



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

MODULACIÓN FISIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA
DEL ABULÓN ROJO *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822)
DURANTE LA ANESTESIA E INJERTO EN EL
PROCESO INICIAL DE FORMACIÓN DE PERLAS.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Alejandro Ignacio Rojas Figueroa

La Paz, Baja California Sur, enero de 2025.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8:45 horas del día 12 del mes de diciembre del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Modulación fisiológica e inmunológica del abulón rojo *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) durante la anestesia e injerto en el proceso inicial de formación de perlas".

Presentada por el alumno:

Alejandro Ignacio Rojas Figueroa

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dr. Andrés Granados Amores
Co-Tutor de Tesis



Dr. Rubén Araya Valencia
Co-Tutor de Tesis

Dr. Francisco Guardiola Abellán
Co-Tutor de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos



La Paz, Baja California Sur, a 18 de diciembre de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante ALEJANDRO IGNACIO ROJAS FIGUEROA del Programa de Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
Ithenticate
- Filtros utilizados:
Citas excluidas, Bibliografías excluidas,
Excluir coincidencias pequeñas (10 palabras)
- Porcentajes de similitud:
14%
Se muestra captura de pantalla

		Citas excluidas	14%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 1915 palabras Copiado el 15-Oct-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx		9%
2	Crossref 222 palabras Alejandro Rojas, Carlos Angulo, Rubén Araya, Andrés Granados-Amores, Francisco Guardiola, Pedro E. Saucedo.		1%
3	Internet 70 palabras hdl.handle.net		<1%
4	Internet 65 palabras Copiado el 10-Dic-2024 firmaonline.org		<1%
5	Internet 60 palabras Copiado el 24-Nov-2022 pcientificas.ujat.mx		<1%
6	Internet 28 palabras Copiado el 22-Jul-2021 buleria.unileon.es		<1%
7	Internet 26 palabras Copiado el 20-Jun-2024		<1%

Codirectores

Dr. Pedro Saucedo Lastra

Dr. Carlos Angulo Valadez

Estudiante

Alejandro Rojas Figueroa

Personal técnico de asesoría en el análisis

Lic. Ana María Talamantes

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Andrés Granados Amores
Universidad Autónoma de Baja California Sur
Co-Tutor de Tesis

Dr. Rubén Araya Valencia
Universidad de Antofagasta - Chile
Co-Tutor de Tesis

Dr. Francisco Guardiola Abellán
Universidad de Murcia - España
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Pedro Saucedo Lastra
Dr. Carlos Angulo Valadez
Dr. Andrés Granados Amores
Dr. Rubén Araya Valencia
Dr. Francisco Guardiola Abellán

Jurado de Examen

Dr. Pedro Saucedo Lastra
Dr. Carlos Angulo Valadez
Dr. Andrés Granados Amores
Dr. Rubén Araya Valencia
Dr. Francisco Guardiola Abellán

Suplentes

Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Dariel Tovar Ramírez

Resumen

La industria perlera tiene importancia económica en varias regiones del mundo, pero está saturada por tres especies de ostras perleras: *P. fucata*, *P. margaritifera*, y *P. maxima*. En el intento de diversificar a nuevas especies de moluscos productores de perlas de alta calidad, pocas califican, entre ellas el abulón *Haliotis* sp. El abulón rojo (*H. rufescens*) posee una cara interna nacarada de gran belleza con tonos tornasolados intensos, que lo convierten en un excelente candidato. La anestesia e injerto son los principios básicos de la producción de perlas. En la anestesia, se utilizan sustancias (fenoxietanol, benzocaína y eugenol) para minimizar el estrés de los animales y facilitar su injerto. El injerto es una cirugía delicada en la gónada de un molusco receptor para introducir núcleo esférico y una pieza de manto obtenida de un molusco donador de la misma especie (aloinjerto, AL) o de la misma ostra injertada (autoinjerto, AT) que provoca una irritación y secreción de capas de nácar sobre el núcleo. En el abulón rojo, las investigaciones científicas en torno a los requerimientos de estos organismos para la formación de perlas son aún muy escasas. Por lo tanto, el presente estudio se dividió dos bioensayos: anestesia (selección de anestésico) e injerto (efecto del origen del manto, AT y AL). En el bioensayo de anestesia se evaluó la respuesta visual (tasa de relajación y recuperación, organismos aptos para injerto) de cuatro anestésicos. Los anestésicos eugenol 0.25 mL L⁻¹ (EUB), fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ (PEB) y CO₂ (saturación) obtuvieron mayor proporción de organismos aptos para injerto. Durante la recuperación (0.5, 1, 2 y 24 h) se evaluaron indicadores fisiológicos. Los índices glucídico y mucopolisacáridos ácidos fueron incrementados significativamente por EUB y PEB, mientras que CO₂ mantuvo valores similares al control. En la actividad antioxidante (superóxido dismutasa, SOD y catalasa, CAT) EUB y PEB presentaron mayores variaciones, pero fueron transitorias. La respuesta inmunitaria no fue alterada por los anestésicos (recuento de hemocitos, RTH; mieloperoxidasa, MPO y óxido nítrico, ON). El bioensayo de injerto la actividad antioxidante (SOD) incrementó en todos los tratamientos (48 h), CAT aumento en AL (2 y 4 h) y en AT (24 y 48 h). La respuesta inmunitaria (MPO y ON) fue afectada por AL casi en la totalidad de los tiempos evaluados sin afectar la sobrevivencia. Nuestros resultados sugieren el uso de CO₂ como anestésico y la práctica de aloinjerto para producción de perlas en abulón.

Palabras clave: Acuicultura, anestésicos, injerto, índice glucídico, mucopolisacáridos, actividad antioxidante, respuesta inmunitaria.

ORCID: 0000-0003-0591-2108



Dr. Pedro Saucedo Lastra
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Angulo Valadez
Co-Director de Tesis

Summary

The pearl industry plays an economically important role in several regions of the world dominated by three species of pearl oysters: *Pinctada fucata*, *P. margaritifera*, and *P. maxima*. This industry is diversifying to find new species of mollusks capable of producing high-quality pearls, although only a few have been identified as potential candidates, including the abalone *Haliotis* spp. The nacre layer in this species is unique and displays a lustrous and multicolored chromatic range (with tones of blue, violet, green, and gold) that is highly valued for pearl culture. Anesthesia and grafting are the basic principles of pearl production. Substances such as phenoxyethanol, benzocaine, and eugenol are employed during the anesthesia stage to mitigate stress in the animal and facilitate grafting. Grafting is a delicate surgical procedure performed on the gonad of a recipient mollusk and involves implanting of a spherical nucleus and a piece of mantle obtained from a donor mollusk of the same species (allograft, AL) or from the grafted oyster itself (autograft, AT). This procedure is stressful and causes irritation to the oyster, which starts secreting nacre layers that are deposited over the nucleus. Because scientific research on the requirements of abalone for pearl formation remains scarce, this study was divided into two bioassays focused on evaluating the effects of anesthesia (anesthetic selection) and grafting (mantle origin, AT and AL) in red abalone *Haliotis rufescens*. In the anesthesia bioassay, the visual response (relaxation and recovery rates to select organisms suitable for grafting) was evaluated from four different anesthetics. The anesthetics eugenol (0.25 mL L⁻¹, EUB), phenoxyethanol (3.0 mL L⁻¹, PEB), and CO₂ (saturated in seawater) yielded the greatest proportion of organisms suitable for grafting. During the recovery period (0.5, 1, 2, and 24 h), the glycogen and acid mucopolysaccharide indices were significantly increased by EUB and PEB, while CO₂ maintained values similar to the control. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity was significantly increased in abalone exposed to EUB and PEB, but the effect was only transient. The immune response (total hemocytes count, RTH; myeloperoxidase, MPO and nitric oxide, ON) was not altered by any anesthetic. In the grafting bioassay, SOD activity was significantly increased across all treatments up to 48 h, while CAT activity exhibited a significant rise in both the AL (2 and 4 h) and AT (24 and 48 h) treatments. The immune response (MPO and ON) was only affected in abalone receiving an AL at almost all evaluation times, but with no impact on survival. Based on the findings of this study, we recommend using CO₂ as an anesthetic and evaluating the feasibility of allografting on other immunological parameters in *H. rufescens* used for pearl production.

Keywords: Aquaculture, anesthetics, grafting, glycogen index, mucopolysaccharide, antioxidant activity, immune response.

ORCID: 0000-0003-0591-2108



Dr. Pedro Saucedo Lastra
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Angulo Valadez
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mi esposa (Faba) e hij@s (Javi y Felipe) por apoyarme en este desafío que decidí emprender, conscientes del sacrificio emocional de tener que separarnos por 4 años, a ti también **Lana** abrazos y lengüetazos de perro feliz, que partiste cuando recién comenzaba este viaje.

A mis padres (Norita y Amable) por sus oraciones y preocupación para que todo resultase satisfactoriamente en el desarrollo de mis estudios

A toda mi familia, herman@s, cuñad@s y sobrin@s sentir su apoyo y energías positivas a través de las redes sociales me permitió sentirme más acompañado y conectado con ustedes a pesar de estar en el otro hemisferio de la tierra.

A mis amistades en México, gracias por invitarme a ser parte de este grupo cosmopolita de amig@s, de verdad hicieron sentirme muy acompañado y fue muy grato conocerlos a cada uno de ustedes y disfrutar de cumpleaños, reuniones, playa y más playa...

A la Península de Baja California, realmente eres un lugar mágico me sentí felizmente encantado y acogido, disfrute cada día tus playas y de los innumerables lugares hermosos que posees, el recorrer toda la Península en tres ocasiones es un regalo gigantesco para quienes amamos el contacto con la naturaleza, volveré....

Agradecimientos

Agradezco a las autoridades de CONAHCYT, por el apoyo económico brindado mediante la beca número 1083555 para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S.C. y a todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por atender todas mis solicitudes, dudas y requerimientos durante estos 4 años. Agradecer de manera especial, el apoyo recibido para realizar mis estancias de investigación que fueron fundamentales en el desarrollo de la tesis doctoral.

A mis Co-directores, Dr. Pedro E. Saucedo Lastra y Dr. Carlos E. Angulo Valadez, por todo el apoyo brindado, en las revisiones y sugerencias que fortalecieron mi proyecto de tesis. Además, por mantenerse atentos a dar apoyo y colaboración más allá de lo estrictamente académico.

A mi Comité Tutorial, Dr. Andrés Granados Amores, Dr. Rubén Araya Valencia y Francisco Guardiola Abellán, agradecer las revisiones de mis informes, artículos científicos, comentarios y sugerencias en cada una de las reuniones tutoriales que sin duda ayudaron a enriquecer el trabajo científico llevado a cabo.

A todo el equipo del laboratorio de Histología e Histopatología de la Unidad Académica de Pichilingue-UABCS, por las facilidades de equipamiento y materiales otorgadas para procesar las muestras. En especial al Dr. Andrés Granados Amores y sus estudiantes Ada, Ulises, Vanessa y Sandra, por el entrenamiento, paciencia, amistad y apoyo.

Al Dr. J. Gabriel Correa y Dra. Tatiana Olivares por todas las facilidades entregadas para llevar a cabo mis bioensayos en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC. Así como también a Enrique, Romario y Don Filidor por estar atentos a apoyarme en la marcha de los bioensayos.

A todo el equipo del Grupo de Inmunología y Vacunología por la capacitación recibida para procesar las muestras. En especial a la Dra. Marta Reyes Becerril por resolver cada una de mis dudas durante la curva de aprendizaje, también al Dr. Abel y al Ing. Hassian por el apoyo en las actividades de laboratorio.

CONTENIDO

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Anestesia en moluscos como terapia pre-operatoria a la formación de perlas	4
2.2 Anatomía microscópica y función del manto en los moluscos	6
2.3 Injerto de manto para la formación inicial de perlas en moluscos	7
2.4 Indicadores de respuesta antioxidante	9
2.5 Indicadores de respuesta inmune	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivos general	18
5.2 Objetivos particulares	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 Bioensayo 1: anestesia	19
6.1.1 Obtención de abulones	19
6.1.2 Diseño experimental	19
6.2 Bioensayo 2: injerto	21
6.2.1 Obtención de abulones	21
6.2.2 Diseño experimental	21
6.3 Indicadores de respuestas de los organismos (Bioensayos 1 y 2)	22
6.3.1 Análisis visual del efecto de los anestésicos (Bioensayo 1)	22
6.3.2 Indicadores de respuesta fisiológica (Bioensayo 1)	24
6.3.3 Indicadores de respuesta antioxidante e inmune (Bioensayo 1 y 2)	25
6.3.3.1 Concentración total de proteínas (TP)	25
6.3.3.2 Superóxido dismutasa (SOD)	26
6.3.3.3 Catalasa (CAT)	26
6.3.3.4 Recuento total de hemocitos (RTH)	26
6.3.3.5 Mieloperoxidasa (MPO)	26
6.3.3.6 Óxido nítrico (ON)	27
6.4 Análisis estadísticos de resultados	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Bioensayo 1: Efecto de los anestésicos	28
7.1.1 Análisis visual	28
7.1.2 Indicadores de respuesta fisiológica	33
7.1.2.1 Índice glucídico (IG)	33
7.1.2.2 Índice de mucopolisacáridos ácidos (IMA)	35

7.1.2.3 Índice de Lipofuscina (ILF)	37
7.1.3 Indicadores de respuesta antioxidante	39
7.1.3.1 Concentración total de proteínas (TP)	39
7.1.3.2 Superóxido dismutasa (SOD).....	41
7.1.3.3 Catalasa (CAT)	43
7.1.4 Indicadores de respuesta inmunitaria	45
7.1.4.1 Recuento total de hemocitos (RTH)	45
7.1.4.2 Mieloperoxidasa (MPO)	46
7.1.4.3 Producción de óxido nítrico (ON).....	48
7.2 Bioensayo 2: Efecto de la cirugía de injerto y origen del manto	50
7.2.1 Indicadores de respuesta antioxidante	50
7.2.1.1 Concentración total de proteínas (TP)	50
7.2.1.2 Superóxido dismutasa (SOD).....	52
7.2.1.3 Catalasa (CAT)	54
7.2.2 Indicadores de respuesta inmunitaria	56
7.2.2.1 Recuento total de hemocitos (RTH)	56
7.2.2.2 Mieloperoxidasa (MPO)	57
7.2.2.3 Óxido nítrico (ON)	59
8. DISCUSIÓN	61
8.1 Bioensayo 1: Efecto de los anestésicos	61
8.1.1 Efecto visual	61
8.1.2 Respuesta fisiológica	64
8.1.3 Respuesta antioxidante.....	66
8.1.4 Respuesta inmunológica	68
8.2 Bioensayo 2: Efecto de la cirugía de injerto (autoinjerto y aloinjerto).....	71
8.2.1 Respuesta antioxidante.....	71
8.2.2 Respuesta inmunológica	73
9. CONCLUSIONES	75
10. LITERATURA CITADA	76
11. ANEXOS	89
Anexo A. Artículo publicado.-Comparative analysis of anesthetic agents used in pre-operative therapy for pearl culture in the red abalone <i>Haliotis rufescens</i> (Swainson, 1822).	89
Anexo B. Artículo publicado.-Modulation of systemic antioxidant and immune responses in red abalone (<i>Haliotis rufescens</i>) during the recovery phase of anesthesia, in preparation for grafting surgery.	97

Lista de figuras

- Figura 1.** Variaciones temporales en los porcentajes de anestesia observados como respuesta visual al estímulo en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) sometido a distintos tipos y concentraciones de anestésicos. Tratamientos: EUA: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; EUB: Eugenol 0.15 mL L⁻¹; PEA: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 1.5 mL L⁻¹; BZA: Benzocaína 0.30 g L⁻¹; BZB: Benzocaína 0.15 g L⁻¹; CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± DE. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).29
- Figura 2.** Variaciones temporales en el índice glucídico del abulón rojo (*Haliotis rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ±SD. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05). ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.34
- Figura 3.** Variaciones temporales en el índice de mucopolisacáridos ácidos en el abulón rojo (*Haliotis. rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: tejido del manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ± DS. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos. ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.36
- Figura 4.** Variaciones temporales en el índice de lipofuscinas en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: tejido del manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ± DS. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos. ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.38
- Figura 5.** Variaciones temporales en la concentración total de proteínas en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).40
- Figura 6.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).42
- Figura 7.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de catalasa (CAT) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados(B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).44

- Figura 8.** Variaciones temporales en el número de hemocitos en la hemolinfa de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) sometido a diferentes anestésicos. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: Control. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).45
- Figura 9.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en la hemolinfa libre de células(A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).47
- Figura 10.** Variaciones temporales en la concentración de óxido nítrico (NO) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).49
- Figura 11.** Variaciones temporales en la concentración total de proteínas en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).51
- Figura 12.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).53
- Figura 13.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de catalasa (CAT) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).55
- Figura 14.** Variaciones temporales en el número de hemocitos en la hemolinfa de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto (manto propio); AL: Aloinjerto (manto donado misma especie) y CT: Control. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).56
- Figura 15.** Variaciones temporales en la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).58
- Figura 16.** Variaciones temporales en la concentración de óxido nítrico (NO) en la hemolinfa (A) y hemocitos (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).60

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen del efecto visual de los diferentes anestésicos en el abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>). Se presentan los valores promedios \pm desviación estándar	32
---	----

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cultivo de perlas (perlicultivo) es una de las actividades acuícolas económicamente más rentables, respetuosas con el medio ambiente y socialmente responsables (Zhu et al., 2019; Southgate, 2021; Saucedo et al., 2022), la cual generó en 2020 un comercio de cerca de 450 millones de dólares (The Observatory of Economic Complexity, 2022). A su vez, esta actividad acuícola promueve ingresos por exportación de perlas, genera empleos para los locales y ofrece importantes oportunidades de subsistencia a grupos de mujeres y jóvenes en muchas comunidades de países desarrollados y en vías de desarrollo (Saidi et al., 2017; Johnston et al. 2020; Southgate et al., 2019).

Históricamente, los moluscos que se han utilizado en todo el mundo en el perlicultivo marino son tres especies de ostras perleras pertenecientes a los géneros *Pinctada* (*Pinctada fucata*, *Pinctada margaritifera*, *Pinctada maxima*) y *Pteria* (*Pteria penguin*, *Pteria sterna*) (Taylor y Strack 2008; Southgate et al. 2008). Por ello, la industria perlera se encuentra hoy en día en un proceso de diversificación en búsqueda de nuevas especies de moluscos capaces de producir perlas de calidad, aunque en la lista figuran pocas especies como el caracol del Caribe *Strombus gigas* (*Aliger gigas* = *Lobatus gigas*) (Acosta-Salmón y Davis, 2007), las almejas de agua dulce (familia Unionidae) (Saucedo et al. 2015) y el abulón *Haliotis spp.* (Monteforte y Bervera 2010; Rojas-Figuera et al. 2019). Dentro de las especies de abulones que existen, *Haliotis rufescens* (abulón rojo), aparece como candidato ideal para el perlicultivo y en los últimos años se han dedicado serios esfuerzos para investigar los factores que influyen en la formación del saco perlero y perlas (Rojas-Figueroa et al., 2019, 2023; Sáez-Saavedra et al., 2024a, b) y en la producción comercial de perlas (Araya et al., 2020). Otro aspecto que agrega importancia a este recurso, es que actualmente se cultiva para consumo humano únicamente, por lo que producir perlas a partir de esta especie, significaría un aprovechamiento integral del abulón añadiendo un valor agregado interesante de explorar.

En moluscos (ostras perleras), las etapas básicas del ciclo de producción de perlas lo constituyen la anestesia o relajación (etapa pre-operatoria), injerto (etapa operatoria), y cultivo de perlas (etapa post-operatoria). En la anestesia se utilizan sustancias naturales o artificiales para relajar los tejidos, minimizar el estrés de las ostras y facilitar su manejo durante la etapa operatoria

(Granados-Amores et al. 2017, 2018). Entre las sustancias que se han evaluado en los últimos años con este fin, las más comunes incluyen el 2-fenoxi-etanol (Mamangkey et al., 2009), fenoxipropanol (Norton et al., 1996; Kishore et al., 2022), benzocaína (Acosta-Salmón et al., 2005; Kishore et al., 2022), aceite de clavo o eugenol (Bilbao et al., 2010; Norton et al., 1996), MS-222 o tricaína de metasulfonato (Monteforte et al., 2004), y cloruro de magnesio (Acosta-Salmón y Davis, 2007).

Por su parte, el injerto es una cirugía que conlleva una incisión o herida en la gónada de una ostra receptora para introducir un núcleo esférico y una pieza de manto obtenida de una ostra donadora (Southgate, 2008; Taylor y Strack, 2008). Esta herida provoca una irritación en la ostra receptora, con la cual el manto injertado inicia la secreción de capas de nácar que se depositan de forma gradual sobre el núcleo hasta cubrirlo por completo (Southgate, 2021; Saucedo et al. 2022). Posterior al injerto, las ostras son transferidas a la etapa de convalecencia en tanques con aireación y alimento suficiente, donde son observadas para descartar casos de mortalidad y rechazo de injertos. Las ostras sobrevivientes son enviadas al campo para la etapa final de cultivo de perlas, la cual ocurre entre 12 y 24 meses después (Southgate, 2021; Saucedo, et al. 2022). La respuesta de los organismos a ambas etapas, particularmente al injerto, varía mucho en función de la especie, habilidad del injertador y factores ambientales, por lo que las estadísticas mundiales de mortalidad y rechazo de núcleos son altas y varían entre el 30 y 50% (Taylor y Strack 2008).

A pesar de que los moluscos carecen de un sistema inmune adaptativo, descansando únicamente sobre un sistema inmune innato como primera línea de defensa contra patógenos y estresores (Tiscar y Mosca, 2004; Ren et al., 2016), se acepta que puede existir una respuesta fisiológica e inmunológica durante la relajación y particularmente durante el injerto, asociada a un cierto grado de rechazo por incompatibilidad biológica, sin importar que el donante de manto durante la cirugía de injerto sea de la misma especie. No obstante, poco es lo que se ha estudiado sobre el efecto del injerto en la fisiología del receptor, y casi nada sobre el efecto del origen del manto injertado en su respuesta inmune en algunas especies de ostras perleras. De acuerdo al origen del manto, cuando el donador y receptor son de la misma especie, que es la forma tradicional de realizar la cirugía de injerto, se denomina un aloinjerto (Wei et al., 2017). Por el contrario, en los casos en los que donador y receptor son de especies diferentes se trata de un xenoinjerto, comenzando a utilizarse en años recientes esta técnica para producir perlas con tonos cromáticos

diferentes a los de la ostra receptora del manto (McGinty et al., 2010; Fukushima et al., 2014). Finalmente, cuando se injerta un trozo de manto del mismo individuo que será injertado, se habla de un autoinjerto, y puede ser importante bajo la hipótesis de que su uso puede generar una respuesta inmune menos severa que con un aloinjerto o un xenoinjerto. Sin embargo, estos aspectos se desconocen por completo en cualquier especie de abulón (*Haliotis* sp.).

El presente proyecto de tesis plantea utilizar herramientas histológicas, histoquímicas, bioquímicas, enzimáticas y para profundizar en los mecanismos de respuesta fisiológica, antioxidante e inmunológica en abulón rojo (*Haliotis rufescens*) sometido a los procesos de anestesia e injerto de manto de diferente origen, como parte del proceso inicial de formación de perlas. El propósito está orientado en seleccionar el anestésico y método para la colocación de los injertos más adecuado para la especie, con el fin de reducir el estrés fisiológico y la tasa de rechazo que se tiene actualmente en el cultivo comercial de perlas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Anestesia en moluscos como terapia pre-operatoria a la formación de perlas

En actividades de acuicultura, el uso de anestésicos es una práctica rutinaria que ha motivado muchos estudios para evaluar el efecto de muchas sustancias naturales y artificiales sobre los organismos (Hoseini et al., 2018). Un buen anestésico debe actuar rápido a nivel celular para facilitar la manipulación y recuperación del organismo (Mamangkey et al., 2009). Otras consideraciones importantes son el costo, disponibilidad, fácil manipulación y baja toxicidad para animales, humanos y medio ambiente (Soto y Burhanuddin 1995; Ross y Ross, 2008). Los anestésicos actúan induciendo una depresión generalizada sobre el sistema nervioso central, producida por una acción sobre los axones nerviosos a través de la liberación de neurotransmisores, o modulando la permeabilidad de la membrana, o una combinación de estas acciones, lo que provoca supresión del dolor y pérdida de sensibilidad (Ross y Ross, 2008). El único principio unificador de la acción anestésica es que los anestésicos interactúan de alguna manera con los componentes de la membrana, ya sea que éstos se encuentren intracelularmente o en la superficie celular (Winlow et al., 1992), aunque probablemente todos modifican la actividad de los canales iónicos (Arhem et al., 2003).

En moluscos, particularmente aquellos de uso comercial en la acuicultura, uno de los anestésicos más utilizados es el cloruro de magnesio, una sal efectiva para sedar especies como *Ostrea edulis* (Culloty y Mulcahy, 1992), *Pecten fumatus* (Heasman et al., 1995), *Saccostrea glomerata* (Butt et al., 2008) y *Nodipecten subnodosus* (Torres-Martínez et al., 2012), así como en el caracol *Strombus gigas* (Acosta-Salmon y Davis, 2007) y los cefalópodos *Sepia officinalis* (Goncalves, 2012), *Loligo forbesi*, *Octopus vulgaris* y *Eledone cirrhosa* (Messenger et al., 1985). El aceite de clavo (eugenol) también ha sido ampliamente utilizado como anestésico o relajante en las ostras perleras *P. margaritifera* (Norton et al., 2000) y *P. maxima* (Mamangkey et al., 2009), no obstante, generó altas mortalidades en muchos organismos. El eugenol, si bien ha probado ser un relajante adecuado para el manejo de especies de abulón como *Haliotis tuberculata coccinea*, no es recomendable para actividades de perlicultivo porque provoca contracción del musculo del pie (Bilbao et al., 2010); en el caso de *H. discus hannai*, provocó mortalidad, despigmentación del pie y contracción del epipodio (Soza-Chinchilla, 2014). En ensayos con *H. laevigata* y *H. rubra*, se

reporta que el pie y el manto adoptaron una apariencia ondulada y perdieron su tacto suave; además los organismos produjeron exceso de moco y sufrieron mortalidades bajo el efecto del eugenol (Burke et al., 2001).

La benzocaína ha sido efectiva como anestésico con las ostras perleras *P. fucata* y *P. margaritifera* (Acosta-Salmón et al., 2005), aunque se reporta que induce al desove espontáneo en algunas especies como *Pt. sterna* (Granados-Amores et al. 2017). La benzocaína disuelta en etanol es usada de manera regular en los cultivos de abulón para remover los organismos desde los estanques y ha mostrado ser un eficiente anestésico, favoreciendo una rápida recuperación y baja mortalidad de los organismos (Edwards et al., 2000). En *Haliotis iris*, ha sido muy efectiva para relajar al abulón, aunque provoca rigor y cambio de coloración del pie (Aquilina y Roberts, 2000); similares resultados fueron obtenidos con *H. discus hannai* (Soza-Chinchilla, 2014), *H. rubra* y *H. laevigata* (Burke et al. 2001).

El 2-fenoxi-etanol (o fenoxietanol) es un reactivo moderadamente soluble en agua, es bactericida y fungicida (Coyle et al., 2004) y ha sido utilizado con éxito para anestesiarse las ostras perleras *P. albina* y *P. margaritifera* (Norton et al., 1996) y *P. maxima* (Mamangkey et al., 2009). La utilización de fenoxietanol en especies de abulón tales como *H. midae* (White et al., 1996), *H. discus hannai* (Soza-Chinchilla, 2014), *H. rubra* y *H. laevigata* (Burke et al., 2001) ha demostrado ser eficaz para relajar por completo a los organismos, favoreciendo también que el manto esté flácido y extendido y sin mortalidades posterior a la recuperación. El 1-fenoxi-propanol (o fenoxipropanol) también ha tenido buenos resultados como relajante en las ostras perleras *P. maxima* (Mamangkey et al., 2009), *P. albina* y *P. margaritifera* (Norton et al., 1996).

Los estudios relativos al uso de anestésicos en abulón se han concentrado principalmente en la eficacia de algunas sustancias y su efecto en el tiempo de recuperación, mortalidad y crecimiento somático del animal (White et al., 1996; Aquilina y Roberts, 2000; Burke et al., 2001; Sharma et al., 2003; Bilbao et al., 2010; Kishore et al., 2022). Sin embargo, muy poco o nada es lo que se sabe de los efectos de la anestesia a nivel fisiológico en el abulón (*Haliotis* sp.), particularmente si ocasiona daños a los tejidos blandos. De estos estudios se desprende que cada especie de molusco, no solo tiene un umbral de respuesta único que varía entre anestésicos, dosis y tiempos de exposición, sino que el anestésico, dosis y tiempo de exposición óptimos para una especie en

particular pueden no ser adecuados para otras especies. Recientemente, se reportó en la ostra perlera *Pt. sterna* que la anestesia, en su fase inicial antes de actuar a nivel celular (neuronal), puede ser estresante para los organismos y ocasionar efectos secundarios que incluyen sobreproducción de moco por irritación de los tejidos blandos, desoves espontáneos, daño celular moderado a severo e incluso mortalidad (Granados-Amores et al. 2017, 2018).

2.2 Anatomía microscópica y función del manto en los moluscos

En los moluscos, el manto es el tejido responsable de un gran número de funciones especializadas, como capacidad sensorial, almacenamiento de nutrientes, dirección de corrientes alimenticias, y protección de órganos internos. Igualmente, en el manto se regula la integración de una compleja matriz orgánica de polisacáridos y proteínas como la conchiolina, así como de otra matriz inorgánica de cristales de carbonato de calcio, calcita y aragonita que forman parte del proceso de biomineralización de la concha (Acosta-Salmón y Southgate, 2005a; Olivera-Bonilla, 2006; Nudelman, 2015). Estos compuestos llevan todas las instrucciones de fabricación de estructuras mineralizadas a nano-escala, las cuales están codificadas en el genoma y son especie-dependientes, por lo que se encargan de regular la deposición de patrones micro arquitectónicos de color y lustre de la capa interna nacarada (Jackson et al., 2006; Levi et al., 1998; Acosta-Salmón y Southgate, 2005a; Nudelman, 2015). Sin embargo, los mecanismos precisos de formación de los elementos constitutivos de la concha por parte del manto siguen sin estar del todo claros, y muchos estudios se han centrado en describir la micro arquitectura, ultraestructura y morfogénesis del manto en algunas especies de moluscos productores de perlas, tanto marinos (Levi et al., 1998; Dauphin et al., 2008; Fougereuse et al., 2008; Lin et al., 2008), como de agua dulce (Checa, 2000; Barik et al., 2004; Van Phuc et al., 2011).

Anatómicamente, el manto está compuesto por tres regiones o zonas claramente definidas: marginal (formada a su vez por tres lóbulos, interno, medio y externo), paleal y central (Zuñiga, 1998; Pérez, 2000; Fougereuse et al., 2008). Histológicamente, la región marginal presenta un epitelio de recubrimiento interno y externo separado por una capa de tejido conectivo, nervios y fibras de colágeno y musculares (Dix, 1973; Jabbour-Zahab et al., 1992; Fourgerouse et al., 2008). En cada región y lóbulo de esta región se distinguen diferentes tipos celulares característicos que se encargan también de diferentes funciones especializadas durante el proceso de

biomineralización y secreción de nácar (Fougerouse et al., 2008; Awaji y Machii et al., 2011). Por ejemplo, el lóbulo externo regula la formación del periostraco (o capa externa), el lóbulo medio la formación del mesostraco (capa prismática, calcárea o intermedia que le da grosor a la concha) y el lóbulo interno la formación del endostraco (capa interna a de nácar). En la región marginal, el manto posee células secretoras de mucopolisacáridos ácidos que pueden participar en el transporte de calcio, así como células secretoras con abundante ARN, presencia de polipéptidos diversos y alta actividad enzimática de anhidrasa carbónica en las células epiteliales (García-Gasca et al., 1994; Gao et al., 2015). La región marginal en particular es de suma importancia en los moluscos, ya que regula el tipo de microarreglo de compuestos de calcita y aragonita que le dan lustre u opacidad al nácar en cada especie de molusco (Checa, 2000; Marin et al., 2007), lo cual a su vez la hace propicia para la donación durante el proceso de injerto para la formación de perlas.

2.3 Injerto de manto para la formación inicial de perlas en moluscos

La técnica original de injerto desarrollada en Japón a finales de los años 1800s bajo el nombre 'Mise-Nishikawa' conlleva una cirugía denominada injerto, que es la que se utiliza hoy en día con todas las especies de ostras perleras del mundo para la producción comercial de perlas esféricas (Taylor y Strack 2008; Southgate 2021; Saucedo et al., 2022). El primer paso inicia con la etapa pre-operatoria (anestesia), utilizando algún agente anestésico como los descritos en la sección 2.1 (e.g. benzocaína, 2-fenoxi-etanol, eugenol, etc.) para reducir el estrés y lograr una fácil manipulación del organismo. Una vez que la ostra está anestesiada, es inmediatamente colocada en una base especial de injerto con las dos valvas abiertas mediante una cuña de madera o PVC. El segundo paso consiste en realizar una pequeña incisión, o herida, en el área de la gónada y con una espátula se abre un canal superficial hacia la parte más distal de este tejido, concretamente en una estructura de tejido conectivo blando conocida como 'asa intestinal'; ahí se coloca un núcleo esférico elaborado de concha de unos 6 a 15 milímetros de diámetro (dependiendo de la talla de la ostra perlera a injertar) y una pieza 1 a 2 mm² de manto obtenido de una ostra donadora de la misma especie (Arnaud-Haond et al., 2007; Taylor y Strack, 2008; Kishore et al., 2015). Esta cirugía debe realizarse de manera rápida y con precisión en un tiempo no mayor a 2 min. Las ostras recién injertadas son transferidas a tanques de recuperación para ser observadas por un periodo de 24 a 48 h para descartar casos de mortalidad y rechazo de núcleos. Finalmente, las

ostras que sobreviven y retienen el núcleo son transferidas a instalaciones de cultivo en campo y mantenidas por espacio de 9 a 24 meses hasta la cosecha de las perlas (Ruiz-Rubio et al., 2006; Saucedo et al. 2022). El tiempo exacto de cultivo en campo de las ostras depende de la especie en cuestión, las condiciones ambientales y las necesidades del mercado (Southgate, 2008; Taylor y Strack, 2008; Zhu et al., 2019).

A la fecha, se han realizado pocos estudios sobre el efecto del injerto durante la formación de perlas en las ostras perleras *P. fucata* (Suzuki et al., 1991; Awaji y Suzuki 1995; Acosta-Salmon y Southgate, 2005; Kripa et al., 2007, Muhammad et al., 2021), *P. margaritifera* (Jabbour-Zahab et al., 1992; Awaji y Suzuki, 1995; Acosta-Salmón y Southgate, 2005b; McGinty et al., 2010) y *P. maxima* (Dix, 1973; McGinty et al., 2010). Posterior a la cirugía de injerto, se inicia el delicado proceso de regeneración de las células epiteliales del manto injertado, con el fin de encapsular al núcleo inerte y formar una ampolla llamada 'saco perlero' (Kishore et al., 2016). Esta ampolla, que se forma por la actividad mitótica de las células epiteliales del manto en respuesta a la herida, comienza a secretar capas concéntricas de nácar que se van depositando gradualmente sobre el núcleo hasta formar la perla (Cahn, 1949; Awaji y Machii, 2011). La formación del saco perlero está supeditado a la estrecha y delicada unión entre el injerto de manto y el núcleo esférico, la cual se mantiene únicamente por tensión superficial o adherencia (Kishore y Southgate, 2016). Otros factores que intervienen en esta unión son la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno del agua (Awaji y Suzuki, 1995; Olivera-Bonilla, 2006), por consiguiente, este proceso puede tomar entre 15 y 20 días como se reportó en la ostra perlera *P. margaritifera* (Herbaut et al., 2000; Kishore y Southgate, 2016).

La técnica de injerto de manto para producción de perlas esféricas en abulón es una adaptación del método utilizado en ostras perleras, considerando las claras diferencias anatómicas y fisiológicas que existen entre moluscos bivalvos y gasterópodos. Igualmente inicia con una etapa de anestesia de los organismos, en la cual un agente anestésico (generalmente CO₂) es disuelto en agua de mar a saturación (Soza-Chinchilla, 2014) para relajar los tejidos y facilitar la manipulación y acceso a la zona de injerto. Luego que el organismo está anestesiado, es ubicado en una mesa de disección (sin la necesidad de uso de una base de injerto, como en las ostras perleras) para separar el músculo del pie de la pared abdominal. Como segundo paso, con un bisturí se realiza una pequeña incisión en la zona dorsal de la pared abdominal para introducir un

núcleo esférico (7 a 9 milímetros) y un trozo de manto de 4 mm² aproximadamente, obtenido de un abulón donador de la misma especie (aloinjerto); ambos elementos son alojados en la cavidad abdominal del organismo. Una vez finalizado el injerto, se realiza una sutura quirúrgica en la zona de incisión, con el objetivo de reducir la tasa de rechazo de núcleos, que suele ser en promedio un 30% (sin sutura quirúrgica >80%).

Posteriormente, los organismos injertados son llevados a recuperación en un estanque con flujo continuo de agua de mar con aireación por un periodo de 48 h para observar casos de mortalidad de organismos y rechazo del injerto. A diferencia de las ostras perleras, en que núcleo y manto son injertados al interior de la gónada (asa intestinal), en los abulones no existe esta estructura, por lo tanto, ambos elementos quedan ubicados al interior de la cavidad abdominal en contacto estrecho con los órganos internos del abulón. Lo anterior incide en la delicada adhesión por tensión superficial que deben mantener núcleo y trozo de manto para la formación del saco perlero, haciendo evidente las diferencias anatómicas entre ambos grupos de moluscos. Otra diferencia entre moluscos bivalvos (que son sésiles) y gasterópodos (de vida libre), es que en el abulón el músculo del pie ejerce una fuerte presión sobre sus órganos internos (incluyendo el área de injerto) al realizar movimientos de desplazamiento, pudiendo afectar la formación del saco perlero al separarse el núcleo del trozo de manto o incrementar la tasa de rechazo al expulsar el núcleo. En consecuencia, esto reduce considerablemente el éxito en la producción de perlas.

2.4 Indicadores de respuesta antioxidante

El estrés oxidativo ocurre en todos los organismos vivos (vertebrados e invertebrados) que están expuestos a factores exógenos y endógenos cambiantes, y comúnmente implica un desequilibrio entre pro-oxidantes (especies reactivas de oxígeno o ERO) y antioxidantes (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), a favor de los primeros (Seis, 1991; Guerra et al., 2012), mientras que la definición actualizada lo describe también como un desequilibrio en el estado redox (Seis, 2015). De igual manera, la amenaza por estímulos intrínsecos o extrínsecos al equilibrio dinámico de los organismos (homeostasis) se denomina estrés (Sokolova et al., 2012). En condiciones normales, la generación y eliminación de ERO está bajo un delicado control celular que permite mantener estos compuestos en concentraciones relativamente bajas y así asegurar que participen en vías de señalización celular y numerosos procesos fisiológicos (Lushchak, 2011).

Sin embargo, cuando los organismos se encuentran con condiciones ambientales adversas, y quedan expuestos a factores estresantes como las fluctuaciones en la salinidad, la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH (Wei et al., 2022); o también a pesticidas, metales pesados, hidrocarburos, químicos mutagénicos y radiación entre otros, producen como resultado un incremento en la producción de ERO, provocando con ello, estrés oxidativo (Fidan et al., 2008). Si los sistemas antioxidantes son capaces de hacer frente adecuadamente al incremento de las ERO, y los niveles de éstas vuelven a su estado inicial, estos eventos pueden denominarse 'estrés oxidativo agudo'. Por el contrario, en los casos en que los organismos no pueden reducir la concentración de ERO a su estado inicial, y éstas se mantienen por un largo periodo de tiempo, el proceso se denomina 'estrés oxidativo crónico'. Finalmente, cuando las concentraciones de ERO se estabilizan en niveles mayores a las iniciales, alterando sustancialmente la homeostasis, se denomina estado 'quasi estacionario' (Lushchak, 2014).

Entre las enzimas antioxidantes que participan en los mecanismos de defensa en los invertebrados marinos está la SOD (superóxido dismutasa), la cual cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y agua (Fridovich, 1998; Buttemer et al., 2010). La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio dependiente que ayuda a catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH) utilizando como agente reductor al glutatión reducido (GSH) (Cárdenas-Rodríguez et al., 2008; Grilo et al., 2018). La CAT (catalasa) es otra enzima antioxidante con actividad peroxidasa que se encarga de descomponer el H_2O_2 en agua y oxígeno (Peraza, 2008; Jaganjac et al., 2022).

Estudios relacionados al efecto de estresores como metales pesados, han mostrado variaciones en la actividad enzimática del sistema antioxidante de diferentes especies de moluscos. Por ejemplo, en la ostra perlera *P. fucata*, bajas concentraciones de cobre estimularon la actividad SOD en branquias y glándula digestiva, en tanto que altas concentraciones la inhibieron en las branquias (Jing et al., 2006). En el tejido del manto de *P. fucata*, tanto altas como bajas concentraciones de cobre estimularon la actividad de la SOD (Jing et al., 2007). Por otra parte, el efecto combinado de estrés por temperatura y desecación en *P. fucata*, afectaron la actividad de la SOD en la glándula digestiva, mostrando niveles significativamente más bajos que en el grupo control (Wei et al., 2021). Las toxinas producidas por dinoflagelados en los eventos de mareas rojas, también producen estrés oxidativo y afectan los niveles de actividad de la SOD en tejidos

como branquias y glándula digestiva del abulón verde (*Haliotis discus hannai*) expuesto a distintas concentraciones de homo-yesotoxina (Liang et al., 2022).

Por otro lado, los niveles de CAT también pueden mostrar variaciones como consecuencia del uso de anestésicos, por ejemplo, en la ostra perlera *Pt. sterna* se observó una mayor actividad de esta enzima en el músculo aductor y manto de los organismos al ser tratados con cloruro de magnesio y benzocaína, respectivamente (Granados-Amores et al., 2018). En el abulón *H. discus hannai* sometido a condiciones de hipoxia ($2.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), la actividad de CAT en la hemolinfa se incrementó al primer mes para luego reducirse desde el segundo al cuarto mes; ambas variaciones fueron significativas al ser comparadas con el control (Nam et al., 2020). En la misma especie de abulón hubo una reducción en la actividad de CAT en branquias y glándula digestiva como consecuencia a la exposición de homo-yesotoxinas (Liang et al., 2022).

El uso de diferentes anestésicos (eugenol, benzocaína, cloruro de magnesio y fenoxipropanol) en la ostra perlera *Pt. sterna* para evaluar la actividad de GPx, en diferentes tejidos (manto y músculo aductor) no mostraron diferencias significativas en los primeros 120 min al ser comparados con el grupo control; sin embargo, una mayor actividad de esta enzima fue observada a las 65 h (Granados-Amores et al., 2018). Contrariamente, en la ostra perlera *P. fucata* la actividad de GPx (branquias y glándula digestiva) fue significativamente más baja que el grupo control en organismos expuestos a diferentes concentraciones de cobre (0.05 a $0.5 \mu\text{M}$) por hasta 72 h (Jing et al., 2006). En el tejido del manto de *P. fucata* expuesto a distintas concentraciones de cobre y plomo no hubo variaciones significativas en la actividad de GPx al ser comparadas con el control. En juveniles de abulón *H. midae*, sometidos a estrés por hipoxia e hiperoxia encontraron que las concentraciones de GPx fueron mayores en aquellos organismos sometidos a altos niveles de oxígeno (Vosloo et al., 2013).

Por otra parte, se sabe que los lípidos de la membrana constituyen un blanco de acción de las ERO, lo que puede resultar en una peroxidación lipídica por la descomposición y producción de una variedad de sustancias, incluyendo etano, pentano y aldehídos (Sukhotin et al., 2002; Nikki, 2016). Por lo tanto, la formación excesiva de lípidos peroxidados ha sido reconocida como buen indicador de daño oxidativo y cuantificada como sustancias reactivas al ácido tibobarbiturico (TBARS), dando como producto final de la peroxidación lipídica el malondialdehído (MDA) (Ribera

et al., 1991; Sukhotin et al., 2002; Torres et al., 2002; de Almeida et al., 2007; Moreira et al., 2019; Wei et al., 2022). En algunas especies de moluscos bivalvos, como los mejillones *Perna perna* y *Mytella guyanensis*, la glándula digestiva es un tejido de gran importancia para el monitoreo de niveles de TBARS, debido a los altos niveles de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que posee este tejido (de Almeida et al., 2004, 2007). Por otra parte, el uso de cloruro de magnesio como anestésico en *Pt. sterna* promovió un aumento significativo en la producción de TBARS en el músculo aductor y el tejido del manto. Por el contrario, la exposición a fenoxipropanol favoreció la menor acumulación de TBARS en todos los tejidos y, como tal, la menor peroxidación de los lípidos de membrana (Granados et al., 2018). En el abulón verde (*H. discus hannai*), el contenido de MDA incrementó significativamente en branquias y glándula digestiva conforme la concentración de homo-yesotoxina aumentó (0 – 10 ug L⁻¹) luego de 12 h de exposición a la toxina (Liang et al., 2022). Un efecto similar se produjo en la hemolinfa de la misma especie sometida a condiciones de hipoxia (2.5 mg O₂ L⁻¹) por un periodo de cuatro meses (Nam et al., 2020).

Las lipofuscinas, o pigmentos del envejecimiento, son agregados de proteínas oxidadas, lípidos y metales no degradables, y la acumulación de estos provoca un daño relevante porque no pueden degradarse por procesos enzimáticos ni eliminarse por exocitosis (Winston, 1991; Terman y Brunk, 2004; Jung et al., 2009; Höhn et al., 2011). Las lipofuscinas pueden inhibir la degradación de proteínas oxidadas, incluyendo las proteasas lisosomales y del proteosoma, haciendo que éstas sean menos funcionales. A través de un índice que cuantifica la acumulación de lipofuscinas en los tejidos se pudo establecer, por ejemplo, que los valores de estas sustancias en *Pt. sterna* se duplicaron y triplicaron en el manto y las branquias al ser expuestas los organismos a anestésicos como el cloruro de magnesio y benzocaína, respectivamente, durante el proceso de anestesia para la formación de perlas (Granados et al. 2017). En la almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, la acumulación de lipofuscinas en los tejidos blandos resultó del daño oxidativo después de la temporada principal de desove, cuando los animales estaban agotados energéticamente (Guerra et al., 2012). Dicho daño, también ocurrió en las gónadas y los tejidos somáticos involucrados en la reproducción de las ostras *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* en respuesta a fluctuaciones drásticas en la temperatura del agua (Rodríguez-Jaramillo, 2014).

En conclusión, se desconoce por completo el efecto que pueden tener ciertos anestésicos como agentes estresores en el abulón (*Haliotis* spp.), particularmente durante la etapa inicial de recuperación de la anestesia, provocando cambios fisiológicos ligados a los mecanismos de utilización de reservas energéticas. Igualmente, se desconoce si estos cambios podrían estar relacionados con la producción de enzimas antioxidantes (como la CAT, GPx o SOD), con los niveles de TBARS como indicador de peroxidación lipídica, y con la producción de lipofuscinas, las cuales están asociadas a la edad y eventos de estrés oxidativo.

2.5 Indicadores de respuesta inmune

Los hemocitos son las principales células de defensa de los moluscos y son los responsables de su sistema inmunitario innato, para lo cual se encuentran circulando en la hemolinfa y se infiltran en los tejidos para responder ante cualquier estresor interno o externo (Moreira et al., 2019). La tendencia actual en la clasificación de los hemocitos es hacia la existencia de dos tipos principales: granulocitos e hialinocitos (Prado-Alvarez et al., 2012; Gianazza et al., 2021). Los granulocitos generalmente contienen muchos gránulos citoplasmáticos y son el tipo más abundante, tienen una alta actividad fagocítica y contienen enzimas hidrolíticas y oxidativas. Por otro lado, los hialinocitos tienen pocos o ningún gránulo, suelen ser más pequeños que los granulocitos, tienen una alta relación núcleo/citoplasma y pueden ser no fagocíticos o menos que los granulocitos (Moreira et al., 2019). Los hemocitos también se dedican a la reparación de la concha y tejidos blandos, así como al transporte de nutrientes, excreción de metabolitos, osmoregulación e intercambio de gases y defensa celular (Cheng, 1981; Beninger et al., 2003; Moreira et al., 2019). Finalmente, los hemocitos realizan funciones que incluyen la fagocitosis celular, excitosis, producción de ERO, síntesis y liberación de proteínas efectoras y péptidos antimicrobianos (Mitta et al., 2000).

Los estudios sobre la inmunidad en moluscos generalmente se centran en cuantificar varios parámetros inmunes de la hemolinfa, como la cantidad y lisis de hemocitos circulantes, actividad antioxidante, estallido respiratorio (formación de moléculas altamente reactivas al oxígeno, como el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno) y actividad fagocítica (Cheng et al., 2004; Wang et al., 2012). Las variaciones en las concentraciones o actividades de los hemocitos se han utilizado como biomarcadores de actividad inmune, con el objetivo de evaluar la capacidad inmune de los

moluscos al ser expuestos a estresores ambientales, como la hipoxia, altas temperatura y los metales pesados. Las variaciones en el conteo de hemocitos constituyen también una de las herramientas más útiles para medir estos cambios e indicadores inmunes mediante citometría de flujo (Lacoste et al., 2001; Monari et al., 2007; Donaghy et al., 2009).

Trabajos recientes sobre el efecto del estrés por calor en varios parámetros inmunes y fisiológicos en abulón (*H. rubra*) reportan que los recuentos de hemocitos circulantes aumentaron rápidamente con el incremento repentino de la temperatura del agua y luego disminuyeron a medida que se aclimataron (Dang et al., 2012). Las tasas de actividad fagocítica y de enzimas de respuesta inmunitaria como la fenoloxidasa disminuyeron después del desove en el abulón *Haliotis tuberculata* durante los pequeños flujos de temperatura en verano. Sin embargo, no quedó claro qué efecto directo tuvo la temperatura del agua sobre estos parámetros inmunes, en relación con el estrés del desove (Travers et al., 2008). Por su parte, la actividad antibacteriana aumentó de forma transitoria con estrés por calor y luego disminuyó por debajo de los niveles de referencia en el abulón *H. rubra* (Dang et al., 2012). A la fecha no ha habido informes del efecto de la temperatura del agua sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida (ACP) en las distintas especies de abulones, aunque se ha encontrado una elevación significativa de ACP en el abulón *Haliotis diversicolor supertexta* (Wang et al., 2004) y otras especies de moluscos infectados con bacterias, lo que indica que es probable que sea importante en la inmunidad de los moluscos en general (Cong et al., 2008).

En condiciones de hipoxia, se ha observado una disminución significativa del número total de hemocitos, de la actividad antibacteriana y la actividad de la lisozima en *H. discus hannai*, a partir del primer mes de estar expuestos a esas condiciones (Nam et al., 2020). A su vez, en la almeja de agua dulce (*Hyriopsis cumingii*), la actividad de ACP en los hemocitos fue significativamente mayor que la del grupo de control dentro de los primeros tres días después de que se realizó la operación de injerto para la producción de perlas (Wei et al., 2001). También, en la ostra perlera *P. fucata* injertada con aloinjertos y xenoinjertos, la actividad de la ACP y la fosfatasa alcalina (AKP) fue significativamente mayor que el grupo control, entre los días 1 y 13 y los días 4 a 11 días posteriores al injerto, respectivamente (Wei et al., 2017). Estos autores también reportaron que la actividad de lisozimas en los grupos experimentales fue significativamente más alta que en el grupo de control a los 4-11 días después de la cirugía de injerto y volvieron a la normalidad a los

13-15 días. Estos resultados indican que la herida por la cirugía y las piezas de manto insertadas conducen a una respuesta inmune por parte de los animales, aunque todavía se carece de información suficiente al respecto para entender bien los mecanismos inmunes que activan estas respuestas en los animales.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el potencial de aprovechamiento del abulón para el cultivo de productos de alto valor agregado, como las perlas, se ha evaluado con éxito en países como México y Chile. Esto ha dado como resultado importantes avances en la adaptación de la tecnología de cirugía de injerto desarrollada para moluscos bivalvos sésiles (ostras perleras) a moluscos gasterópodos móviles (abulones), considerando las claras diferencias anatómicas entre organismos ambos grupos. Esta adaptación ha representado todo un desafío tecnológico.

Por otra parte, existen suficientes antecedentes que, en el proceso de producción de perlas, las etapas pre-operatoria (anestesia) y operatoria (microcirugía de injerto de núcleo y manto) son eventos estresantes para los organismos y que por lo tanto se esperan respuestas fisiológicas, antioxidante e inmunitaria que pueden incidir en la formación de las perlas. En este contexto, existe un vacío significativo de información para el caso de abulones en cuanto a evaluar una adecuada selección de un anestésico y entender el posible riesgo de rechazo por incompatibilidad biológica que puede sufrir el organismo receptor al recibir un agente extraño (manto, sin importar que éste sea de la misma especie).

Por ello, en el presente estudio se evaluó aspectos de la modulación fisiológica, antioxidante e inmunitaria en el abulón (*H. rufescens*) para generar conocimiento científico aplicable para la producción de perla libre. X

4. HIPÓTESIS

Hipótesis #1 (Anestesia): Si los agentes anestésicos pueden actuar como estresores, entonces generarán una respuesta fisiológica, antioxidante e inmunitaria diferencial en ellos dependiendo de la naturaleza del anestésico, del tiempo de relajación y la dosis empleada.

Hipótesis #2 (Injerto): Aunque el sistema inmune de los moluscos es simple, entonces se prevé una respuesta antioxidante e inmunitaria menos severa y un menor riesgo de rechazo por incompatibilidad biológica en los organismos injertados con una pieza de su propio manto (autoinjerto), en comparación con aquellos injertados con un manto donado (aloinjerto), sin importar que este sea de la misma especie.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos general

Evaluar la respuesta fisiológica, antioxidante e inmunitaria asociada en las etapas pre-operatoria (anestesia) y operatoria (injerto) durante la etapa inicial de la formación de perlas en abulón rojo (*H. rufescens*).

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el tiempo de anestesia, tiempo de recuperación, supervivencia, eventos de desove espontáneo, producción de moco, organismos aptos para injerto, variación en el índice glucídico, mucopolisacáridos y lipofuscinas, actividad antioxidante y respuesta inmunitaria del abulón rojo (*H. rufescens*) a distintos tipos y concentraciones de anestésicos.
- Evaluar la supervivencia, porcentaje de aceptación y rechazo de injertos, actividad antioxidante y respuesta inmunitaria del abulón rojo (*H. rufescens*) sometido a injerto de manto de diferente origen (aloinjerto y autoinjerto).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Bioensayo 1: anestesia

6.1.1 Obtención de abulones

Se seleccionaron 240 adultos de *H. rufescens* con una talla promedio de 87.76 ± 2.73 mm de longitud de la concha y biomasa húmeda promedio de 97.56 ± 9.72 g desde la Unidad de Perlicultivo de Abulon de la Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos de la Universidad de Antofagasta, Chile. Los organismos fueron mantenidos en estanques tipo race-ways de 5 m^3 , con aireación constante, flujo agua de mar continuo (1 recambio por hora), densidad de 2500 individuos por estanque, alimentación a base de macroalgas (*Macrocystis pyrifera* y *Ulva* sp) al 10% de la biomasa corporal y temperatura promedio de $16 \text{ }^\circ\text{C}$. Los organismos seleccionados para el ensayo fueron separados en el mismo estanque usando un canasto con 4 refugios. Una muestra de 30 abulones fue medida con un vernier digital (0.1 mm) y pesada con una balanza digital portátil (0.1 g) para obtener los datos promedio de longitud y biomasa total húmeda, respectivamente.

6.1.2 Diseño experimental

Los organismos seleccionados fueron sometidos a siete tratamientos diferentes con anestésicos utilizados habitualmente en la industria perlera y acuícola (Mamangkey et al., 2009; Bilbao et al., 2010, Granados-Amores et al. 2017, 2018). A excepción del CO_2 , cada tratamiento se utilizó a dos diferentes concentraciones de la siguiente manera:

1. Eugenol a 0.15 mL L^{-1} (**EUA**)
2. Eugenol a 0.25 mL L^{-1} (**EUB**)
3. Fenoxietanol a 1.5 mL L^{-1} (**PEA**)
4. Fenoxietanol a 3.0 mL L^{-1} (**PEB**)
5. Benzocaina a 0.15 g L^{-1} (**BZA**)
6. Benzocaina a 0.30 g L^{-1} (**BZB**)

7. CO₂ disuelto a saturación en agua de mar (CO₂)

Se incluyó también un octavo tratamiento con organismos mantenidos en agua de mar filtrada sin anestésico (control).

Para cada tratamiento se utilizaron tres estanques de 30 L de agua de mar filtrada a 10 µm y 10 abulones por estanque ($n=30$ por tratamiento). La benzocaína se utilizó en formato líquido (BZ-20®, Veterquímica®, Chile) y los volúmenes requeridos para obtener la concentración deseada fueron disueltos en etanol 96% en proporción 1:4 (benzocaína: etanol) (Acosta-Salmon y Rangel Davalos, 1997); la solución resultante fue mezclada en la misma proporción en agua de mar antes de administrar a los estanques. Las soluciones de eugenol fueron diluidas al 50% con etanol 96% (Bilbao et al., 2010) y homogenizadas con agua de mar filtrada. Los volúmenes de fenoxietanol fueron diluidos en agua de mar antes de dosificar a los estanques (White et al., 1996). En el caso del CO₂ la saturación en el agua de mar fue por burbujeo durante 55 min (Soza-Chinchilla, 2014).

La evaluación de los anestésicos se realizó en dos etapas: Primero, la respuesta visual se evaluó a los 10, 20, 30 y 45 min posteriores a la inmersión de los organismos en cada uno de los anestésicos. Esta evaluación se realizó de manera individual para cada uno de los 30 organismos de cada tratamiento y los criterios a considerar se describen en la sección 6.3.1. Transcurridos los 45 min de exposición al anestésico, los organismos de cada tratamiento fueron trasladados a estanques con agua de mar sin anestésico hasta las 24 h, con el fin de evaluar su recuperación, según lo descrito también en la sección 6.3.1.

En la segunda etapa se evaluó la respuesta fisiológica e inmune de los organismos en cada uno de los anestésicos; en este caso los muestreos se realizaron a los 0.5, 1, 2 y 24 h posteriores a la exposición del anestésico, recolectando tres organismos por muestreo y tratamiento ($n=3$). De cada organismo se recolectaron a su vez muestras de tejidos somáticos (pie, manto, branquias, glándula digestiva), gónada y hemolinfa (obtenida desde el músculo del pie), las cuales se utilizaron para diferentes tipos de análisis; una parte de las muestras se destinó para análisis histoquímicos, en los cuales se determinaron tres índices: índice glucídico, índice de mucopolisacáridos e índice de lipofuscinas (ver sección 6.3.2). A partir de la hemolinfa se obtuvieron las fracciones de hemolinfa libre de células y hemocitos lisados (ver sección 6.3.3), las cuales fueron utilizados para análisis de determinación de la concentración de proteínas totales,

actividad antioxidante de superóxido dismutasa (SOD) catalasa (CAT), para cada uno de los tratamientos (ver secciones 6.3.3.1, 6.3.3.2 y 6.3.3.3). Adicionalmente, como parte de los indicadores de respuesta inmune se realizó un recuento de hemocitos, así como la determinación de la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) y concentración de óxido nítrico (ver secciones 6.3.3.4, 6.3.3.5 y 6.3.3.6).

6.2 Bioensayo 2: injerto

6.2.1 Obtención de abulones

Se obtuvieron 170 adultos de *H. rufescens* con talla promedio de 87.76 ± 2.73 mm y biomasa húmeda promedio de 97.58 ± 9.72 g, desde la empresa de Abulones Cultivados, S. de R.L. de C.V., México. Los organismos fueron aclimatados por un periodo de dos semanas previo al ensayo en las instalaciones del Laboratorio 4 del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada B.C. Se utilizaron dos estanques de 190 L en un sistema de recirculación a una temperatura promedio de 16.5 °C y fueron alimentados a base de las macroalgas *M. pyrifera* y *Ulva* sp. al 10 % de la biomasa corporal. Se tomó una muestra inicial de 30 abulones para registrar la longitud de la concha con un vernier digital (0.1 mm) y el peso con una balanza digital portátil para obtener su biomasa total húmeda (0.1 g).

6.2.2 Diseño experimental

Los organismos fueron divididos en cuatro tratamientos de 30 organismos cada uno, los cuales fueron mantenidos en dos estanques de 60 L con agua de mar filtrada a 10 μ m. Todos fueron anestesiados utilizando el agente anestésico seleccionado en el ensayo anterior (CO_2) y los tratamientos experimentales de injerto fueron los siguientes:

- 1) Tratamiento autoinjerto (**AT**) o “**manto propio**”: organismos sometidos a anestesia, incisión en la pared abdominal, e injerto de una pieza de manto propio
- 2) Tratamiento aloinjerto (**AL**) o “**manto donado**”: organismos sometidos a anestesia, incisión en la pared abdominal, e injerto de manto obtenido de un donador de la misma especie

3) Tratamiento (IN) “**incisión**”: organismos sometidos a anestesia e incisión en la pared corporal, pero sin injerto de manto de ningún tipo

4) Tratamiento (AN) “**anestesiados**”: organismos sometidos a anestesia, pero sin incisión en la pared corporal, ni injerto de manto de ningún tipo

5) **Grupo control (CT)**: organismos no sometidos a anestesia, ni incisión en la pared corporal, ni injerto de manto de ningún tipo.

En ninguno de los tratamientos se injerto un núcleo, solo la pieza de manto y su preparación para la cirugía de injerto se realizó según lo descrito en la sección 2.3 de los antecedentes. Para el tratamiento 1 (autoinjerto), no existe un donador de manto y el receptor fue injertado con una pieza de su propio manto; por ende, en este tratamiento los organismos tuvieron que reparar dos heridas, una en el manto y otra en la cavidad abdominal. En el tratamiento 2 (aloinjerto), el donador y receptor de manto son de la misma especie, por lo que al donador se le retiró una tira larga de manto, la cual se seccionó en unas 8-10 piezas de 4 mm² que fueron injertadas de forma individual en cada organismo. En ambos casos, la cirugía de injerto se llevó a cabo en una mesa de disección mantenida bajo condiciones asépticas, en donde se separó el músculo del pie de la pared abdominal del abulón para realizar una incisión e introducir el injerto y luego proceder con una sutura quirúrgica en la herida de la incisión.

Para evaluar el efecto de la microcirugía de injerto, se realizaron muestreos a las 2, 4, 24 y 48 h posteriores al injerto, recolectando tres organismos por tratamiento (n=3). De cada organismo se extrajeron muestras de hemolinfa las cuales fueron procesadas de la misma manera que en el bioensayo de anestésicos. A su vez, se determinaron los mismos indicadores de actividad antioxidante y respuesta inmunitaria evaluados en el bioensayo de anestesia.

6.3 Indicadores de respuestas de los organismos (Bioensayos 1 y 2)

6.3.1 Análisis visual del efecto de los anestésicos (Bioensayo 1)

Para el análisis del efecto visual de la anestesia, se realizaron observaciones a los 10, 20, 30 y 45 min; en cada tiempo los organismos se consideraron en diferente grado de anestesia de acuerdo

a la respuesta al estímulo físico (tocando el borde del pie con una pinza) de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) No Anestesiado, cuando el abulón presenta una respuesta inmediata al estímulo físico recibido.
- b) Anestesiado, cuando el abulón responde a estímulos físicos, pero de manera lenta o no responde.

También se consideraron otros efectos de los anestésicos tales como:

- a) Distensión del pie: No contraído (el pie se observa normal o distendido y sobresale por los bordes de la concha) y contraído (músculo del pie duro y bajo el margen del periostraco)
- b) Producción de moco: Sin producción (no se observa secreción de moco en el pie al retirar del agua de mar al abulón) y con producción de moco (secreciones finas o gruesas escurren por el borde del pie).
- c) Desove espontáneo: No desovado (sin liberación de gametos) y desovado (libera gametos al agua de mar).

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje promedio de organismos que presentaron los criterios evaluados en cada uno de los tratamientos. Finalizados los 45 min, y con base en el análisis de todos los indicadores anteriores, se consideró a los organismos en dos grandes condiciones:

- a) Aptos para injerto: Organismos que se pueden manipular adecuadamente para la cirugía de injerto, separando el pie de la pared abdominal con nula o casi nula resistencia al mover el pie.
- b) No aptos para injerto: Organismos que ponen resistencia al separar el pie de la pared abdominal, ya sea por movimiento del pie o porque el músculo del pie se encuentra contraído.

Posterior a la evaluación visual, solo se continuó el bioensayo y los sucesivos análisis con los organismos que fueron aptos para injertos y con valores estadísticamente significativos. Por lo tanto, esos organismos fueron trasladados a recuperación dentro de canastos dispuestos en estanques con aireación y flujo continuo de agua de mar. Se tomó el tiempo de recuperación de cada organismo hasta un máximo de 4 h. Para ello, los abulones fueron puestos en posición

invertida y se consideró al organismo recuperado por completo cuando por si solo fue capaz de reincorporarse y retomar su posición normal. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje promedio de organismos anestesiados y de organismos aptos para injerto. A su vez, con los organismos trasladados a recuperación se determinó la tasa de recuperación y de supervivencia total (%) en cada uno de los tratamientos de anestesia.

6.3.2 Indicadores de respuesta fisiológica (Bioensayo 1)

Las muestras de tejidos (manto, músculo del pie, branquias, glándula digestiva y gónada) obtenidas de los organismos del bioensayo anestesia, fueron fijadas en solución Davidson y procesadas siguiendo la técnica histológica propuesta por Kim et al. (2006) y los cortes histológicos se hicieron a 4 μm . Posteriormente, para los análisis histoquímicos, los mismos tejidos fueron teñidos utilizando colorantes específicos sensibles a glúcidos y mucopolisacáridos ácidos (azul alciano PAS) y lipofuscinas (carbol-fuscina-kiyoung). Las laminillas fueron digitalizadas en tres campos visuales (10X) tomados al azar y a alta resolución (3600 dpi; 3465x5184 pixeles), empleando el mismo sistema de análisis digital de imágenes. Luego con el programa Image Pro, las imágenes fueron segmentadas de manera manual, eligiendo los pixeles marcados según las tonalidades de colores de cada tinción utilizada para la cuantificación de mucopolisacáridos ácidos y glúcidos. La segmentación se realizó en tonos de color que varían entre azul-magenta-rosa (para glúcidos) y azul (para mucopolisacáridos ácidos). Para la tinción de lipofuscinas, las tonalidades obtenidas fueron entre amarillo y rojo-pardo. Realizada la segmentación, el programa cálculo el área de los pixeles seleccionados en cada fotografía (μm^2) y generó un promedio de los tres campos visuales tomados al azar para cada imagen digital. La información generada se utilizó para la determinación del índice glucídico (IG), índice de mucopolisacáridos ácidos (IMA) e un índice de lipofuscinas (ILF), según las fórmulas estandarizadas por Rodríguez-Jaramillo (2004) y Rodríguez-Jaramillo et al. (2008):

$$\text{IG} = (\text{ACG}) / (\text{ATI}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{IMA} = (\text{AMA}) / (\text{ATI}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{ILF} = (\text{ACLF}) / (\text{ATI}) \times 100 \quad (3)$$

Dónde:

IG= índice glucídico

ACG= área de cobertura glucídica (μm^2)

IMA= índice de mucopolisacáridos ácidos

AMA= área de cobertura de mucopolisacáridos ácidos (μm^2)

ILF= índice de cobertura de lipofuscinas

ACLF=área de cobertura de lipofuscinas (μm^2)

ATI= área total de la imagen (μm^2)

6.3.3 Indicadores de respuesta antioxidante e inmune (Bioensayo 1 y 2)

Las muestras de hemolinfa para evaluar indicadores de respuesta antioxidante e inmunitaria se obtuvieron desde el músculo del pie del abulón, utilizando una jeringa tuberculina de 1 mL (25 G x 16 mm). Cada muestra de hemolinfa fue centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 4 °C (Wei et al., 2017) y el sobrenadante fue recuperado como la fracción de hemolinfa libre de células (HLC). La fracción sedimentada (hemocitos) fue resuspendida en buffer salino, sonicada a 3 ciclos de 50% por 5 seg, centrifugada a 12000 rpm por 15 min a 4 °C (Monari et al., 2007 modificado) y el sobrenadante fue recuperado como la fracción de hemocitos lisados (HL). Ambas fracciones (HLC y HL) fueron almacenados en ultracongelador (-80 °C), para su posterior análisis como a continuación se detalla.

6.3.3.1 Concentración total de proteínas (TP)

La concentración total de proteínas en las fracciones HLC y HL se cuantificó por el método Bradford (1976). Se preparó una curva estándar utilizando proteína de albúmina sérica bovina (#9048-46-8, Sigma-Aldrich). Alícuotas de 80 μL de muestra y 20 μL de reactivo de Bradford (#B6916, Sigma-Aldrich) fueron agregadas en una microplaca y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm.

6.3.3.2 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD fue medida en HCL y HL a través del porcentaje de inhibición de la reacción enzimática xantina oxidasa con el colorante cloruro de tetrazolio usando el kit de ensayo SOD (Sigma,19160, Darmstadt, Germany). La metodología se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de manufactura. Después de 20 min de incubación a 37 °C, la absorbancia fue medida a 490 nm. La actividad de SOD fue expresada en porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhib.} = \{[(\text{blanco 1} - \text{blanco 3}) - (\text{muestra} - \text{blanco 2})] / (\text{blanco 1} - \text{blanco 3})\} \times 100 \quad (4)$$

6.3.3.3 Catalasa (CAT)

La actividad de CAT fue realizada por el método de Clairborne (1985), utilizando una placa de Elisa (96 pocillos). A las muestras (50 µL) se agregaron 25 µL de “buffer assay diluted” (preparado con 2 mL de buffer de fosfatos de potasio 100 mM y 18 mL de agua grado HPLC), 25 µL de metanol y 5 µL de peróxido de hidrógeno diluido (30%) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en agitación. Se terminó la reacción agregando 25 µL de hidróxido de potasio 10 M y 50 µL de reactivo de purpald. Se cubrió la placa con papel aluminio, se incubó por 10 min en agitación y se leyó en espectrofotómetro a 655 nm.

6.3.3.4 Recuento total de hemocitos (RTH)

Un volumen de 500 µL de hemolinfa obtenida desde el músculo del pie fue agregado a igual volumen de una solución fijadora (27 mM de citrato de sodio, 11.5 mM de EDTA, agua de mar filtrada 0.2 µm y paraformaldehído 6% v/v). El recuento total de hemocitos se realizó por triplicado utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Olympus BX-50. Los valores fueron expresados en cel mL⁻¹.

6.3.3.5 Mieloperoxidasa (MPO)

El análisis de MPO se llevó a cabo utilizando cámaras multipozos en las cuales se agregaron 20 µL de muestras en cada pocillo. Por otra parte, en un tubo separado se adicionarán 40 mL de agua destilada, 1 pastilla de sustrato TMB (Tetrametilbenzidina, #S5814 Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno al 30%; esta mezcla fue agitada en obscuridad hasta disolver completamente la pastilla

y luego se agregaron 100 μL a cada pocillo. Después de la conversión se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 M (50 μL). La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 450 nm.

6.3.3.6 Óxido nítrico (ON)

La producción de NO se determinó en las fracciones HCF y LH añadiendo 100 μL de cada una de las muestras en una placa de 96 pozos, luego se adicionaron 100 μL de reactivo de Griess (4 mg mL^{-1}) y se incubó durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 490 nm.

6.4 Análisis estadísticos de resultados

Para deducir la normalidad de los datos (longitud y peso húmedo total de los abulones), se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianzas de Levene. En el caso de los bioensayos 1 y 2, debido a que el número de muestra que se manejó fue pequeño ($n= 30$ y 3 individuos por muestreo, respectivamente) para las distintas observaciones y mediciones realizadas, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1981) para detectar diferencias significativas en los parámetros medidos (porcentaje de organismos anestesiados, distensión del pie, producción de moco, organismos aptos para injerto, tiempo de recuperación, sobrevivencia, índice glucídico, índice de mucopolisacáridos ácidos, índice de lipofuscinas, actividad enzimática, determinación de óxido nítrico y recuento de hemocitos) en función de los distintos tratamientos de anestesia (con 4 niveles) e injerto de manto (5 niveles). Esto se hizo para cada una de las muestras (pie, manto, branquias, glándula digestiva, gónada, hemolinfa y hemocitos) obtenidas y de manera independiente para cada uno de los tiempos (0.5, 1, 2 y 24 h para el bioensayo de anestesia y 0.5, 4, 24 y 48 h para el bioensayo de injerto). Según fue necesario, se aplicaron pruebas de comparación múltiple de medias de rangos para jerarquizar las diferencias detectadas. Los datos fueron analizados con el programa STATISTICA (versión 14.0, Stat Soft Inc., E.U.A.) y en todos los casos el nivel de significancia se fijó a $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Bioensayo 1: Efecto de los anestésicos

7.1.1 Análisis visual

El efecto de los anestésicos se comenzó a observar a los 10 min de exposición en los tratamientos benzocaína a 0.30 g L^{-1} (56.6 %) y CO_2 (46.6 %), los cuales fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a los tratamientos benzocaína 0.15 g L^{-1} , fenoxietanol 1.5 mL L^{-1} y eugenol en ambas concentraciones. A los 20 min de exposición, el porcentaje de organismos anestesiados en los tratamientos fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} , CO_2 y benzocaína en ambas concentraciones mostraron valores significativamente mayores ($P < 0.05$) al ser comparados con los tratamientos de eugenol (ambas concentraciones). Estadísticamente ($P < 0.05$), la misma tendencia anterior se observó a las 0.5 h, destacando que en todos los tratamientos mayores se obtuvieron el 100 % de los organismos anestesiados. Al finalizar el proceso de anestesia (45 min), los valores de organismos anestesiados en todos los tratamientos y concentraciones evaluadas no exhibieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos. La Fig. 1 muestra la evolución temporal del proceso de anestesia en los organismos de los diferentes tratamientos.

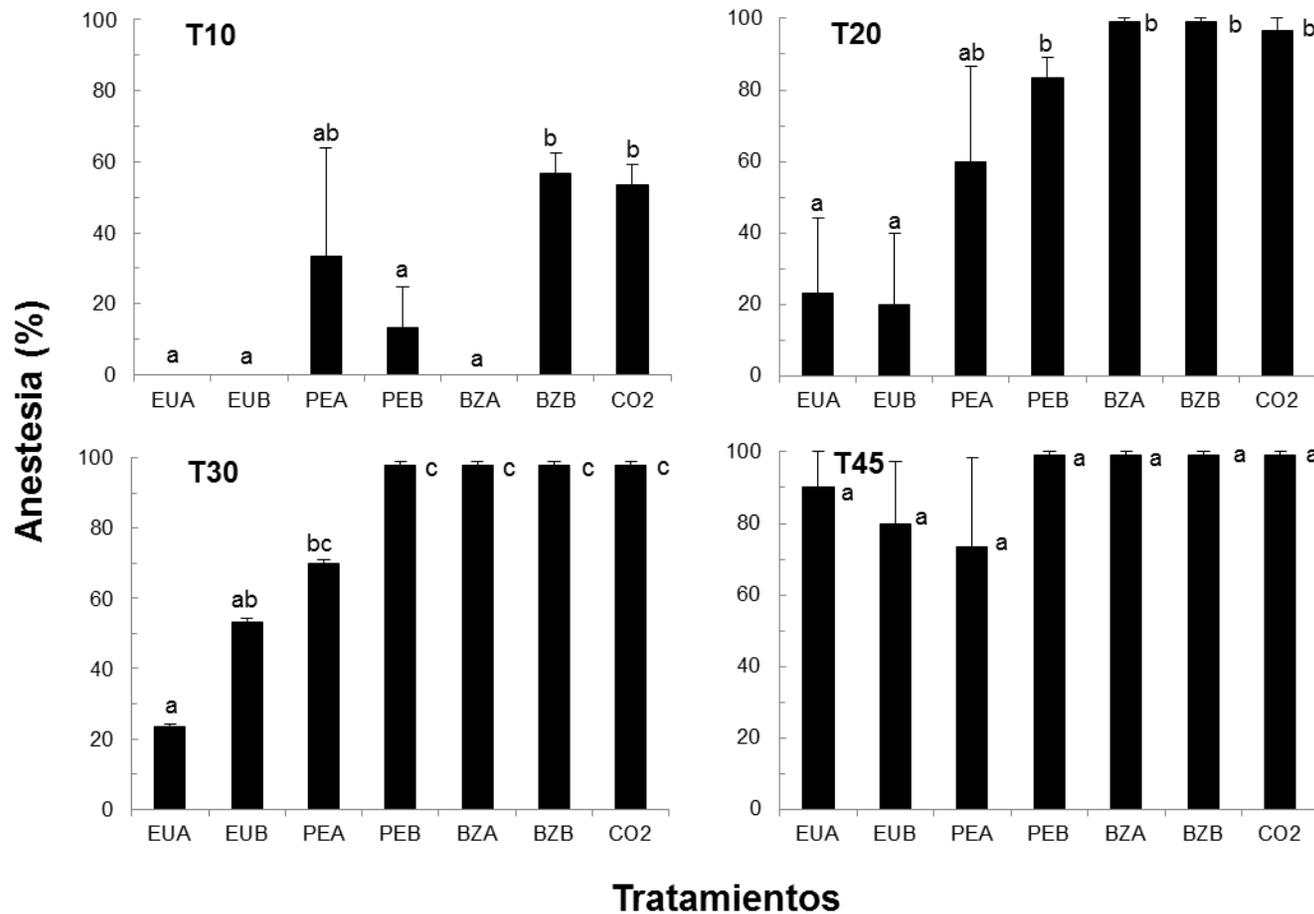


Figura 1. Variaciones temporales en los porcentajes de anestesia observados como respuesta visual al estímulo en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) sometido a distintos tipos y concentraciones de anestésicos. Tratamientos: EUA: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; EUB: Eugenol 0.15 mL L⁻¹; PEA: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 1.5 mL L⁻¹; BZA: Benzocaína 0.30 g L⁻¹; BZB: Benzocaína 0.15 g L⁻¹; CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± DE. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

Los tratamientos fenoxietanol 1.5 mL L⁻¹ y benzocaína en ambas concentraciones provocaron rigor del pie en las abulones a partir de los 10 min de exposición, siendo estos valores estadísticamente significativos (P<0.05) al ser comparados con el resto de los tratamientos; esta tendencia se mantuvo hasta finalizar los 45 min de exposición a los anestésicos. Es importante destacar que los abulones anestesiados con benzocaína en ambas concentraciones también manifestaron la reacción de rigor muscular en el 100 % de los organismos a partir de los 20 min de exposición. Por el contrario, al finalizar los 45 min, el pie de los abulones se mantuvo de normal a distendido en los tratamientos eugenol 0.15 mL L⁻¹ (100 %), eugenol 0.25 mL L⁻¹ (96.6 %), fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ (100 %) y CO₂ (100 %), cuyos valores fueron significativamente más altos (P<0.05) que el resto de los tratamientos.

Se observó irritación de los tejidos a través de la producción de moco, de manera moderada y excesiva en el tratamiento eugenol 0.25 mL L⁻¹ a lo largo de todo el tiempo de exposición a este anestésico. Los porcentajes de producción de moco en el tratamiento eugenol 0.25 mL L⁻¹ variaron de 33.3 % a 93.3 % al finalizar el proceso de anestesia; estos valores fueron significativamente más altos (P<0.05) al ser comparados con los demás tratamientos. En similar proporción (33.3% a 93.3%), se observó despigmentación de pie y epipodio en los abulones tratados con eugenol a ambas concentraciones. En una menor proporción, los organismos tratados con fenoxietanol 3 mL L⁻¹ (3.3 %) y eugenol 0.15 mL L⁻¹ (26.6 %) mostraron producción de moco. Por otra parte, ninguno de los tratamientos provocó desoves espontáneos de los abulones al finalizar el proceso de anestesia.

Los porcentajes de organismos que resultaron aptos para injerto fueron significativamente mayores (P<0.05) en los tratamientos de CO₂ (90 %), fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ (83.3 %) y eugenol 0.25 mL L⁻¹ (46.7 %). Por el contrario, no se obtuvieron organismos aptos para injerto en ninguna de las dos concentraciones de benzocaína y en eugenol 0.15 mL L⁻¹.

Los tiempos de recuperación de los abulones después de la anestesia fueron significativamente más rápidos (P< 0.05) con el tratamiento CO₂ (186.3 min, 100% recuperados) al ser comparado con fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ (220 min, 96.7 % recuperados) y eugenol 0.25 mL L⁻¹ (240 min, 76.7 % recuperados). En cuanto a la sobrevivencia de los animales a las 24 h, el tratamiento con el eugenol 0.25 mL L⁻¹ provocó mayores mortalidades (6.7 %) en comparación con el resto de los

tratamientos, no obstante, estas diferencias no fueron significativas. La Tabla 1 presenta un resumen de los principales criterios utilizados para evaluar el efecto de los anestésicos a nivel visual en el abulón rojo *H. rufescens*, con el fin de determinar su aptitud para operaciones de injerto y producción de perlas.

Tabla 1. Resumen del efecto visual de los diferentes anestésicos en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*). Se presentan los valores promedios \pm desviación estándar.

	Eugenol		Fenoxietanol		Benzocaína		CO ₂
	mL L ⁻¹		mL L ⁻¹		g L ⁻¹		
	0.15	0.25	1.5	3.0	0.15	0.30	Saturación
Pie relajado (% , 45 min)	100 ^b	96.7 \pm 5.7 ^b	66.7 \pm 5.8 ^a	100 ^b	NO	NO	100 ^b
Producción de moco (% , 45 min)	26.7 \pm 15.3 ^a	93.3 \pm 11.6 ^b	NO	NO	NO	NO	NO
Aptos para injerto (% , 45 min)	NO	46.7 \pm 32.2 ^{ab}	3.3 \pm 5.8 ^a	83.3 \pm 15.3 ^b	NO	NO	90.0 \pm 10.0 ^b
Organismos recuperados (%)	NR	76.7 \pm 11.6 ^a	100*	96.7 \pm 5.8 ^b	NR	NR	100 ^b
Tiempo de recuperación (min)	NR	240 ^b	75 \pm 15*	220 \pm 22.9 ^b	NR	NR	168.3 \pm 20.2 ^a
Sobrevivencia 24 h (%)	NR	93.3 \pm 5.8 ^a	100*	100 ^a	NR	NR	100 ^a

NR: Valores no registrados o no presentados por no observar organismos aptos para injerto. NO: No se observa el efecto evaluado o presenta el efecto opuesto. a, b: denota la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$). * Datos no incluidos en el análisis estadístico por presentar bajo porcentaje de organismos aptos para injerto.

7.1.2 Indicadores de respuesta fisiológica

7.1.2.1 Índice glucídico (IG)

En el músculo del pie, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el IG entre tratamientos y control en cada uno de los tiempos de evaluación posteriores a la exposición a los distintos anestésicos. La variación del IG en las branquias sólo fue significativamente más baja ($P < 0.05$) en los abulones expuestos al tratamiento con eugenol a 0.25 mL L^{-1} a 1 h, en comparación con los expuestos a fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2 (Fig. 2).

En la glándula digestiva, los valores de IG de los tratamientos con eugenol 0.25 mL L^{-1} y CO_2 fueron significativamente más bajos ($P < 0.05$) a los 0.5 h al ser comparados con el control y el fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} ; similar tendencia se registró en 1 h ($P < 0.05$), pero sólo con el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} (Fig. 2). Igualmente, el tratamiento eugenol 0.25 mL L^{-1} promovió valores significativamente menores ($P < 0.05$) de IG en la glándula digestiva, al ser comparado con CO_2 a las 2 h y con el control a las 24 h.

El IG en la gónada mostró valores significativamente más bajos ($P < 0.05$) en todos los tratamientos de anestesia a los 30 min al ser comparados con el control (Fig. 2). A las 2 h post-anestesia no se observaron diferencias significativas en los valores del IG entre tratamientos y el control. Sin embargo, a las 24 h, el eugenol 0.25 mL L^{-1} promovió valores significativamente más bajos ($P < 0.05$) de IG que el control y los demás tratamientos. En el manto, el tratamiento con CO_2 fue el único en el que se registraron valores significativamente más altos ($P < 0.05$) de IG, en comparación con el fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a las 2 y 24h.

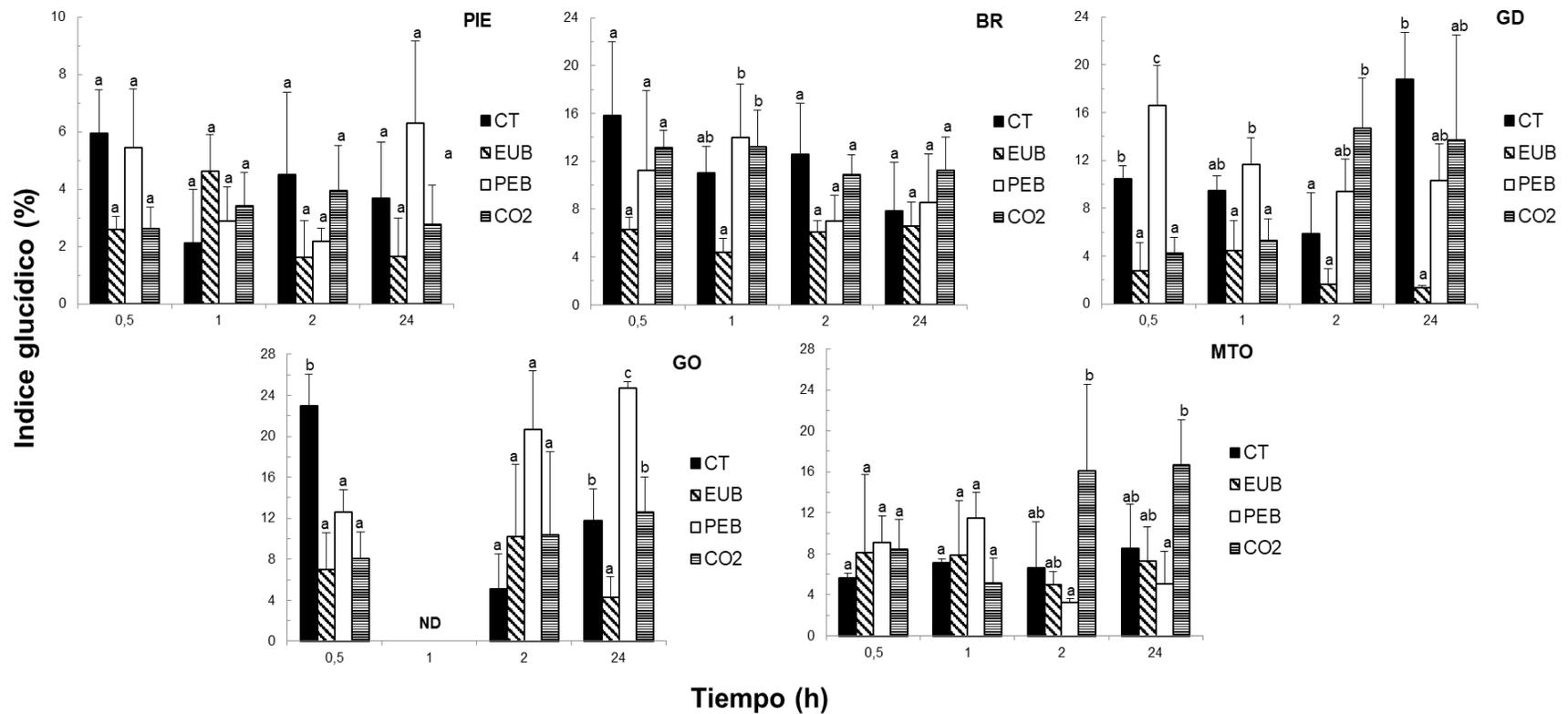


Figura 2. Variaciones temporales en el índice glucídico del abulón rojo (*Haliotis rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ±SD. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05). ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.

7.1.2.2 Índice de mucopolisacáridos ácidos (IMA)

En el pie, las variaciones en el IMA a los 30 min fueron significativamente más altas ($P < 0.05$) en los organismos anestesiados con eugenol 0.25 mL L^{-1} que en los restantes tratamientos y el control. De la misma manera, los valores del IMA fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a las 2 h en los abulones anestesiados con eugenol 0.25 mL L^{-1} , en comparación con el resto de los tratamientos; esta misma tendencia se mantuvo a las 24 h (Fig. 3).

En las branquias, el tratamiento con eugenol 0.25 mL L^{-1} y el control presentaron valores del IMA estadísticamente mayores ($P < 0.05$) que el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a los 30 min (Fig. 3). Esta misma tendencia estadística se observó a las 2 h, pero sólo entre los tratamientos con eugenol 0.25 mL L^{-1} y fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} . A las 24 h, el tratamiento con eugenol 0.25 mL L^{-1} registró un IMA significativamente más alto ($P < 0.05$) comparado al control y los demás tratamientos.

En la glándula digestiva, los valores del IMA fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) en los abulones expuestos a eugenol 0.25 mL L^{-1} al ser comparados con el control o el resto de los tratamientos a los 0.5, 1, 2 y 24 h durante la recuperación del proceso de anestesia (Fig. 3).

En los abulones anestesiados con eugenol 0.25 mL L^{-1} y CO_2 , el IMA en la gónada mostró valores significativamente más altos ($P < 0.05$) que el control y fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a los 30 min. A las 2 h, los valores del IMA en los tratamientos eugenol 0.25 mL L^{-1} y CO_2 fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) que con el fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} , no obstante, el tratamiento CO_2 no presentó diferencias con el control. El eugenol 0.25 mL L^{-1} promovió valores de IMA significativamente más altos ($P < 0.05$) al ser comparado con el control y los demás tratamientos a las 24 h.

Las variaciones en el IMA observadas en el manto no fueron significativas ($P > 0.05$) a los 0.5, 1 y 2 h en los abulones expuestos a los distintos anestésicos y el control. A las 24 h, el valor del IMA en el grupo control fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) que el tratamiento con CO_2 .

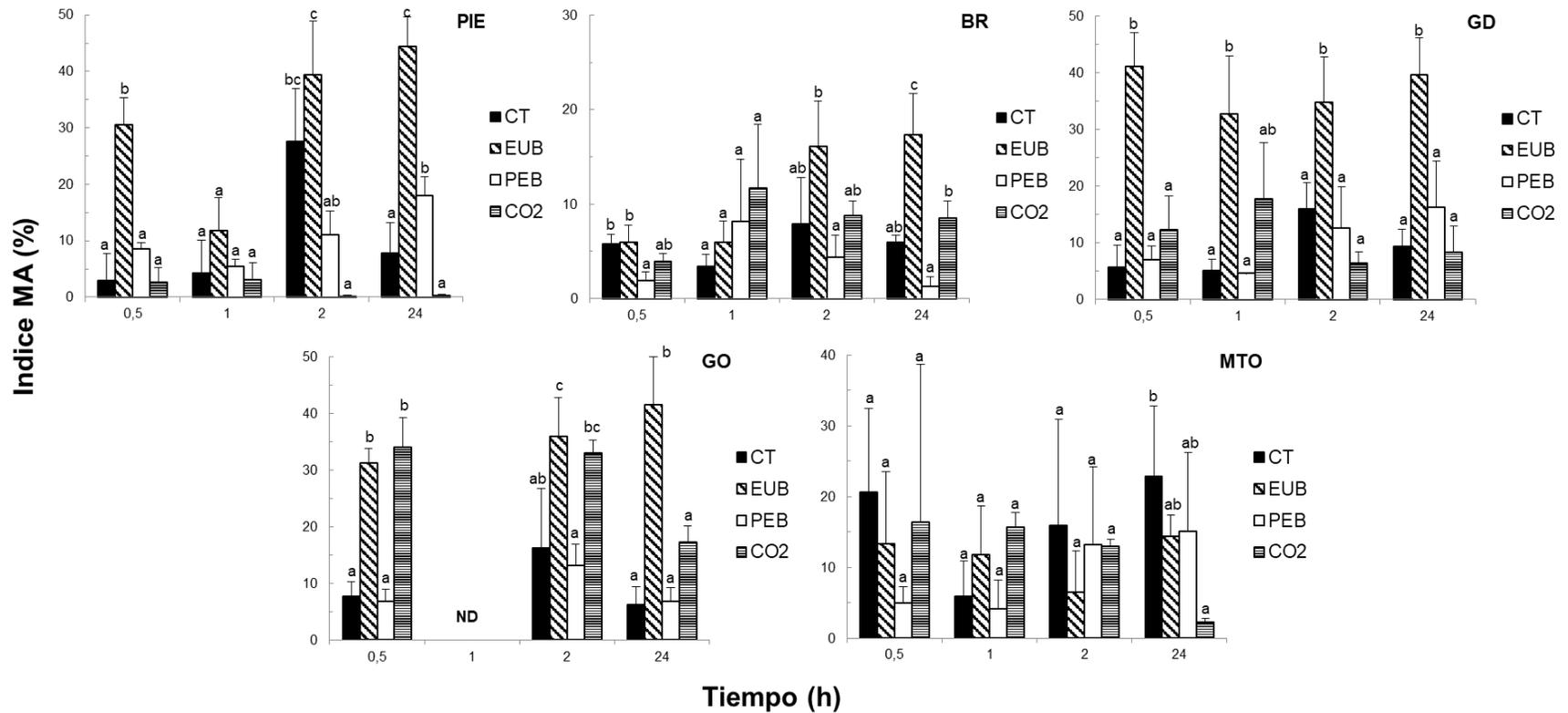


Figura 3. Variaciones temporales en el índice de mucopolisacáridos ácidos en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: tejido del manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ± DS. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos. ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.

7.1.2.3 Índice de Lipofuscina (ILF)

En el pie, las variaciones en el ILF a los 0.5 h fueron significativamente más altas ($P < 0.05$) en los organismos anestesiados con CO_2 al ser comparados con el control. De la misma manera, el tratamiento con CO_2 (24 h) mostró valores de ILF significativamente mayores ($P < 0.05$) al ser comparado con los abulones anestesiados con eugenol 0.25 mL L^{-1} . Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el ILF entre tratamientos a los tiempos 0.5, 1 y 2 h. La variación en el ILF en las branquias sólo fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en los abulones expuestos al tratamiento con CO_2 , en comparación con los demás tratamientos, pero no con el control en el tiempo de 30 min (Fig. 4).

El ILF en la glándula digestiva no mostró valores significativamente diferentes entre los tratamientos y el control a los 0.5 y 1 h posterior a la anestesia. No obstante, a las 2 h post-anestesia se observaron diferencias significativamente más altas ($P > 0.05$) en los valores del ILF, al comparar el control con los distintos tratamientos. A las 24 h, el tratamiento con CO_2 exhibió valores significativamente más altos ($P < 0.05$) de ILF que el control, pero no con respecto a los demás tratamientos (Fig. 4).

En la gónada, solo se observaron variaciones en el ILF significativamente mayores ($P < 0.05$) a los 0.5 h, al comparar el control con los organismos anestesiados con fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} . En el tejido del manto, las variaciones en el ILF no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguno de los tiempos de muestreo (Fig. 4).

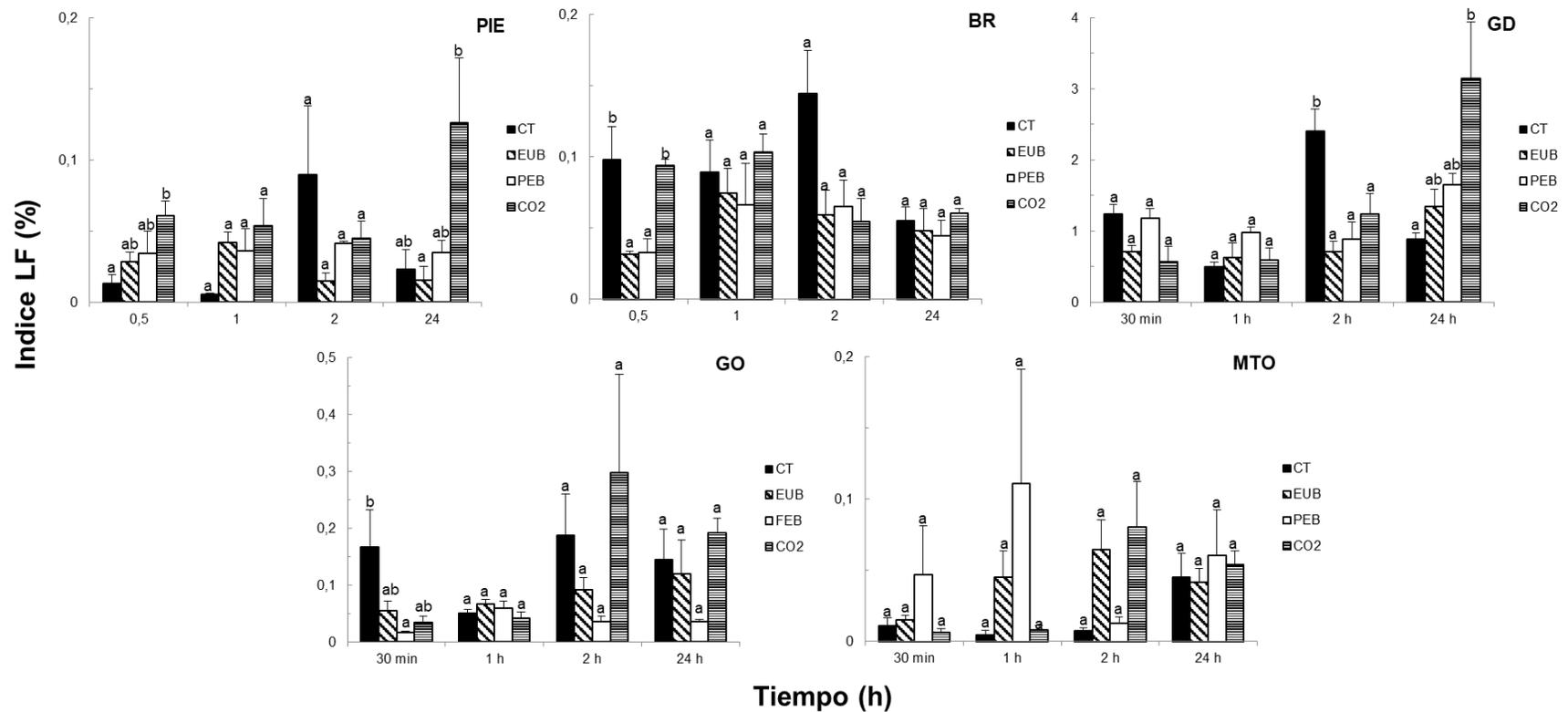


Figura 4. Variaciones temporales en el índice de lipofuscinas en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) posterior al proceso de anestesia en aquellos tratamientos con organismos aptos para injerto. PIE: músculo del pie; BR: branquias; GD: glándula digestiva; GO: gónada; MTO: tejido del manto. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹; CO2: CO₂ saturación y CT: control. Se presenta la media ± DS. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos. ND: datos no registrados en ese periodo de tiempo.

7.1.3 Indicadores de respuesta antioxidante

7.1.3.1 Concentración total de proteínas (TP)

La concentración TP en la fracción de hemolinfa libre de células (HLC) mostró valores significativamente mayores ($P < 0.05$) en el tratamiento con fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} con respecto al control y demás tratamientos a las 0.5, 1 y 24 h (Fig. 5A). En la fracción de hemocitos lisados (HL), solo se observaron valores de TP significativamente mayores ($P < 0.05$) en el control con respecto a fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a las 0.5 h y en el control con respecto a los restantes tratamientos a las 24 h ($P < 0.05$) (Fig. 5B).

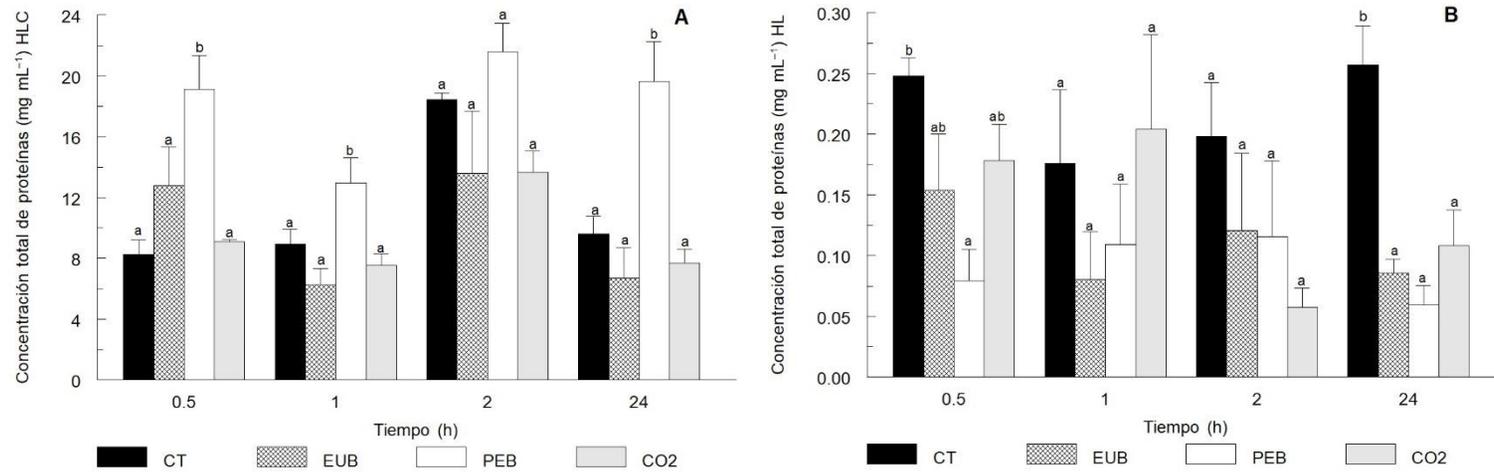


Figura 5. Variaciones temporales en la concentración total de proteínas en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

7.1.3.2 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD en la fracción de hemolinfa libre de células fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} en comparación con el control a las 0.5 h. Los tratamientos eugenol 0.25 mL L^{-1} , fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2 mostraron una actividad significativamente más alta ($P < 0.05$) de la SOD con respecto al control a 1 h. A las 2 h, la actividad de la SOD fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2 con respecto al control. Los valores de SOD no variaron significativamente ($P > 0.05$) entre tratamientos y el control a las 24 h (Fig. 6A).

En la fracción de hemocitos lisados, la actividad de la SOD fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento eugenol 0.25 mL L^{-1} que el control y el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a las 0.5 h. Aunque a la 1 h no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la SOD entre tratamientos y control ($P > 0.05$), los valores fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) a las 2 h en el control al compararlos con el resto de los tratamientos. A las 24 h, el porcentaje de inhibición de la SOD también fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el control que en los tratamientos fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2 , pero no se detectaron diferencias entre los tratamientos anestésicos (Fig. 6B).

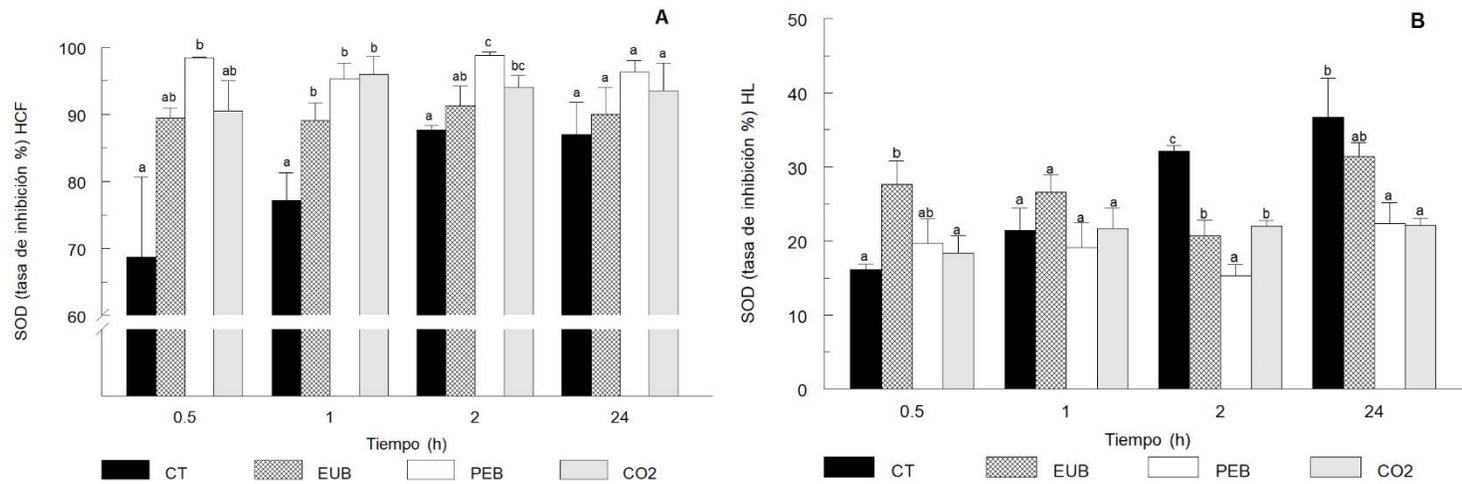


Figura 6. Variaciones temporales en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

7.1.3.3 Catalasa (CAT)

En la fracción de hemolinfa libre de células, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en la actividad de la CAT por efecto de la anestesia en los diferentes tiempos al comparar el control con los distintos tratamientos. No obstante, la actividad de esta enzima fue significativamente mayor ($P<0.05$) en el tratamiento eugenol 0.25 mL L^{-1} que en el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} a la 1, 2 y 24 h (Fig. 7A).

En la fracción de hemocitos lisados, la actividad de CAT fue significativamente más alta ($P<0.05$) en los tratamientos eugenol 0.25 mL L^{-1} y fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} en comparación con el control y CO_2 a la 1 h. A las 24 h, solo se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) entre el control y el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} (Fig. 7B).

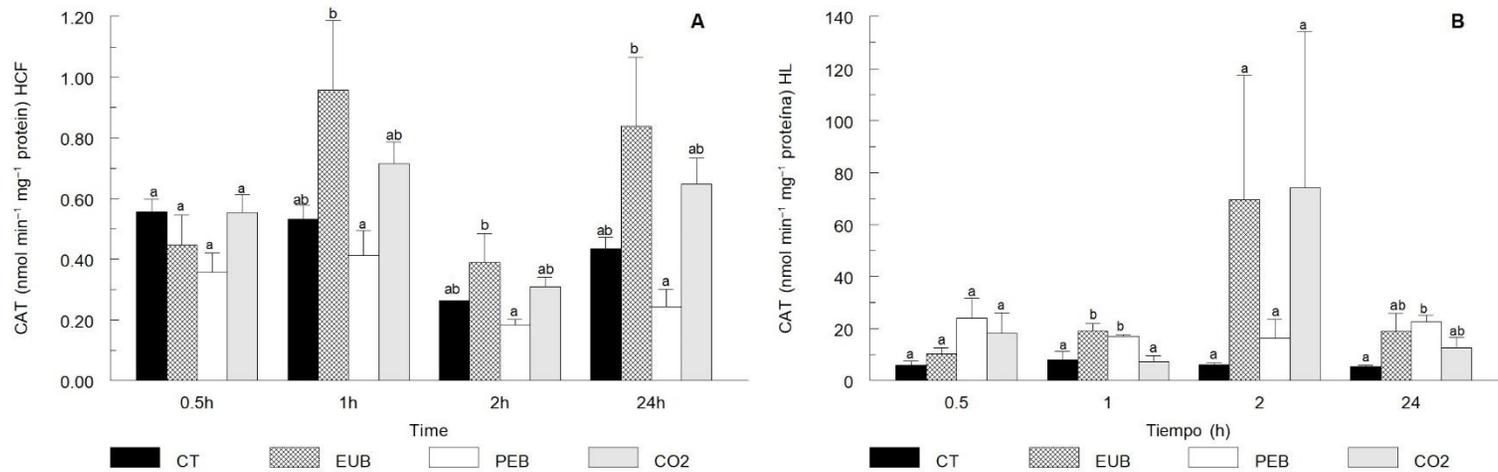


Figura 7. Variaciones temporales en la actividad enzimática de catalasa (CAT) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO₂: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0.05).

7.1.4 Indicadores de respuesta inmunitaria

7.1.4.1 Recuento total de hemocitos (RTH)

El RTH solo fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a las 2 h en el control con respecto al tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} . No obstante, todos los tratamientos siguieron una tendencia a disminuir el RTH en distintas proporciones, para luego estabilizarse o mostrar una recuperación a las 24 h (Fig. 8).

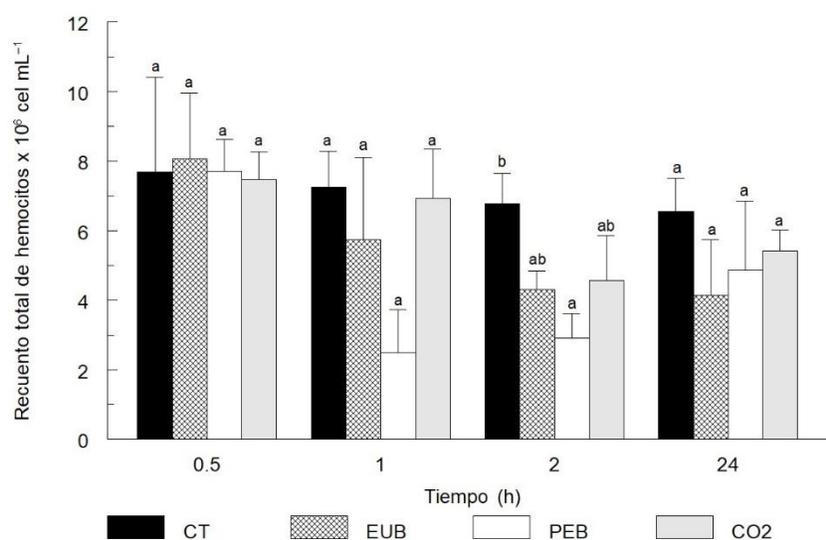


Figura 8. Variaciones temporales en el número de hemocitos en la hemolinfa de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) sometido a diferentes anestésicos. Tratamientos: EUB: Eugenol 0.25 mL L^{-1} ; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} ; CO2: CO_2 saturación y CT: Control. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.1.4.2 Mieloperoxidasa (MPO)

Los valores de la MPO en la fracción de hemolinfa libre de células fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) en el control al compararlos con los demás tratamientos a la 0.5 h. Por el contrario, la actividad de la MPO fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento eugenol 0.25 mL L⁻¹ que en el fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ a la 1, 2 y 24 h (Fig. 9A).

En la fracción de hemocitos lisados, la actividad de MPO solo presentó valores significativamente ($P < 0.05$) mayores en el tratamiento fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ en comparación con el control a las 24 h de finalizado el proceso de anestesia (Fig. 9B).

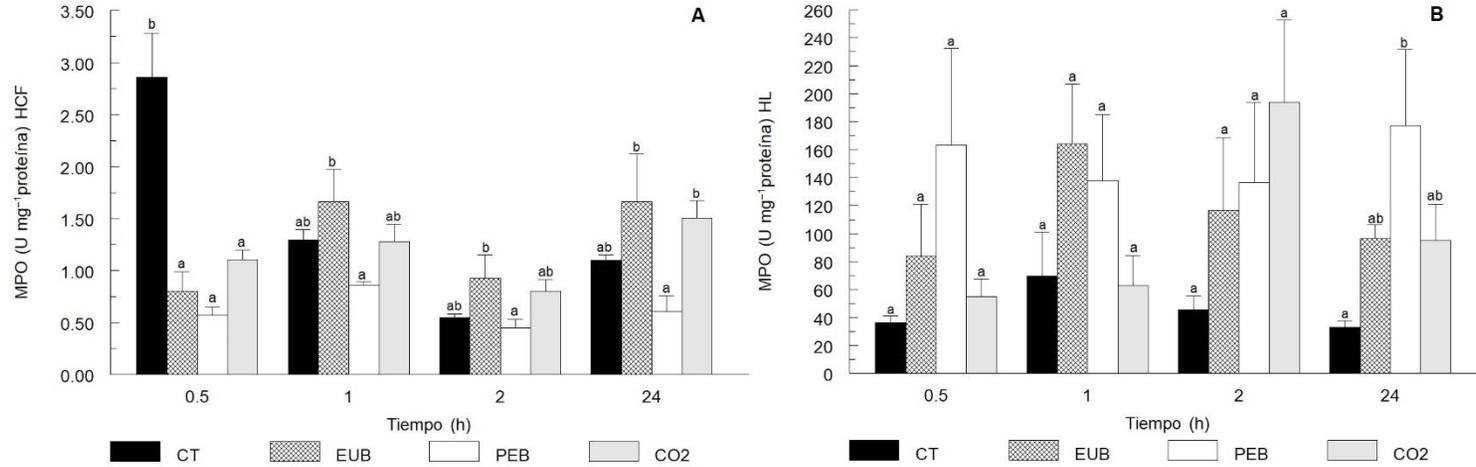


Figura 9. Variaciones temporales en la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en la hemolinfa libre de células(A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO2: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

7.1.4.3 Producción de óxido nítrico (ON)

La producción de ON en la fracción de hemolinfa libre de células no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos y el control a las 0.5 h. Sin embargo, a 1 h posterior a la anestesia la concentración de ON fue significativamente mayor ($P<0.05$) en el tratamiento fenoxietanol 0.30 mL L^{-1} al compararlo con los tratamientos eugenol 0.25 mL L^{-1} y CO_2 , pero no con respecto al control. A las 2 h, solo se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración de ON entre los tratamientos eugenol 0.25 mL L^{-1} y CO_2 . A las 24 h, la producción de ON fue significativamente más alta ($P<0.05$) en el control y fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} que en el tratamiento eugenol 0.25 mL L^{-1} (Fig. 10A).

En la fracción de hemocitos lisados, la concentración de ON solo fue significativamente mayor ($P<0.05$) a las 2 h posteriores a la anestesia en el control con respecto a los restantes tratamientos (Fig. 10B).

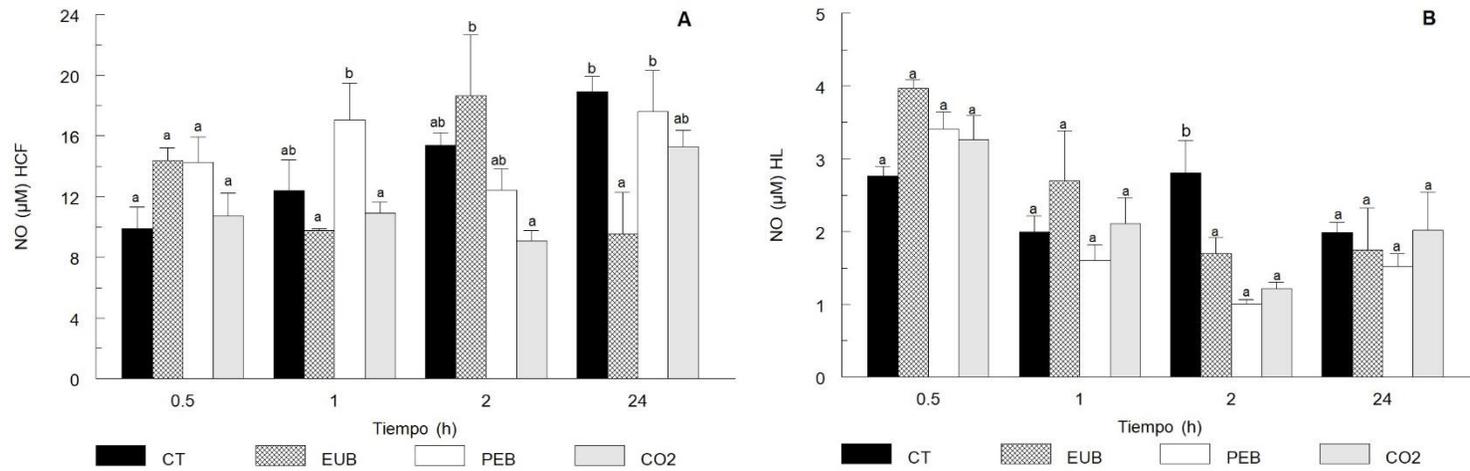


Figura 10. Variaciones temporales en la concentración de óxido nítrico (NO) en la hemolinfa libre células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Anestesia. Tratamientos: CT: Control; EUB: Eugenol 0.25 mL L⁻¹; PEB: Fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y CO₂: CO₂ saturación. Se presenta la media ± error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

7.2 Bioensayo 2: Efecto de la cirugía de injerto y origen del manto

7.2.1 Indicadores de respuesta antioxidante

7.2.1.1 Concentración total de proteínas (TP)

La concentración TP en la fracción de hemolinfa libre de células fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el control que en los demás tratamientos a las 4 h. A las 24 h, la concentración TP fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento aloinjerto (AL) al compararlo con el tratamiento anestesiados (AN). Finalmente, a las 2 y 48 h no se observaron variaciones estadísticamente significativas en la concentración TP entre tratamientos (Fig. 11A).

En la fracción de hemocitos lisados, las variaciones en la concentración total de proteínas no fueron significativas entre tratamientos y el control a lo largo de todos los tiempos de muestreo (Fig. 11B).

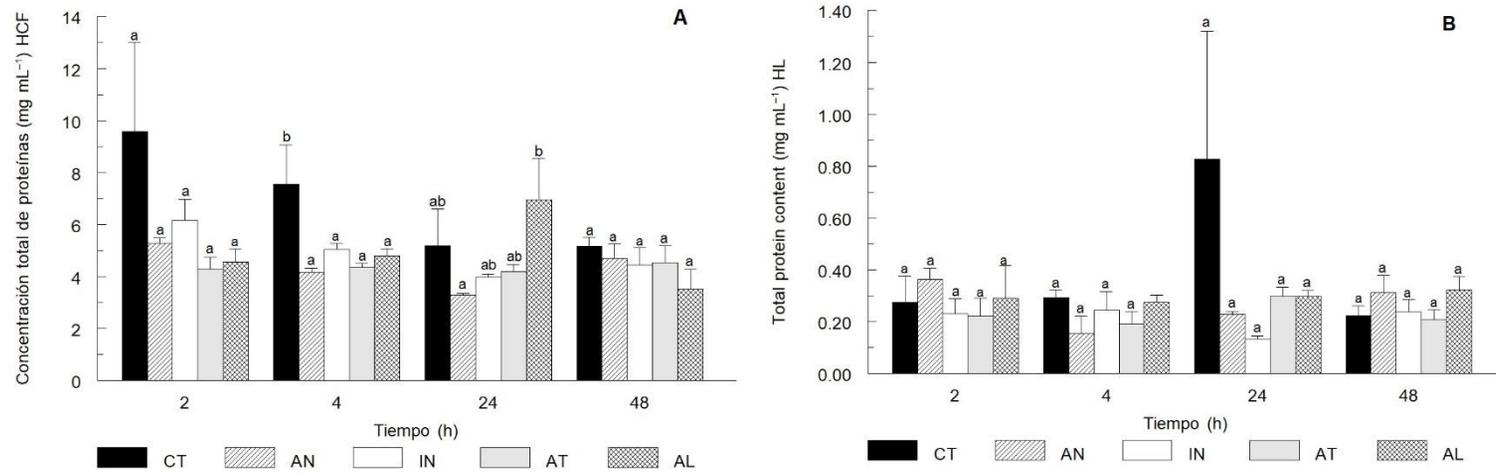


Figura 11. Variaciones temporales en la concentración total de proteínas en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.2.1.2 Superóxido dismutasa (SOD)

No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la tasa de inhibición de la SOD en la fracción de hemolinfa libre de células al comparar los tratamientos experimentales con el control a las 2, 4 y 24 h posteriores a la cirugía de injerto. Sin embargo, a las 48 h la actividad de la SOD fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en todos los tratamientos con respecto al control (Fig.12A).

En la fracción de hemocitos lisados no se observaron diferencias en la actividad de la SOD entre tratamientos y el control a las 2 h. A las 4 h, el control y el tratamiento aloinjerto (AL) presentaron valores de SOD significativamente mayores ($P < 0.05$) al ser comparado con el tratamiento anestesiados (AN). A las 24 h posterior al proceso de cirugía de injerto, el control y los tratamientos autoinjerto (AT) y aloinjerto (AL) mostraron valores estadísticamente mayores ($P < 0.05$) de SOD en comparación con los tratamientos anestesiados (AN) e incisión (IN). No se observaron diferencias entre tratamientos y el control a las 48 h (Fig. 12B).

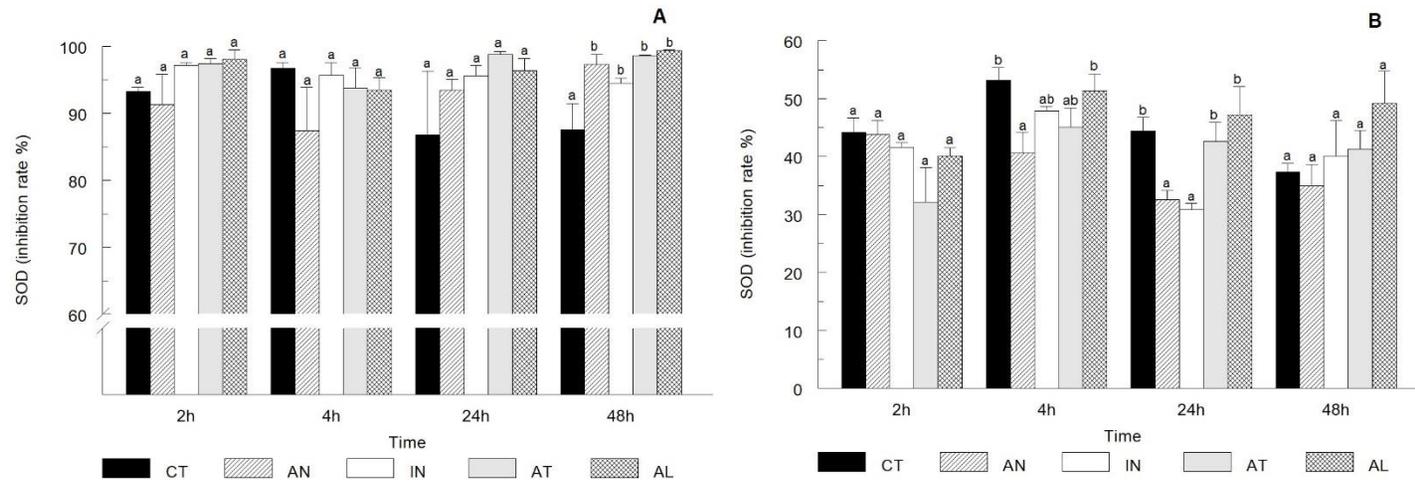


Figura 12. Variaciones temporales en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.2.1.3 Catalasa (CAT)

En la hemolinfa libre de células, la actividad de la CAT fue significativamente menor ($P < 0.05$) en el tratamiento autoinjerto que en el aloinjerto a las 2 h posteriores a la cirugía de injerto. La misma tendencia se observó a las 4 h, pero esta vez el tratamiento aloinjerto presentó valores de CAT significativamente mayores ($P < 0.05$) que en el control y los demás tratamientos. A las 24 y 48 h, la actividad de CAT fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en el tratamiento autoinjerto en comparación con el control y los otros tratamientos (Fig. 13A).

En los hemocitos lisados, solo se observaron variaciones significativas ($P < 0.05$) en la actividad de CAT entre el control y los demás tratamientos a las 24 h (Fig. 13B).

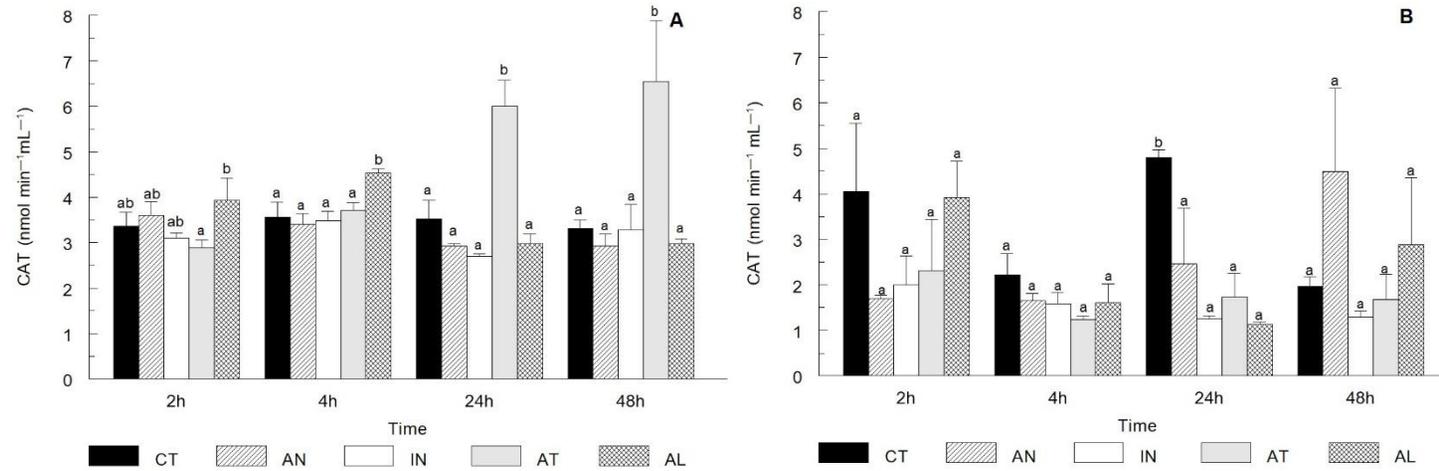


Figura 13. Variaciones temporales en la actividad enzimática de catalasa (CAT) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.2.2 Indicadores de respuesta inmunitaria

7.2.2.1 Recuento total de hemocitos (RTH)

Las variaciones en el número de hemocitos no fueron significativas ($P>0.05$) al comparar el control con los restantes tratamientos a la 2 h. No obstante, a las 4 h las diferencias en el número de hemocitos fueron significativamente más altas ($P<0.05$) en el tratamiento incisión al compararlo con el control y los tratamientos anestesiados y aloinjerto. También a las 4 h, el conteo de hemocitos fue significativamente mayor ($P<0.05$) en los tratamientos autoinjerto y aloinjerto que, en el tratamiento anestesiados, pero fueron similares al control (Fig. 14). Las variaciones en el recuento de hemocitos fueron significativamente menores ($P>0.05$) a las 24 h en los organismos anestesiados que en aquellos que recibieron un autoinjerto. A las 48 h, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en el conteo de hemocitos entre tratamientos y el control (Fig. 14).

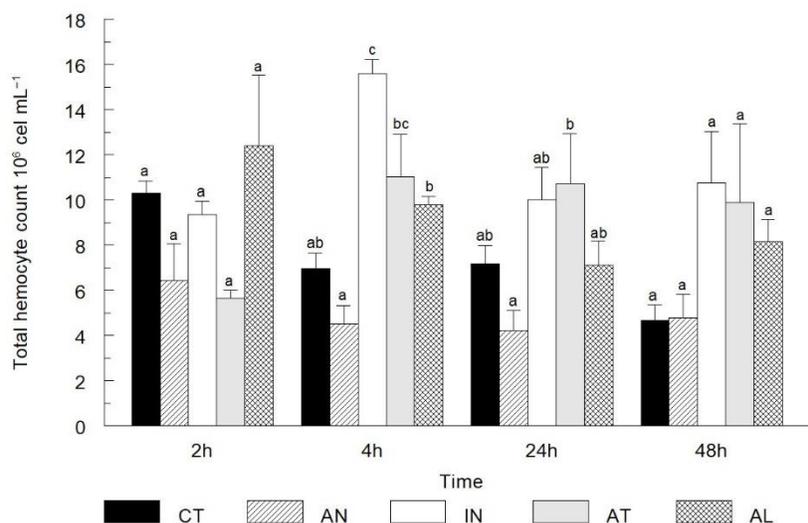


Figura 14. Variaciones temporales en el número de hemocitos en la hemolinfa de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto (manto propio); AL: Aloinjerto (manto donado misma especie) y CT: Control. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$).

7.2.2.2 Mieloperoxidasa (MPO)

La actividad de MPO en la hemolinfa libre de células fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en los organismos con un aloinjerto que en los del control y los demás tratamientos a las 4 y 24 h posteriores al injerto. La misma tendencia se observó a las 48 h, pero esta vez las diferencias solo fueron significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento aloinjerto y el control (Fig. 15A).

En los hemocitos lisados, la actividad de MPO fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a las 4 y 48 h en el tratamiento aloinjerto en comparación con el control y los otros tratamientos. A las 24 h, los tratamientos incisión y aloinjerto registraron una actividad significativamente mayor ($P < 0.05$) de MPO que el control y el tratamiento anestesiados (Fig. 15B).

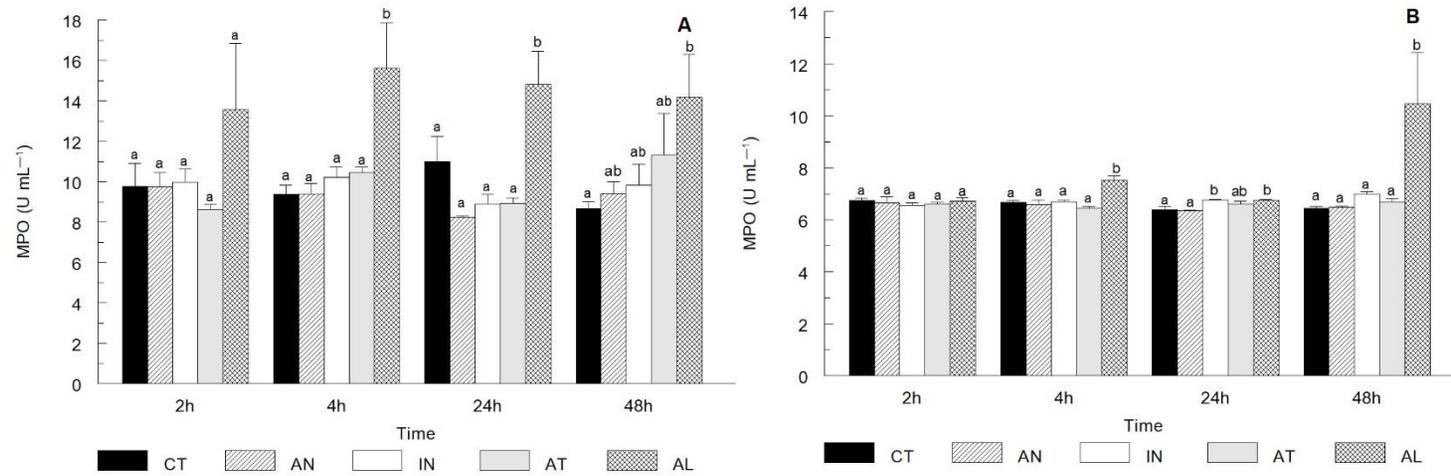


Figura 15. Variaciones temporales en la actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en la hemolinfa libre de células (A) y hemocitos lisados (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.2.2.3 Óxido nítrico (ON)

En la hemolinfa libre de células, la concentración de ON no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos y el control a la 2 h. No obstante, a las 4 y 24 h los valores de ON se incrementaron significativamente ($P<0.05$) en los organismos que recibieron un aloinjerto en comparación con el control y los demás tratamientos. No se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos y el control a las 48 h posteriores a la cirugía de injerto (Fig. 16A).

En los hemocitos lisados, no se observaron variaciones significativas ($P>0.05$) en la concentración de ON entre tratamientos en ninguno de los tiempos de muestreos (Fig. 16B).

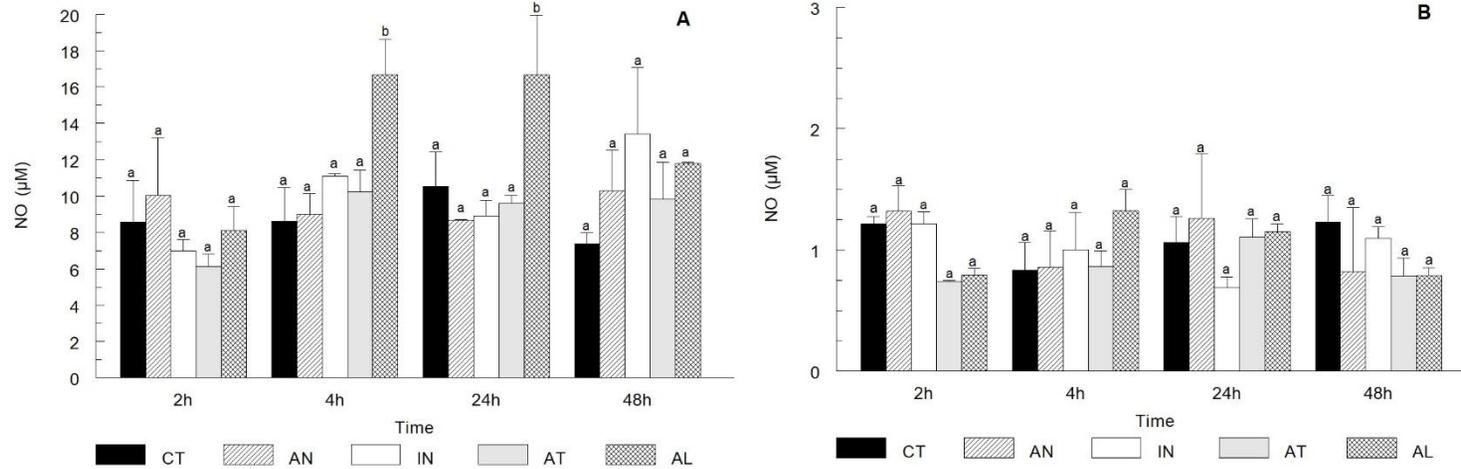


Figura 16. Variaciones temporales en la concentración de óxido nítrico (NO) en la hemolinfa (A) y hemocitos (B) de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en el Bioensayo de Injerto. Tratamientos: CT: Control; AN: Anestesiados; IN: Incisión; AT: Autoinjerto y AL: Aloinjerto. Se presenta la media \pm error estándar. Las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Bioensayo 1: Efecto de los anestésicos

8.1.1 Efecto visual

Las diferencias observadas en el presente ensayo en los tiempos de anestesia y recuperación de *H. rufescens* sometidos a diferentes tipos y concentraciones de anestésicos, comparados con los existentes en la literatura (White et al., 1996; Aquilina y Roberts, 2000; Burke et al., 2001; Bilbao et al., 2010), obedecen principalmente al propósito y criterio para establecer que un organismo esté anestesiado completamente. Por ejemplo, una regla común para establecer que los abulones están anestesiados, es la pérdida de la capacidad de mantenerse adheridos con el músculo del pie a una superficie (White et al., 1996; Aquilina y Roberts, 2000 y Bilbao et al., 2010). Este criterio es útil cuando el propósito es el manejo en el cultivo (reducir densidad, selección por tallas etc.), pero no para actividades de perlicultivo donde se requiere un efecto más profundo del anestésico que permita una distensión del músculo del pie y el epipodio para acceder fácilmente a la zona de injerto sin estresar a los organismos. Esta narcotización más profunda a nivel celular (neuronal) (Ramlochansingh et al., 2014; Stanley et al., 2020) sin duda se refleja en un mayor tiempo de recuperación y riesgos de mortalidades.

El análisis realizado hasta ahora para evaluar el efecto de los anestésicos en los organismos a nivel visual revela con claridad que los abulones respondieron de diferente manera a cada anestésico y concentración utilizada. Por ejemplo, la benzocaína actuó más rápidamente como anestésico, y en un rango de 20 a 30 min, todos los organismos estuvieron completamente anestesiados en ambas concentraciones (0.15 y 0.30 g L⁻¹), por lo que resulta efectivo en primera instancia. En una ventana de tiempo similar, se logró el mismo efecto anestésico con la benzocaína en la ostra perlera *Pt. penguin*, pero exponiendo a los organismos a una concentración mayor de 1.20 g L⁻¹ (Kishore et al., 2022). En cuanto al efecto anestésico de la benzocaína, puede existir cierta proporcionalidad con los resultados obtenidos por Aquilina y Roberts (2000) con el abulón *Haliotis iris*, quienes utilizaron una concentración de 0.10 g L⁻¹ de la misma sustancia y observaron que el 100 % de los organismos fueron anestesiados a los 43 min. Estos resultados son consistentes con los descritos para *H. rufescens* en este estudio, relacionados a la contracción y

endurecimiento del pie y epipodio, así como una sobrevivencia del 100 % (Aquilina y Roberts, 2000). Caso contrario ocurrió para la concentración 0.30 g L^{-1} de benzocaína, donde la sobrevivencia de los organismos se redujo al 96.7% a las 24 h. De forma consistente, la contracción y encogimiento del pie también ha sido un efecto secundario resultante del uso de la benzocaína a 0.1 g L^{-1} en otras especies de abulón, como *H. rubra* y *H. laevigata* (Burke et al., 2001), así como en el caracol *Lobatus gigas* (Acosta-Salmon y Davis, 2007). El efecto observado en este estudio con ambas concentraciones de benzocaína se tradujo en que no se obtuvieron organismos aptos para injerto debido a la dificultad de acceder a la zona de injerto.

El uso fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} es recomendado para actividades de cultivo de algunas especies de abulón como *H. midae*, logrando anestésiar bien a los organismos para desprenderlos de las paredes de los estanques en 2.9 min, así como favoreciendo su recuperación en 46 min sin casos de mortalidad (White et al., 1996). Con fines de perlicultivo, el análisis visual de este estudio demuestra que el fenoxietanol a 3.0 mL L^{-1} logra anestésiar el 100 % de los organismos a los 30 min, siendo un 83.3 % aptos para cirugía de injerto; posteriormente, un 96.7% de ellos se recupera a los 220 min sin casos de mortalidad. Comparativamente, la ostra perlera *P. maxima* expuesta a la misma concentración de fenoxietanol mostró también indicadores satisfactorios para injerto, como una alta proporción de ostras anestesiadas (96.3%) en un tiempo de 13.8 min y una recuperación en 2 h sin mortalidades (Mamangkey et al., 2009).

Algunos efectos secundarios no deseados asociados a la anestesia, como el rigor del pie, fueron observados también en la concentración más baja de fenoxietanol (1.5 mL L^{-1}), presentando una alta proporción (70%) de abulones en esta condición en los primeros 10 min, la cual fue disminuyendo al finalizar los 45 min de exposición al anestésico (33 %). El uso de fenoxietanol a esta concentración también se tradujo en solo un 3.3% de los organismos aptos para la cirugía de injerto. Efectos similares de contracción muscular han sido reportados en la ostra de roca (*Saccostrea gigas*) utilizando concentraciones de 3.0 mL L^{-1} de fenoxietanol (Acosta-Salmon et al., 2007). Contrariamente, una dosis 3.0 mL L^{-1} de fenoxietanol fue inefectiva para anestésiar adecuadamente la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) utilizada para fines de perlicultivo y provocó un colapso del manto (Torres-Martínez et al., 2012). En un escenario diferente, una menor concentración de fenoxietanol (1.0 mL L^{-1}) fue exitosa en el proceso de

anestesia y recuperación de la misma especie (Torres-Martínez et al., 2012), lo que resalta la importancia de la dosis óptima de anestésico en diferentes especies de moluscos.

El eugenol es un anestésico ampliamente utilizado en organismos acuícolas, como peces (Oliveira et al., 2019; He et al., 2019; Ferreira et al., 2021), moluscos (Granados et al., 2018; Yang et al., 2020) y crustáceos (Perrot-Minnot, 2021; Saydmohammed y Pal, 2009), variando ampliamente la concentración efectiva y sus respuestas entre diferentes especies (Pawar et al., 2011; Mohammadi and Khara, 2015). En *H. rufescens*, el eugenol fue un efectivo anestésico en ambas concentraciones (0.15 y 0.25 mL L⁻¹), alcanzando una proporción de 90 y 80% de organismos anestesiados, respectivamente en 45 min. No obstante, solo el tratamiento con eugenol a 0.25 mL L⁻¹ logró un 46.7% de organismos aptos para cirugía de injerto. Contrariamente, una dosis de aceite de clavo (principio activo eugenol) de 0.1 y 0.3 mL L⁻¹ resultó poco efectiva para anestesiarse adultos de *H. tuberculata coccinea* en un periodo de 30 min (Bilbao et al., 2010). En este estudio, la dosis de eugenol 0.25 mL L⁻¹ promovió valores discretos de organismos anestesiados (53.3 %) a los 0.5 h, y no fue hasta los 45 min que actuó con mayor eficacia. Estos resultados sugieren que el tiempo de exposición es complementario a la dosis utilizada para que el anestésico logre actuar adecuadamente. Mayores concentraciones de aceite de clavo (entre 0.5 y 1.5 mL L⁻¹) han sido efectivas para anestesiarse ejemplares de *H. laevigata* y *H. rubra* (Burke et al., 2001) y una concentración de 0.5 mL L⁻¹ es recomendada para *H. tuberculata coccinea* (Bilbao et al., 2010).

Un efecto adverso observado en *H. rufescens* al utilizar eugenol como anestésico fue la irritación de los tejidos a través de la producción de moco en una proporción de 26.6 % (0.15 mL L⁻¹) a 93.3% (0.25 mL L⁻¹). Igualmente, la despigmentación de tejidos blandos (pie y epipodio) fue otro efecto secundario que ocurrió en un (33.3 a 93.3%) de los organismos al utilizar eugenol en ambas concentraciones, así como la recuperación lenta de la anestesia (≥ 240 min) y mortalidades a las 24 h (6.7% en dosis de 0.25 mL L⁻¹). Estos efectos adversos fueron también reportados previamente para *H. rufescens* (SozaChinchilla, 2014) y son similares a los observados en *H. laevigata* y *H. rubra*, reportando exceso de producción de moco, mayor tiempo de recuperación y altas mortalidades (Burke et al., 2001). Evidencias de altas mortalidades también se reportan en la ostra perlera *P. maxima* anestesiada con eugenol previo a la cirugía de injerto (Mamangkey et al., 2009). Para el caso de abulones tratados con eugenol, se puede señalar que un mayor

tiempo de exposición (cuando se requiere sedación profunda) incrementa significativamente las posibilidades de producir efectos adversos. En este estudio el tiempo de exposición empleado fue de 45 min y en el trabajo de Burke et al. (2001) de 1 h.

El uso de gas CO₂ como anestésico no es una práctica muy difundida en organismos marinos, aunque ofrece una manera confiable y relativamente económica para la anestesia de los organismos (Cooper, 2011). Sin embargo, la disolución de CO₂ en el agua de mar resulta en una disminución del pH, con el consiguiente aumento de la acidez (Cooper, 2011). Previamente, el uso de CO₂ en *H. rufescens* produjo una disminución del pH de 8.4 a 5.1 en el agua de mar (Rojas-Figueroa, obs. pers.). El dióxido de carbono se puede burbujear desde un cilindro a través del agua en un recipiente adecuado (generalmente un frasco de vidrio o plástico) y esto tiene la ventaja de cierto control sobre la concentración (Summerfelt y Smith, 1990; Pirhonen y Shreck, 2003). En este estudio, la utilización de CO₂ mediante burbujeo para anestesiar *H. rufescens* fue muy eficiente y resultó en una alta proporción de organismos anestesiados a los 20 min (96.7 %) y del 100 % a los 45 min (Fig. 1). También se obtuvo una alta proporción de organismos aptos para injerto (90%), así como un 100% de organismos recuperados a los 168 min y sin mortalidades (Tabla 2). De manera similar, los reportes de Soza-Chinchilla (2014) con el abulón japonés *H. discus hannai* incluyen la anestesia de los organismos a los 40 min y su recuperación a los 30 min sin registro de mortalidades. Macroscópicamente, no se observaron efectos adversos en los organismos con el uso de CO₂. De la misma manera, estudios con la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) demuestran que posterior a la anestesia con CO₂, los organismos recuperan sus hábitos alimenticios con normalidad a los 4 h (Pirhonen y Shreck, 2003). Actualmente, no existen antecedentes del uso de CO₂ en otras especies de moluscos productores de perlas, pero sin duda estos resultados ponen a disposición una nueva alternativa para el manejo de los organismos en la etapa pre-operatoria de la cirugía de injerto.

8.1.2 Respuesta fisiológica

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa en vertebrados e invertebrados y es la sustancia clave para el metabolismo y para el sustento energético de los procesos de crecimiento, reproducción y desarrollo (Sun et al., 2023). En ese sentido, el índice glucídico (IG) resulta en un

indicador confiable de movilización de energía entre tejidos como respuesta al estrés por la presencia de ciertos agentes estresores, como los anestésicos utilizados en el perlicultivo (Granados-Amores et al., 2017). En este estudio, el IG mostró una disminución consistente en los organismos anestesiados con eugenol 0.25 mL L^{-1} , al ser comparados con el control y los otros tratamientos. Esto sugiere que la exposición al eugenol es estresante para *H. rufescens* durante la anestesia y recuperación, y conlleva, una respuesta fisiológica energéticamente más costosa para hacer frente a los efectos adversos observados visualmente (e.g. despigmentación de pie y epipodio, recuperación más lenta y altas mortalidades), en comparación con el control y los otros tratamientos. Este patrón por el uso de eugenol incluso derivó en diferencias significativas en el IG a los 30 min y 24 h en tejidos como la glándula digestiva y gónada. De manera similar, esto fue observado en la ostra perlera *Pt. sterna* anestesiada con eugenol a 0.5 mL L^{-1} (Granados-Amores et al., 2017). Por otro lado, al comparar las variaciones del IG en organismos expuestos a eugenol con respecto a los tratamientos fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2 y el control sugieren que la movilización de energía para cubrir las necesidades fisiológicas como defensa contra agentes estresores (Sokolova, 2013), ocurre de manera menos severa en los últimos dos tratamientos, reestableciéndose los niveles de IG más rápidamente.

La producción de moco por irritación de tejidos en *H. rufescens*, expresado como índice de mucopolisacáridos ácidos (IMA), se incrementó significativamente en el tratamiento eugenol 0.25 mL L^{-1} , en comparación con el control y los otros tratamientos (fenoxietanol 3.0 mL L^{-1} y CO_2). Esto fue particularmente evidente en músculo del pie, glándula digestiva y gónada y resultó concordante con la observación visual de producción de moco (en el proceso de anestesia) en una proporción de 93.3% en el músculo del pie. Adicionalmente, este resultado deja en evidencia que la exposición al eugenol afecta internamente a otros tejidos blandos en esta especie de abulón. Estas mismas observaciones fueron reportadas previamente para otras especies de moluscos, como los abulones *H. discus hannai* (Soza-Chinchilla, 2014), *H. laevigata* y *H. rubra* (Burke et al., 2001), así como en la ostra perlera *P. maxima* (Mamangkey et al., 2009).

Las lipofuscinas, también conocidas como pigmentos del envejecimiento (Höhn et al., 2010), son un conglomerado altamente oxidado de proteínas (30-70%) y lípidos (20-50%) (Double et al., 2008). Otra característica de las lipofuscinas es su acumulación intracelular gradual en tejidos

como la gónada, glándula digestiva y branquias (Jung et al., 2007), lo cual es detectable con técnicas histoquímicas y de fluorescencia (Terman et al., 2010). La acumulación de estos metabolitos está relacionado a la actividad celular o desgaste celular (Gandahi et al., 2023), así como también a factores estresores que producen un incremento en las especies reactivas de oxígeno o ROS (Rogers et al., 2023). De acuerdo a los resultados del presente estudio, el ILF no mostró una tendencia significativa de incremento en los organismos que fueron expuestos a los diferentes agentes anestésicos con respecto al control. Solo de manera puntual, en el tratamiento con CO₂ se observaron diferencias significativas comparadas con el control, en el músculo del pie y glándula digestiva a los 0.5 y 24 h, respectivamente, esto implica que no existe un daño oxidativo en el corto plazo por efecto de los anestésicos, o que los mecanismos de reparación del daño a lípidos y proteínas por efecto de las especies reactivas de oxígeno están actuando en forma eficiente. De manera similar, el proceso de anestesia de la ostra perlera *Pt. sterna* no provocó variaciones significativas en el ILF (manto y branquias) de los organismos del grupo control con respecto a aquellos sometidos a diferentes concentraciones de agentes anestésicos (Granados et al., 2017). Por otro lado, la exposición a metales pesados (cadmio) durante tres semanas provocaron un incremento significativo en la acumulación de lipofuscinas en branquias y glándula digestiva del mejillón *Modiolus modiolus* (Dovzhenko et al., 2005). Lo mismo ocurrió en el mejillón (*Villosa iris*) expuesto a iones de cloruro y potasio por un periodo de tiempo de 61 días (Rogers et al., 2023). Estos resultados sugieren que la ventana de tiempo que se utilizó en el presente estudio para exponer a los abulones a diferentes anestésicos (45 min), no fue suficiente para observar la acumulación de lipofuscinas como consecuencia del estrés generado.

8.1.3 Respuesta antioxidante

El contenido total de proteínas en la fracción de hemolinfa libre de células mostró un aumento significativo en los abulones expuestos a fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ en casi todos los tiempos de muestreos, a diferencia de los tratamientos con eugenol 0.25 mL L⁻¹ y CO₂ que mantuvieron valores similares al control durante todo el proceso de recuperación de la anestesia. Este patrón no se observó en la fracción de hemocitos lisados, donde las diferencias en el contenido total de proteínas entre los tratamientos y el control no fueron significativas. En general, el uso de anestésicos puede causar hipoxia de moderada a severa (Ross & Ross, 1984; Hur et al., 2019),

como se reportó en abulón azul (*H. fulgens*) expuesto a 1 mL L⁻¹ de fenoxietanol durante 10 min; en esta especie, la hipoxia debida a la anestesia causó una disminución de la frecuencia respiratoria, que luego aumentó rápidamente durante la fase de recuperación hasta 2 h (Chacón et al., 2003). La exposición de *H. fulgens* a estrés por hipoxia de hasta 1,0 mg O₂ L⁻¹ también provocó que el contenido de proteínas en la hemolinfa aumentara durante la fase de recuperación en condiciones normales de oxígeno (7,8 mg O₂ L⁻¹) (Calderón-Liévanos et al., 2021). Partiendo de la base de que el estrés por hipoxia es un efecto secundario de la anestesia que puede afectar al contenido proteico durante la fase de recuperación, nuestros resultados ofrecen una posible explicación del mayor contenido proteico en la HCF en el abalón anestesiado con fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹. También es probable que el fenoxietanol actúe más severamente sobre el sistema nervioso central de *H. rufescens* que el eugenol y el CO₂, reduciendo su tasa respiratoria (hipoxia) y causando un mayor contenido de proteínas durante la etapa de recuperación. Además, se ha sugerido que el fenoxietanol se une competitivamente al N-metil-D-aspartato (NMDA), un receptor del ácido glutámico (Musshoff et al., 1999) que causa depresión del sistema nervioso central e hipoxia (Chacon et al., 2023).

Se sabe que algunos anestésicos pueden modificar la actividad antioxidante en peces (Gressler et al., 2012) y moluscos (Granados-Amores et al., 2018), particularmente de las enzimas SOD (Wang et al., 2018) y CAT (Almeida et al., 2007; Jaganac et al., 2022). Los anestésicos utilizados en este estudio provocaron un aumento significativo de la actividad SOD en la fracción de hemolinfa libre de células entre los 30 min y 2 h, lo que sugiere una activación de esta enzima a nivel sistémico. Es importante señalar que los abulones del grupo de control fueron desprendidos de las paredes del tanque de cultivo utilizando una espátula en cada muestreo, y este procedimiento podría haber sido un estresor que generó un aumento de la actividad antioxidante (SOD). En cambio, el uso de la espátula no fue necesario en los tratamientos experimentales entre los 30 min y 2 h porque los abulones no estaban completamente recuperados de los efectos de la anestesia. En concordancia con estos hallazgos, el proceso de anestesia con cloruro de magnesio de la ostra de roca (*S. glomerata*) provocó un aumento significativo del contenido de anión superóxido (sustrato de la SOD) en la hemolinfa libre de células durante la fase de recuperación (48 h), volviendo a valores similares a los de control a las 96 h (Butt et al., 2008). Del mismo modo, la actividad de la

SOD también aumentó significativamente en el músculo aductor de la ostra perlera (*Pt. sterna*) tras la anestesia con benzocaína, eugenol y fenoxietanol hasta las 65 h (Granados-Amores et al., 2018). Con base en estos resultados, parece claro que algunos anestésicos pueden inducir cambios sistémicos en la actividad de la SOD, y que la intensidad y el tiempo en que se manifiestan estos cambios, dependen de la especie, del anestésico, de la dosis y del tiempo de exposición.

La actividad de la CAT no varió significativamente entre los tratamientos anestésicos y el control en la hemolinfa, y en la fracción de hemocitos lisados, observándose diferencias solo a 1 h (eugenol 0.25 mL L⁻¹ y fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ > que el control) y 24 h (fenoxietanol 0.30 mL L⁻¹ > que el control). Estos patrones sugieren que eugenol, fenoxietanol y CO₂ no afectaron severamente la actividad de esta enzima a nivel sistémico y celular en *H. rufescens*. Consistentemente, la actividad de la CAT no varió significativamente en el músculo aductor y el tejido del manto de la ostra perlera (*Pt. sterna*) durante la recuperación después de la exposición al eugenol y la benzocaína en la preparación para la cirugía de injerto (Granados-Amores et al., 2018). Si la CAT elimina el H₂O₂ cuando sus niveles superan los 10 µmol L⁻¹ (Vosloo et al., 2013), podemos suponer entonces que el aumento de la actividad de la SOD en respuesta a la anestesia no se reflejó en una producción excesiva de H₂O₂ como sustrato para la CAT. Además, es probable que otras enzimas antioxidantes como el glutatión y la glutatión peroxidasa (Lushchak, 2014) y metales de transición no enzimáticos como la reacción de Fenton (Holmblad y Söderhäll, 1999) podrían estar actuando sobre el H₂O₂ para reducir sus niveles. Los resultados de este estudio con la SOD en particular sugieren una respuesta antioxidante a corto plazo (0,5 h a 2 h) en *H. rufescens* durante el proceso de recuperación de la anestesia, así como una respuesta antioxidante a mediano plazo (24 h) para restaurar la actividad a niveles similares a los de control sin consecuencias fisiológicas. Esta tendencia no fue observada para el caso de la CAT.

8.1.4 Respuesta inmunológica

El uso de anestésicos no afectó en gran medida el recuento total de hemocitos en *H. rufescens*, aunque la exposición a fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ en particular sí provocó un patrón de disminución del RTH (1 y 2 h) en comparación con el control. En general, se acepta que los cambios en el RTH pueden reflejar el estado fisiológico de los organismos (Shen et al., 2019), aunque todavía no está

claro si este indicador aumenta o disminuye bajo diferentes condiciones de estrés, como la hipoxia, la temperatura, la salinidad y los ataques de patógenos (Cheng et al., 2004; Wang et al., 2012). Además, hay pocos estudios que aborden la relación entre la anestesia y el conteo de hemocitos, por lo que los efectos reales de algunos anestésicos a nivel fisiológico se desconocen o pueden ser contradictorios. Esto se debe a que la acción de los anestésicos es específica de cada especie y también depende de la dosis, el tiempo de exposición y la etapa de desarrollo de la especie objetivo, entre otros factores. Por ejemplo, el uso de fenoxietanol a 0.2 mL L^{-1} causó una reducción en el porcentaje del hematocrito de la trucha arco iris (*O. mykiss*) (Iwama et al., 1989), lo que puede indicar un grado de anemia debido al bajo número de glóbulos rojos. Por el contrario, la ostra de roca (*S. glomerata*) experimenta primero un aumento significativo del número de hemocitos durante la recuperación de la anestesia (24 h) con cloruro de magnesio (50 g L^{-1}) y luego se estabiliza para volver a valores similares a los de control después de 48 h (Butt et al., 2008). Con base en estos resultados, así como en los datos de este estudio, es evidente que los anestésicos evaluados no tuvieron un efecto significativo a nivel sistémico en el RTH en organismos adultos de *H. rufescens*, con la excepción del fenoxietanol. Por lo tanto, estos resultados indican el uso seguro de algunos anestésicos en *H. rufescens*.

La enzima MPO está relacionada con el sistema inmunitario de los organismos (Garagiola et al., 2016) y es clave como parte de su respuesta inflamatoria (Pattison et al., 2009). En el presente estudio no se observaron cambios significativos en la actividad MPO en la fracción de hemolinfa libre de células (30 min a 2 h) y en los hemocitos lisados (30 min a 24 h), lo que sugiere que las concentraciones de anestésicos utilizadas y/o el tiempo de exposición, no provocaron una respuesta inmunitaria o inflamatoria a nivel sistémico en *H. rufescens*. Dado que la MPO requiere como sustrato el H_2O_2 producido por la SOD (Niki, 2016), se puede inferir que en esta especie de abulón no se cumplieron las condiciones o elementos necesarios para generar variaciones en la actividad de la MPO a corto plazo, con los anestésicos y dosis seleccionadas. De manera congruente con estos resultados, la actividad de la MPO en neutrófilos renales de la carpa cabezona (*Pimephales promelas*) tampoco se vio afectada durante el proceso de recuperación de la anestesia con eugenol a 30 mg L^{-1} (Palić et al., 2006). Sin embargo, la actividad de otras enzimas relacionadas a la respuesta inmunitaria, expresada como las variaciones en la fosfatasa ácida,

aumentó en la ostra de roca (*S. glomerata*) durante el proceso de recuperación (respuesta a corto plazo a 48 h) de la anestesia con cloruro de magnesio (50 g L^{-1}) y luego volvió a niveles similares a los de control (96 h) (Butt et al., 2008). De la misma manera, otros parámetros de respuesta inmunitaria, como la tasa de fagocitosis y actividad antimicrobiana, han sido evaluados en abulones híbridos (*H. rubra* x *H. laevigata*) anestesiados con benzocaína (0.07 mg mL^{-1}), observando un incremento en estos parámetros a los 50 min, los cuales posteriormente se reestablecieron dentro de las 24 h siguientes (Hooper et al., 2011). Comparando estos resultados con los datos del presente estudio, parece claro que no existe una respuesta inmunitaria sistémica en adultos de *H. rufescens* por efecto de los anestésicos eugenol, fenoxietanol y CO_2 en la dosis y tiempo de exposición utilizados.

El óxido nítrico (ON) se difunde a través de la membrana celular (Nikki, 2016) y regula numerosos procesos fisiológicos, cardiovasculares, inflamatorios y neuronales (Jaffrey, 2018), incluyendo el control de patógenos (Comesaña et al., 2012). En *H. rufescens* no observamos cambios significativos en la concentración del óxido nítrico, tanto en la hemolinfa libre de células, como en los hemocitos lisados entre los diferentes tratamientos de anestésicos y el control. Desafortunadamente, no existe mucha información sobre el efecto de los anestésicos en la respuesta inmunitaria de los invertebrados marinos, y en el caso particular del óxido nítrico, esta información es escasa, contradictoria y solo está disponible para ciertos grupos de organismos. En la tilapia del Nilo (*O. niloticus*), por ejemplo, Zahran et al. (2021) reportaron de que el anestésico propofol protegía las células endoteliales (cultivadas *in vitro*) de los daños causados por la acumulación de ROS (H_2O_2), aumentando así la producción de óxido nítrico (Wang et al., 2007). La producción de esta sustancia también aumentó significativamente en los hemocitos de la almeja *Ruditapes decussatus* tras la exposición al patógeno *Vibrio tapetis* (Tafalla et al., 2003). Sin embargo, la evidencia de este estudio indica que ninguno de los anestésicos evaluados (eugenol, fenoxietanol y CO_2) afectaron la concentración de ON a nivel sistémico, al menos en la dosis y tiempo de exposición seleccionados. Se requiere evaluar otras enzimas relacionadas con el sistema inmunitario de *H. rufescens* (e.g. fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, lisozima) para confirmar estos resultados.

8.2 Bioensayo 2: Efecto de la cirugía de injerto (autoinjerto y aloinjerto)

8.2.1 Respuesta antioxidante

En general, las variaciones en el contenido total de proteínas en la hemolinfa libre de células no se vieron afectadas por ninguno de los tratamientos evaluados, y aunque si se observó una diferencia en los valores de este indicador entre los organismos que recibieron un aloinjerto y los que solo fueron anestesiados (AL > AN), los valores en ambos casos fueron estadísticamente similares a las del control. Este mismo patrón se mantuvo en la fracción de hemocitos lisados, lo que sugiere que el origen del manto no afectó este indicador en el proceso de injerto en *H. rufescens* a lo largo del tiempo evaluado.

La actividad de la enzima SOD solo varió significativamente en la hemolinfa a las 48 h como respuesta de largo plazo de los organismos, siendo el incremento en el porcentaje de inhibición mayor en todos los tratamientos experimentales con respecto al control. En el caso de los hemocitos lisados, los valores fueron similares entre tratamientos y el control. Contrario a estos resultados, Granados-Amores et al. (2024) reportaron una disminución significativa en la actividad de la SOD en la gónada y glándula digestiva de la ostra perlera (*Pt. sterna*) injertada con autoinjertos y aloinjertos entre las 3 a 9 h. Por otra parte, en la almeja de agua dulce (*Hyriopsis cumingii* Lea) sometida a cirugía de aloinjerto, se observó un incremento en la actividad de la SOD a partir del 5to hasta el 10mo día (Li et al., 2010). La comparación de estos resultados no solo confirma que los patrones de respuesta antioxidante en los moluscos son específicos de cada especie, sino que también refleja las posibles diferencias fisiológicas que existen entre moluscos bivalvos sésiles (ostras perleras) y moluscos gasterópodos móviles (abulón). Con *H. rufescens* en particular, las variaciones en la actividad de la SOD sugieren dos posibles explicaciones: (1) la enzima actúa de manera eficiente en una ventana de tiempo entre las 4 a 24 h, y a partir de las 48 h, el efecto estresor de los diferentes tratamientos de injerto provoca un incremento en su actividad para contrarrestar la producción del anión superóxido; (2) de manera similar a lo observado en el bioensayo de anestesia, la forma de desprender a los abulones (tratamiento control) de las paredes del estanque usando una espátula (en cada muestreo) puede ser también un estresor para los organismos, lo cual incrementa los niveles de SOD desde el inicio e

invisibilizan las reales diferencias en la actividad antioxidante de esta enzima entre control y tratamientos.

En el bioensayo injerto observamos dos patrones opuestos en la actividad de la CAT que están relacionadas con el origen del manto. Primero, hubo un incremento significativo en la actividad de la CAT en los organismos que recibieron un aloinjerto a las 2 h (aloinjerto > autoinjerto) y 4 h (aloinjerto > control y otros tratamientos). Segundo, la actividad de la CAT fue significativamente mayor en el tratamiento autoinjerto que en el control y los demás tratamientos, entre las 24 y 48 h. Dado que existen a la fecha pocos estudios que relacionen la actividad antioxidante y el origen del manto (aloinjerto y autoinjerto) con los procesos de injerto en moluscos productores de perlas, no es posible establecer un patrón claro para esta enzima. Por ejemplo, se registró también un incremento en la actividad de la CAT en la gónada de la ostra perlera *Pt. sterna* en el rango de tiempo de 9 a 12h en el tratamiento aloinjerto comparado con, autoinjerto, pero no se observó un patrón inverso (autoinjerto > aloinjerto) a partir de las 24 h (Granados-Amores et al., 2024). A su vez, se ha observado en la ostra perlera *Akoya (P. fucata)* un incremento en la capacidad antioxidante total de los organismos desde 1 a 13 días posteriores a la colocación de un autoinjerto, aloinjerto y un xenoinjerto proveniente de *P. máxima* y *P. margaritifera*, indicando que se produjo una gran cantidad de radicales libres de oxígeno para acomodar el manto injertado sin importar que este fuese de la misma u otra especie de ostra perlera (Wei et al., 2017). En *H. rufescens*, asumimos que la reacción más rápida en el incremento de la actividad de la CAT en el tratamiento aloinjerto fue provocada por el manto donado sin importar que éste fuera de la misma especie, bajo la hipótesis de una posible incompatibilidad biológica que activó la respuesta antioxidante. No obstante, esta respuesta fue solo transitoria y posteriormente los abulones se recuperaron y la actividad de la CAT volvió a valores similares a los del control. En el caso del tratamiento autoinjerto, los cambios en la actividad de la CAT pueden estar asociados a un efecto estresor acumulativo como resultado de la doble incisión para retirar un trozo de manto y luego la incisión durante la cirugía de injerto.

8.2.2 Respuesta inmunológica

Claramente, las variaciones en el conteo total de hemocitos solo fueron significativas entre el tratamiento incisión y el control a las 4 h. No obstante, a partir de las 4 hasta las 48 h el conteo promedio de hemocitos en los tratamientos (incisión, autoinjerto y aloinjerto) que se les realizó una incisión en la pared abdominal, fueron mayores que el control, pero esas diferencias no se reflejaron en términos estadísticos. En cuanto a las variaciones en el número de hemocitos, estudios en la ostra perlera *P. fucata* reportan que posterior al proceso de cirugía de injerto sigue una rápida acumulación de hemocitos en el sitio de la herida y posteriormente el trozo de manto injertado, también es cubierto por capas de hemocitos (Awaji y Suzuki, 1995; Awaji y Machii, 2011). De la misma manera, las observaciones histológicas realizadas en *P. margaritifera* demuestran una intensa reacción de infiltración de hemocitos (24 h) en los tejidos de la ostra «receptora», incluyendo el tejido conectivo de la glándula digestiva y gónadas que además son zonas por las que pasan las herramientas de injerto, manto y el núcleo que provocan laceraciones en los tejidos (Cochennec-Laureau et al., 2010). Por lo tanto, concordante con los resultados de este estudio, esta respuesta modulada ligeramente a un incremento del número de hemocitos circulantes está asociada a los requerimientos de los abulones para llevar a cabo procesos de cicatrización de heridas y la reacción al injerto de un trozo de manto en la cavidad abdominal.

El origen del manto afectó la actividad de la MPO en *H. rufescens* y se observó un incremento en este indicador en el tratamiento aloinjerto (4 a 48 h) al compararlo con el control y demás tratamientos en la fracción de hemolinfa libre de células. A su vez, se ha observado en la ostra perlera *P. fucata* el incremento de indicadores de respuesta inmunitaria como la fosfatasa ácida (1 a 13 días) y alcalina (4 a 11 días) posterior a la cirugía de autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto (manto donado de otra especie) (Wei et al., 2017). En la almeja de agua dulce (*Hyriopsis cumingii* Lea), se reportó un patrón similar de incremento de la fosfatasa ácida a partir de las 24 h hasta los 10 días posteriores a la cirugía de aloinjerto (Li et al., 2010). Los resultados de este estudio, sugieren una respuesta inmunitaria mayor en el tratamiento aloinjerto, el cual reconoce y responde al recibir material biológico de otro abulón donador (pero de la misma especie) pero no produce una falla sistémica en los abulones que comprometa la sobrevivencia porque no se observaron mortalidades en el tratamiento aloinjerto y en ninguno en particular.

En el bioensayo de injerto se observó claramente una mayor concentración ON en el tratamiento de aloinjerto al compararlos con el grupo control y demás tratamientos (4 h y 24 h). Esta mayor generación de ON sugiere que es la respuesta de los organismos al injerto de una pieza de manto proveniente de un donador, que activa el sistema inmunológico, pero de manera transitoria porque los abulones son capaces de retornar a niveles similares al control dentro de las 48 h. El rechazo del injerto debido a la incompatibilidad inmunológica en aloinjerto es un fenómeno común en el cultivo de perlas, que a menudo causa la muerte de la ostra huésped (Wu et al., 2017), sin embargo, nuestros resultados en abulones muestran una mayor tolerancia inmunitaria al aloinjerto.

Los resultados de este estudio sugieren que la respuesta antioxidante e inmunitaria de *H. rufescens* fue transitoria durante la fase de recuperación de la anestesia y se restableció después de 24 h. Por lo tanto, los anestésicos en las dosis y tiempo de exposición fueron tolerados satisfactoriamente por los abulones. De la misma manera, la respuesta antioxidante e inmunitaria a nivel sistémico por el efecto combinado del proceso de anestesia y de la cirugía de injerto no fue muy severa en esta especie de abulón dentro de las 48 h e independientemente del origen del manto. Esto demuestra que *H. rufescens* es una especie resistente que tolera bien ambos procesos, por lo que se puede utilizar bien para la producción de perlas considerando los protocolos desarrollados en este estudio.

9. CONCLUSIONES

- La evaluación visual de *H. rufescens* expuesto a diferentes anestésicos indicó que la mayor proporción de organismos aptos para injerto se obtuvo, en orden decreciente, con CO₂, fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y eugenol 0.25 mL L⁻¹.
- Por sus efectos adversos, no se recomienda utilizar la benzocaína (provoca rigor del pie) y eugenol (ocasiona mortalidades y exceso de producción de moco) como anestésicos para fines de cultivo de perlas en *H. rufescens*.
- Durante el proceso de recuperación de la anestesia los indicadores fisiológicos, índice glucídico y de mucopolisacáridos ácidos, disminuyó e incrementó respectivamente, en la gónada, glándula digestiva y músculo del pie al utilizar eugenol 0.25 mL L⁻¹ como anestésico.
- La concentración de total proteínas incrementó al usar fenoxietanol 3.0 mL L⁻¹ y se mantuvo hasta las 24 h; en cambio la actividad de la SOD (en todos los anestésicos) incrementó transitoriamente y los organismos regresaron a valores similares a los del control después de 24 h.
- Los indicadores de respuesta inmunitaria evaluados en los abulones aptos para cirugía de injerto no se vieron afectados por ninguno de los anestésicos utilizados (eugenol 0.25 mL L⁻¹, fenoxietanol 0.30 mL L⁻¹ y CO₂) durante el proceso de recuperación.
- El origen del manto (aloinjerto o autoinjerto) provocó un aumento en la actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT durante el proceso de recuperación de la cirugía de injerto de *H. rufescens*.
- La actividad de la mieloperoxidasa y la producción de óxido nítrico incrementaron en los organismos que recibieron un aloinjerto en comparación con los que recibieron un autoinjerto, por lo tanto, el origen del manto produjo cambios en la respuesta inmunitaria.
- La respuesta inmunitaria observada en el tratamiento aloinjerto no desencadenó una falla sistémica o colapso de los organismos porque no se registraron mortalidades.
- La evidencia histoquímica, fisiológica, antioxidante e inmunológica indica que *H. rufescens* es un organismo resistente a los procesos de anestesia e injerto y se recomienda utilizar CO₂ como anestésico y colocar un aloinjerto para fines de producción de perlas.

10. LITERATURA CITADA

- Acosta-Salmón, H. y Rangel-Dávalos, C. (1997). Benzocaine (ethyl-p-aminobenzoate) as anesthetic for surgical implantation of nucleus in the pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851). World Aquaculture'97 Book of Abstracts, Seattle, WA, USA, Feb 19-23. World Aquaculture Society, Baton Rouge LA, USA, p. 3.
- Acosta-Salmón, H., Martínez Fernández, E. y Southgate, P. (2005). Use of relaxants to obtain saibo tissue from the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) and the akoya pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Aquaculture*, 246(1-4): 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.010>
- Acosta-Salmón, H. y Southgate, P. (2005a). Mantle regeneration in the pearl oysters *Pinctada fucata* and *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*, 246(1-4): 447-453. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.027>
- Acosta-Salmón, H. y Southgate, P. (2005b). Histological changes in the gonad of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* Linnaeus, 1758) during the reproductive season in north Queensland Australia. *Molluscan Research*, 25: 71-74.
- Acosta-Salmón, H. y Davis, M. (2007). Inducing relaxation in the queen conch *Strombus gigas* (L.) for cultured pearl production. *Aquaculture*, 262(1): 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.032>
- Aquilina, B. y Roberts, R. (2000). A method for inducing muscle relaxation in the abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture*, 190(3-4): 403-408. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00410-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00410-5)
- Araya, R., Saucedo, P.E., Maturana, J. y Rojas-Figueroa, A. (2020) Method for producing free pearls in abalone. WIPO International Patent No. WO 2016/183695 A.
- Arhem, P., Klement, G. y Nilsson, J. (2003) Mechanisms of anesthesia: towards integrating network, cellular, and molecular level modeling. *Neuropsychopharmacology*, 28: S40-S47. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300142>
- Arnaud-Haond, S., Goyard, E., Vonau, V., Herbaut, C., Prou, J. y Saulnier, D. (2007). Pearl formation: Persistence of the graft during the entire process of biomineralization. *Marine Biotechnology*, 9: 113-116. <https://doi.org/10.1007/s10126-006-6033-5>
- Awaji, M. y Suzuki, T. (1995). The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster. *Fisheries Science*, 61(5): 747-751. <https://doi.org/10.2331/fishsci.61.747>.
- Awaji, M. y Machii, A. (2011). Fundamental studies on *in vivo* and *in vitro* pearl-formation contribution of outer epithelial cells of pearl oyster mantle and pearl sacs. *Aqua-BioScience Monographs*, 4 (1): 1-39. <https://doi.org/10.5047/absm.2011.00401.0001>
- Barik, S., Jena, J. y Janaki-Ram, K. (2004). CaCO₃ crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel. *Current Science*, 86: 1-10
- Beninger, P., Le Pennec, G. y Le Pennec M. (2003). Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus*. *Biological Bulletin*, 205: 83-92. <https://doi.org/10.2307/1543448>
- Bilbao, A., Courtois, G., Del Pino, M., Sosa, B., Fernández, H. y Hernández, M. (2010). Efficiency of clove oil as anesthetic for abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve). *Journal of Shellfish Research*, 29 (3): 679-682. <https://doi.org/10.2983/035.029.0318>
- Burke, C., Harris, J., Hindrum, S., Edwards, S. y Maguire, G. (2001). Environmental requirements of abalone. FRDC Project No 97/323 School of Aquaculture, University of Tasmania, Australia.

- Butt, D., Kuchel, R., O'Connor, W. y Raftos, D. (2008). Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*, 275: 342-346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.004>
- Buttemer, W.A., Abele, D. y Costantini, D. (2010). From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, 24: 971-983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01740.x>
- Cahn, A.R. (1949). Pearl culture in Japan. United States Department of the Interior; Fish and Wildlife Service, Washington D.C., pp. 81.
- Calderón-Liévanos, S., Lluch-Cota, S., Hernandez Saavedra, N., Racotta, I., Cruz, P., Ascencio, F. y Sicard, M. (2021). Responses of the green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) to sudden and recurring extreme environmental variations. *Journal of Shellfish Research*, 40: 127-136. <https://doi.org/10.2983/035.040.0112>.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O. y Pedraza-Chaverri, J. (2008). Glutathione peroxidases: Una familia de enzimas. En: Konigsberg, M. (Ed). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. Manual Moderno, México, D.F. pp. 183-200.
- Chacón, O., Viana, M.T., Farias, A., Vazquez, C. y Garcia-Esquivel, Z. (2003). Circadian metabolic rate and short-term response of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi) to three anaesthetics. *Journal of Shellfish Research*, 22: 415-421.
- Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue & Cell*, 32(5): 405-416. <https://doi.org/10.1054/tice.2000.0129>.
- Cheng, T. (1981). Bivalves. In: Ratcliffe, N.A. Rowly, A.F. (Eds.). *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, London, pp. 233-300.
- Cheng, W., Li, C. y Chen, J. (2004). Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 232(1-4): 103-115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00488-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00488-5)
- Cochennec-Laureau, N., Montagnani, C., Saulnier, D., Fougereuse, A., Levy, P. y Lo, C. (2010). A histological examination of grafting success in pearl oyster *Pinctada margaritifera* in French Polynesia. *Aquatic Living Resources*, 23: 131-140. <https://doi.org/10.1051/alr/2010006>.
- Comesaña, P., Casas, S.M., Cao, A., Abollo, E., Arzul, I., Morga B. y Villalba, A. (2012). Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 274-286. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.007>.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M., Babut, M., Exinger, A. y Vasseur, P., (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(2): 122-131. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1582>.
- Coyle, S., Durborow, R. y Tidwell, J. (2004). Anesthetics in aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication. Publication No. 3900.
- Cong, M., Song, L., Wang, L., Zhao, J., Qiu, L., Li, L. y Zhang, H. (2008). The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 151(2): 91-196. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.014>.

- Cooper, J.E. (2011). Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. *ILAR Journal* 52 (2): 196–204. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.2.196>
- Culloty, S. y Mulcahy, M. (1992). An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*, 107: 249-252. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90073-T](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90073-T).
- Dang, V.T., Speck, P. y Benkendorff, K. (2012). Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5): 732–740. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.022>
- Dauphin, Y., Ball, A.D., Cotte, M., Cuif, J.P., Meibom, A., Salomé, M., Susini, J. y Williams, C. (2008) Structure and composition of the nacre-prisms transition in the shell of *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 1659–1669. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1860-z>.
- De Almeida, E., Miyamoto, S., Bainy, A., Medeiros, M. y Mascio, P. (2004). Protective effects of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6): 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.020>
- De Almeida, E., Bainy, A., Loureiro, A., Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J. y Sigolo, C. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4): 588-600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Dix, TG. (1973). Histology of the mantle and pearl sac of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Lamellibranchia). *Journal of the Malacological Society of Australia*, 2(4): 365-375. <https://doi.org/10.1080/00852988.1973.10673862>.
- Donaghy, L., Kim, B., Hong, H., Park, H. y Choi, K. (2009). Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2): 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.010>.
- Double, K.L., Dedov, V.N., Fedorow, H., Kettle, E., Halliday, G.M., Garner, B. y Brunk, U.T. (2008) The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11):1669-1682. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7581-9>.
- Dovzhenko, N.V., Kurilenko, A.V., Bel'cheva, N.N y Chelomin, V.P. (2005). Cadmium-Induced oxidative stress in the bivalve mollusk *Modiolus modiolus*. *Russian Journal of Marine Biology*, 31: 309-313. <https://doi.org/10.1007/s11179-005-0093-7>.
- Edwards, S., Burke, C., Hindrum, S. y Johns, D. (2000). Recovery and growth effects of anaesthetic and mechanical removal on greenlip (*Haliotis laevis*) and blacklip (*Haliotis rubra*) abalone. *Journal of Shellfish Research*, 19: 510.
- Fidan, A., Ciğerci, İ., Konuk, M., Küçükkurt, İ., Aslan, R. y DüNDAR, Y. (2008). Determination of some heavy metal levels and oxidative status in *Carassius carassius* L., 1758 from Eber Lake. *Environmental Monitoring Assessment*, 147: 35–41. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0095-3>
- Flohe, L. y Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In: Packer, L. (Ed.). *Methods in enzymology: Oxygen radicals in biological systems*. Academic Press, Inc. Vol. 105. USA, pp 114-120. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1).

- Fougerouse, A., Rousseau, M. y Lucas, J. (2008). Soft tissue anatomy, shell structure and biomineralisation. In: Southgate, P.C., Lucas, A.B. (Eds.). *The pearl oyster*. Elsevier, Amsterdam, pp. 77–99.
- Fridovich, I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Science*, 7: 2688-2690. <https://doi.org/10.1002/pro.5560071225>.
- Fukushima, E., Iwai, T., Miura, C., Celino, F.T., Urasaki, S. y Miura, T. (2014). A xenograft mantle transplantation technique for producing a novel pearl in an akoya oyster host. *Marine Biotechnology*, 16(1):10-6. <https://doi.org/10.1007/s10126-013-9525-0>.
- Gandahi, N.S., Gandahi, J.A., Yang, S., Liang, C., Ding, B., Yang, P. y Chen, Q. (2023). Ultrastructural evidence of four types of lipofuscins in the melanomacrophagic centers in hepatocytes of zebrafish (*Denio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 132: 108480. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108480>.
- Gao, P., Liao, Z., Wang, X-x., Bao, L-f., Fan, M-h., Li X-m, Wu, C-w. y Xia, S-w. (2015). Layer-by-layer Proteomic Analysis of *Mytilus galloprovincialis* Shell. *PLoS ONE* 10(7): e0133913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133913>
- García-Gasca, A., Ochoa-Baez, R. y Betancourt, M. (1994). Microscopic anatomy of the mantle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Journal of Shellfish Research*, 13(1): 297-303.
- Garagiola, M.L., Tarán, M., Scribano, M.P., Balceda, A., García, E., Fonseca, I., Moya, M. y Baez, M.C. (2016). Myeloperoxidase as an indicator of oxidative stress in metabolic syndrome. *Revista Argentina de Cardiología*, 84: 538–542. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i6.9946>.
- Gianazza, E., Eberini, I., Palazzolo, L. y Miller, I. (2021). Hemolymph proteins: An overview across marine arthropods and molluscs. *Journal of Proteomics*, 245: 104294. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104294>.
- Gonçalves, R., Aragão, C., Frias, P. y Sykes, A. (2012). The use of different anaesthetics as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles. *Aquaculture*, 370: 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.014>.
- Granados-Amores, A., Campa-Córdova, A., Rodríguez-Jaramillo, C., Mazón-Suástegui, J., Tovar-Ramírez, D. y Saucedo, P. (2017). Physiological response to relaxation as pre-operative therapy to pearl formation in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture*, 473: 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.002>.
- Granados-Amores, A., Saucedo, P., Mazón-Suástegui, J., Rodríguez-Jaramillo, C., Acosta-Salmón, H., Zenteno-Savín, T. y Campa-Córdova, A. (2018). Does relaxation as a sedative therapy previous to pearl production affect antioxidant response and cause oxidative damage in the winged pearl oyster *Pteria sterna*? *Aquaculture*, 491: 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.051>.
- Granados-Amores, A., Campa-Córdova, A.I., Acosta-Salmón, H., Angulo, C., Rodríguez-Jaramillo, C., Zenteno-Savín, T. y Saucedo, P.E. (2024). Antioxidant activity and oxidative damage associated with seeding surgery for pearl culture in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Antioxidants*, 13: 723. <https://doi.org/10.3390/antiox13060723>.
- Gressler, L., Parodi, T., Riffel, A., DaCosta, S. y Baldisserotto, B. (2012). Immersion anaesthesia with tricaine methanesulphonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, 81: 1436–1445. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03409.x>.

- Grilo, T.F., Lopes, A.R., Sampaio, E., Rosa, R. y Cardoso, P.G. (2018). Sex differences in oxidative stress responses of tropical topshells (*Trochus histrio*) to increased temperature and high pCO₂. *Marine Pollution Bulletin*, 131(A): 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.031>
- Gueguen, Y., Denis, S., Adrien, S., Kevin, M., Pierre, G., Solène, B., Marine, N., Patrick, B., Herehia, H., Serge, P. y Gilles, L.M. (2017). Response of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* to cadmium and chromium: Identification of molecular biomarker. *Marine Pollution Bulletin*, 118(1–2): 420-426. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.012>.
- Guerra, C., Zenteno-Savín, T., Maeda-Martínez, A., Philipp, E. y Abele, D. (2012). Changes in oxidative stress parameters in relation to age, growth and reproduction in the short-lived catarina scallop *Argopecten ventricosus* reared in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 162(4): 421-430. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.04.018>.
- Heasman, M., O'Connor, W. y Frazer, A. (1995). Induction of anaesthesia in the commercial scallop, *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*. 131(3-4): 231-238. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00360-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00360-Z).
- Herbaut, C., Hui, B., Herbaut, J., Remoissenet, G. y Boucaud, E. (2000). The pearl: isolation of outside bodies by molluscs: evolution of the graft and the pearl-sac in *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Lamellibranchia). *Bulletin De La Societe Zoologique De France*, 125: 63-73. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-006-6033-5>.
- Hidalgo, M., Fernández, E., Cabello, A., Rivas, C., Fontecilla, F., Morales, L. y Cabrera, E. (2006). Evaluación de la respuesta antioxidante en *Chiton granosus* Fremby, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) a contaminantes oxidativos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(2): 155–165. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572006000200003>.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., Catalgol, B., Weber, D., y Grune, T. (2011). Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5): 585-591. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.011>.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S. y Grune, T. (2010) Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 48: 1100–1108. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.030>.
- Holmblad, T. y Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean: possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111-123. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00446-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00446-3).
- Hooper, C., Day, R., Slocombe R., Benkendorff, K. y Handlinger, J. (2014). Histopathology and haemolymph biochemistry following anaesthesia and movement in farmed Australian abalone (*Haliotis rubra* × *Haliotis laevis*). *Aquaculture*, (422–423): 202-210, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.035.S>.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe R., Benkendorff, K. y Handlinger, J. (2011). Effect of movement stress on immune function in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aquaculture*, 315: 348-354, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.012>.
- Hoseini, S., Mirghaed, A. y Yousefi, M. (2018). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Review in Aquaculture*, 11(3): 550-564. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>
- Humason G.L. (1979). *Animal tissue techniques*. W. H. Freeman and Company, USA, pp. 649.

- Hur, J.W., Gil, H.W., Choi, S.H., Jung, H.J. y Kang, Y.J. (2019). Anesthetic efficacy of clove oil and the associated physiological responses in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Reports*, 15, 100227. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100227>.
- Jabbour-Zahab, R., Chagot, D., Blanc, F. y Grizel, H. (1992). Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquatic Living Resources*, 5(4): 287-298. <https://doi.org/10.1051/alr:1992027>.
- Jaffrey, S.R. (2018). Nitric oxide. In: Bertram, G., Katzung, M.D. (Ed.). *Basic and clinical pharmacology* 14th Edition. Mc Graw Hill Education, U.S.A., pp. 339–345.
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N. y Zarkovic, K. (2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 181: 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.004>
- Jing, G., Li, Y., Xie, L. y Zhang, R. (2006). Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(2): 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.005>.
- Johnston, W., Gordon, S., Wingfield, M., Halafihi, T., Hine, D. y Southgate, P. (2020). Economic feasibility of small-scale mabé pearl production in Tonga using the winged pearl oyster, *Pteria penguin*. *Aquaculture Reports*, 17:100347. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100347>.
- Jung, T., Höhn, A., Catalgol, B. y Grune, T. (2009). Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(1): 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.007>.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. y Powell, E. (2006). Histological techniques for marine bivalve molluscs: Update. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 26. Silver Spring, MD, 76 p.
- Kishore, P., Southgate, P.C., Seeto, J. y Hunter, J. (2015). Factors influencing the quality of half-pearls (mabé) produced by the winged pearl oyster, *Pteria penguin* (Röding, 1758). *Aquaculture Research*, 46: 769–776. <https://doi.org/10.1111/are.12228>.
- Kishore, P., Wingfield, M., Militz, T., Aisea, T. y Southgate, P.C. (2022). Anaesthetic induced relaxation of the winged pearl oyster, *Pteria penguin*, varies with oyster size and anaesthetic concentration. *Aquaculture Reports*, 22:100987. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100987>.
- Kripa, V., Mohamed, K., Appukuttan, K. y Velayudhan, T. (2007). Production of Akoya pearls from the southwest coast of India. *Aquaculture*, 262(2-4): 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.047>.
- Kooter, I. (2004). *Inventory of biomarkers for oxidative stress*. RIVM, Bilthoven, 30 p.
- Lacoste, A., Malham, S., Cueff, A. y Poulet, S. (2001). Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General and Comparative Endocrinology*, 122 (2): 181–188. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7629>.
- Levi, Y., Albeck, S., Brack, A., Weiner, S. y Addadi, L. (1998). Control over aragonite crystal nucleation and growth: an in vitro study of biomineralization. *Chemistry – A European Journal*, 4: 389-396. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19980310\)4:3%3C389::AID-CHEM389%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19980310)4:3%3C389::AID-CHEM389%3E3.0.CO;2-X).
- Li, W., Shi, Z. y He, X. (2010). Study on immune regulation in *Hyriopsis cumingii* Lea: effect of pearl-nucleus insertion in the visceral mass on immune factors present in the hemolymph. *Fish & Shellfish Immunology*, 28 (5-6):789-794. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.019>.

- Li, H., Sun, X., Cai, Z., Cai, G. y Xing, K. (2010). Identification and analysis of a Cu/Zn superoxide dismutase from *Haliotis diversicolor supertexta* with abalone juvenile detached syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(2): 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.11.009>
- Liang, Y., Ni, Z., Zhu, T., Yang, J., Ji, N., Mao, T. y Gu, H. (2022). Changes in physiological activities are responsible for homoyessotoxin-induced toxicity in abalone *Haliotis discus hannai*. *Toxicology*, 477: 153270. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153270>.
- Lin, A., Chen, P. y Meyers, M. (2008) The growth of nacre in the abalone shell. *Acta Biomaterialia*, 4(1): 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.05.005>.
- Lushchak, V.I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2): 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224: 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- Mamangkey, N., Acosta-Salmón, H. y Southgate, P. (2009). Use of anaesthetics with the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). *Aquaculture*, 288(3-4): 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.008>.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B. y Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press, 80: 209-276. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80006-8).
- McGinty, E., Evans, B., Taylor, J. y Jerry, D. (2010). Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *P. maxima* and *P. margaritifera*: Effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution. *Aquaculture*, 302(3-4): 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.023>.
- Messenger, J., Nixon, M. y Ryan, K., (1985). Magnesium chloride as anaesthetic for cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 82(1): 203-205. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90230-0).
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. y Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters*, 486 (3): 185–190. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02192-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02192-X).
- Mohammadi, M. y Khara, H. 2014. Effect of different anesthetic agents (clove oil, tricainemethanesulfonate, ketamine, tabacco) on hematological parameters and stress indicators of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. *Comparative Clinical Pathology*, 24: 1039–1044. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2027-2>.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G. y Marin, M. (2007). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(1–2): 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.016>.
- Monteforte, M., Bervera, H. y Saucedo, P. (2004). Response profile of the Calafia pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), to various sedative therapies related to surgery for round pearl induction. *Journal of Shellfish Research*, 23(1): 121-128.
- Moreira, R., Novoa, B. y Figueras, A. (2019). Cellular aspects of innate immunity in molluscs. *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90283-8>.

- Muhammad, G., Fujimura, T., Sahidin, A. y Komaru, A. (2021). The influence of donor and recipient oyster red and blue shell nacre interference color on *Pinctada fucata martensii* pearl quality. *Aquaculture*, 543: 736947. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736947>
- Musshoff, U., Madeja, M., Binding, N., Witting, U. y Speckmann, E.J. (1999). Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. *Archives of Toxicology*, 73:55–59. <https://doi.org/10.1007/s002040050586>.
- Nam, S.E., Haque, Md. N., Lee, J.S., Park, H.S. y Rhee, J.S. (2020). Prolonged exposure to hypoxia inhibits the growth of Pacific abalone by modulating innate immunity and oxidative status. *Aquatic Toxicology*, 227: 105596. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105596>.
- Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595: 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>.
- Norton, J.H., Dashorst, M., Lansky, T.M. y Mayer R.J. (1996). An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. *Aquaculture*, 144(1-3): 39-52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01289-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01289-6).
- Norton, J., Lucas, J., Turner, I., Mayer, R. y Newnham, R. (2000). Approaches to improve cultured pearl formation in *Pinctada margaritifera* through use of relaxation, antiseptic application and incision closure during bead insertion. *Aquaculture*, 184(1-2): 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00308-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00308-7).
- Nudelman, F. (2015). Nacre biomineralisation: a review on the mechanism of crystal nucleation. *Seminars in Cell and Development Biology*, 46: 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.004>.
- Nuseti, O., Marcano, L., Zapata, E., Esclapés, M., Nuseti, S. y Lodeiros, C. (2004). Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil. *Interciencia*, 29 (6): 324-328.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Olivera-Bonilla, A. (2006). *Determinación de las condiciones básicas para el cultivo primario in vitro de células de manto de la madreperla Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Tesis de Maestría*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz B.C.S.
- Palić, D., Herolt, D.M., Andreasen, C.B., Menzel, B.W. y Roth, J.A. (2006). Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture*, 254: 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.004>.
- Pattison, D.I., Hawkins, C.L. y Davies, M.J. (2009). What are the plasma targets of the oxidant hypochlorous acid? A kinetic modeling approach. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 807–817. <https://doi.org/10.1021/tx800372d>.
- Pawar, H.B., Sanaye, S.V., Sreepada, R.A., Harish, V., Suryavanshi, U. y Ansari, Z.A. (2011). Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture*, 311: 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.007>.
- Peraza, R., 2008. Catalasa. En: *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas*. Manual Moderno, México D.F., pp. 183-200.

- Pérez-Estrada, C. (2000). *Descripción anatómica e histológica de la concha nácar Pteria sterna, mollusca: Pteriidae. Tesis de Licenciatura.* Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
- Persky, A., Green, P., Stublely, L., Howell, C., Zaulyanov, L., Brazeau, G. y Simpkins, J. (2000). Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1): 59-66. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.2000.22308.x>.
- Pirhonen, J. y Schreck, C.B. (2003). Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220 (1–4): 507–514. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00624-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00624-5).
- Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B. y Figueras, A. (2012) Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1): 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.10.019>.
- Ramlochansingh C., Branoner F., Chagnaud B.P. y Straka H. (2014). Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PLoS One*, 9(7): e101606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101606>.
- Ren, Y., Pan, H., Pan, B. y Bu, W. (2016). Identification and functional characterization of three TLR signaling pathway genes in *Cyclina sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 50: 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.025>.
- Reyes-Becerril, M., Angulo, M., Sanchez, V., Machuca, C., Méndez-Martínez, Y. y Angulo, C. (2021) β -Glucan bioactivities from *Cystobasidium benthicum* in *Totoaba macdonaldi* thymus cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 119: 542-553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.042>.
- Rivera, D., Narboone, J., Michel, X., Livingstone, D. y O' Hara, S. (1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1-2): 177-181. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90149-N](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90149-N).
- Rodríguez-Jaramillo, M. (2004). *Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *Tesis de Maestría.* Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S.
- Rodríguez-Jaramillo, M, Hurtado, M., Romero-Vivas, E., Ramírez, J., Manzano, M. y Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5): 1129-1141. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1129>
- Rodríguez-Jaramillo, M. (2014). *Cambios fisiológicos durante la gametogénesis en respuesta a incremento de temperatura experimental y natural: comparación entre una especie de ostión templada (Crassostres gigas) y una tropical (C. corteziensis).* *Tesis Doctoral.* Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S.
- Rogers, J.J., Henley, W.F., Weberg, A.G., Jones, J.W. y Cope, W.G. (2023). Histological evaluations of organ tissues reveal sublethal effects in a freshwater mussel (*Villosa iris*) exposed to chloride and potassium concentrations below benchmark estimates. *Aquatic Toxicology*, 258: 106476. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106476>.

- Rojas-Figueroa, A., Araya, A., Acosta-Salmón, H., Chávez-Contreras, F., Ortiz-Cornejo, N. y Saucedo, P. (2019). Factors influencing half-pearl (mabe) production and quality in the red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture Research*, 50(11): 3392-3400. <https://doi.org/10.1111/are.14297>.
- Ross, L., Ross, B. y Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd Edition. Blackwell Publishing, Oxford. <https://doi.org/10.1002/9781444302264.ch8>.
- Ruíz-Rubio, H., Acosta-Salmon, H., Olivera, A., Southgate, P.C., Rangel-Dávalos, C. (2006) The influence of culture method and culture period on quality of half-pearls ('mabé') from the winged pearl oyster *Pteria sterna*, Gould, 1851. *Aquaculture*, 254: 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.030>
- Saidi, I., Johnston, B. y Southgate, P.C. (2017). Potential profitability of pearl culture in coastal communities in Tanzania. *Aquaculture Reports*, 5: 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.11.003>.
- Saucedo, P., Castillo-Domínguez, A. y Melgar-Valdes, C. (2015). Aprovechamiento de almejas dulceacuícolas en Tabasco para producción de perlas y Artesanía. Colecciones Robirosa, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco. Primera edición. Editorial de Publicaciones No Periódicas de la Dirección de Difusión y Divulgación Científica y Tecnológica de la UJAT. Villahermosa, Tabasco, México, pp. 133.
- Saucedo, P., McLaurin, D., Lodeiros, C., Freitas, L., León, L., Cáceres-Puig, J., Albuquerque, M., Southgate, P. y Acosta-Salmón, H. (2023). Progress towards reestablishing Latin America as a major pearl producing region: A review. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12714>.
- Saydmohammed, M. y Pal, A.K. (2009). Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 298 (1–2): 0–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.020>.
- Sharma, P., Nollens, H., Keogh, J. y Probert, P. (2003). Sodium pentobarbitone-induced relaxation in the abalone *Haliotis iris* (Gastropoda): effects of animal size and exposure time. *Aquaculture*, 218:589–599. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00195-3).
- Shen, Y., Huang, Z., Liu G., Ke, C. y You, W. (2019) Hemolymph and transcriptome analysis to understand innate immune responses to hypoxia in Pacific abalone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 30: 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.02.001>.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3): S31-S38. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2).
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4: 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- Sokal, R. y Rohlf, F. (1981). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 2nd ed. W.H. Freeman, New York.
- Sokolova, I., Sukhotin, A. y Lanning, G. (2012). Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks. En: D. Abele, J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín (eds). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Wiley-Blackwell, UK, pp. 263-280.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53: 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.

- Soto, C. y Burhanuddin, G. (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136(1-2): 149–152. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01051-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01051-3).
- Southgate, P.C. (2008). Pearl oyster culture. Ed: P.C. Southgate, J.S. Lucas (eds). *The pearl oyster*. Elsevier, 1st ed., Amsterdam, The Netherlands, pp. 231-272.
- Southgate, P., Strack, E., Hart, A., Wada, K.T., Montefiore, M., Cariño, M., Langy, S., Lo, C., Acosta-Salmón, H. y Wang, A. (2008). Exploitation and culture of major commercial species. In: Southgate PC & Lucas JS (eds.) *The pearl oyster: Biology and culture*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 303–356.
- Southgate, P.C., Kishore, P.V., Sharma, S., y Simos, T. (2019). Empowering women through pearl industry-based livelihoods in Fiji. Secretariat of the Pacific Community (SPC), *Women in Fisheries Information Bulletin*, 29: 24–29.
- Southgate, P.C. (2021). Pearl oyster culture and pearl culture. In: Shumway SE (ed.). *Molluscan shellfish aquaculture: A practical guide*. 5M publishing, Essex, England, pp. 205–231.
- Soza-Chinchilla, C. (2014). *Evaluación de diferentes anestésicos como terapia de relajación para la formación de perlas en abalón rojo Halotis rufescens*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Antofagasta, Antofagasta.
- Stanley, C.E., Adams, R., Nadolski, J., Amrit, E., Barrett, M., Bohnett, C., Campbell, K., Deweese, K., Dhar, S., Gillis, B., Hill, C., Inks, M., Kozak, K., Larson, A., Murtaza, I., Nichols, D., Roberts, R., Tyger, H., Waterbury, C. y Cooper R.L. (2020) The effects of tricaine mesylate on arthropods: crayfish, crab and Drosophila. *Invertebrate Neuroscience*, 20: 10. <https://doi.org/10.1007/s10158-020-00243-5>.
- Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J.P. y Fleury, M.J.J. (2017). Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 110: 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015>.
- Summerfelt, R.C. y Smith, L.S. (1990). Anesthesia, surgery, and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA, pp. 213–272.
- Sun, X., Nie, H. y Yan, X. (2023). Glycogen-related genes play potential roles in immune response of *Ruditapes philippinarum* under *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Aquaculture*, 563 (1): 738954. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738954>.
- Sukhotin, A., Abele, D. y Purtner, H. (2002). Growth, metabolism and peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Marine Ecology Progress Series*, 226: 223-234. <https://doi.org/10.3354/meps226223>.
- Suzuki, T. y Mori, K. (1991). Immunolocalization and in vitro secretion of hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Zoological Science*, 8(1): 23-29.
- Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B. y Figueras, A. (2003). Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 27: 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00098-8).
- Taylor, J. y Strack, E. (2008). Pearl production. En: Southgate P.C., Lucas J.S. (eds.), *The pearl oyster: Biology and culture*. Elsevier. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands. pp 273-302.
- Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E.A. y Brunk, U.T. (2010). Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants Redox Signal*, 12: 503–535. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2598>.

- Terman, A. y Brunk, U. (2004). Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8): 1400-1404. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.009>.
- Tiscar, P. y Mosca F. (2004). Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications*, 28: 57–62. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000045379.78547.23>.
- Torres, M., Testa, C., Gáspari, C., Masutti, M., Panitz, C., Curi-Pedrosa, R. y Filho, D. (2002). Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9): 923-932. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X).
- Torres-Martínez, J., Saucedo, P., Rangel-Dávalos, C. y Acosta-Salmón, H. (2012). Advances in pre-operative techniques for pearl production in the lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*: Relaxation and mantle excision. *Aquaculture*, 365: 279-283. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.004>.
- Travers, M., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. y Paillard, C. (2008). Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6): 800-808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.003>.
- Van Phuc, P., Viet, P.Q., Hoang, N.M., Tam, N.T. y Ngoc, P.K. (2011). Research on in vitro culture and inducing nacre crystal formation of freshwater pearl mussel mantle epithelial cell *Sinohyriopsis cumingii*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 3: 105–113.
- Vosloo, A., Laas, A. y Vosloo, D. (2013). Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(1): 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.002>
- Wang, S., Wang, Y., Zhang, Z., Ralph, J., Weng, Z., Zou, Z. y Ziping, Z. (2004). Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or nonpathogenic infection. *Journal of Shellfish Research*, 23: 1173–1177.
- Wang, B., Luo, T., Chen, D. y Ansley, D.M. (2007). Propofol reduces apoptosis and up-regulates endothelial nitric oxide synthase protein expression in hydrogen peroxide-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Anesthesia & Analgesia*, 105: 1027–1033. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000281046.77228.91>.
- Wang, Y., Hu, M., Cheung, S., Shin, P., Lu, W. y Li, J. (2012). Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture*, 356: 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.001>.
- Wang, Y., Branicky, R., Noe, A. y Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217 (6): 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.
- Wei, J., Liu, B., Fan, S., Zhang, B., Su, J. y Yu, D. (2017). Serum immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* to xenografts and allografts. *Fish & Shellfish Immunology*, 62: 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.039>.
- Wei, W., Zhang, H. y Shi, A. (2001). The study of relationship between acid phosphatase activity and oyster defence. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 25(4): 413-415.
- Wei, S., Xie, Z., Liu, C., Sokolova, I., Sun, B., Mao, Y., Xiong, K., Peng, J., Fang, J., Hu, M., y Wang, Y. (2022). Antioxidant response of the oyster *Crassostrea hongkongensis* exposed to diel-cycling

- hypoxia under different salinities. *Marine Environmental Research*, 179: 105705. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105705>.
- White, H., Hecht, T. y Potgieter, B. (1996). The effect of four anesthetics on *Haliotis midae* and their suitability for application in commercial abalone culture. *Aquaculture*, 140(1-2): 145–151. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01185-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01185-4).
- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M.C. y Mitchell, J.B. (1995). Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicology Letters*, 82-83, 221–226. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03557-5](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03557-5).
- Winlow, W., Yar, T., Spencer, G., Girdlestone, D. y Hancox, J. (1992). Differential effects of general anaesthetics on identified molluscan neurons in situ and culture. *General Pharmacology*, 23(6): 985-992. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(92\)90276-p](https://doi.org/10.1016/0306-3623(92)90276-p).
- Winston, G. y Di Giulio, R. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19(2): 137-161. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6).
- Wu, Y., Liang, H., Wang, Z., Lei, Q. y Xia, L. (2017). A novel toll-like receptor from the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* is induced in response to stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 214: 19-26. <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.08.006>.
- Yang, S.J. y Min, B.H. (2019). Sub-optimal or reduction in temperature and salinity decrease antioxidant activity and cellularity in the hemolymph of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish & Shellfish Immunology*, 84: 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.041>.
- Yang, H., Zhao, Y., Song, W., Ye, Y., Wang, C., Mu, C. y Li, R. (2020). Evaluation of the efficacy of potential anesthetic agents on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) juveniles. *Aquaculture Reports*, 18: 100524. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100524>.
- Zahran, E. Risha, E. y Rizk, A. (2021). Comparison of propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. *Aquaculture*, 534: 736251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736251>.
- Zhu, C., Southgate, P.C. y Li, T. (2019). Production of pearls. In: Smaal, A., Ferreira, J., Grant, J., Petersen, J., Strand, Ø. (eds). Goods and services of marine bivalves. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_5
- Zuñiga, C.P. (1998). *Descripción anatómica e histológica de la Madre Perla Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) (Mollusca: Petriidae). *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S.