

Cinvestav-Monterrey

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

**“Estudio de los efectos de anestésicos generales y locales en un  
modelo *in vivo*: el caso de *D. magna*”**

Tesis que presenta:

**Kevin Carlo Martín Robledo Sánchez**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias**

Con especialidad en:

**Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis:

**Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez**

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2019

# Agradecimientos

Quisiera agradecer...

A la prof.<sup>a</sup> Juana Ma Cangas Gómez, mi madre y mi primera maestra. Por haberme enseñado desde la lectura hasta la claves vida. Por que eso me trajo aquí. Por ser mi mayor influencia. Por todo.

A mis padres Luz Patricia y Martín, por que sin ese inmenso apoyo, confianza y sacrificio, no lo habría logrado. A mis hermanos, Ricardo, por ser mis compañeros en este viaje.

A Fatima por esperar paciente y valientemente. Este logro también es tuyo.

A mis amigos Norman y Óscar, por esas amenas esas tardes después de clases. A mis compañeros de laboratorio Ángel y Javier por su amistad y apoyo.

Al doctor Carlos Ruiz, por esas charlas y por haber confiado. Por compartir esa fascinación por descubrir.

Al CONACyT, por cumplir con sus funciones y hacer llegar los recursos necesarios para la realización de este posgrado.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
1.1	Anatomía general de la <i>D. magna</i> . . . . .	5
1.1.1	Sistemas . . . . .	5
1.2	Aspectos generales de la anestesia local . . . . .	7
1.3	Aspectos generales de la anestesia general . . . . .	8
1.3.1	Componentes del estado anestésico . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
2.1	<i>Objetivo general</i> . . . . .	11
2.2	<i>Objetivos particulares</i> . . . . .	11
<b>3</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
3.1	<i>Materiales</i> . . . . .	12
3.1.1	Cultivo de <i>D. magna</i> . . . . .	12
3.1.2	Anestésicos locales . . . . .	12
3.1.3	Gases . . . . .	12
3.2	<i>Métodos</i> . . . . .	12
3.2.1	Ensayo de motilidad para anestésicos locales . . . . .	12
3.2.2	Estudio de los efectos de los anestésicos locales en el corazón de DM . . . . .	13
3.2.3	Evaluación de la toxicidad de AL en <i>Daphnia magna</i> . . . . .	13
3.2.4	Supervivencia a altas presiones . . . . .	14
3.2.5	Inducción de anestesia . . . . .	14
3.2.6	Procesamiento de imágenes . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>17</b>
4.1	Efectos de los AL sobre el nado de DM . . . . .	17
4.2	Alteraciones en el corazón . . . . .	17
4.3	Toxicidad de los AL en DM . . . . .	22
4.4	Efectos de los gases nobles . . . . .	24
<b>5</b>	<b>Discusión</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>29</b>
	<b>References</b>	<b>30</b>

## Resumen

El inicio de la anestesia moderna tuvo lugar hace poco más de 170 años en un espectáculo teatral en la ciudad de Boston. Sin embargo, en la actualidad restan piezas importantes en la comprensión de la acción de los anestésicos. Aunque se han establecido nuevos conceptos explicativos en la teoría de la anestesia, la exigencia por parte de la comunidad científica para entender en su totalidad la acción que ejercen los anestésicos en los organismos, prevalece. Actualmente, los anestésicos corresponden a los fármacos más utilizados en el manejo del dolor y son empleados en miles de clínicas simultáneamente. A pesar de ser un procedimiento habitual en intervenciones clínicas, se desconoce en su totalidad la cadena de eventos que culminan en el estado anestésico. Lo único que queda claro es que la anestesia posee un tiempo de restablecimiento relativamente corto, es un proceso reversible y que deja prácticamente sin molestias al paciente. Esta misteriosa y compleja acción farmacológica de los anestésicos, demanda modelos y simulaciones cada vez más complejos y realistas. En este sentido, el modelo biológico representa una alternativa viable y ética, en el desarrollo de nuevos tratamientos, técnicas, y sobre todo, en la comprensión de los mecanismos de acción de los fármacos. En este trabajo se propone al invertebrado *Daphnia magna*, como un factible modelo para el estudio de los efectos de anestésicos locales y generales.



### 3 Abstract

The beginning of modern anesthesia took place just over 170 years ago in a theatrical show in the city of Boston. However, today several important pieces for the understanding of the action mechanism of anesthetics remain unknown. Although new explanatory concepts have been established in the theory of anesthesia, the demand of scientific community to fully understand the action exerted by anesthetics remains. Today, the anesthetics correspond to the drugs most used in pain management and are used in thousands of clinics. However, despite that anesthesia is a common and necessary procedure in interventions that are little or not tolerable; the chain of events that culminate in anesthesia is not completely known. The only thing that is clear is the fact that it has a relatively short recovery time, it is a reversible process, and it leaves the patient with low to no discomfort. This mysterious and complex pharmacological action of anesthetics demands new biological models, to perform more precise and realistic assays. Indeed, the biological model has proven to be a viable and ethical alternative in the development of new treatments, diagnostic techniques and, above all, in the understanding of the action mechanisms of the drugs. In this work, we proposed for the first time *Daphnia magna* as a feasible model for the study of the effects of local and general anaesthetics.

## Lista de Figuras

1	Morfología general de <i>Daphnia Magna</i> . Tomada de Paulo Corgosinho (2015). . . .	6
2	Imagen del corazón de <i>Daphnia magna</i> adulta tomada con microscopía invertida (10x). . . . .	7
3	Configuración experimental. A) Cámara de acero inoxidable diseñada para soportar altas presiones. B) Ensayo experimental de anestesia. Se colocó un led rojo para proporcionar un estímulo nocivo y se utilizó un filtro para homogeneizar la iluminación. Las tapas de acrílico permiten observar y filmar a través de ellas. La muestra contiene 100 DM nadando libremente en 10 ml de medio. . . . .	15
4	Ejemplo del procesamiento de imágenes. $t_0$ representa al primer cuadro y $t_n$ los diferentes cuadros del video. Un cuadrado de 150 por 150 píxeles fue tomado en la parte central de los cuadros. Las matrices con distintas intensidades fueron analizadas mediante el modelo de autocorrelación. . . . .	16
5	Seguimiento de las trayectorias de nado de DM. Las trayectorias corresponden a películas de 30 s tomadas después de exponer a DM a 16 mg L <sup>-1</sup> de THCl durante 2 h. Las trayectorias individuales están marcadas con diferentes colores. . . . .	17
6	Población inmovilizada de DM expuesta a diferentes cantidades de THCl, LHCl y a una mezcla de ambos. La inmovilidad EC <sub>50</sub> para el THCl fue de 182.94 mg L <sup>-1</sup> y de 241.81 mg L <sup>-1</sup> para la mezcla. El ajuste observado es una curva de dosis-respuesta. Los valores son el porcentaje de población inmovilizada y las barras de error corresponden a la desviación estándar ( $p < 0.05$ ) para $n = 8$ . . . . .	18
7	Rapidez promedio de nado de las DM expuestas a diferentes concentraciones de THCl, LHCl, THCl-LHCl y BPVHCl. Las barras de error son desviaciones estándar ( $p < 0.5$ ) para $n = 6$ . . . . .	19
8	Desplazamiento cuadrático medio de DM. El control en diamantes de color rosa, la THCl en cuadrados grises, el LHCl en círculos de color naranja y una mezcla en porciones iguales en triángulos cían. La concentración utilizada para los cuatro fármacos es de 512 mg L <sup>-1</sup> . . . . .	20
9	Los fármacos probados provocan una disminución en la frecuencia cardíaca de DM. La mezcla THCl-LHCl presenta una desaceleración menor en la FC en comparación con la THCl en estado puro. Las barras de error representan la desviación estándar ( $p < 0.05$ ); $n = 6$ . . . . .	21
10	Observación microscópica del corazón de DM a 10x. Diástole (A) y sístole (B), sin la presencia de drogas. La posición del corazón y la superficie cardíaca, se puede definir mediante la identificación de la ostia lateral (LO) en su estado cerrado o abierto y la expansión o contracción de las paredes del corazón (HW) [10]. . . . .	22
11	Área cardíaca de la DM. (A) Cambios en el tamaño del corazón después de la exposición a diferentes concentraciones de THCl (16, 32, 64, 128 y 256 mg L <sup>-1</sup> ) durante 2 horas. La reducción de la superficie cardíaca se puede mitigar (B) cuando el clorhidrato de tetracaína se mezcla con clorhidrato de lidocaína en las mismas concentraciones. Los valores son el área media del corazón $\pm$ SD ( $p < 0.05$ ); $n = 6$ . . . . .	23

12	Autocorrelación de imágenes encontrada a diferentes presiones de xenón que van de las 0 a las 14 atm. Los valores cercanos a 0, muestran una alta motilidad de DM. Por otro lado, valores cercanos a 1, representan una supresión de la respuesta motora posterior al estímulo nocivo (anestesia). . . . .	25
13	Autocorrelación de imágenes encontrada a diferentes presiones de criptón que van de las 0 a las 44 atm. Los valores cercanos a 0, muestran una alta motilidad de DM. Por otro lado, valores cercanos a 1, representan una supresión de la respuesta motora posterior al estímulo nocivo. . . . .	26

# 1 Introducción

*Daphnia magna* (DM), es un macro-invertebrado perteneciente al género de crustáceos planctónicos de la orden de los cladocera que mide entre 0.2 y 5 milímetros. Es conocido en el lenguaje popular como pulga de agua, debido a su estilo de natación saltada que se asemeja a la motilidad de los organismos terrestres pertenecientes al orden de los *Siphonáptera*.

Aunque se estima que existen más de 700 especies del género cladocera, se conocen únicamente 150 especies del género, siendo *Daphnia magna* y *Daphnia pulex* las especies más comúnmente utilizadas en la investigación.

En este trabajo, se expone por primera vez al modelo DM como un posible candidato para el estudio de anestésicos generales y locales que, por sus características fisiológicas y su fácil obtención y crianza, brindará información importante acerca de los diferentes efectos farmacológicos, para su posterior contraste con organismos vertebrados.

## 1.1 Anatomía general de la *D. magna*

El cuerpo de la *D. magna* se prolonga desde la cabeza hasta la espina inferior, tanto la región cefálica como la espina varían en tamaño según la especie. Se sabe además que ambos elementos pueden aumentar su tamaño en función de la presencia de depredadores, siendo las alelomonas responsables de dicha expresión [1]. Este incremento depende de la presencia de compuestos químicos emitidos por una especie depredadora, mientras que la presa utiliza estas señales como un indicador del nivel de riesgo, para posteriormente cambiar su morfología.

DM presenta una morfología segmentada, difícilmente diferenciable. El cuerpo de DM consta de dos partes principales: una cabeza y una región abdominal. En la cabeza se ubican los ojos compuestos por una cornea y lentes fotorreceptores capaces de distinguir el brillo y el color. Presenta además, ancladas a la parte superior, dos antenas natatorias. En la región cefálica son fácilmente distinguibles la superficie rostral, la boca, y los maxilares. El cuerpo medio compuesto por la zona abdominal, presenta una abertura ventral la cual no está cubierta por caparazón. Aquí yacen cinco o seis pares de patas dotadas de ensilas. Todo el cuerpo (a excepción de la abertura ventral), está cubierto por un caparazón, el cual en algunas especies es semitraslúcido.

Recientemente, DM ha sido evaluada como modelo para estudio de fármacos [2], la cual demostró una alta viabilidad, con efectos secundarios similares a los reportados en vertebrados. La alta reproducibilidad, la genética poco variable (que resulta en la generación de crías con fenotipos muy similares), corresponden sin duda a características valiosas, difícilmente encontradas en la naturaleza. Tomando como referencia a otros modelos animales, como *Danio reiro*, por ejemplo, el cual ha tomado bastante relevancia en la investigación, y que además se proyecta como un futuro sustituto de la rata de laboratorio [3], DM permite la observación de órganos internos en todas sus etapas de desarrollo.

### 1.1.1 Sistemas

El sistema circulatorio de *D. magna* es considerado como un sistema abierto, se compone de un corazón de carácter miogénico que se encarga de hacer circular la hemolínfa. En este tejido líquido

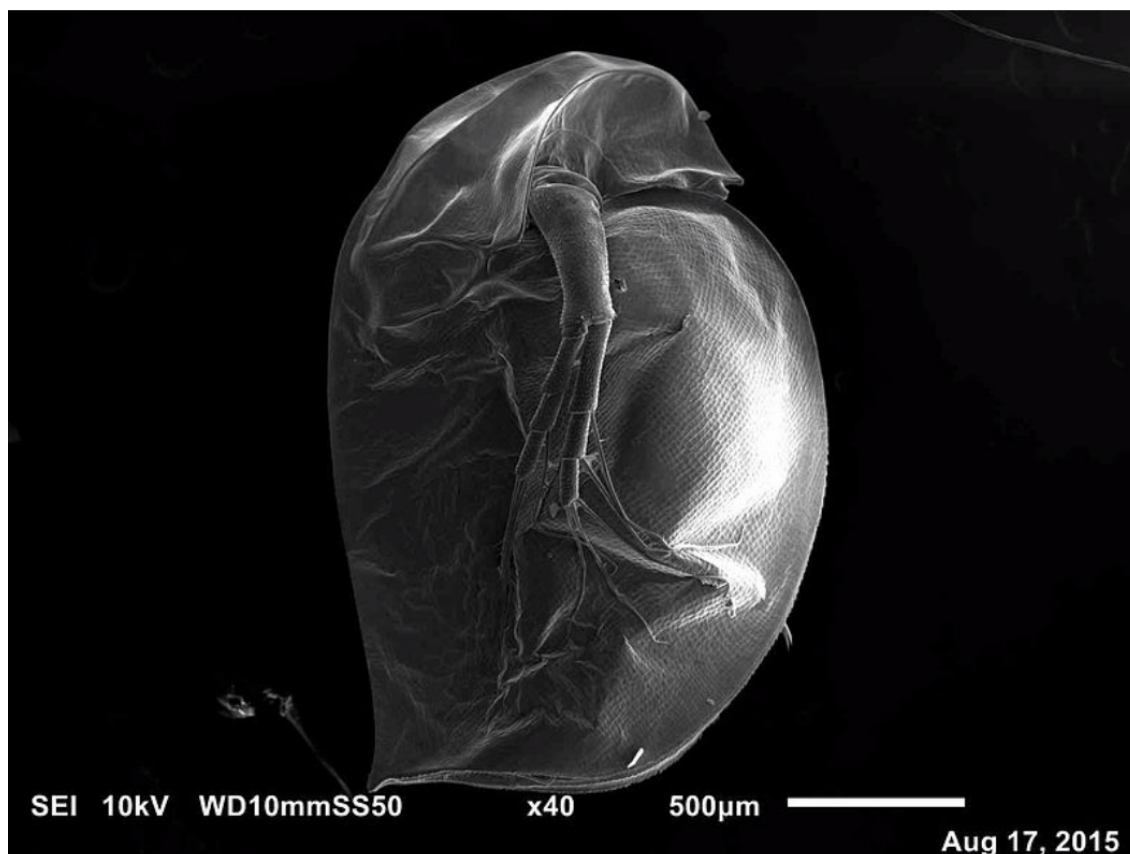


Figure 1: Morfología general de Daphnia Magna. Tomada de Paulo Corgosinho (2015).

amarillezco suspende células sanguíneas, donde se puede identificar principalmente amebocitos y granulocitos (células con funciones inmunitarias).

El corazón mide aproximadamente  $0.78 \text{ mm}^2$  en un adulto de 3 mm, con una capacidad aproximada de 2.53 nL en el caso *D. pulex* [4]. La regulación de las contracciones cardíacas es miogénica, aunque se ha demostrado que el corazón es innervado por el nervio cardíaco, y puede responder positivamente a la adrenalina [5]. El sistema nervioso central no participa en la regulación del corazón, como fue demostrado previamente al eliminar diversas partes del mismo [6], comprobando de esta forma la autonomía del órgano. Posteriormente, se demostró que la sustancia neurotransmisora acetilcolina inhibe la transmisión de las señales nerviosas, reduciendo la frecuencia cardíaca [7].

Las alteraciones farmacológicas que causan irregularidades en el ciclo cardíaco fueron estudiadas previamente [2]. De la misma manera, algunos efectos como los cronotrópicos e inotrópicos fueron identificados utilizando diferentes fármacos cardioactivos.

El sistema nervioso central está compuesto por un cerebro subdividido en tres regiones: el protocerebro, que corresponde a la parte frontal del órgano, la mácula ocular y los ganglios ópticos que conectan dichas porciones. El deutocerebro que comprende el neurópilo V proveniente de la antena; y el tritocerebro, el más alejado, situado cerca de las conexiones esofágicas [8].

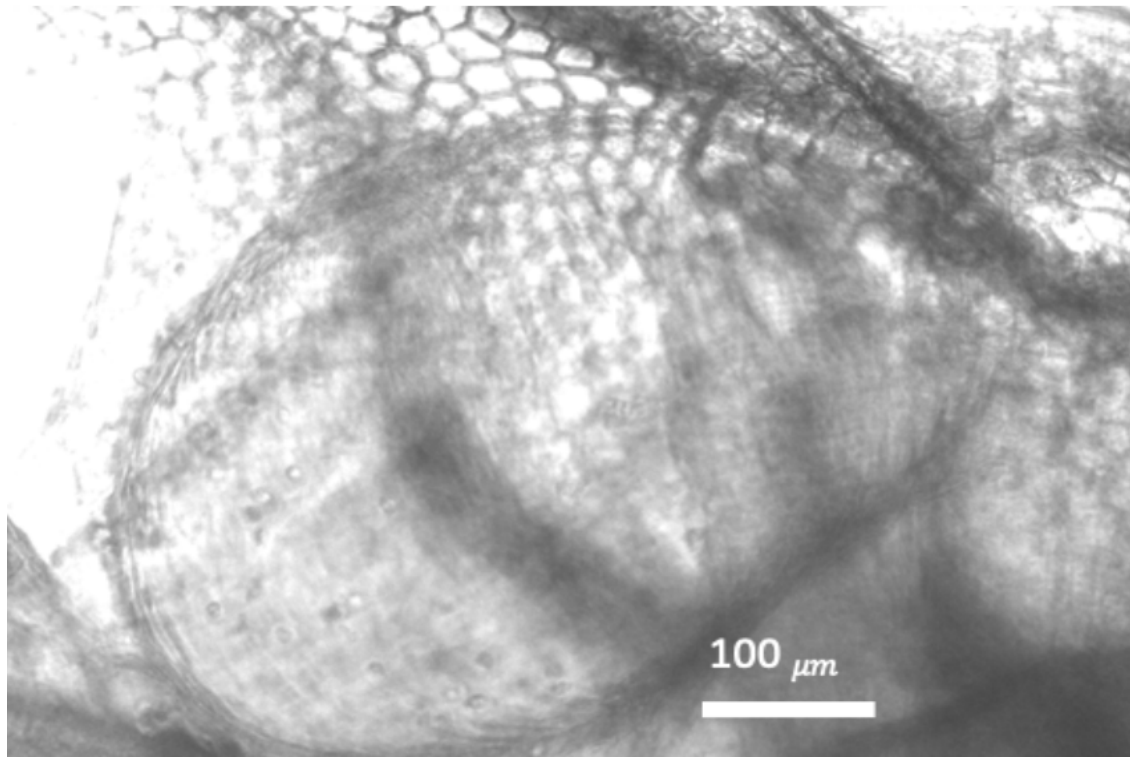


Figure 2: Imagen del corazón de *Daphnia magna* adulta tomada con microscopía invertida (10x).

## 1.2 Aspectos generales de la anestesia local

Los anestésicos locales (LA) se encuentran entre los fármacos más utilizados [9, 10] y corresponden a la primera línea de fármacos utilizados en la práctica anestesiológica y el manejo del dolor.

Estos fármacos actúan bloqueando de manera reversible la conducción del sistema nervioso sin importar la región, lo que genera una pérdida en la sensibilidad de carácter reversible una vez que el fármaco es excretado.

Los anestésicos locales bloquean la conducción pero también impiden la propagación del potencial de acción, al disminuir o prevenir el incremento transitorio en la permeabilidad de las membranas excitables al  $\text{Na}^+$ , que normalmente se produce por una despolarización leve de la membrana.

El efecto más frecuente de los anestésicos locales en el SNC es la somnolencia; la lidocaína puede originar disforia o euforia y fasciculaciones musculares. Después de ser absorbido por el organismo y de haber ingresado al torrente sanguíneo, los anestésicos locales actúan en el sistema cardiovascular, particularmente en el miocardio, disminuyendo la excitabilidad eléctrica y la frecuencia de conducción y la fuerza de contracción [11].

## 1.3 Aspectos generales de la anestesia general

El objetivo principal de la anestesia general es hacer más tolerables algunos procesos de intervención clínica, reduciendo la sensación de dolor o de otras sensaciones que son molestas o desagradables.

La anestesia puede presentar uno o varios de los siguientes efectos y se clasifica según diferentes niveles, que van desde la reducción de la ansiedad, pasando por la sedación hasta profundizar en la anestesia general [12].

### 1.3.1 Componentes del estado anestésico

#### A. Analgesia

Corresponde al mecanismo propio de ciertos fármacos para suprimir o reducir la entrada de señales al sistema nervioso central o al sistema nervioso periférico. Los anestésicos difieren de las drogas analgésicas pues afectan sólo temporalmente y, en algunos casos, eliminando por completo la sensación de dolor.

#### B. Amnesia

Consiste en la pérdida de la capacidad que posee el sistema nervioso central para tomar, clasificar y fijar eventos que provienen del pasado. En la clínica, se define como un estado transitorio del funcionamiento de la memoria. En dicho estado, el paciente resulta incapaz de conservar o recuperar información proveniente de sucesos pasados, pues se ven alterados mecanismos neuronales que regulan la formación y el almacenamiento de la memoria [13].

#### C. Inmovilidad

La inmovilidad es la característica que poseen los anestésicos para suprimir la respuesta motora ante un estímulo nocivo. De hecho, en el caso de los anestésicos inhalados, la medida estándar que permite determinar la potencia anestésica, es la concentración alveolar mínima (MAC), que se define como: la cantidad de un anestésico que debe ser inhalado para suprimir el movimiento en respuesta a la estimulación nociva en la mitad de los sujetos. La MAC corresponde, entonces a la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) de un anestésico inhalado [14].

La movilidad como respuesta a una estimulación, específicamente dolorosa, es una clara reacción que poseen los organismos dotados de un sistema nervioso. Esto convierte a la movilidad en una referencia estándar para el estudio de la teoría anestésica.

Todos los anestésicos son sustancias lipofílicas, pero no todas las sustancias lipofílicas son anestésicos. Existen algunas sustancias que carecen de efectos inmovilizadores. El 1,2-diclorohexafluorobutano conocido también como F6, posee un coeficiente de partición de 44 aceite/gas [15], el cual es similar al reportado para el sevofluroano (47 aceite/gas). No obstante, el F6 no corresponde a sustancia inmovilizadora y por tanto no es considerada como anestésica.

Sin embargo, recientemente se han propuesto distintas teorías, que en principio pretenden enfatizar la importancia de la interacción fármaco-lípido. Dicha interacción no debe ser desestimada, pues se sustenta en la propiedad que poseen los anestésicos para difundir y posteriormente alterar las propiedades termo-elásticas de los lípidos que conforman la membrana. Esta acción podría de alguna forma alterar la función de los canales proteicos, en específico, de canales iónicos cuya apertura o cierre son esenciales para la generación y propagación del impulso nervioso.

Aunque los anestésicos presentan diferentes efectos en diversos tejidos del organismo, se ha propuesto que la inmovilidad inducida por estos fármacos, se debe en gran medida a la acción que ejercen en la médula espinal, en lugar de ejercer una acción entera en la región cortical del SNC como anteriormente se creía [16]. Se demostró previamente mediante ECG que no existe correlación entre la actividad en esa zona, con la inmovilización después de un estímulo nocivo [17]

Estos hallazgos fueron reforzados *in vivo*, pues al descerebrar precolicularmente a una rata, la MAC del isoflurano no se ve modificada. Otro estudio encontró mediante la disección del cordón espinal torácico superior en ratas, que el sevoflurano perdía la capacidad para suprimir el movimiento. Una prueba más que sugiere que la inmovilidad por anestésicos subyace en el sistema nervioso central, pero que yace en su mayor parte en la espina dorsal, radica en los resultados experimentales electrofisiológicos del cordón espinal que demuestran que los anestésicos pueden suprimir la actividad de las neuronas motoras [18]. En mamíferos se observó que la inmovilidad después de un estímulo nocivo, está correlacionada con la pérdida de la excitabilidad de las neuronas motoras [19].

Pruebas experimentales en mamíferos (cabras), mostraron un corrimiento en la concentración alveolar mínima, al administrar casi exclusivamente el fármaco al cerebro. Dicho incremento pasó del 1.2% al 3%, utilizando isoflurano. En el halotano este corrimiento es más pronunciado pues la concentración alveolar mínima pasó del 0.9% a 3.4% en entrega confinada al cerebro [20]. Esto confirma nuevamente que el mayor efecto de inmovilidad yace en la médula espinal, y sólo en una fracción pequeña del efecto en el cerebro, demostrando así la naturaleza del fenómeno.

La inmovilidad generada en la espina dorsal es inducida a partir de la inhibición de una clase específica de neuronas: las neuronas motoras. Estas células inervan la señal de entrada del potencial de acción a los músculos, así como la señal de salida para la ejecución del movimiento. La reducción en la excitabilidad de las neuronas motoras se debe a que los anestésicos volátiles mejoran la conducción de la corriente GABA (ácido gama amino butírico), propiciando la entrada de iones cloro que aumentan las cargas negativas al interior celular, haciendo más difícil disparar un potencial de acción y transmitirlo a través de la célula nerviosa.

#### **D. Hipnosis**

La hipnosis corresponde a un nivel de conciencia distinto al ordinario. El estado hipnótico se consigue mediante el uso de fármacos anestésicos administrado por vía inhalatoria o intravenosa, siendo preferida esta última pues es más cómoda para el paciente, aunque presenta algunos inconvenientes, por ejemplo, la caída en la temperatura corporal. En general los anestésicos inhalables provocan cambios en la mucosa e irritación de los bronquios, por lo que su utilización corresponde más a la retención del estado hipnótico del procedimiento.

Se sabe que todos los fármacos utilizados para generar la hipnosis reducen la capacidades hemodinámicas del organismo, también, alteran frecuencia cardiaca (efectos cronotrópicos negativos), y su acción genera cambios en la fuerza de contracción del corazón.

Se ha demostrado en diferentes estudios [21], que mediante la hipnosis se pueden atenuar las respuestas fisiológicas relacionadas a los estímulos nocivos, los cuales provienen de la excitación eléctrica del nervio seorial, por lo que la hipnosis va más allá de la disminución o modificación de la expresión verbal que transmite la reacción sonora de incomodidad ante el estímulo doloroso [22].



**E. Parálisis.**

Corresponde a la pérdida o disminución de la motricidad o de la contractibilidad en uno o varios músculos, la cual puede o no estar acompañada de la pérdida en las sensaciones. La parálisis muscular se debe en general a que las uniones neuromusculares no pueden transmitir suficientes señales desde las fibras nerviosas hasta las fibras musculares.

## **2 Objetivos**

### **2.1 *Objetivo general***

Identificar y cuantificar los efectos de anestésicos generales y locales en DM, a fin de compararlos con los efectos reportados en mamíferos.

### **2.2 *Objetivos particulares***

1. Determinar la curva de supervivencia a anestésicos locales.
2. Determinar y caracterizar los efectos de diferentes anestésicos locales.
3. Inducir anestesia general mediante diferentes gases inhalables.

## 3 Materiales y métodos

### 3.1 *Materiales*

#### 3.1.1 Cultivo de *D. magna*

La población de DM fue adquirida en una empresa en la ciudad Guadalajara, México. Los organismos se aclimataron y cultivaron en el laboratorio durante 3 meses a  $21 \pm 2^\circ$  C, con un periodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las DM fueron alimentadas diariamente con cultivo unicelular de *Chlorella vulgaris* [23]. El cultivo consistió en 800 ml de un medio con características fisicoquímicas particulares (agua reconstituida). Este medio líquido se preparó con: NaCl 25 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MOPS 2 mM que actuó como amortiguador de pH, y NaHCO<sub>3</sub> 1 mM [24]. El pH y la dureza fueron monitoreadas constantemente utilizando un potenciómetro (Thermoscientific Versastar Pro, EE. UU.). El oxígeno disuelto (OD) se determinó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-087), después de 48 horas de aireación. El agua reconstituida se cambió dos veces por semana y, cuando fue necesario, se repuso el volumen perdido por evaporación añadiendo agua miliQ.

#### 3.1.2 Anestésicos locales

Los anestésicos locales no son fáciles de disolver en agua. Por esta razón, los fármacos utilizados son hidroclorados. Los fármacos utilizados para este trabajo fueron: clorhidrato de lidocaína (LHCl), (No. CAS 6108-05-0; grado analítico, pureza 99%), clorhidrato de tetracaína (THCl) (No. CAS 136-47-0; grado analítico, pureza 99%) y clorhidrato de bupivacaína monohidratada (BPVHCl) (No. CAS 241-917-8; grado analítico, pureza 99%); los cuales fueron adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich (EE. UU.). Todos los demás químicos utilizados son de calidad analítica y se obtuvieron de la misma empresa. Los criterios para la selección de estos fármacos fueron: (1) amplia utilización clínica (2) pertenecen a las dos familias de AL, y (3) difieren en potencia, absorción y duración en su efecto.

#### 3.1.3 Gases

Los gases utilizados para los experimentos fueron: nitrógeno como control (No. CAS 7440-63-3, estándar analítico, pureza > 95%), xenón (grado investigación 5.5, No. CAS 7440-63-3, pureza > 99%), criptón (grado de investigación 5, No. CAS 7439-90-9, pureza > 99%). Estos gases fueron adquiridos de Praxair Technology Inc (México). Los criterios para la selección de estos gases fueron: (1) baja reactividad química, (2) alto coeficiente de partición aceite/agua.

### 3.2 *Métodos*

#### 3.2.1 Ensayo de motilidad para anestésicos locales

Los efectos de los anestésicos locales sobre la motilidad de DM fueron evaluados. Se seleccionaron un conjunto de seis DM de 2 a 4 semanas de edad (2.5-3.4 mm de longitud) [25]. Los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de AL. El ensayo se realizó en 150 ml de medio con el

fármaco disuelto durante 2 horas [2]. Las concentraciones nominales utilizadas fueron 0, 16, 32, 64, 128 y 256 mg L<sup>-1</sup> [26]. Los AL empleados fueron: tetracaína, lidocaína y una mezcla de lidocaína más tetracaína (relación 1 mg de tetracaína por cada 1 mg de lidocaína). Los experimentos se realizaron en seis compartimientos, los cuales contenían al menos dos organismos cada uno. Antes del registro, el volumen en la cámara se ajustó lentamente a 10 ml de solución para limitar el movimiento vertical de los organismos [27]. Se colocó un led en la cámara para proporcionar una luz fría y fuerte, que actuó también como estímulo nocivo [25]. Los movimientos colectivos de las DM se registraron empleando una cámara, colocada a 20 cm por encima de los compartimientos. Esta fue operada a 60 cuadros por segundo y con una resolución de 2592 x 1994 pixeles. Se filmaron videos de 20 segundos para cada concentración y posteriormente, las películas se transfirieron a una computadora para ser procesadas. Las filmaciones fueron analizadas utilizando el software ImageJ 1.46 y un `script` de Python. Este programa fue diseñado para identificar y analizar el movimiento en objetos similares, considerando el cambio de posición del organismo entre dos cuadros. Fueron determinadas la rapidez media y el desplazamiento cuadrático medio (MSD) como parámetros de motilidad.

### 3.2.2 Estudio de los efectos de los anestésicos locales en el corazón de DM

Los efectos de los AL en el corazón se clasificaron en dos: (1) los cambios en la frecuencia cardíaca y (2) los cambios en el área cardíaca durante la sístole y la diástole. Para cada experimento, un conjunto de seis DM fueron expuestas a los medicamentos durante 2 h en un recipiente con 150 ml de solución. Posteriormente, las DM se colocaron en una caja de Petri (30 mm de diámetro). El volumen se redujo para evitar el movimiento de las DM mientras se enfocaba a cada una momentáneamente. El componente principal de nuestra configuración experimental fue un microscopio invertido Zeiss Axio Z.1 (Alemania) operado con un objetivo 10X. El video en cámara lenta fue capturado utilizando una cámara rápida (modelo IO Industries Flare 2M360-CL sensor CMOSIS CMV2000, 5.0 MP, Color, Canadá). La cámara fue operada a 300 cuadros por segundo con una resolución de 2048 x 1088 pixeles. Los videos del corazón fueron capturados uno a la vez, para seis diferentes DM. Para cada réplica y concentración, se grabaron diez películas y luego se analizaron. Los cambios en el área cardíaca se identificaron a través de la selección de bandas musculares cardíacas que componen las paredes de la cámara ventricular. Como el corazón tiene una forma elipsoidal, medimos los cambios en el radio menor y mayor. Una vez delimitado el perímetro, se cuantificó el área cardíaca utilizando un sistema de análisis de imagen digital, diseñado para obtener el número de pixeles contenidos en la región seleccionada.

### 3.2.3 Evaluación de la toxicidad de AL en *Daphnia magna*

Las pruebas de toxicidad aguda a 48 h para DM, se orientaron utilizando el procedimiento operativo estándar 2024 de la EPA de los Estados Unidos [28]. Para la experimentación, se eligieron a ocho neonatos de la 2da a la 6ta generación, con menos de 24 horas de edad. Las DM se colocaron en un vaso con 150 ml del fármaco disuelto. El tiempo de exposición fue de 48 horas a nado libre. Para todos los fármacos se usó un mínimo de cinco concentraciones y la evaporación se consideró insignificante. Para la validez del ensayo, se utilizó una muestra de control. Esta muestra presentó

una tasa de inmovilización de menos del 8%. Todos los ensayos y el control fueron realizados por triplicado. El criterio para discernir la supervivencia de los organismos fue considerar la inmovilidad después de 48 horas, seguido de una observación mediante microscopía para descartar contracciones cardíacas. Ambos parámetros nos permitieron calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ).

### 3.2.4 Supervivencia a altas presiones

DM fue sometida a condiciones hiperbáricas para evaluar su supervivencia. Para este experimento, se eligieron seis DM de 2 a 4 semanas de edad (2.5-3.4 mm de longitud) las cuales fueron expuestas a diferentes presiones durante 1 hora. Las DM se colocaron en un tubo de microcentrífuga lleno con 1,5 ml de agua reconstituida. El tubo de microcentrífuga abierto se colocó en un dispositivo cilíndrico herméticamente cerrado. La figura 3 (A) muestra el dispositivo hermético diseñado para soportar altas presiones. Las presiones probadas fueron de 40 y 90 atmósferas de nitrógeno durante 1 h. Todos los ensayos y el control se realizaron por triplicado. El criterio para discernir la supervivencia fue considerar la inmovilidad después de 1 h, seguido de una doble verificación con microscopía para descartar las contracciones cardíacas y el daño tisular.

### 3.2.5 Inducción de anestesia

La capacidad del xenón y el criptón para suprimir la respuesta motora después de un estímulo dañino se evaluó en DM. Para este ensayo, se seleccionó un conjunto de cuarenta DM de 2 a 4 semanas de edad y se colocó en un vaso de precipitados con 10 ml de agua reconstituida. La solución con las DM se colocó en una cámara especial. La Figura 3 (B), muestra la configuración del experimento. El ensayo consistió en una cámara fabricada con acero inoxidable, las tapas se fabricaron en acrílico para permitir la observación y la correcta iluminación. Se colocó un led en la parte inferior para proporcionar una luz fuerte que actuó como estímulo [25]. Se implementó una cámara para detectar cambios en la natación colectiva. Las películas se capturaron utilizando una cámara PixeLINK, modelo PL-B742U (sensor ON Semi MT9M00, EE. UU). La cual fue operada a 4 cuadros por segundo, y con una resolución de 1024 x 768 pixeles. Debido a las características hidrofóbicas del xenón y del criptón fue necesario disolverlos por presión. Las presiones analizadas para el xenón fueron de 0 a 14 atm con aumento progresivo de 0.5 atmósferas entre cada presión. Para el criptón, las presiones probadas fueron de 0 a 46 atm con un aumento de 2 atmósferas en cada presión. El tiempo de registro para cada presión fue de 30 segundos, el cual fue un tiempo adecuado para observar los cambios en la natación colectiva. Después de este lapso, la presión se incrementó rápidamente para descartar el efecto por acumulación.

### 3.2.6 Procesamiento de imágenes

Los videos fueron transferidos a una computadora para ser procesados y analizados. Se capturaron un total de 130 imágenes para cada evento. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ 1.46 y el complemento de autocorrelación de imagen, que permiten determinar el DMR en una determinada sección de fotogramas sucesivos ( $t_n$ ), con respecto al primer fotograma tomado en

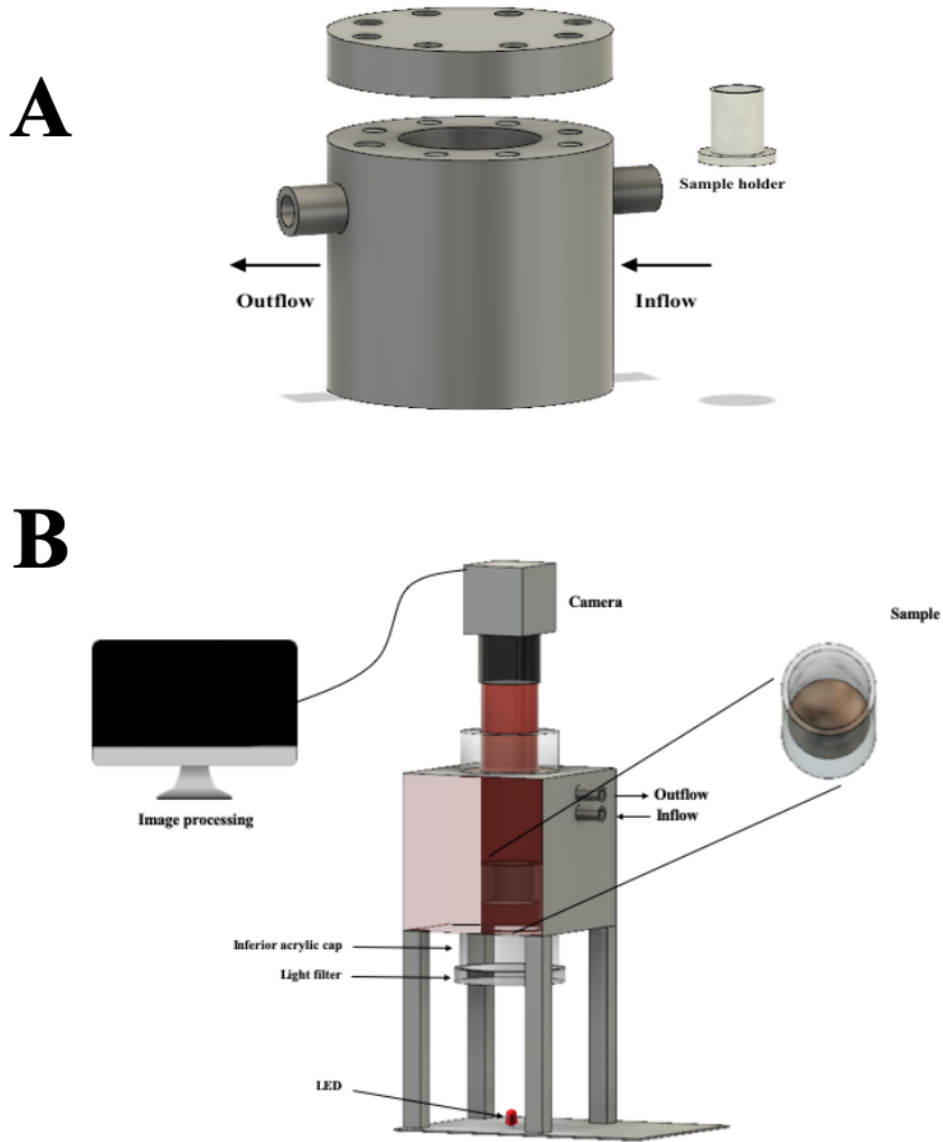


Figure 3: Configuración experimental. A) Cámara de acero inoxidable diseñada para soportar altas presiones. B) Ensayo experimental de anestesia. Se colocó un led rojo para proporcionar un estímulo nocivo y se utilizó un filtro para homogeneizar la iluminación. Las tapas de acrílico permiten observar y filmar a través de ellas. La muestra contiene 100 DM nadando libremente en 10 ml de medio.

$t_0$ . El programa analizó cada evento a diferentes presiones a través de un modelo de correlación temporal dado por la siguiente expresión:

$$C_I(t_0, t) = \frac{1}{\beta} \frac{\langle I(t_0)I(t_0 + 1) \rangle_{X,Y}}{\langle I(t_0) \rangle_{X,Y} \langle I(t_0 + 1) \rangle_{X,Y}}$$

Donde la región seleccionada corresponde a cuadrados de 150 por 150 píxeles, lo que produce una matriz de intensidad  $I(X, Y, t)$ . La intensidad media ( $I_0$ ) en  $t_0$ , corresponde a la suma de todos los elementos en la matriz  $I(X, Y, t_0)$  promediada en la región seleccionada, y  $\beta$  es un factor de normalización calculado por la autocorrelación temporal de  $I(t_0)$  consigo mismo. El valor para la autocorrelación ( $C_I$ ) va de 0 a 1. Los valores cercanos a 1 corresponden a los organismos con baja motilidad, mientras que los valores aproximados a 0 corresponden a una respuesta efectiva después de un estímulo nocivo (alta motilidad de DM).

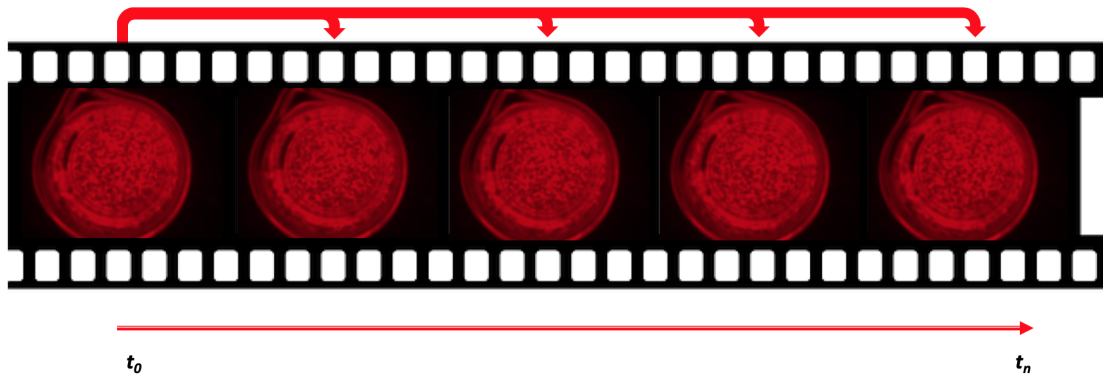


Figure 4: Ejemplo del procesamiento de imágenes.  $t_0$  representa al primer cuadro y  $t_n$  los diferentes cuadros del video. Un cuadrado de 150 por 150 píxeles fue tomado en la parte central de los cuadros. Las matrices con distintas intensidades fueron analizadas mediante el modelo de autocorrelación.

## 4 Resultados

### 4.1 Efectos de los AL sobre el nado de DM

Los AL alteran el comportamiento de nado de DM. A una concentración de  $182.94 \text{ mg L}^{-1}$ , el THCl inmobiliza al 50% de la población de DM, después de 2 horas de exposición (2 h-CE<sub>50</sub>). La LHCl y la BPVHCl, no presentaron efectos en la inmovilidad de DM a ninguna concentración probada. Esto nos motivó a hacer una mezcla LHCl-THCl (50%-50%) para observar algún tipo de antagonismo entre ambas sustancias. En efecto, la capacidad de THCl para inducir la inmovilidad se redujo cuando se añadió LHCl. La 2 h-CE<sub>50</sub> fue desplazada a  $241.81 \text{ mg L}^{-1}$ .



Figure 5: Seguimiento de las trayectorias de nado de DM. Las trayectorias corresponden a películas de 30 s tomadas después de exponer a DM a  $16 \text{ mg L}^{-1}$  de THCl durante 2 h. Las trayectorias individuales están marcadas con diferentes colores.

Las drogas producen diferentes alteraciones en el comportamiento de nado de la DM. La Figura 6 muestra que la THCl presenta un efecto estimulante a  $16 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, cuando la concentración aumenta, la actividad de natación se reduce para alcanzar finalmente la inmovilidad total. Por el contrario, la lidocaína presenta un efecto estimulante sobre la actividad de la DM en concentraciones superiores a  $32 \text{ mg L}^{-1}$ . El efecto estimulante permite que las DM alcancen altas velocidades. Además, como se mencionó anteriormente, el LHCl atenúa el efecto producido por el THCl, excepto a la concentración más alta ( $512 \text{ mg L}^{-1}$ ), donde predomina el efecto inmovilizador del THCl. La BPVHCl no muestra efectos significativos en la rapidez media de la DM. Por otra parte, el desplazamiento cuadrático medio se redujo drásticamente con  $512 \text{ mg L}^{-1}$  de THCl. La LHCl a tal concentración produce el efecto contrario, las DM muestran desplazamientos más grandes. Encontramos que la mezcla puede mitigar el efecto producido por el THCl a tiempos largos. El desplazamiento cuadrático medio no se muestra para concentraciones inferiores debido a que las diferencias fueron insignificantes.

### 4.2 Alteraciones en el corazón

Los tres fármacos utilizados en este trabajo causaron desaceleración de la frecuencia cardíaca (FC) de las DM. Se encontró que el ritmo cardiaco cambia drásticamente de  $278 \pm 25$  latidos por minuto



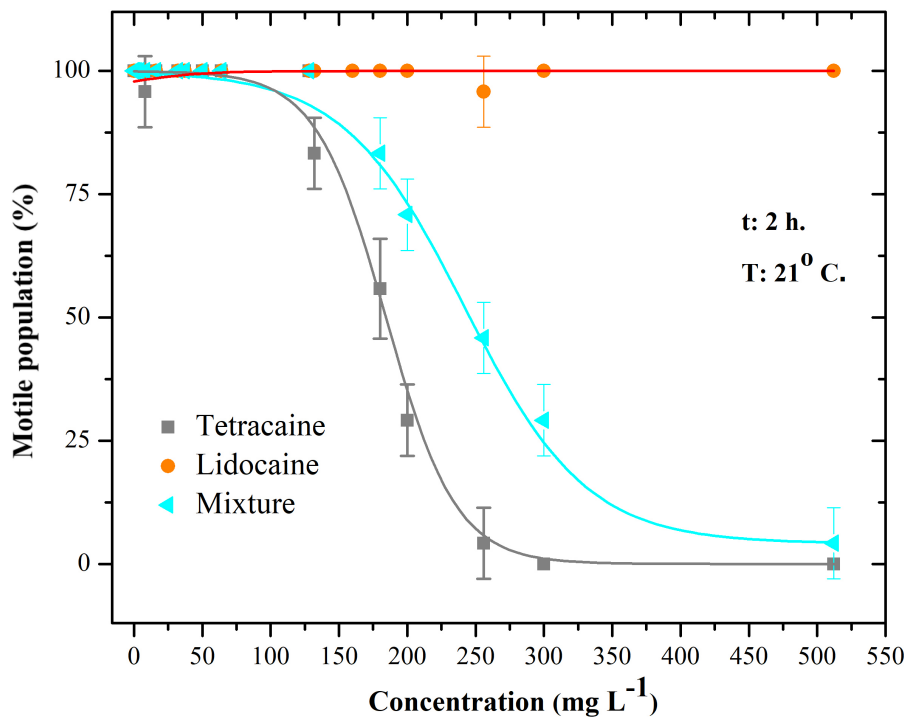


Figure 6: Población inmovilizada de DM expuesta a diferentes cantidades de THCl, LHCl y a una mezcla de ambos. La inmovilidad  $EC_{50}$  para el THCl fue de  $182.94 \text{ mg L}^{-1}$  y de  $241.81 \text{ mg L}^{-1}$  para la mezcla. El ajuste observado es una curva de dosis-respuesta. Los valores son el porcentaje de población inmovilizada y las barras de error corresponden a la desviación estándar ( $p < 0.05$ ) para  $n = 8$ .

(BPM) a  $33 \pm 10$  BPM después de la exposición a tetracaína a la concentración más alta empleada en este experimento ( $256 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esto representa una reducción de la frecuencia en un 89%. La DM presenta disminución de la frecuencia cardíaca tras ser expuesta a BPVHCl en las siguientes concentraciones: 16, 128 y  $256 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, el organismo muestra un incremento en la frecuencia cardíaca tras exponerse a: 32 y  $64 \text{ mg L}^{-1}$  de BPVHCl. La máxima disminución en la FC que encontramos, fue tras exponer a las DM a  $256 \text{ mg L}^{-1}$  de THCl. Tras esta exposición se reportó una reducción aproximada del 78% en la FC con respecto al control. La lidocaína presenta la potencia más baja para inducir bradicardia. De hecho, incluso en la concentración más alta, la reducción de la FC fue de aproximadamente del 34.7%. La mezcla THCl-LHCl también mitiga el efecto del THCl en la FC.

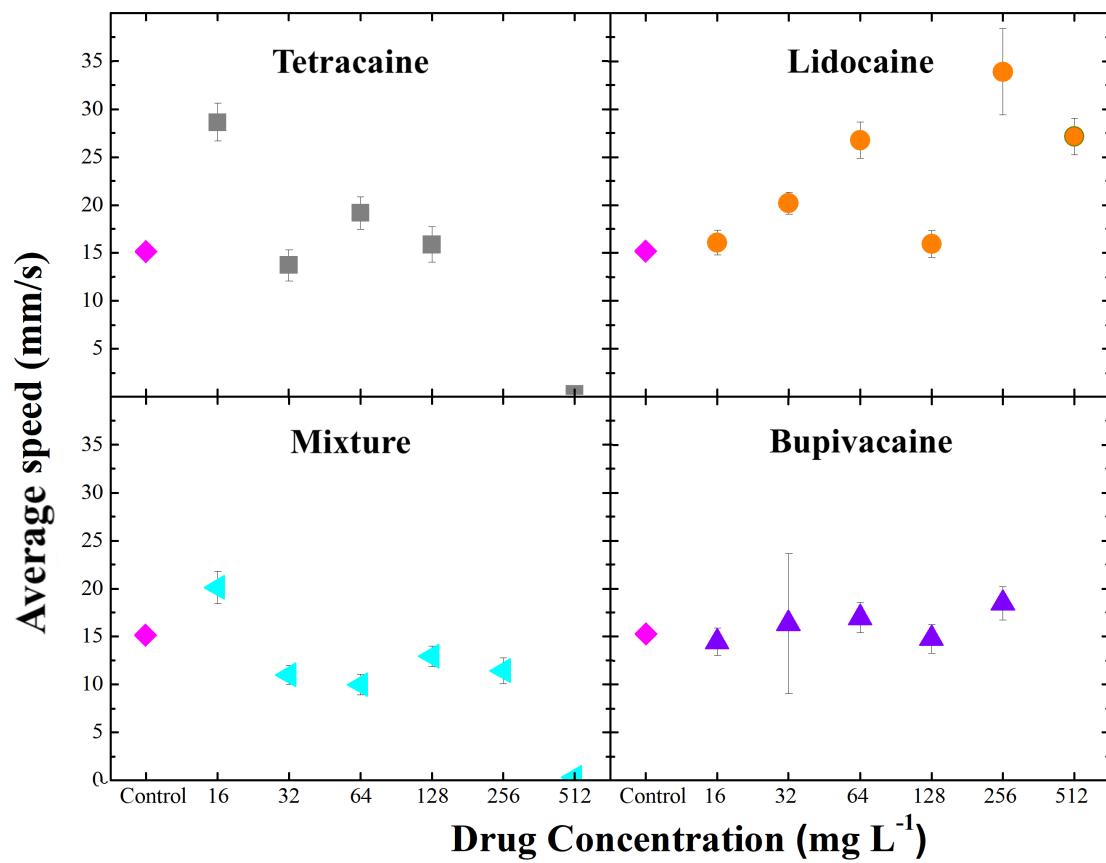


Figure 7: Rapidez promedio de nado de las DM expuestas a diferentes concentraciones de THCl, LHCl, THCl-LHCl y BPVHCl. Las barras de error son desviaciones estándar ( $p < 0.5$ ) para  $n = 6$ .

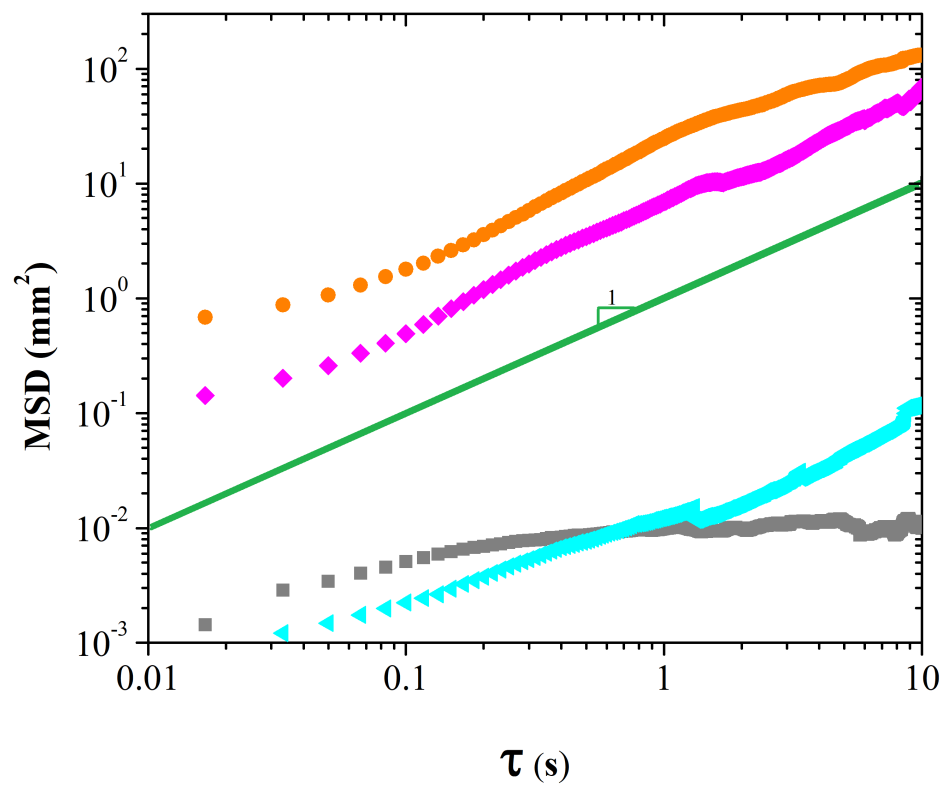


Figure 8: Desplazamiento cuadrático medio de DM. El control en diamantes de color rosa, la THCl en cuadrados grises, el LHCl en círculos de color naranja y una mezcla en porciones iguales en triángulos cían. La concentración utilizada para los cuatro fármacos es de  $512 \text{ mg L}^{-1}$ .

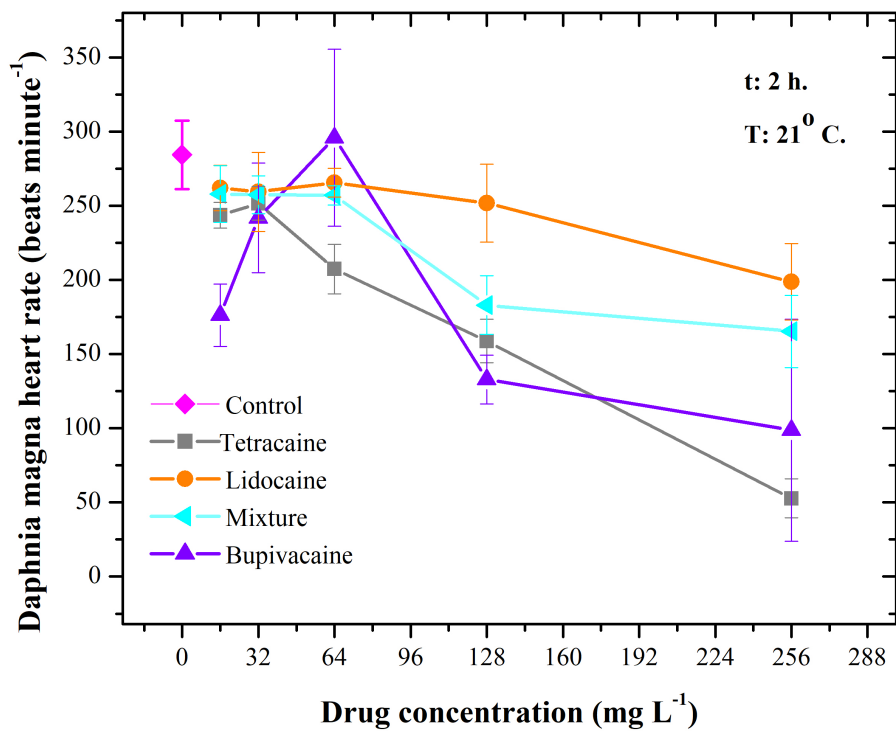


Figure 9: Los fármacos probados provocan una disminución en la frecuencia cardíaca de DM. La mezcla THCl-LHCl presenta una desaceleración menor en la FC en comparación con la THCl en estado puro. Las barras de error representan la desviación estándar ( $p < 0.05$ );  $n = 6$ .

Se encontró además que la THCl genera una reducción en la superficie del corazón de DM, la cual depende de la dosis. Durante la sístole y la diástole, la reducción máxima encontrada resultó tras la exposición a la concentración más alta de THCl ( $256 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esta disminución de la superficie cardíaca fue de  $0.033 \text{ mm}^2$ , lo que representa el 28% del área durante el evento sistólico con respecto al control. Por otra parte, la superficie cardíaca durante la diástole también se redujo tras la exposición a  $256 \text{ mg L}^{-1}$  de THCl. En este caso la reducción de la superficie fue de  $0.034 \text{ mm}^2$ , lo que representa aproximadamente el 38% del área total con respecto al control. La reducción de la superficie del corazón causada por el THCl puede ser mitigada cuando se agrega LHCl. La lidocaína en estado puro no mostró efectos significativos en la superficie cardíaca.

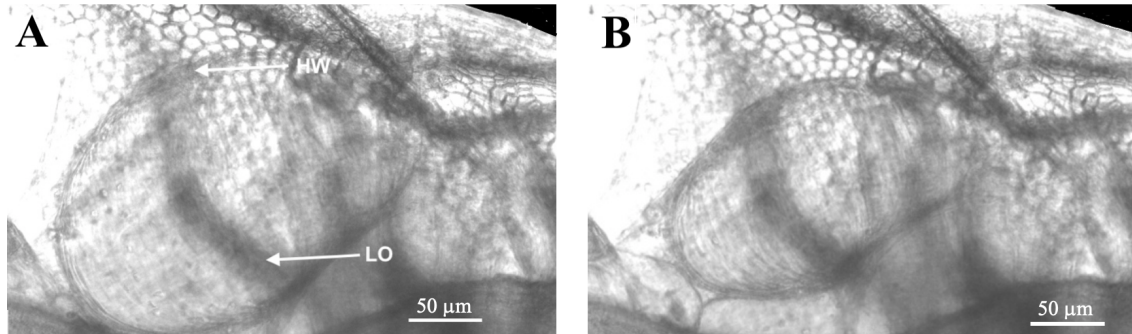


Figure 10: Observación microscópica del corazón de DM a 10x. Diástole (A) y sístole (B), sin la presencia de drogas. La posición del corazón y la superficie cardíaca, se puede definir mediante la identificación de la ostia lateral (LO) en su estado cerrado o abierto y la expansión o contracción de las paredes del corazón (HW) [10].

### 4.3 Toxicidad de los AL en DM

Todos los fármacos resultaron tóxicos a diferentes concentraciones para la DM tras ser expuesta durante 48 horas. La Tabla 1, muestra las características fisicoquímicas de los AL disueltos en agua reconstituida. No se encontraron diferencias significativas entre el control y las tres soluciones, por lo que las interferencias se descartaron con las condiciones de prueba recomendadas para la DM. La Tabla 2 muestra los valores de 48 h- $LC_{50}$  para DM, la  $LD_{50}$  intravenosa para ratones [29], y las dosis máximas recomendadas para humanos [30]. Los resultados mostraron que la DM fue más sensible al THCl con una 48 h- $CL_{50}$  de  $6.58 \pm 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido de  $42.4 \pm 10.32 \text{ mg L}^{-1}$  para LHCl y  $18.6 \pm 5.2 \text{ mg L}^{-1}$  para BPVHCl. Estos resultados muestran que la toxicidad de estos medicamentos es el mismo en los tres organismos.

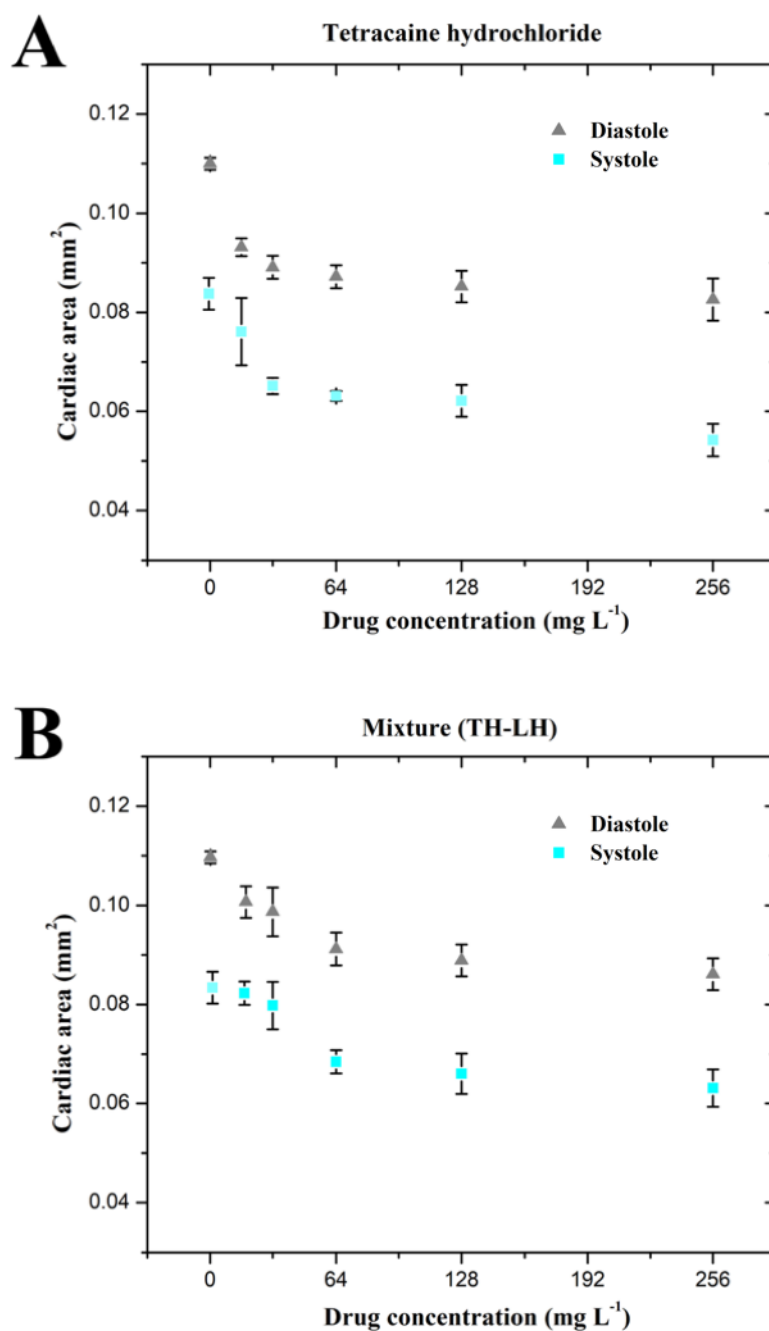


Figure 11: Área cardíaca de la DM. (A) Cambios en el tamaño del corazón después de la exposición a diferentes concentraciones de THCl (16, 32, 64, 128 y 256 mg L<sup>-1</sup>) durante 2 horas. La reducción de la superficie cardíaca se puede mitigar (B) cuando el clorhidrato de tetracaína se mezcla con clorhidrato de lidocaína en las mismas concentraciones. Los valores son el área media del corazón  $\pm$  SD ( $p < 0.05$ );  $n = 6$ .

Tabla 1: Parámetros físico-químicos de los fármacos (16 mg L<sup>-1</sup>)

Droga	pH	Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	Conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
THCl	7.65	8.02	612
LHCl	8.09	8.14	589
Mezcla	8.19	7.9	601
BPVHCl	7.55	8.44	599

Tabla 2: Valores de 48 h-LC50 probada en DM, en comparación con LD50 i.v. en ratones y máxima dosis recomendada en humanos (MDRH) sin vasoconstrictor.

Droga	48-h LC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	LD50 ( <i>i.v.</i> ) (mg kg <sup>-1</sup> )	MDRH (mg kg <sup>-1</sup> )
THCl	6.88± 2.55	NR	1-3
LHCl	42.4± 10.32	133.11	4-5
BPVHCl	18.66± 5.22	58.57	2.5

#### 4.4 Efectos de los gases nobles

DM presentó una alta tolerancia a condiciones hiperbáricas. Nuestras mediciones mostraron que el porcentaje de supervivencia después de la exposición al nitrógeno (N<sub>2</sub>) a 40 bar, se aproximó al 95% y al 88% después de la exposición a 90 bar. Sin embargo, la subsiguiente despresurización de la cámara provocó la conformación de burbujas macroscópicas en varios compartimentos externos del cuerpo de la DM.

Las propiedades anestésicas de los gases nobles xenón y criptón se evaluaron en DM. El rango

de presiones de xenón en la cámara parece no presentar efectos inmovilizadores en la DM de 0 a 3 atm. Este resultado podría estar relacionado con la presencia nula de átomos de xenón en el agua. Además, el incremento progresivo de la presión del xenón disminuye la respuesta motora (efecto anestésico) en DM. El rango de presiones para reducir la motilidad a la mitad fue a las 5 atm. En presiones superiores a las 6 atm el efecto se hace más evidente.

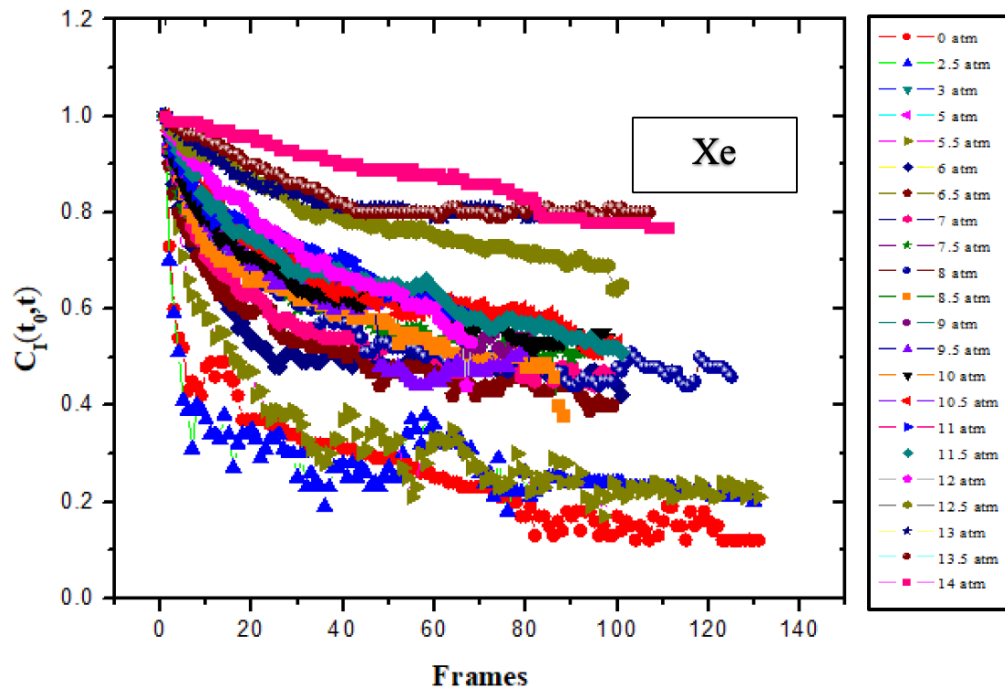


Figure 12: Autocorrelación de imágenes encontrada a diferentes presiones de xenón que van de las 0 a las 14 atm. Los valores cercanos a 0, muestran una alta motilidad de DM. Por otro lado, valores cercanos a 1, representan una supresión de la respuesta motora posterior al estímulo nocivo (anestesia).



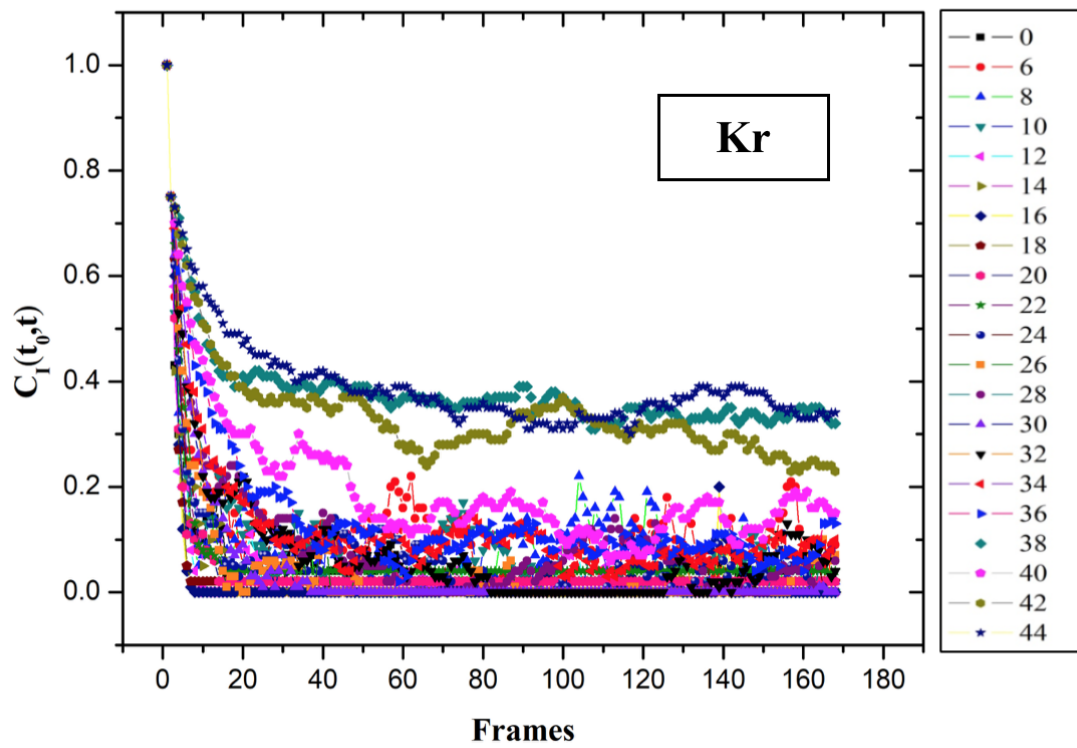


Figure 13: Autocorrelación de imágenes encontrada a diferentes presiones de criptón que van de las 0 a las 44 atm. Los valores cercanos a 0, muestran una alta motilidad de DM. Por otro lado, valores cercanos a 1, representan una supresión de la respuesta motora posterior al estímulo nocivo.

## 5 Discusión

El presente estudio muestra que la exposición de DM a varios de los AL más utilizados (clorhidrato de tetracaína, clorhidrato de lidocaína y clorhidrato de bupivacaína) afecta la rapidez de natación, el desplazamiento cuadrático medio, la frecuencia cardíaca, el área cardíaca y la supervivencia. La velocidad de natación está determinada por la longitud de la DM [31]. Este parámetro puede usarse como un biomarcador sensible para los efectos subletales de fármacos. Se esperaba que el invertebrado expuesto a los AL fuera inmovilizado. Esto, debido a la facultad que presentan para bloquear la conducción nerviosa motora. Se sabe que la capacidad de bloqueo motor es más efectiva y significativamente más larga con la tetracaína, en comparación con la bupivacaína en vertebrados [32]. En este sentido, la dosis para inmovilizar la tetracaína corresponde al bloqueo de la conducción nerviosa motora. El efecto fue reversible después de 30 minutos tras el traspaso de los organismos a agua fresca. Resultados anteriores [33], muestran que la lidocaína compete con la rianodina por su sitio de unión. Por el contrario, la tetracaína interactúa de una manera no competitiva. Nuestros resultados sugieren la existencia de un sitio de unión único (inhibidor y estimulante) de los LA en el corazón de la DM, similar al reportado en animales superiores [34].

El THCl resultó ser el fármaco más tóxico, además de presentar reducción en la superficie cardíaca durante todo el ciclo. Este efecto puede ser mitigado cuando se añade LHCl. La lidocaína presenta la potencia más baja para inducir bradicardia en el corazón y la menor toxicidad en DM. En dosis aceptadas, la lidocaína no tiene efectos significativos sobre la frecuencia cardíaca en varios modelos animales [35, 36]. Sin embargo, a dosis altas, la lidocaína actúa como un depresor del miocardio y reduce la frecuencia de las descargas en cualquier marcapasos [37]. La bupivacaína ejerce una disminución en la frecuencia cardíaca a 16, 128 y 256 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, mostró una recuperación a 64 y 128 mg L<sup>-1</sup>. La bupivacaína presenta una alta eficiencia para reducir la frecuencia cardíaca a la concentración más baja (16 mg L<sup>-1</sup>) en comparación con la tetracaína, lo que representa una acción más rápida en el latido cardíaco de DM. La BPVHCl, en la concentración más alta (256 mg L<sup>-1</sup>), no tiene la potencia del THCl para reducir la frecuencia cardíaca.

DM presentó mortalidad a la presencia de AL en el medio acuático, siendo el clorhidrato de tetracaína el más tóxico después de la exposición a 48-h, seguido de bupivacaína y lidocaína. El orden de toxicidad encontrado para la DM coincidió con la toxicidad reportada previamente para varios animales vertebrados [38, 39].

Nuestro estudio demostró que el xenón atenúa la respuesta motora de DM después de un estímulo dañino. Presentamos un nuevo sistema para probar la potencia de cualquier gas a diferentes presiones y probar sus propiedades anestésicas, si las hay. A pesar de la gran cantidad de métodos disponibles, desarrollamos una técnica simple para estudiar muestras poblacionales suficientemente grandes mediante el uso de autocorrelación espacio-temporal [40, 41]. Esta técnica nos permitió definir con precisión la pérdida de la respuesta motora en el organismo.

Mostramos que DM es un buen candidato para probar las propiedades anestésicas de los gases con un riesgo fisiológico bajo o nulo. A pesar de que todos estos gases presentan una alta hidrofobicidad, el incremento de la presión aumenta su solubilidad en agua. El rango aproximado de presiones para la disolución de xenón y criptón en agua a 25 °C es 5-48 atm y 33- 81 atm respectivamente [42]. Nuestro dispositivo nos permitió disolver los gases efectivamente para exponer

a los animales. Encontramos que el xenón produjo efectos significativos en la respuesta motora una vez que el gas se disuelve en el agua y es absorbido por organismo. El criptón muestra una potencia baja para inducir anestesia en DM, incluso a la más alta presión. Nuestros resultados están en línea con lo reportado anteriormente para roedores [43]. El efecto inmovilizador producido por la alta presión fue descartado. Para ello, se llevó a cabo un control con nitrógeno (no posee propiedades anestésicas) a una presión de 80 atm. El mecanismo de DM para captar estos gases sigue siendo incierto. Sin embargo, los procesos para la oxigenación de la sangre, podrían explicar cómo los gases se intercambian en el flujo sanguíneo y llegan al sistema nervioso para inducir la insensibilidad y la pérdida de la respuesta motora. El mecanismo para el intercambio de oxígeno en DM se produce cerca del margen posterior del caparazón y en la parte rostral de la cabeza [44]. Los efectos producidos por niveles bajos de oxígeno fueron descartados, debido a la alta capacidad de la DM para adaptarse a múltiples condiciones de bajo oxígeno, inclusive a la hipoxia grave (anoxia) [45, 46].

DM presenta un sistema nervioso complejo, el cual posee múltiples receptores que aún se desconocen. Se encontró que el xenón produjo efectos motores similares a los que se presentan en mamíferos. El efecto del xenón, sugiere la inhibición del receptor de NMDA en DM. Sin embargo, el efecto del criptón no se puede vincular a este mecanismo. El uso de clones de DM redujo la influencia de las variaciones genéticas.

## 6 Conclusiones

Este estudio muestra por primera vez los efectos de los AL en la tasa de supervivencia, el comportamiento de nado y en el corazón de la DM. Los resultados experimentales de AL, muestran una analogía con los efectos encontrados en organismos vertebrados. Nuestros resultados muestran que la DM es un modelo ideal para probar la toxicidad y los efectos de otros AL.

Por otra parte, en este trabajo se presenta un sistema capaz de disolver gases que generalmente son insolubles en condiciones normales. De esta forma es posible evaluar las propiedades anestésicas de diferentes gases, en diferentes organismos acuáticos. Por lo tanto, este sistema podría ser implementado para nuevos modelos biológicos, generando así, nueva información sobre el tratado de anestesia y el manejo del dolor. El xenón mostró que, al igual que en vertebrados, puede inhibir la respuesta motora de DM ante un estímulo dañino. Este efecto es reversible en un corto tiempo y no presentó efectos secundarios que pudieran comprometer al organismo. Los gases presentan diferencias importantes entre sí, siendo el xenón el más efectivo para inducir anestesia. *D. magna* mostró ser un buen modelo para predecir y probar el efecto de anestésico de diferentes gases.

## References

- [1] Linda C. Weiss and Julian Leimann. Ralph Tollrian, “Predator-induced defences in *Daphnia longicephala*: location of kairomone receptors and timeline of sensitive phases to trait formation”. *Journal of Experimental Biology*, ,:2918–2926, 2015.
- [2] A. Villegas-Navarro, E. Rosas-L, and J. L. Reyes. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(2):127–134, 2003.
- [3] U. Strähle, S. Scholz, R. Geisler, P. Greiner, H. Hollert, S. Rastegar, and T. Braunbeck. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2):128–132, 2012.
- [4] D. M. Maynard. Circulation and heart function. *The Physiology of Crustaceans*, 1:161–226, 1960.
- [5] N. W. Jermakoff and M. W. Ermakov. Nervous system and heart activity in invertebrates. Observations on the heart of Cladocera. *Medichnyi Zhurnal. An Ukrainian. SSR*, 6(3):755–782, 1936.
- [6] N. W. Jermakoff and M. W. Ermakov. Nervous system and heart activity in invertebrates. II. On innervation of the heart in Cladocera. *Medichnyi Zhurnal. An Ukrainian SSR*, 7(1):263–275, 1937.
- [7] T. J. Postmes, R. Prick, and I. Brorens. The deceleration of the heart frequency in the waterflea *Daphnia magna* by adrenoceptor agonists and antagonists. *Hydrobiologia*, 171:141–148, 1989.
- [8] L. C. Weiss, R. Tollrian, Z. Herbert, and C. Laforsch. Morphology of the *Daphnia* nervous system: a comparative study on *Daphnia pulex*, *Daphnia lumholtzi*, and *Daphnia longicephala*. *Journal of morphology*, 273(12):1392–1405, 2012.
- [9] G. R. Strichartz and J. M. Ritchie. *The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1987.
- [10] K. C. M. Robledo-Sánchez, F. J. Guevara-Pantoja, and J. C. Ruíz-Suarez. Video-tracking and high-speed bright field microscopy allow the determination of swimming and cardiac effects of *D. magna* exposed to local anaesthetics. *Science of The Total Environment*, 2019.
- [11] B. G. Covino. *Toxicity and systemic effects of local anesthetic agents*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1987.
- [12] D. D. Koblin, B. S. Chortkoff, M. J. Laster, M. J. Halsey, and P. Ionescu. Polyhalogenated and perfluorinated compounds that disobey the Meyer-Overton hypothesis. *Anesthesia and*, 79(6):1043–1048, 1994.
- [13] E. N. Brown, R. Lydic, and N. D. Schiff. General anesthesia, sleep, and coma. *New England Journal of Medicine*, 363(27):2638–2650, 2010.

- [14] L. S. Goodman. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis*, volume 1549. 1996.
- [15] D. D. Koblin, B. S. Chortkoff, M. J. Laster, M. J. Halsey, and P. Ionescu. Polyhalogenated and perfluorinated compounds that disobey the Meyer-Overton hypothesis. *Anesthesia and*, 79(6):1043–1048, 1994.
- [16] I. J. Rampil, P. Mason, and H. Singh. Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology*, 78(4):707–712, 1993.
- [17] I. J. Rampil and M. J. Laster. No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology*, 77(5):920–925, 1992.
- [18] B. S. King and I. J. Rampil. Anesthetic depression of spinal motor neurons may contribute to lack of movement in response to noxious stimuli. *Anesthesiology*, 81(6):1484–1492, 1994.
- [19] I. J. Rampil and B. S. King. Volatile anesthetics depress spinal motor neurons. *Anesthesiology. The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 85(1):129–134, 1996.
- [20] J. F. Antognini and K. Schwartz. Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain. *Anesthesiology*, 79(6):1244–1249, 1993.
- [21] D. P. Brown. Clinical hypnosis research since, 1992.
- [22] S. Györke, V. Lukyanenko, and I. Györke. Dual effects of tetracaine on spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 500(2):297–309, 1997.
- [23] C. Barata. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 61:143–154, 2002.
- [24] B. and Ratte Kluttgen and H. T. Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry. An International Journal*, 13:1619–1627, 1994.
- [25] J. D. McKenzie, P. Calow, and W. S. Nimmo. A model to test the potency of inhalation anaesthetics. *British Journal of Anesthesiology*, 34:212, 1990.
- [26] P.A. and Horning Lewis and W. B. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environmental toxicology and chemistry*, 10:1351–1357, 1991.
- [27] E. Artells. Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. *PLoS. One*, 8, 2013.
- [28] W. Peltier. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to aquatic organisms*, volume 1. Laboratory, 1978.
- [29] R. Jong and J. D. Bonin. Deaths from local anesthetic-induced convulsions in mice. *Anesthesia and Analgesia*, 59:401–405, 1980.

- [30] B. Cox, M. E. Durieux, and M. A. Marcus. Toxicity of local anesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 17:111–36, 2003.
- [31] Dodson S. and Ramcharan C. Size-specific swimming behavior of *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research*, 13:1367–1379, 1991.
- [32] K. and Widman Axelsson and G. B. A comparison of bupivacaine and tetracaine in spinal anaesthesia with special reference to motor block. *Acta anaesthesiologica*, 1985.
- [33] Shoshan-Barmatz V. and Zchut S. The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. *The Journal of membrane biology*, 133:171–181, 1993.
- [34] G. Vanderkooi. On the mechanism of action of anesthetics. Direct inhibition of mitochondrial F1-ATPase by n-butanol and tetracaine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 635:200–203, 1981.
- [35] A. K. Enderle. Clinical evaluation of ketamine and lidocaine intravenous infusions to reduce isoflurane requirements in horses under general anaesthesia. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 2008.
- [36] Kao F.F. and Jalar U.H. The central action of lignocaine and its effect on cardiac output. *British journal of pharmacology and analgesia*. , 14:522–526, 1959.
- [37] H. J. Marriott and K. Phillips. Profound hypotension and bradycardia after a single bolus of lidocaine. *Journal of electrocardiology*, 7:79–82, 1974.
- [38] J. D. Bonin. Deaths from local anesthetic induced convulsions in mice. *Anesthesia and analgesia*. 59:401–405, 1980.
- [39] C. Nancarrow et al. Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanisms of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine in the sheep. *Anesthesia and*, 69:276–283, 1989.
- [40] R. Finsy, J. Peetermans, and H. Lekkerkerker. Motility evaluation of human spermatozoa by photon correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 27(2):187–191, 1979.
- [41] J. B. Dixon, A. A. Gashev, D. C. Zawieja, J. E. Moore, and G. L. Coté. Image correlation algorithm for measuring lymphocyte velocity and diameter changes in contracting microlymphatics. *Annals of biomedical*, 35(3):387–396, 2007.
- [42] R. P. Kennan and G. L. Pollack. Pressure dependence of the solubility of nitrogen, argon, krypton, and xenon in water. *The Journal of Chemical Physics*, 93(4):2724–2735, 1990.
- [43] S. C. Cullen and E. G. Gross. The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science*, 113(2942):580–582, 1951.
- [44] R. Pirow, F. Wollinger, and R. J. Paul. The sites of respiratory gas exchange in the planktonic crustacean *Daphnia magna*: an in vivo study employing blood haemoglobin as an internal oxygen probe. *Journal of Experimental Biology*, 202(22):3089–3099, 1999.

- [45] L. J. Weider and W. Lampert. Differential response of *Daphnia* genotypes to oxygen stress: respiration rates, hemoglobin content and low-oxygen tolerance. *Oecologia*, 65(4):487–491, 1985.
- [46] R. J. Paul, M. Colmorgen, R. Pirow, Y. H. Chen, and M. C. Tsai. Systemic and metabolic responses in *Daphnia magna* to anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(3):519–530, 1998.





# Video-tracking and high-speed bright field microscopy allow the determination of swimming and cardiac effects of *D. magna* exposed to local anaesthetics

K. Carlo Martín Robledo-Sánchez, F.J. Guevara-Pantoja, J.C. Ruiz-Suárez \*

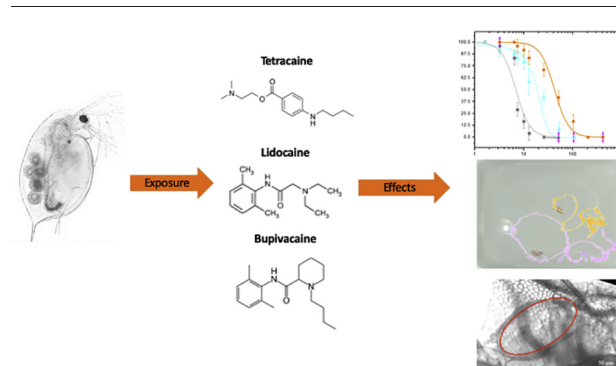
Unidad Monterrey, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Vía del Conocimiento 201, PIIT, Autopista al Aeropuerto, Km. 9.5, Apodaca, Nuevo León, Mexico



## HIGHLIGHTS

- Local anaesthetics affect the motility of *D. magna*.
- Tetracaine produces total immobility to *D. magna*.
- Local anaesthetics reduce the cardiac frequency of *D. magna*.
- The release of local anaesthetics is an environmental risk.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 May 2019

Received in revised form 27 June 2019

Accepted 30 June 2019

Available online 02 July 2019

Editor: Henner Hollert

### Keywords:

*Daphnia magna*

Local anaesthetics

Tetracaine

Lidocaine

Bupivacaine

Lethal concentration

Swimming performance

Heart rate

Ecotoxicity

Environmental risk

## ABSTRACT

Local anaesthetics are among the most used drugs in clinical practice, but once they are released to the environment, the effects on the aquatic fauna remain uncertain. This study evaluates, for the first time, the impact of tetracaine, lidocaine and bupivacaine on the survival rate and physiological effects of cladocera *Daphnia magna*. Video-tracking and image processing allowed us to obtain changes in behaviour parameters like swimming average velocity and mean square displacement. We found that tetracaine shows the most severe effect. A high-speed microscopy system was also used to determine the response of *D. magna* heart to these drugs. Our results show that tetracaine presents dose-dependent area reduction during all cardiac cycle, while bupivacaine and lidocaine did not present significant effects on heart size. The tested drugs, at environmental high concentrations, altered behaviour, heart function and survival of *D. magna*.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [cruiz@cinvestav.mx](mailto:cruiz@cinvestav.mx) (J.C. Ruiz-Suárez).

## 1. Introduction

Local anaesthetics (LAs) are among the most used drugs (Ritchie, 1987), and correspond to the first line of compounds used in the anesthesia practice and pain management. Like many pharmaceuticals that continuously increase in the aquatic environment (Zhang et al., 2008), LAs are not the exception. Since drugs cannot be fully removed in conventional wastewater treatment plants (Escher et al., 2011; Wick et al., 2009; Rúa-Gómez and Püttmann, 2013), some are detected even in potable water. Consequently, there is an urgent need for assessing the environmental risks of long-time exposure to low doses of prescribed pharmaceuticals, via their effects in lower animals (Fent et al., 2006; Rodríguez-Mozaz and Weinberg, 2010). The presence of local anaesthetics in the aquatic environment, like lidocaine (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) ethanamide) and an important number of amino compounds, has not been extensively investigated yet (Rúa-Gómez and Püttmann, 2012).

Daphnids have been used as test organisms to evaluate the ecotoxicological effects of pharmaceutical substances in aquatic media (Anderson, 1950). Since it presents a myogenic heart (Smirnov, 2017), which can be observed easily due to the semi-translucent property of its body (Bownik, 2015, 2016), is an ideal model to study the effects that exert certain drugs by direct observation, without the need of surgical intervention. The organ can be affected by several biological substances (Bekker and Krijgsman, 1951; Postmes et al., 1989), pharmaceutical compounds (Villegas-Navarro et al., 1997, 2003; Camougis and Tasse, 1965; Hykes, 1926) and even natural oils (Bownik, 2015, 2016).

DM has a nervous system that shares some similarities with the nervous systems of mammals, for example in the need of several neurotransmitters (Ren et al., 2015) and also responses to neuroactive drugs (Garreta-Lara et al., 2018). Indeed, the exposition of DM to general anaesthetics can induce a state of anesthesia (McKenzie et al., 1990).

Daphnids present complex swimming (Dodson and Ramcharan, 1991), which depends on their size and capability to accelerate (Hylander et al., 2014). Usually, such swimming behaviour is determined by the average speed (Hansen and Roslev, 2016; Zein et al., 2015) or mean square displacements (MSD) (Betini et al., 2016).

It is well-known that LAs block the generation and transmission of nerve impulses and when they are put in contact with a nerve trunk, sensory and motor paralysis can arise (Goodman, 1996). Cardiotoxicity and arrhythmia are also important effects and are associated with the production of systemic toxic reactions (Mulroy, 2002). Contrastingly lidocaine is a useful antiarrhythmic in adequate doses (Harrison et al., 1963).

The aim of the present study is to carry out a series of experiments to understand the impact of LAs on the environment. We expose DMs to different concentrations of tetracaine hydrochloride (THCl), lidocaine hydrochloride (LHCl), and bupivacaine hydrochloride (BPVHCl). We evaluate their effects on swimming performance, cardiac alterations and the impact on survival rate using a 48 h-LC50 (Stanley et al., 2006, 2007; Du et al., 2016; Huggett et al., 2002). The changes in swimming behaviour were characterized by video-recording and the films were

fragmented and processed to determine individual trajectories. Using high-speed microscopy, we were able to differentiate with high precision cardiac events. Our experimental setup allowed us to determine the cardioactive effects and alterations in the DM's heart produced by LAs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Daphnia magna*

Daphnids were acclimated and cultivated in the laboratory at  $21 \pm 2$  °C under 12-h light:12-h dark periods and fed with unicellular culture *Chlorella vulgaris* daily, following the protocol of Barata et al., 2002. The culture was prepared in a glass beaker with 800 ml of reconstituted water, prepared with: 25 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MOPS as a pH buffer, and 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (Kluttgen and Ratte, 1994). Dissolved oxygen (DO) was determined, in agreement to the Mexican Official Norm (SCFI, 1995), to be 8.9 mg L<sup>-1</sup> after 48 h of aeration. The physicochemical parameters of reconstituted water were: pH 7.1–8.4 (Thermoscientific Model Versastar Pro, USA), 230–615 μS cm<sup>-1</sup>, and 145–178 mg L<sup>-1</sup> of calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) for hardness. Reconstituted water was refreshed twice a week and when it was necessary to replenish the lost volume by evaporation milliQ water was added.

### 2.2. Drugs

Since LAs are not as easy to dissolve in water they were hydrochloride. Lidocaine hydrochloride (CAS—No. 6108-05-0; analytical standard, purity 99%), tetracaine hydrochloride (CAS—No. 136-47-0; analytical standard, purity 99%) and bupivacaine hydrochloride monohydrate (CAS- No. 241-917-8; analytical standard, purity 99%) were purchased in Sigma-Aldrich (USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained also from Sigma-Aldrich (USA). The criteria selection for experimentation with these drugs were: (1) wide clinical application; (2) representability to the two families of LAs, and (3) different potency, absorption, and action time in mammals.

### 2.3. Motility assay

The effects of LAs on DM's motility were investigated. A set of six daphnids 2–4 weeks old (2.5–3.4 mm in length) were chosen, following recommendation of McKenzie et al., 1990. They were exposed to different concentrations in a 150 ml of the test medium during 2 h (Villegas-Navarro et al., 2003). The nominal concentrations tested were 0, 16, 32, 64, 128, 256 and 512 mg L<sup>-1</sup> (Lewis and Horning, 1991) of THCl, LHCl, BPV and a mixture of THCl plus LHCl, respectively, at equal portions. The experiments were carried out in three chambers containing two organisms each. Before capturing the videos, the volume in the chambers was slowly adjusted to 10 ml of solution, to limit the vertical movement of daphnids (Artells et al., 2013). A led was placed above the chamber to provide a strong cold light acting as a stimulus (McKenzie et al., 1990).



**Fig. 1.** Tracking images of DM swimming. The trajectories correspond to 30s films taken after exposing DM to 16 mg L<sup>-1</sup> of THCl during 2 h. Individuals trajectories are marked with different colours.

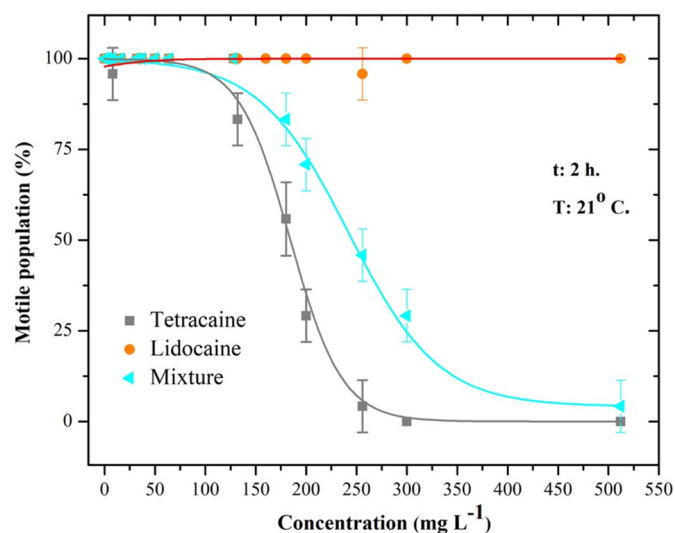
The collective daphnids movements were recorded using a dual-camera system, placed at 20 cm above the chambers and was operated at 20 frames  $s^{-1}$  and a high-resolution of  $2592 \times 1994$  pixels. A film of 20 s was captured for each concentration and transferred to a computer for processing, using ImageJ version 1.4 and then analyzed with Trackpy Python library, designed for identification and analysis of movement in similar objects, considering the position change of the organism between two frames (Fig. 1). It was determined the average speed and mean square displacement only for the highest concentrations (lower concentrations did not show great differences).

#### 2.4. LAs exposure of DM's heart assay

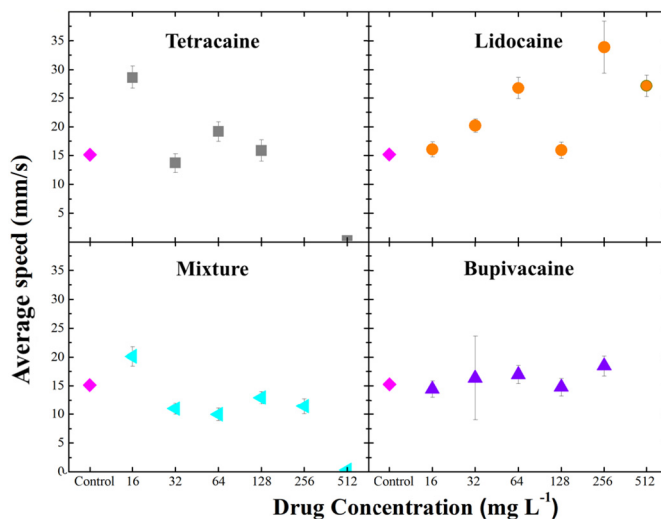
The effects of LAs on daphnid hearts were classified in two ways: (1) the heart rate, and (2) the cardiac area during the systole and diastole. For each experiment, a set of six daphnids were exposed to the drugs during 2 h in a baker glass container with a 150 mL of solution. Subsequently, daphnids were placed in a petri dish (30 mm diameter). The volume was reduced in order to prevent swimming while focusing on the animals.

#### 2.5. Determination of cardiac events

The main component of our experimental setup was an inverted microscope Zeiss Axio Z.1 (Germany) operated with a  $10\times$  objective. The slow-motion video was captured using a fast camera IO industries model Flare 2 M360-CL (sensor CMOSIS CMV2000, 5.0 MP, Color, Canada), operated at 300 frames  $s^{-1}$  with  $2048 \times 1088$  pixels resolution. The videos of the heart were captured one at a time, for six different daphnids. For each replication and concentration, ten films were recorded and then analyzed. The determination and characterization changes of the cardiac area were performed through the selection of cardiac muscular bands that compounds the walls of the ventricular chamber. Since the heart has an ellipsoid form, we measured changes in the minor and major radii. Once the perimeter was delimited, the cardiac area was quantified using a digital image analysis system, designed to obtain the number of pixels contained in the selected region.



**Fig. 2.** Motile population vs concentration of DM exposed to different amounts of THCl, LHCl, and a mixture of both. The 2-h  $EC_{50}$  immobility for THCl was  $182.94 \text{ mg L}^{-1}$  and  $241.81 \text{ mg L}^{-1}$  for the mixture. The observed fitting is a dose-response curve with a Hill slope. Values are the percent of immobilized population and the error bars corresponds to the standard deviation ( $p < 0.05$ ) for  $n = 8$ .



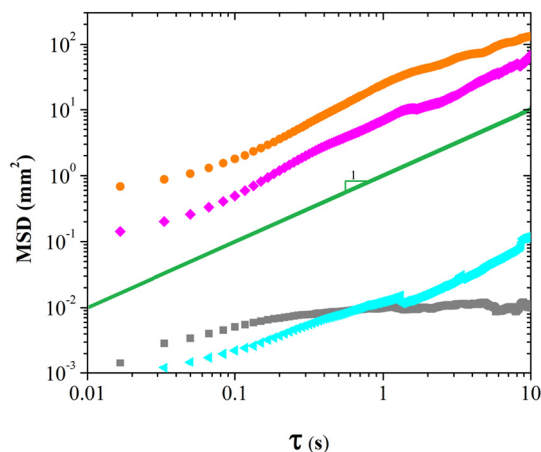
**Fig. 3.** Swimming average speeds of DMs exposed to different concentrations of (a) THCl, (b) LHCl, (c) THCl-LHCl, and (d) BPVHCl. The error bars are standard deviations ( $p < 0.5$ ) for  $n = 6$ .

#### 2.6. Determination of 48 h-LC<sub>50</sub>

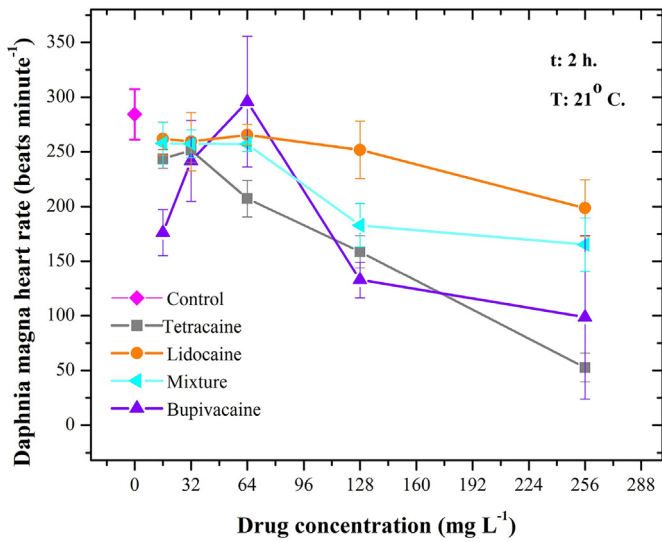
The 48-h acute toxicity tests using *D. magna* were oriented using the standard operating procedure 2024 by U.S. EPA (Peltier, 1978). For further experimentation, eight neonates from the 2nd–6th generations, <24 h old, were chosen and placed into a beaker with 150 ml of the dissolved drug. The exposure time was 48 h, at free swimming. For all drugs a minimum of five concentrations was used and the evaporation was negligible. For the validity of the assay, a control sample was used, showing an unmoving rate of <8%. All the assays and the control were made in triplicate. The criteria to discern the survival of the specimens was immobility after 48 h, followed by observation in the microscopy to discard cardiac contractions. Both parameters allowed us to calculate the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>).

#### 2.7. Statistical analysis

The comparisons of the groups, mean and variance, were calculated using analysis of variance obtained by one-way ANOVA, followed by the Tukey's comparison to determine pairwise significance. The level of



**Fig. 4.** Mean squared displacements of DM. Control (pink diamonds),  $512 \text{ mg L}^{-1}$  concentration of THCl (gray squares), LHCl (orange circles), and a mixture at equal portions of both (cyan triangles). The green line (slope 1), is shown as a reference. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 5.** Almost at all concentrations, the drugs provoke diminution of DM heart rate. The mixture THCl- LHCl has lower reduction of heart rate compared to pure THCl. The error bars are standard deviation ( $p < 0.05$ );  $n = 6$ .

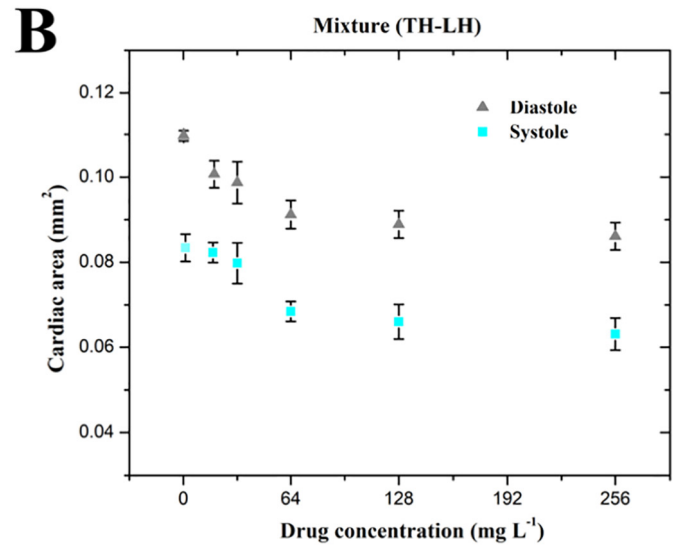
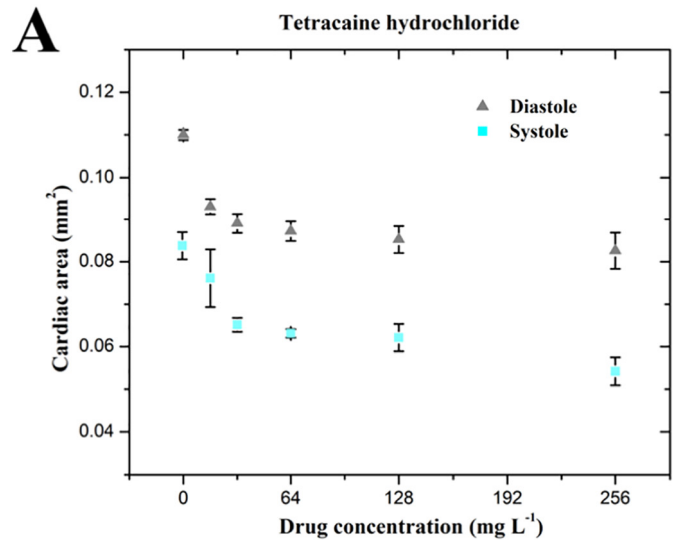
significance was set to be at least  $p < 0.05$ . The results are shown as means  $\pm$  standard deviation. All ANOVAs and Tukey's comparisons were performed with Origin Pro 8 SR0 Software Ver. 8.0724 (Northampton, MA, USA.).

**3. Results**

**3.1. Swimming performance**

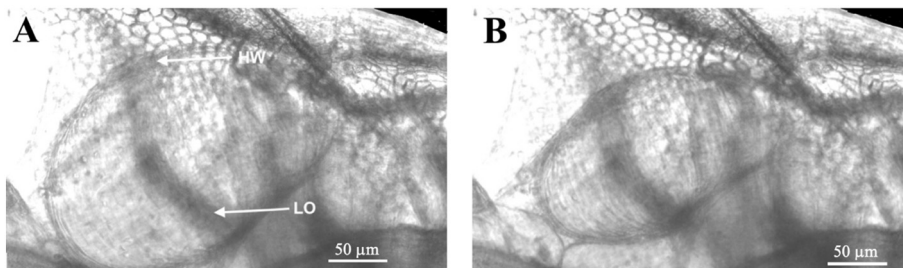
LAs alter swimming behaviour of DM. At a concentration of 182.94 mg L<sup>-1</sup>, THCl immobilizes 50% of the population of *D. magna* after 2 h exposition (2 h-50CE). This immobilization was reduced when LHCl was added at equal portions, displacing the 2 h-50CE to 241.81 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 2). LHCl and BPVHCl have no immobilizing effects at any concentration tested after 2-h exposure.

The drugs produce different alterations on the DM swimming performance. Fig. 3 shows that THCl presents a stimulatory effect at 16 mg L<sup>-1</sup>. However, when the concentration increases, the swimming activity is reduced to eventually reach total immobility. Contrastingly, lidocaine presents a stimulatory effect on DM activity at concentrations >32 mg L<sup>-1</sup>. The stimulatory effect allows daphnids to reach high speeds. Furthermore, LHCl inhibits the effect produced by THCl, except at the highest concentration (512 mg L<sup>-1</sup>), where the immobilizing effect of THCl is predominant. BPVHCl does not show significant effects on the average speed of DM. The mean square displacement, see Fig. 4, is drastically reduced at 512 mg L<sup>-1</sup> of THCl. LHCl at such concentration



**Fig. 7.** DM cardiac area. (A) Heart size changes after exposure to different concentrations of THCl (16, 32, 64, 128 and 256 mg L<sup>-1</sup>) during 2 h. The reduction of the cardiac surface can be mitigated (B) when tetracaine hydrochloride was mixed with lidocaine hydrochloride in the same concentrations. Values are mean heart area  $\pm$  SD ( $p < 0.05$ );  $n = 6$ .

produces the contrary effect, daphnids show larger displacements. We found that the mixture can mitigate the low displacement produced by THCl at large times. We did not show mean square displacements at lower concentrations because differences are negligible.



**Fig. 6.** Microscopic observation of *D. magna* heart at 10 $\times$ . Diastole (A) and systole (B), without the presence of drugs. The position of the heart and cardiac surface can be defined by the identification of lateral ostia (LO) in its closed or open state and the expansion or contraction of the heart walls (HW).



**Table 1**  
Physicochemical parameters of dissolved drugs (16 mg L<sup>-1</sup>).

Drug	pH	Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	Conductivity (μS cm <sup>-1</sup> )
THCl	7.65	8.02	612
LHCl	8.09	8.14	589
Mixture	8.19	7.9	601
BPVHCl	7.55	8.44	599

### 3.2. Heart rate

The drugs used in this work caused dose-dependent deceleration of DM heart rate (Fig. 5). See Supplementary Data for the particular case of 128 mg L<sup>-1</sup> of THCl. The heartbeat was found to drastically change from 278 ± 25 beats per minute (BPM) to 33 ± 10 BPM, after exposure to the highest concentration employed in this experiment (256 mg L<sup>-1</sup>). This represents a frequency reduction of 89% respect to the control. BPVHCl shows decreasing heart rates at 16, 128 and 256 mg L<sup>-1</sup>. However, it shows an increment on heart contractions after exposures of 32 and 64 mg L<sup>-1</sup>. The maximum decrease found was at 256 mg L<sup>-1</sup>, which represents a reduction of 78% respect to the control. Lidocaine presents the lowest potency to induce bradycardia. Indeed, even at the highest concentration, the reduction on rate was approximately 34.7%. The mixture THCl-LHCl also mitigates the effect of THCl in this case.

### 3.3. Effects on cardiac area

THCl produces dose-dependent reduction on the DM heart size during systole and diastole. The maximum reduction was at the highest concentration (256 mg L<sup>-1</sup>), see Fig. 7A. The decrease of the cardiac surface at the highest concentration was of 0.033mm<sup>2</sup>. This represents approximately a reduction of 28% during the diastolic event with respect to the control. For the cardiac surface change during systole, the reduction of area after exposition to the highest concentration (256 mg L<sup>-1</sup>) was 0.034 mm<sup>2</sup>, which represents approximately a reduction of 38%. The reduction of the heart surface can slightly diminish when LHCl is added (Fig. 7B). Pure lidocaine did not show significant effects on the cardiac surface (Fig. 6).

### 3.4. Ecotoxicity Testing of LAs

The drugs were toxic for DM after an exposure time of 48 h. Table 1 shows the physicochemical characteristics of LAs dissolved on reconstituted water; there were no significant differences between control and the three solutions, so interferences were discarded with the recommended test conditions for DM. Table 2 shows the 48 h-LC50 values for DM, LD50 intravenous for mice (Bonin, 1980), and the maximum recommended doses for humans (Cox et al., 2003). The results showed that DM was more sensitive to THCl with 48 h-LC50 of 6.58 ± 2.5 mg L<sup>-1</sup>, followed by 42.4 ± 10.32 mg L<sup>-1</sup> for LHCl and 18.6 ± 5.2 mg L<sup>-1</sup> for BPVHCl. These results show that the increasing order toxicity for three drugs is the same for both species and also agree with de maximum recommended dose in humans (MDRH).

**Table 2**  
Values of 48 h-LC50 tasted in DM compared with values for LD50 i.v. in mice and the maximum recommended dose of LAs in humans (MDRH) without vasoconstrictor.

Drug	48-h LC50 (mg L <sup>-1</sup> )	LD50 (i.v.) (mg kg <sup>-1</sup> )	MDRH (mg kg <sup>-1</sup> )
THCl	6.88 ± 2.55	NR	1–3
LHCl	42.4 ± 10.32	133.11	4–5
BPVHCl	18.66 ± 5.22	58.57	2.5

## 4. Discussion

The present study shows that the exposition of *Daphnia magna* to several of the most commonly used LAs (tetracaine hydrochloride, lidocaine hydrochloride, and bupivacaine hydrochloride), affect swimming velocity, mean square displacement, heart rate, cardiac area, and survival rate. Swimming velocity is, to a large extent, determined by the length of a daphnid (Dodson and Ramcharan, 1991), comprising many single parameters that may be used as sensitive and precise biomarkers for the sublethal effects of chemical compounds. LAs-exposed cladocera were expected to immobilize due to their faculty to block motor nerve conduction. It is well-established to the capacity to motor blockage is more effective and significantly longer with tetracaine, compared to bupivacaine (Axelsson and Widman, 1985) in vertebrates. In this sense, the concentration-dependent dose to immobilize of tetracaine corresponds to the block of motor nerve conduction. The effect was reversible after 30 min in fresh water. Previous results (Shoshan-Barmatz and Zchut, 1993) show that lidocaine competes with ryanodine for its binding site. By contrast, tetracaine interacts in a non-competitive way. Our results suggest the existence of a unique binding site for the inhibitory and stimulatory for LAs in DM's heart, as observed in higher animals (Vanderkooi et al., 1981).

THCl produces also a reduction of the cardiac surface during the cardiac cycle, and this effect can be mitigated with LHCl, possibly by competitive binding. Lidocaine shows the lowest potency to induce bradycardia on the *D. magna* heart. In accepted doses, lidocaine has not significative effects on heart rate in several animal models (Enderle et al., 2008; Kao and Jalar, 1959). However, high doses of lidocaine act as a myocardial depressor and reduces the frequency of discharges in any pacemaker (Marriott and Phillips, 1974). When LHCl is mixed with THCl, the mixture presents different response with respect to the drugs in the pure state. Bupivacaine exerts a decrease on heart rate at 16, 128 and 256 mg L<sup>-1</sup>. However, it showed a recovery at 64 and 128 mg L<sup>-1</sup>. Bupivacaine presents a high efficiency to reduce heart rate at the lowest concentration (16 mg L<sup>-1</sup>) in comparison with tetracaine, which represents a faster action on DM heartbeat. BPVHCl, at the highest concentration (256 mg L<sup>-1</sup>), does not have the potency of THCl to reduce heart rate. Tetracaine hydrochloride showed the highest toxicity after exposure of 48 h, followed by bupivacaine and lidocaine. The order of toxicity found for DM agreed with the toxicity previously reported for several animals (Bonin, 1980; Nancarrow et al., 1989).

Our results bring new information of the LAs and the analogue effects of daphnids with vertebrates. Furthermore, they deepen the information about the toxic repercussions of the studied drugs over aquatic species.

## 5. Conclusion

This study shows, for the first time, the effects of LAs on survival, swimming behaviour and cardiac cycle of DM. It was demonstrated that anaesthetics detected in an aquatic environment should be considered as hazardous waste for freshwater crustaceans, able to alter the aquatic ecosystem.

## Acknowledgements

We thank Angel David Reyes Figueroa (Cinvestav) for helpful discussions. This work has been supported by grant FC-1132 from Conacyt, México.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.538>.

## References

- Anderson, B.G., 1950. The apparent thresholds of toxicity to *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to Lake Erie water. *Trans. Am. Fish. Soc.* 78, 96–113.
- Artells, E., et al., 2013. Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. *PLoS One* 8.
- Axelsson, K., Widman, G.B., 1985. A comparison of bupivacaine and tetracaine in spinal anaesthesia with special reference to motor block. *Acta anaesthesiologica* 29, 79–86.
- Barata, C., et al., 2002. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol.* 61, 143–154.
- Bekker, J.M., Krijgsman, B.J., 1951. Physiological investigations into the heart function of *Daphnia*. *J. Physiol.* 115, 249–257.
- Betini, G.S., et al., 2016. Calcium interacts with temperature to influence *Daphnia* movement rates. *R. Soc. Open Sci.* 3, 160537.
- Bonin, J.D., 1980. Deaths from local anesthetic-induced convulsions in mice. *Anesthesia and* 59, 401–405.
- Bownik, A., 2015. Clove essential oil from *Eugenia caryophyllus* induces anesthesia, alters swimming performance, heart functioning and decreases survival rate during recovery of *Daphnia magna*. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 15 (1), 157–166.
- Bownik, A., 2016. Protective effects of ectoine on physiological parameters of *Daphnia magna* subjected to clove oil-induced anaesthesia. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 16 (3), 691–701.
- Camougis, G., Tasse, J.R.P., 1965. Electrographic studies of cardiac activity of the Cladoceran, *Daphnia*. *Crustaceana* 197–205.
- Cox, B., Durieux, M.E., Marcus, M.A.E., 2003. Toxicity of local anaesthetics. *Best practice & research Clinical* 17, 111–136.
- Dodson, S., Ramcharan, C., 1991. Size-specific swimming behavior of *Daphnia pulex*. *J. Plankton Res.* 13, 1367–1379.
- Du, J., et al., 2016. Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 84–90.
- Enderle, A.K., et al., 2008. Clinical evaluation of ketamine and lidocaine intravenous infusions to reduce isoflurane requirements in horses under general anaesthesia. *Vet. Anaesth. Analg.* 35, 297–305.
- Escher, B.L., et al., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75–92.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic* 76, 122–159.
- Garreta-Lara, E., et al., 2018. Effect of psychiatric drugs on *Daphnia magna* oxylinipin profiles. *Sci. Total Environ.* 644, 1101–1109.
- Goodman, L.S., 1996. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. vol. volume 1549. McGraw-Hill, New York.
- Hansen, L.R., Roslev, P., 2016. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquat. Toxicol.* 179, 36–43.
- Harrison, D.C., Sprossie, J.H., Morrow, A.G., 1963. The antiarrhythmic properties of lidocaine and procaine amide: clinical and physiologic studies of their cardiovascular effects in man. *Circulation* 28, 486–491.
- Huggett, D.B., et al., 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229–235.
- Hykes, O.V., 1926. Mouvements du coeur chez les daphnies sous l'influence de quelques substances endocrines. *C.R. Soc. Biol.* 95, 58–60.
- Hylander, S., et al., 2014. Induced tolerance expressed as relaxed behavioural threat response in millimetre-sized aquatic organisms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20140364.
- Kao, F.F., Jalar, U.H., 1959. The central action of lignocaine and its effect on cardiac output. *British journal of pharmacology and* 14, 522–526.
- Kluttgen, B., Ratte, H.T., 1994. Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry. An International Journal* 13, 1619–1627.
- Lewis, P.A., Horning, W.B., 1991. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1351–1357.
- Marriott, H.J., Phillips, K., 1974. Profound hypotension and bradycardia after a single bolus of lidocaine. *J. Electrocardiol.* 7, 79–82.
- McKenzie, J.D., Calow, P., Nimmo, W.S., 1990. A model to test the potency of inhalation anaesthetics. *British Journal of Anesthesiology* 34, 212.
- Mulroy, M.F., 2002. Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. *Reg. Anesth. Pain Med.* 27, 556–561.
- Nancarrow, C., et al., 1989. Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanisms of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine in the sheep. *Anesthesia and* 69, 276–283.
- Peltier, W., 1978. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Aquatic Organisms. vol. volume 1 (Laboratory).
- Postmes, T.J., Prick, R., Brorens, I., 1989. The deceleration of the heart frequency in the water-flea *Daphnia magna* by adrenoceptor agonists and antagonists. *Hydrobiologia* 171, 141–148.
- Ren, Z., et al., 2015. AChE inhibition: one dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere* 120, 252–257.
- Ritchie, J.M., 1987. Local Anesthetics. Springer, pp. 21–52.
- Rodriguez-Mozaz, S., Weinberg, H.S., 2010. Meeting report: pharmaceuticals in water an interdisciplinary approach to a public health challenge. *Environ. Health Perspect.* 118, 1016–1020.
- Rúa-Gómez, P.C., Püttmann, W., 2012. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 689–699.
- Rúa-Gómez, P.C., Püttmann, W., 2013. Degradation of lidocaine, tramadol, venlafaxine and the metabolites O-desmethyltramadol and O-desmethylvenlafaxine in surface waters. *Chemosphere* 90, 1952–1959.
- SCFI, 1995. Analysis of Waters. Evaluation of Acute Toxicity by Means of *Daphnia magna* Straus (Crustacea- Cladocera), Assay Methodology. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- Shoshan-Barmatz, V., Zchut, S., 1993. The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. *J. Membr. Biol.* 133, 171–181.
- Smirnov, N.N., 2017. Physiology of the Cladocera. Academic Press.
- Stanley, J.K., et al., 2006. Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and Pimephales promelas. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1780–1786.
- Stanley, J.K., et al., 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69, 9–16.
- Vanderkooi, G., et al., 1981. On the mechanism of action of anesthetics. Direct inhibition of mitochondrial F1-ATPase by n-butanol and tetracaine. *Biochim. Biophys. Acta* 635, 200–203.
- Villegas-Navarro, A., Rodríguez Santiago, M., Ruiz Pérez, F., Rodríguez Torres, R., Dieck Abularach, T., Reyes, J.L., 1997. Determination of LC50 from *Daphnia Magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. *Environ. Int.* 23, 535–540.
- Villegas-Navarro, A., Rosas-L., E., Reyes, J.L., 2003. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 136, 127–134.
- Wick, A., et al., 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Res.* 43, 1060–1074.
- Zein, M.A., et al., 2015. Toxic effects of combined stressors on *Daphnia pulex*: interactions between diazinon, 4-nonylphenol, and wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1145–1153.
- Zhang, Y., Geißen, S.U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161.