrcia sylvatica*, *Lippia alba* and *Curcuma longa*, have beneficial health effects including suppression of physiological and oxidative stress. There is a lack of data in mechanism of anaesthesia and health effects of the herbal anaesthetics, which should be followed in future studies. In addition, most of the current studies have focused on certain fish species such as silver catfish (*Rhamdia quelen*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) and common carp (*Cyprinus carpio*), and in most of the studies, essential oils/extracts of South American plants have been used. Thus, there is a need to study other fish and plant species.

Key words: anaesthesia, aquaculture, essential oil, extract, herbal compounds, plant.



Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review

Carine de Freitas Souza¹, Matheus Dellaméa Baldissera², Bernardo Baldisserotto¹, Berta Maria Heinzmann³, Juan Antonio Martos-Sitcha⁴ and Juan Miguel Mancera^{4*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, ² Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, ³ Department of Industrial Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil, ⁴ Department of Biology, Faculty of Marine and Environmental Sciences, Instituto Universitario de Investigación Marina, Campus de Excelencia Internacional del Mar, University of Cádiz, Cádiz, Spain

In fish, stressful events initiate a hormone cascade along the hypothalamus-pituitary-interrenal and hypothalamus-sympathetic-chromaffin (HSC) axis to evoke several physiological reactions in order to orchestrate and maintain homeostasis. Several biotic and abiotic factors, as well as aquaculture procedures (handling, transport, or stocking density), activated stress system inducing negative effects on different physiological processes in fish (growth, reproduction, and immunity). In order to reduce these consequences, the use of essential oils (EOs) derived from plants has been the focus of aquaculture studies due to their diverse properties (e.g., anesthetic, antioxidant, and antimicrobial), which have been shown to reduce biochemical and endocrine alterations and, consequently, to improve the welfare status. Recently, several studies have shown that biogenic compounds isolated from different EOs present excellent biological activities, as well as the nanoencapsulated form of these EOs may potentiate their effects. Overall, EOs presented less side effects than synthetic compounds, but their stress-reducing efficacy is related to their chemical composition, concentration or chemotype used. In addition, their species-specific actions must be clearly established since they can act as stressors by themselves if their concentrations and chemotypes used are not suitable. For this reason, it is necessary to assess the effect of these natural compound mixtures in different fish species, from marine to freshwater, in order to find the ideal concentration range and the way for their administration to obtain the desired biological activity, without any undesired side effects. In this review, the main findings regarding the use of different EOs as stress reducers will be presented to highlight the most important issues related to their use to improve fish welfare in aquaculture.

Keywords: aquaculture, natural compounds, fish stress, fish health, fish immunology

OPEN ACCESS

Edited by:

José Luis Soengas,
University of Vigo, Spain

Reviewed by:

Jose Fernando Lopez-Olmeda,
University of Murcia, Spain

Manuel Gestó,

Technical University of Denmark,
Denmark

*Correspondence:

Juan Miguel Mancera
juanmiguel.mancera@uca.es

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 15 February 2019

Accepted: 04 June 2019

Published: 20 June 2019





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Review

Trends and advancements in fish anaesthesia over the last decade

Mert Minaz^{a,*}, Luís Félix^{b,*}^a Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Recep Tayyip Erdoğan University, Rize, Turkey^b Centre for the Research and Technology of Agroenvironmental and Biological Sciences, CITAB, Inov4Agro, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD, Quinta de Prados 5000-801, Vila Real, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

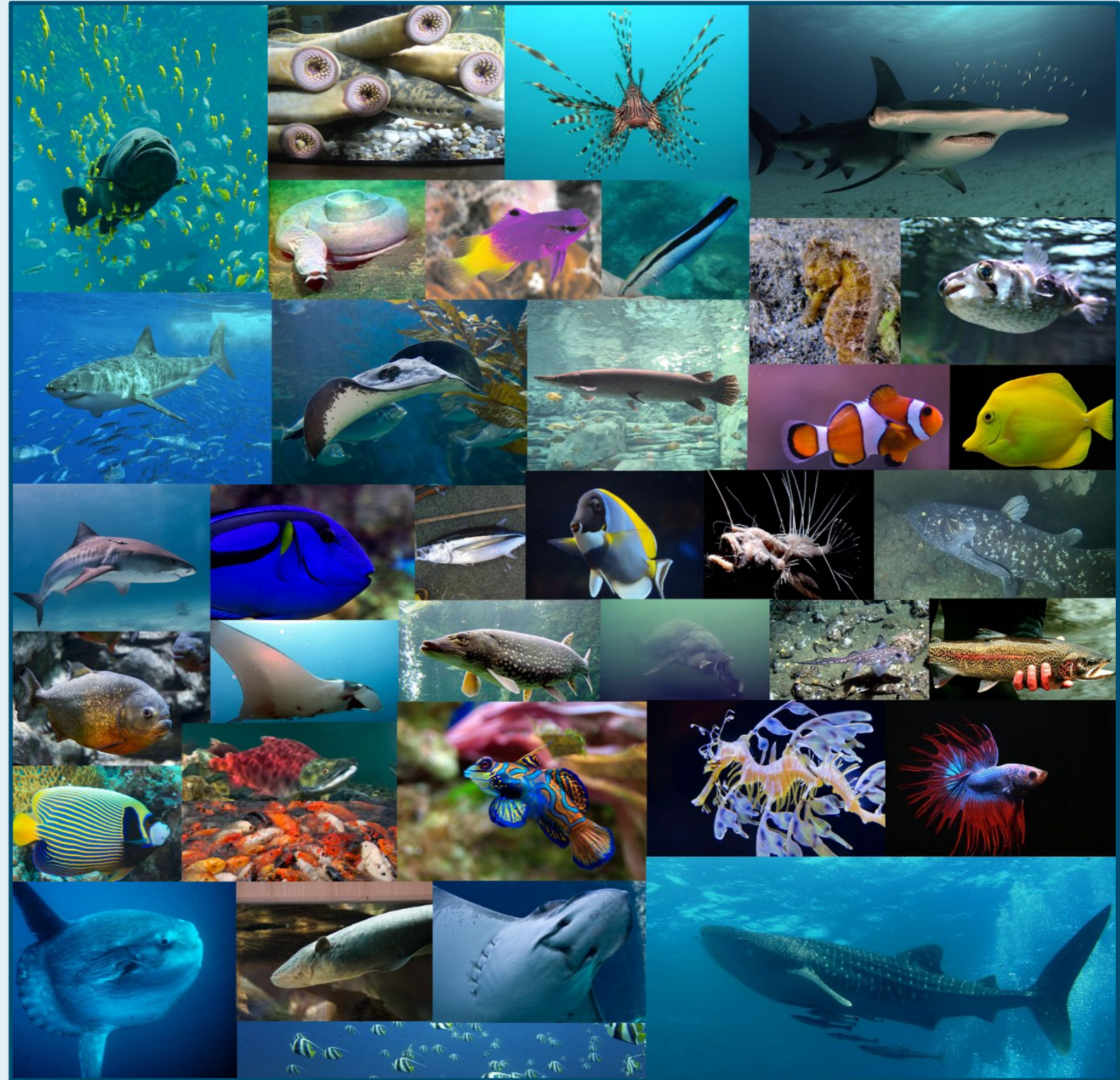
Bibliometric analysis
Sedation
Deep anaesthesia
Clove oil
Eugenol

ABSTRACT

In aquaculture, anaesthesia is applied in various activities such as handling, transportation, and operational procedures to reduce stress levels in fish. In this context, numerous synthetic and natural anaesthetics have been investigated from past to present. This study presents the current state of knowledge on fish anaesthesia methods and anaesthetic agents by focusing on developments over the past decade. Bibliometric analysis results reveal that, in the past, anaesthesia research on fish was predominantly conducted by specific research groups and published in particular journals. However, in recent years, new research teams and countries have also started contributing to this field. Whereas earlier studies primarily examined conventional methods and anaesthetics, recent and contemporary research has increasingly focused on the anaesthetic efficacy of various essential oils. Keyword analyses showed that studies conducted between 2014 and 2017 mainly focused on the effects of anaesthetics on the nervous system, whereas the 2018–2021 period saw a rise in interest in plant-based natural anaesthetics. Since 2022, research has increasingly shifted toward ethical considerations, fish welfare, and recovery processes. Zebrafish, tambaqui, silver catfish, tilapia, and carp are among the most studied species due to their economic importance and species-specific responses to anaesthetics. In conclusion, research on fish anaesthesia has undergone significant evolution over the past decade in terms of both scientific depth and practical application; natural anaesthetics, ethical practices, and fish welfare have come to the forefront, integrating with sustainable aquaculture.

MENSAJE PARA LLEVAR AL LABORATORIO:

“Cada especie es diferente y cada anestésico también tiene propiedades diferentes, por lo que es necesario evaluar la efectividad y margen de seguridad para cada compuesto”



**¡ MUCHAS GRACIAS
POR SU ATENCIÓN !**



Ismael Jerez Cepa

ismael.jerez@uca.es

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Fuente: [Reddit 2019](#)[®]



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Marítimo y de Pesca