

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto del peróxido de hidrógeno y el neuropéptido
APGWamida en la inducción a la liberación de
gametos en abulón azul (*Haliotis fulgens*)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Araceli García Aguilar

Ensenada, Baja California, México

2019

Tesis presentada por
Araceli García Aguilar
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de Tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de Tesis

Miembros del comité

Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Araceli García Aguilar © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y codirectores de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Araceli García Aguilar** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto del peróxido de hidrógeno y el neuropéptido APGWamida como inductores a la liberación de gametos en abulón azul (*Haliotis fulgens*)

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de Tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de Tesis

El abulón azul (*Haliotis fulgens*) es una especie de importancia comercial en la región central de la península de Baja California, México. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de los inductores: H₂O₂-TRIS y APGWamida a dos concentraciones 1) H₂O₂-TRIS a 6 y 9 % V/V y 2) el tetrapéptido APGWamida suministrado vía intramuscular a 2.5 y 5 µg de APGWamida por gramo de organismo. Los experimentos se realizaron con organismos en tres etapas reproductivas, con gónadas al inicio de su maduración en índice visual gonadal (IVG) de 1, totalmente maduras (IVG 3) y en reabsorción. En el presente trabajo, se muestra que las hembras de abulón azul en IVG 1 de cultivo a H₂O₂-TRIS 9 % respondieron el 83 % de las hembras inducidas liberaron gametos después de 7-8 h (4,700 ± 940 ovocitos totales por hembra). Por otra parte, con APGWamida a 5 µg/g respondió el 66 % de las hembras entre las 4-6 h con (7,666 ± 945 ovocitos por hembra). En el caso de los machos de cultivo con IVG 1, tanto con el inductor H₂O₂-TRIS al 9 % y APGWamida a 2.5 µg/g respondieron el 50 %, entre las 5-7 h y las 4-6 h, respectivamente. En este experimento no se midió cantidad de espermatozoides en machos, pero se observó buena motilidad (80%) y se realizó una fertilización, pero no hubo fecundación debido a la inmadurez de los ovocitos usados. Los organismos silvestres en IVG 3, el 50 % de las hembras inducidas respondieron con H₂O₂-TRIS 6 %, en un intervalo de 5 y 8 h post-inducción (168 000 por hembra). Mientras que en la condición con APGWamida a 2.5 µg/g respondieron el 100 % de las hembras entre las 5-6 h, con una cantidad de (610,000 ± 3000 ovocitos por hembra). Por otra parte, el 100 % de los machos silvestres con IVG 3 respondieron a los tratamientos con APGWamida (control con solo solución de Ringer's, 2.5 y 5 µg de APGWamida por gramo), entre las 5 y 9 h promedio post-inyección, (5 y 6 X 10⁵ espermatozoides por macho). En este experimento los organismos del control respondieron, sin embargo pudo ser debido a la condición de estrés y del grado de madurez. Ambos métodos indujeron la liberación de gametos y presentan ventajas dependiendo del interés del objetivo de reproducción, por lo que es necesario probar otras concentraciones, así como establecer un protocolo de fertilización adecuado, ya que no existe para la especie.

Palabras clave: *Haliotis fulgens*, Abulón azul, Reproducción, Inducción a la liberación de gametos

Abstract of the thesis presented by **Araceli García Aguilar** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of hydrogen peroxide and neuropeptide APGWamide as inducers to spawning in green abalone (*Haliotis fulgens*)

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis Director

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Thesis Director

Green abalone (*Haliotis fulgens*) is an important commercial species in the central region of the peninsula of Baja California, Mexico with aquaculture potential. The objective of this work was to evaluate the effect of spawning inducers: H₂O₂-TRIS at 6 % and 9 % V/V and APGWamide injected at 2.5 and 5 µg of APGWamide per gram of body. The experiments were performed with organisms in three different reproductive stages according to their Visual Gonad Index (IVG): non-mature gonads (IVG 1) fully mature (IVG 3) and spawned. Results indicated that for cultured organisms in IVG 1, 83% females spawned between 7-8 h post-induction when 9% H₂O₂-TRIS was used (4,700 ± 940 total oocytes per female). On the other hand, 66 % females injected with 5 µg/g spawned between 4-6 h post-induction (7,666 ± 945 oocytes per female). For males, 50 % of them spawned when induced with 9 % H₂O₂-TRIS or 2.5 µg/g APGWamide between 5-7 h and 4-6 h post-induction, respectively. Motility of sperm was 80 %. Sperm was used to fertilize eggs but fertilization failed due to immature eggs. For wild organisms in IVG 3, 50 % females spawned 5 and 8 h post-induction when 6 % H₂O₂-TRIS was used (168,000 per female) while 100 % females spawned between 5-6 h post-induction when 2.5 µg/g APGWamide was injected (610,000 total oocytes per female). Also, 100% males spawned between 5-9 h post-induction when 2.5 and 5 µg of APGWamide per gram APGWamide was used. Sperm concentration was around 5-6 X 10⁵ per male. In this experiment, organisms from the control treatment spawned due to stress and ripeness. No fertilization was obtained in this experiment. Both methods induced spawning and have different advantages depending of the objectives in a reproduction programs. New concentrations and inducers should be tested. Also, new approaches to fertilize eggs should be developed since optimal protocols are lacking.

Keywords: *Haliotis fulgens*, Green abalone, Reproduction, Spawning

Dedicatoria

A mis papás Ma. Del Socorro y Gustavo

A mis abuelitos Sixta y Andrés Teodoro

A mi hermano Alfonso

A mi sobrino Alexis Emmanuel

A Andrés Octavio

A José Antonio

En memoria de:

Sr. Apolinar Hernández Reyes
PhD. Manuel Segovia Quintero

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para mi estancia en el postgrado y lograr esta meta personal.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)**, en especial al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado en el programa de Maestría y las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

A la doctora **Carmen G. Paniagua Chávez** por aceptarme como su estudiante de maestría y motivarme a no solo titularme como maestra en ciencias, si no a ser una persona íntegra, por sus consejos, su amistad, su incondicional apoyo, pero sobre todo por su paciencia para a escritura de este trabajo. Muchas gracias.

A la doctora **Fabiola Lafarga De la Cruz** por darme la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo, por su paciencia, por motivarme cada día a aprender cosas nuevas, por compartirme sus conocimientos, por el apoyo y su amistad durante mi estancia en Ensenada. Pero sobre todo agradezco eternamente el haberme concedido realizar el presente trabajo en campo.

A los miembros de mi comité de tesis **Dr. Miguel Ángel del Río** y **Dr. Luis Eduardo Calderón** por sus comentarios, sugerencias y apoyo enriqueció este trabajo. Pero sobre todo por su amistad apoyo y la motivación que me dieron durante mi estancia en CICESE. Así como, a la **Dra. Pilar Sánchez** por sus consejos y aceptar ser mi sinodal invitado.

A la **Dra. Mónica Hernández** por compartir la técnica de inyección intramuscular (Seno arterial cefálico), por el préstamo ocasional de reactivos y por el interés mostrado durante la realización del presente trabajo, pero sobre todo por su amistad. Gracias.

Al **PhD. John Hyde** encargado del programa de Genética pesquera de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), gracias por proporcionar el tetrapéptido para la realización de este trabajo.

A la **International Abalone Society (IAS)** presidida por el **Dr. Ricardo Searcy Bernal** por concederme una beca para exponer de forma oral los resultados preliminares del trabajo en el 10th International Abalone Symposium que se llevó a cabo en Xiamen, China del 8-12 mayo del 2018.

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera **“Buzos y pescadores de la Baja California”**, al Sr. **Esteban Sánde Parra** (Chapis), a **Isaac Padilla** (Chaco), **Oscar Roberto García** (Cachufo) a todos los miembros de la cooperativa, a los integrantes del laboratorio al Biol. **José Antonio Espinoza Montes**, L.B.A. **Ramón Francisco Martínez** (Soru), **Julio Orduño**, **Carlos Ruiz**, **Diego García** (Pony) y **Sr. Jesús Alcantar** por su valiosa ayuda para el proyecto de maduración y de inducción a la liberación de gametos, pero sobre todo por la amistad y facilidades prestadas, por todo.. gracias. A mis amigas **Mayté**, **Mariana**, **Elsa** y **Haydeé** mis tardes en la isla no habrían sido tan geniales sin ustedes, pero sobre todo por el apoyo y cariño que siempre me mostraron.

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera **“Progreso”** a todos los socios que la componen por la donación de setenta abulones con fines de investigación, en especial al Oceanólogo **Juan Domingo Aguilar Osuna**, **Daniel Aguilar** y **Andrés Nieto** por compartir sus conocimientos, la confianza, su amistad y apoyo para la realización del proyecto.

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera “**La Purísima S.C. de R.L.**” a todos los socios que la componen por las facilidades prestadas para la realización de una parte del proyecto en sus instalaciones. Al Oceanólogo **Juan Carlos Bonilla Gutiérrez** encargado del Departamento de Pesquerías y Acuicultura por permitir parte de la realización del proyecto en sus instalaciones. Así como, al personal del laboratorio **Brianda Marina Aguilar Monchez, Carlos Samir Patrón Ruiz y Mario Villavicencio Villavicencio** quienes siempre mostraron su apoyo para la realización del trabajo. Gracias por el apoyo y amistad brindada.

Al M. en C. **Erik Fernando Aragón González** a la M. en C. **Yanet Guerrero Rentería**, M. en C. **Carmen Elvira Vargas Peralta**, M. en C. **Constanza del Mar Ochoa Saloma y Oceanólogo Jesús Mariscal** por el apoyo mediante el préstamo de instalaciones y material de los laboratorios que están a cargo y sus consejos tanto académicos como de sobrevivencia, cultura y vida en CICESE.

A mi **mamá, papá, abuelito y abuelita** por sus consejos, por los sacrificios del pasado para que hoy haya llegado hasta este trabajo y por el amor que me dan todos los días. A mi hermano **Alfonso** por vivir en mis memorias de infancia y compartir nuestros sueños de adultos, a **Marlenne** por estar siempre pendiente de mí pese a la distancia. A **Alexis Emmanuel** por contarme cuentos o cantarme canciones cuando estaba estresada y con ganas de renunciar a todo (jaja), te amo sobrino, alegras mis días.

A la familia Puerta González que me adoptó durante el inicio de la maestría mamá **María** y a don **Manuel**, a mis hermanos postizos **Nubia, Denisse, Manuel, Carlos y Fabiola**, nunca podré pagarles lo que hicieron por mí. Gracias.

A mis amigos **Allan, Paola, Abel Geraldo y Cecilia** definitivamente mi estancia en Ensenada y en la maestría no pudo ser mejor. Gracias a ustedes nunca me sentí lejos de casa. A mis tortolos **Leydy y Jonás** gracias por sus consejos, su paciencia, gracias por escuchar mis dolores, tristezas, risas, chistes, por llevarme al médico cuando moría. Gracias por hacerme parte de su familia.

A mi amigo **Andrés Octavio** por ser mi compañero de locuras, aventuras, viajes, por siempre motivarme a convertir mis sueños en realidades, por compartir los tuyos y hacerme partícipe de ellos, por a veces preocuparte por mí (jaja), por hacerme enfrentar mis miedos (X2 y Tatsú jaja), por los dramas matutinos (jaja). No terminaría de citar lo vivido... así que, por todo el tiempo compartido, gracias.

A mi amigo **José Antonio** no tengo palabras para agradecer todo tu cariño y apoyo durante estos dos años, gracias por siempre estar para mí, por tus consejos, por escucharme mientras lloraba, mientras reía o mientras estaba enojada, gracias por tu apoyo, por todas nuestras anécdotas juntos...gracias.

A mis Ensenadenses del corazón **Karla Chacón, Casandra Delgadillo y Casandra Anguiano** por hacer que mis días de tesis fueran agradables, disfrutables y productivos, gracias por brindarme sus apoyo, amistad, amor y cariño definitivamente no existen palabras para expresar mi agradecimiento hacia ustedes.

A mis compañeros de laboratorio y amigos **Erik, Vincent, Rigo y Karla** sin ustedes los desvelos hubieran sido frustrantes, gracias por su total apoyo, por brindarme su amistad, consejos y tiempo.

“Mi camino sigue; sin embargo, mi corazón recuerda cada gesto amable, cada favor y cada sonrisa que alegró mis días, gracias a todas las personas que no mencioné pero que han hecho de mi vida la mejor, estaré eternamente agradecida”

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.2. Características sexuales y de reproducción de haliótidos	3
1.1.3. Órganos para recepción de estímulos en haliótidos	9
1.1.4. Sistema neuroendocrino en haliótidos.....	10
1.1.5. Metabolitos asociados a la liberación de gametos.....	11
1.1.6. Hormonas y péptidos asociados a la liberación de gametos.....	12
1.1.7. Métodos de inducción a la liberación de gametos.....	13
1.1.8. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂ -TRIS) como inductor	13
1.1.9. Tetrapéptido APGWamida como inductor	14
1.2 Justificación	17
1.3 Hipótesis.....	17
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos	18
Capítulo 2. Metodología	19
2.1 Diseño experimental	19
2.2 Identificación de sexo y grado de madurez en organismos seleccionados	19
2.3 Inducción a la liberación de gametos.....	20
2.3.1 Peróxido de hidrógeno-TRIS (H ₂ O ₂ -TRIS)	20
2.3.2 Neuropeptido APGWamida	20
2.3.3 Respuestas observadas post-inducción	21

2.3.4 Análisis estadístico	22
Capítulo 3. Resultados	23
3.1 Éxito en la liberación de gametos	23
3.2 Tiempo de respuesta.....	24
3.3 Cantidad de gametos	24
Capítulo 4. Discusión	30
4.1 Éxito en la liberación de gametos	30
4.2 Tiempo de respuesta.....	36
4.3 Cantidad de gametos	39
Capítulo 5. Conclusiones	41
Capítulo 6 Recomendaciones.	43
Literatura citada	44
ANEXOS	
Anexo 1. Descripción de los abulones usados para los experimentos.....	51
Anexo 2. Preparación de inductor: peróxido de hidrógeno-TRIS (H ₂ O ₂ -TRIS)	52
Anexo 3: Preparación de inductor: <i>Tetrapéptido Ala-Pro-Gli-Trp-NH₂ (APGWamida)</i>	53
Anexo 4: Protocolo para inducción a la liberación de gametos de abulón azul con H ₂ O ₂ –TRIS 6 % y 9 % V/V (Morse <i>et al.</i> , 1977)	56
Anexo 5: Protocolo para inducción a la liberación de gametos de abulón azul con el neuropéptido APGWamida.....	58

Lista de figuras

Figura	Página
1 Disposición de órganos en haliótidos. Vista dorsal de estructuras que pertenecen al sistema sensorial (tentáculo cefálico, ojo, branquia, tentáculo epipodial), digestivo (intestino, estómago 1, estómago 2, espira visceral), reproductivo (Gónada) y circulatorio (Corazón, branquia, manto, músculo) en abulón (tomado y modificado de Heasman. y Savva, 2007).....	3
2 Diferenciación de sexo y determinación de IVG en abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>). A) Gónada con coloración verde olivácea que indica es una hembra con grado de madurez en IVG 2. B) Gónada con coloración amarillo cremoso que indica es un macho con grado de abultamiento en IVG 2.....	4
3 Características de las gónadas femenina y masculina. A. Vista dorsal del crecimiento de la gónada (el crecimiento longitudinal de la gónada estará en función al IVG en el que se encuentre, el IVG 0 no muestra coloración gonadal, ni crecimiento longitudinal, en ocasiones muestra abultamiento, mientras que el IVG 1,2,3 muestran incremento longitudinal y abultamiento) B. corte transversal de la gónada (la gónada crece sobre el hepatopáncreas, en el caso del IVG 0 solo se muestra el hepatopáncreas, en cuanto incrementa la gónada el tamaño del hepatopáncreas disminuye) C. Vista lateral de abulón cuando los organismos se encuentran en IVG 0 e IVG 1 el abultamiento no es observable fuera del abulón sin embargo durante el IVG 2 y 3 el abultamiento es notorio fuera de la concha, pie y manto.....	5
4 Estados de desarrollo gonadal de abulón azul (<i>Haliotis fulgens</i>). A), C), E) y H) Etapas gonadales femeninas, B), D), E) y F) Etapas gonadales masculinas. La gónada rodea el hepatopáncreas. (Tomado de Velez-Arellano, 2016).....	6
5 Interior de la gónada. A) Cortes transversales de gónadas. Gónada femenina (Izquierda) con ovocitos y Gónada masculina (Derecha) con espermatozoides (tomado de: Apizawetakan et al., 2001). B) Corte trasversal de la gónada de <i>Haliotis asinina</i> . Gónada femenina (Izquierda) y gónada masculina (Derecha) HP: hepatopáncreas; ICP: capsulas interiores que rodean al hepatopáncreas; OCP: capsulas exteriores que rodean a la gónada; OC: ovocitos en desarrollo; TR: trabéculas; Sc: espermatozoides (tomado de: Apizawetakan et al., 2001). C) Localización de células granulosas en trabéculas de <i>Haliotis asinina</i> . Gónada femenina madura con ovocitos en etapa V (SYG) (superior e inferior izquierdo), Gónada masculina madura. SZ: espermatozoides; D: Divertícula digestiva; E: Epidermis; T: Trabécula; Flechas negras: células granulosas acidofílicas en trabéculas con ovocitos; SG: espermatogonia; PS: espermatocitos primarios (superior e inferior derecho) (tomado de Awaji y Hamano, 2004).....	18
6 Órganos quimiorreceptores en moluscos gasterópodos. Los órganos quimiorreceptores y fotorreceptores son: (1) tentáculos, (2) tentáculos paliales (3) pie.....	19

7	Sistema nervioso central en <i>haliotis</i> spp.. El sistema nervioso central de los haliótidos está formado por grupos de neuronas de diferentes tipos (A, B, C y D) a los grupos de neuronas se les conoce como ganglios (tomado y modificado de Dorsset, 1986).....	21
8	Localización del sistema circulatorio de abulón. Seno arterial cefálico (cuadro verde). Sitio de inyección del neuropéptido APGWamida (Bourne, 1974).....	29
9	Liberación de gametos en porcentaje de respuesta a los inductores y tiempo de respuesta de abulones con IVG 1. A) porcentaje de abulones que respondieron a los inductores (n= 72). B) tiempo en que los abulones iniciaron la liberación de gametos, los controles de ambos inductores no liberaron gametos. La respuesta de las hembras está representada por la barra color gris y la respuesta de machos por la barra negra (Las líneas en las barras representan el error estándar).....	33
10	Cantidad de gametos femeninos liberados de abulones con IVG 1. Los puntos muestran el promedio y las barras la desviación estándar. La cantidad de ovocitos muestra diferencias estadísticas en el número de gametos liberados con un valor de $\alpha < 0.05$ (P=0.014). las diferencias estadísticas se muestran con (*)......	34
11	Liberación de gametos en porcentaje de respuesta a los inductores y tiempo de respuesta de abulones con IVG 3. A) porcentaje de abulones que respondieron a los inductores (n= 24). B) tiempo en que los abulones iniciaron la liberación de gametos, los controles de ambos inductores no liberaron gametos. La respuesta de las hembras está representada por la barra color gris y la respuesta de machos por la barra negra (Las líneas en las barras representan el error estándar).....	35
12	Cantidad de gametos liberados de abulones con IVG 3. A) La cantidad de ovocitos por hembra no muestra diferencias estadísticas en el número de gametos liberados con un valor de $\alpha > 0.05$ (P= 0.2). B) La cantidad de espermatozoides por macho no muestra diferencia estadística $\alpha > 0.05$ (P=0.8). En los gráficos los puntos muestran el promedio y las barras de error estándar.....	36
13	Respuesta al inductor APGWamida en IVG 1, 3 y reabsorción. A) abulón azul sin inyectar, B) abulón azul inyectado con solución fisiológica de Ringer's, C) abulón inyectado con APGWamida 2 min después de ser colocado en agua. Las flechas rojas señalan la expansión de epipodios, mientras que, las flechas amarillas muestran la expansión del manto. Las Figuras A (únicamente en agua de mar irradiada con UV) y la figura B (inyectada con solución de Ringers) pertenecen a los; sin embargo, la Figura C muestra expansión del mato al ser inyectado con APGWamida y expansión de epipodios.....	37

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Características de la gónada para determinación de Índice Visual Gonadal (IVG) (Leighton, 2000; Vélez-Arellano, 2016).....	4
2	Estados de desarrollo gonadal del abulón. Fases Proliferativa, Gametogénesis, Madurez, Liberación de gametos y Reabsorción de gametos.....	7
3	Clasificación de células neurosecretoras en ganglio cerebral de <i>Haliotis discus hannai</i> . Los ganglios están formados por diferentes tipos neuronales, cada tipo neuronal tiene diferentes funciones como segregación de péptidos o proteínas que señalizan alguna respuesta biológica (Yahata, 1971; Hahn, 1994).....	10
4	Antecedentes del uso del inductor H ₂ O ₂ -TRIS. Diferentes respuestas y especies en que se ha probado.....	14
5	Antecedentes del uso del inductor APGWamida. Diferentes respuestas y especies en que se ha probado.....	16
6	Respuesta de diferentes especies de abulón al inductor H ₂ O ₂ -TRIS y distribución batimétrica.....	34
7	Resumen de respuesta de abulones ante el uso del inductor APGWamida.....	35
8	Datos biométricos y número de organismos expuestos a los métodos de inducción.....	44
9	Reactivos para solución fisiológica de Ringers.....	46
10	Ejemplo de las cantidades a inyectar con respecto al peso de los organismos la cantidad de 2.5 µg/g de org.....	47
11	Ejemplo de las cantidades a inyectar con respecto al peso de los organismos la cantidad de 5 µg/g de org.....	47

Capítulo 1. Introducción

El abulón azul (*Haliotis fulgens*) es una de las cinco especies sujetas a explotación comercial en la península de Baja California, México (CEP, 2015). Históricamente el abulón azul representa entre el 70 y 80% de la captura total en la península (301 ton, CONAPESCA, 2014), siendo el 24.5% aportado por Baja California (BC) y el 73.1% por Baja California Sur (BCS) (CNP, 2017). Desafortunadamente, la producción por captura ha disminuido año con año debido a la sobrepesca, pesca ilegal y mortalidades masivas asociadas a cambios ambientales y presencia de enfermedades (CNP, 2017). La captura de la especie con fines comerciales inició en 1940 (McShane, 1995); sin embargo, en esa época no había planes de repoblamiento. Fue hasta los 90s que inició un plan de rescate de las poblaciones silvestres de abulón mediante el repoblamiento.

Actualmente existen quince cooperativas de producción pesquera en la península de Baja California que se dedican a la extracción de abulón azul y a pesar de que esta especie tiene un gran potencial para ser cultivada, no existe una producción por acuicultura actualmente. Cuatro de estas cooperativas cuentan con laboratorios para producción de larvas, postlarvas y semillas para repoblamiento con la finalidad de coadyuvar a la recuperación de los bancos naturales del recurso pesquero (Searcy-Bernal *et al.*, 2010). Por lo tanto, estos laboratorios representan una gran oportunidad para reproducir abulón no solo para repoblar sino también para engorda en cautiverio.

Actualmente, los inductores para la liberación de gametos de abulón azul son: uso de agua de mar irradiada con luz ultravioleta (UV) con base en la metodología descrita por Hahn (1994_A) (*com. pers.* Espinoza-Montes; S.C.P.P. Buzos y pescadores, 2018), desecación y o bien, la combinación de ambos protocolos (*com. pers.* Aguilar-Osuna; S.C.P.P. PROGRESO, 2018). Las tres metodologías son viables; sin embargo, tienen una eficiencia muy variable (0 %-30 % de respuesta en hembras y del 30-70 % en machos) al inducir a los reproductores silvestres en IVG 3 (Tabla 4). Por lo que se tiene la necesidad de probar métodos de inducción diferentes que permitan mejorar la liberación de gametos. El método de inducción para la liberación de gametos que se ha probado en diferentes especies de abulón y ha mostrado ser exitoso es la utilización del peróxido de hidrógeno con TRIS (H₂O₂-TRIS) (Morse *et al.* 1977). Sin embargo, se ha encontrado que el H₂O₂-TRIS provoca un estrés oxidativo el cual puede generar un daño celular y al ADN que se ve reflejado en las larvas obtenidas de gametos liberados utilizando este inductor (Vosloo y Vosloo, 2017). Por lo tanto, se ha recomendado la investigación de metabolitos u hormonas que esten asociadas a la liberación de gametos para usarlos como métodos de

inducción, ya que éstos serían menos agresivos y permitiría mantener los reproductores en mejor condición (Hahn, 1994).

En haliótidos, la hormona de la puesta de huevos (ELHs por sus siglas en inglés) y el neuropéptido APGWamida han sido asociados a la liberación de gametos (Nuurai *et al.*, 2010_A; York *et al.*, 2012). El péptido APGWamida ha sido utilizado para estimular a la liberación de gametos en los abulones *Haliotis asinina* y *H. discus hannai* y en ambas especies se observó respuesta al inductor únicamente en machos (Chansela *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2018).

La implementación de cultivos marinos en la península de Baja California ha despertado gran interés de las cooperativas por incrementar la producción de larva de abulón. Por lo que es crítico probar métodos alternos de inducción a la liberación de gametos para el abulón azul. Probar un inductor químico H₂O₂-TRIS y un inductor biológico como lo es el neuropéptido APGWamida es de gran importancia para dar nuevas alternativas en la reproducción de la especie. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del H₂O₂-TRIS y el neuropéptido APGWamida en la liberación de gametos del abulón azul.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Características del género *Haliotis* spp.

Los abulones tienen un cuerpo con simetría bilateral que está formado por la cabeza, un pie y una masa visceral. La superficie del epitelio generalmente es ciliada, el epitelio del pie tiene glándulas mucosas con terminaciones nerviosas (Hickman *et al.*, 2001). El sistema nervioso consta de tres pares de ganglios y una serie de terminaciones nerviosas que ayudan a percibir estímulos (Chase, 2002). El sistema sensorial en abulón está compuesto por estructuras como los tentáculos cefálicos, tentáculos del manto y ojos que reciben estímulos del medio natural. Los estímulos son variables ambientales como la temperatura, fotoperiodo, salinidad, pH, estrés oxidativo y manipulación (Uki y Kikuchi, 1984; Chase, 2002; Rogers-Bennet *et al.*, 2010; Farooqui y Farooqui, 2011) cuando los estímulos son detectados por el sistema sensorial se traducen en sustancias liberadas a través del sistema neuroendocrino y son liberadas al sistema circulatorio. El sistema circulatorio es un sistema abierto, es decir el corazón (el cual se localiza rodeando al intestino (Russell y Evans, 1989) distribuye la hemolinfa al cuerpo, de forma no vascularizada, a través de una aorta visceral y una aorta cefálica que desembocan en senos hemolinfáticos. El seno con mayor área es el seno arterial cefálico que distribuye hemolinfa a la gónada y branquias mediante la arteria esofageal (Bourne y Redmond, 1977; Ragg, 2003).

Los abulones son organismos dioicos, es decir, tienen sexos separados (Cox, 1962; Leighton, 2000), por lo que el sistema reproductivo está compuesto por una gónada masculina y una gónada femenina. La gónada es una estructura cónica que se localiza en la parte opuesta a los poros respiratorios de los abulones (Figura 1) (Cox, 1962, Leighton, 2000).

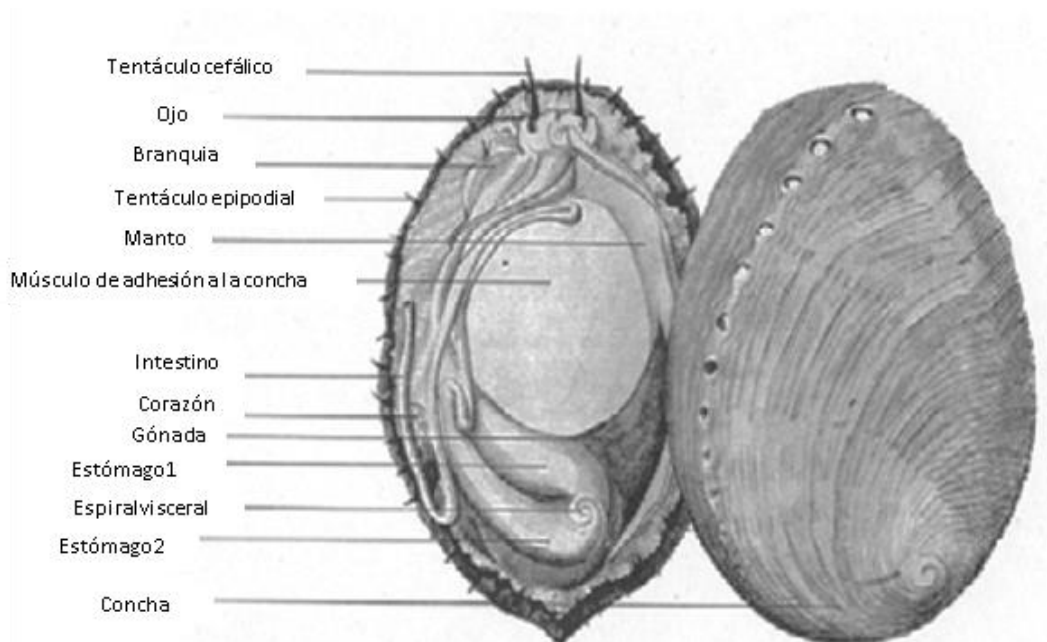


Figura 1. Disposición de órganos en haliótidos. Vista dorsal de estructuras que pertenecen al sistema sensorial (tentáculo cefálico, ojo, branquia, tentáculo epipodial), digestivo (intestino, estómago 1, estómago 2, espiral visceral), reproductivo (Gónada) y circulatorio (corazón, branquia, manto, músculo) (tomado y modificado de Heasman. y Savva, 2007).

1.1.2. Características sexuales y de reproducción de haliótidos

La gónada rodea al hepatopáncreas y tiene la misma posición en machos y hembras (Cox 1962; Sobhon *et al.*, 1999) (Figura 2). La coloración gonadal determina el sexo que tienen los individuos (Peña, 1986). Los machos presentan coloración beige o amarillo cremoso, mientras que las hembras presentan una coloración verde pardo (Booolotian *et al.*, 1962; Cox, 1962; Peña, 1986; Leighton, 2000) (Figura 3). La gónada está compuesta por células germinales en diferentes etapas de desarrollo y por células granulares que forman parte del sistema neuroendocrino (Sobhon *et al.*, 1999; Apisawetakan *et al.*, 2001; Awaji y Hamano, 2004). La primera madurez en abulones se presenta en diferentes edades de acuerdo a la especie (Leighton, 2000). En abulón azul la talla de primera madurez es de 12.7 ± 2.8 cm, sin embargo, se encuentran organismos maduros desde 6.6 cm con una fecundidad de 4.48×10^6 ovocitos por peso de hembra en la zona de pesca II (Vélez-Arellano, 2015) el tiempo en alcanzar la talla de madurez es entre los

4-5 años de edad (Leighton, 2000). Posterior a la primera madurez gonadal la especie puede generar gónada una o dos veces por año y liberar gametos de forma estacional, generalmente en verano (de Abril a Julio) y otoño (de Septiembre a Noviembre) en Baja California Sur (Leighton, 2000; Vélez- Arellano, 2016).

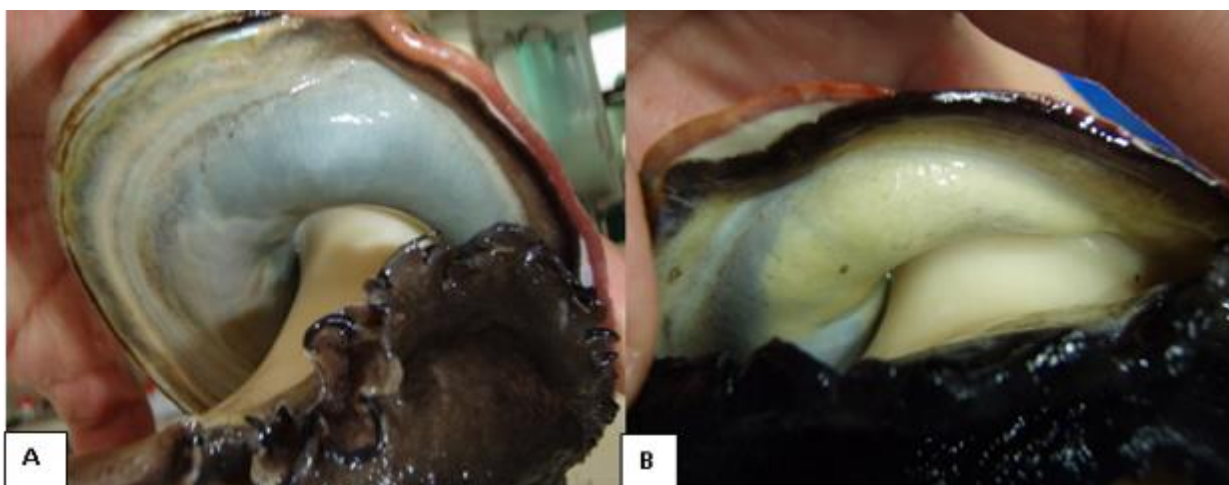


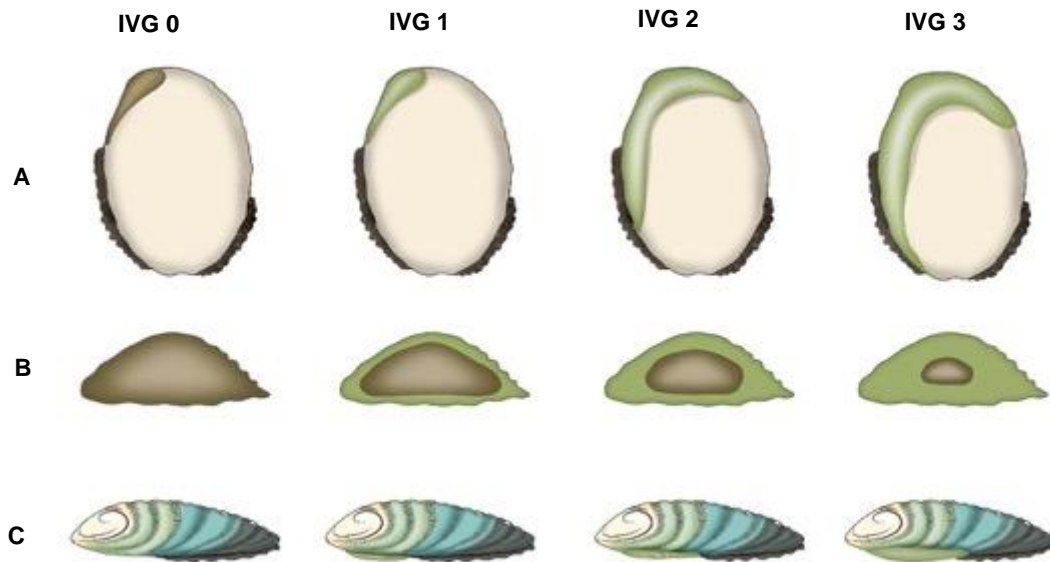
Figura 2. Diferenciación de sexo y determinación de IVG en abulón rojo (*Haliotis rufescens*). A) Gónada con coloración verde olivácea que indica es una hembra con grado de madurez en IVG 2. B) Gónada con coloración amarillo cremoso que indica es un macho con grado de abultamiento en IVG 2.

El grado de madurez se determina a través del índice visual gonadal (IVG), que es una técnica visual que consiste en asignar un valor al abultamiento de la gónada en una escala de 0-3 (Ault, 1985; Leighton, 2000) (Figura 3; Tabla 1). Donde el valor de “IVG 0” es nada de gónada y el “IVG 3” es la gónada totalmente madura, sin embargo, la técnica es subjetiva debido a que la asignación del grado de madurez estará en función de la experiencia del observador.

Tabla 1. Características de la gónada para determinación de Índice Visual Gonadal (IVG) (Leighton, 2000; Vélez- Arellano, 2016).

IVG	Descripción
0	Sin abultamiento de la gónada, predomina la coloración del hepatopáncreas (generalmente verdosa), sin diferenciación entre machos y hembras.
1	Sin abultamiento, se observa un epitelio que cubre porciones del hepatopáncreas con coloración, la diferenciación de sexos aún tiene un margen de error.
2	Abultamiento moderado que inicia la maduración gonadal, el epitelio cubre gran parte del hepatopáncreas y se torna de un color característico que puede ser: amarillo cremoso para machos o verde oliváceo para hembras por lo que la diferenciación de sexos es evidente.
3	Abultamiento pronunciado que indica que la gónada está totalmente madura, el hepatopáncreas se encuentra totalmente cubierto por la gónada y la coloración se intensifica.

Gónada femenina



Gónada Masculina

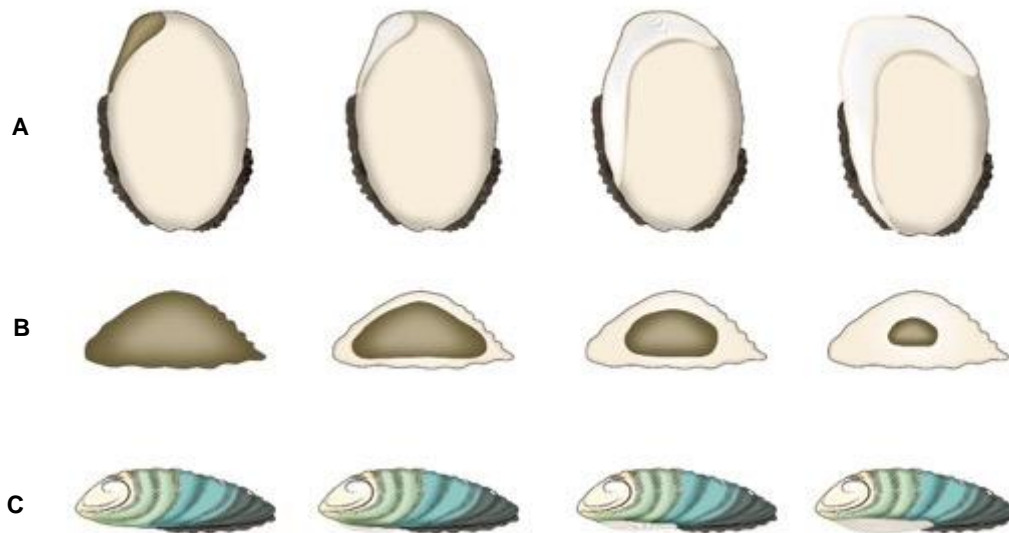


Ilustración: Jonás Martínez

Figura 3. Características de las gónadas femenina y masculina. A. Vista dorsal del crecimiento de la gónada (el crecimiento longitudinal de la gónada estará en función al IVG en el que se encuentre, el IVG 0 no muestra coloración gonadal, ni crecimiento longitudinal, en ocasiones muestra abultamiento, mientras que el IVG 1,2,3 muestran incremento longitudinal y abultamiento) B. corte transversal de la gónada (la gónada crece sobre el hepatopáncreas, en el caso del IVG 0 solo se muestra el hepatopáncreas, en cuanto incrementa la gónada el tamaño del hepatopáncreas disminuye) C. Vista lateral de abulón cuando los organismos se encuentran en IVG 0 e IVG 1 el abultamiento no es observable fuera del abulón sin embargo durante el IVG 2 y 3 el abultamiento es notorio fuera de la concha, pie y manto.

El ciclo reproductivo en abulones consta de cinco fases que son: 1) Fase proliferativa (inicio de un nuevo ciclo reproductivo), 2) Fase de gametogénesis, 3) Fase de madurez, 4) Fase de liberación de gametos y 5) Fase de postliberación de gametos (reabsorción) (Booolotian, *et al.*, 1962; Vélez-Arellano *et al.*, 2016). Cada una de las fases se puede diferenciar ya que presenta cambios en el tamaño y la coloración de la gónada de los organismos (Figura 4).

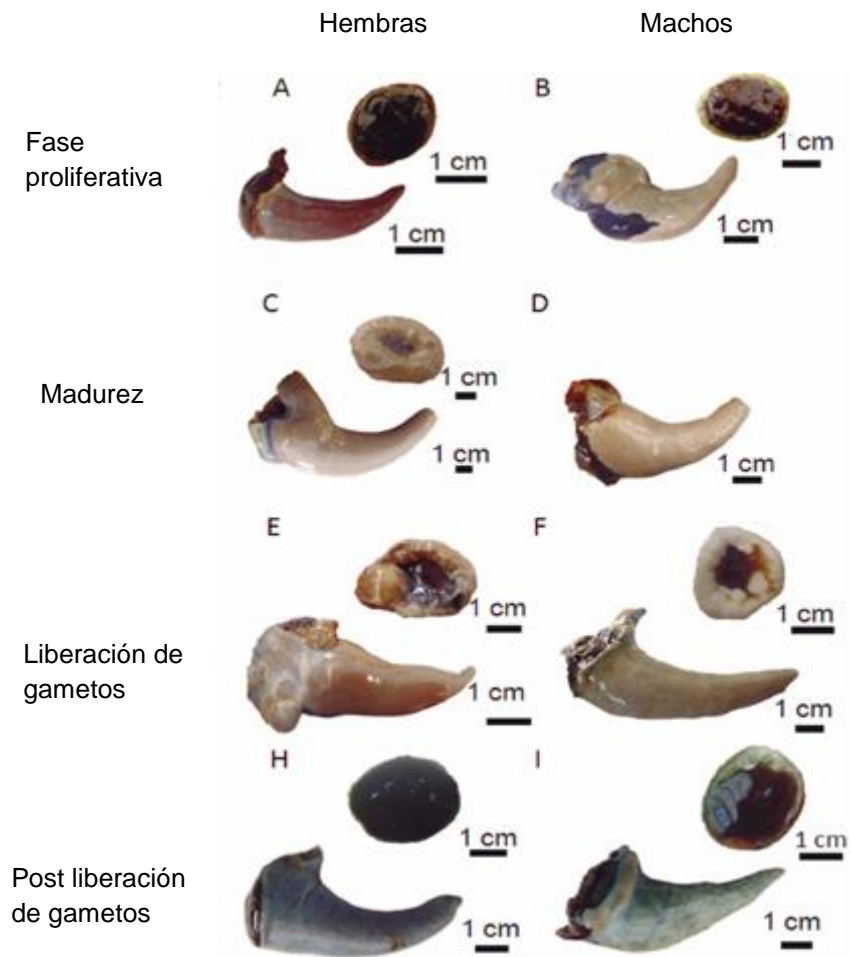


Figura 4. Estados de desarrollo gonadal de abulón azul (*Haliotis fulgens*). A), C), E) y H) Etapas gonadales femeninas, B), D), E) y F) Etapas gonadales masculinas. La gónada rodea el hepatopáncreas. (Tomado de Velez-Arellano, 2015).

Tabla 2. Estados de desarrollo gonadal del abulón. Fases Proliferativa, Gametogénesis, Madurez, Liberación de gametos y Reabsorción de gametos

Fase	Descripción
Proliferativa	<p>Los gametos en diferentes estados de desarrollo (la mayoría inmaduros) se encuentran adheridos a pliegues de músculo liso denominados trabéculas. En esta etapa la gónada no muestra abultamiento, y mantiene una coloración verdosa parda (coloración del hepatopáncreas) (Apisawetakan <i>et al.</i>, 2001) (Figura 5A)</p>
Gametogénesis	<p>La gónada está compuesta por células germinales y gametos en diferentes etapas de desarrollo que se encuentran unidos a trabéculas y el hepatopáncreas aún cubre una superficie extensa con respecto a la gónada (Figura 3). La diferenciación de células germinales en ovocitos (hembras) o espermatozoides (machos) se presenta en juveniles de entre 15 y 34 mm para <i>Haliotis discus hannai</i> (Awaji y Hamano, 2004). Los gametos femeninos tienen seis etapas de desarrollo: 1) Oogonias, 2) Ovocito estadio I, 3) Ovocito estadio II, 4) Ovocito estadio III, 5) Ovocito estadio IV y 6) Ovocito estadio V. En la gónada masculina se clasifican trece estadios que son 1) Espermatogonias, 2) Espermatoцитos primarios, 3) Espermatoцитos en leptoteno, 4) Espermatoцитos en zigoteno 5) Espermatoцитos en paquiteno, 6) Espermatoцитos en diploteno, 7) Espermatoцитos diaquitenicos y metafásicos, 8) Espermatoцитos secundario, 9) Espermátida I, 10) Espermátida II, 11) Espermátida III, 12) Espermátida IV y 13) Espermatozoides (Sobhon <i>et al.</i>, 1999; Vélez-Arellano <i>et al.</i>, 2016) (Figura 5B)</p>
Madurez	<p>La temperatura (Uki y Kikuchi, 1984) y composición nutricional del alimento (Jumah <i>et al.</i>, 2016) son factores externos a los organismos que determinan el grado de maduración gonadal y la calidad y cantidad de los gametos (Rogers-Bennet <i>et al.</i>, 2010; Vélez-Arellano <i>et al.</i>, 2016). Durante esta etapa la gónada se caracteriza por haber cubierto totalmente al hepatopáncreas de los organismos debido a que los gametos ya se encuentran maduros y listos para ser expulsados al medio (Figura 5C)</p>
Liberación de gametos	<p>La liberación de gametos puede ser de tipo sincrónico o asincrónico (Leighton, 2000). Se considera como el producto de tres factores que son: grado de madurez de la gónada; intensidad del estímulo y condiciones en que se da el estímulo (Morse <i>et al.</i>, 1977). Dichos estímulos pueden ser factores exógenos y endógenos (Hahn, 1994A). Los factores exógenos o ambientales que afectan al ciclo gonadal son temperatura y calidad del agua, fotoperiodo, salinidad, nutrición e incluso el tiempo de exposición a aireación (Setyono, 2006; Webber y Giese, 1969). La actividad gametogénica es controlada por factores endógenos tales como el sistema endocrino (Webber y Giese, 1969). La liberación de gametos en vida silvestre es afectada por combinación de estímulos exógenos que promueven a los estímulos endógenos para realizar la liberación de gametos. Sin embargo, en cautiverio la regla no se cumple debido a que factores tales como: estrés, manejo, condiciones de cultivo y alimentación de los organismos influye de manera directa en la calidad de la liberación de gametos que es directamente proporcional a la calidad de los gametos (Morash y Alter, 2016)</p>
Reabsorción de gametos	<p>En abulón azul los durante la reabsorción se ha observado que los gametos presentan ausencia de nucléolo o nucléolo amorfo y con abundante citoplasma en el caso de hembras los gametos son denominados ovocitos atrésicos, por lo que aunque haya coloración de la gónada y pueda diferenciarse los gametos, ya no son liberados (Vélez-Arellano, 2016).</p>

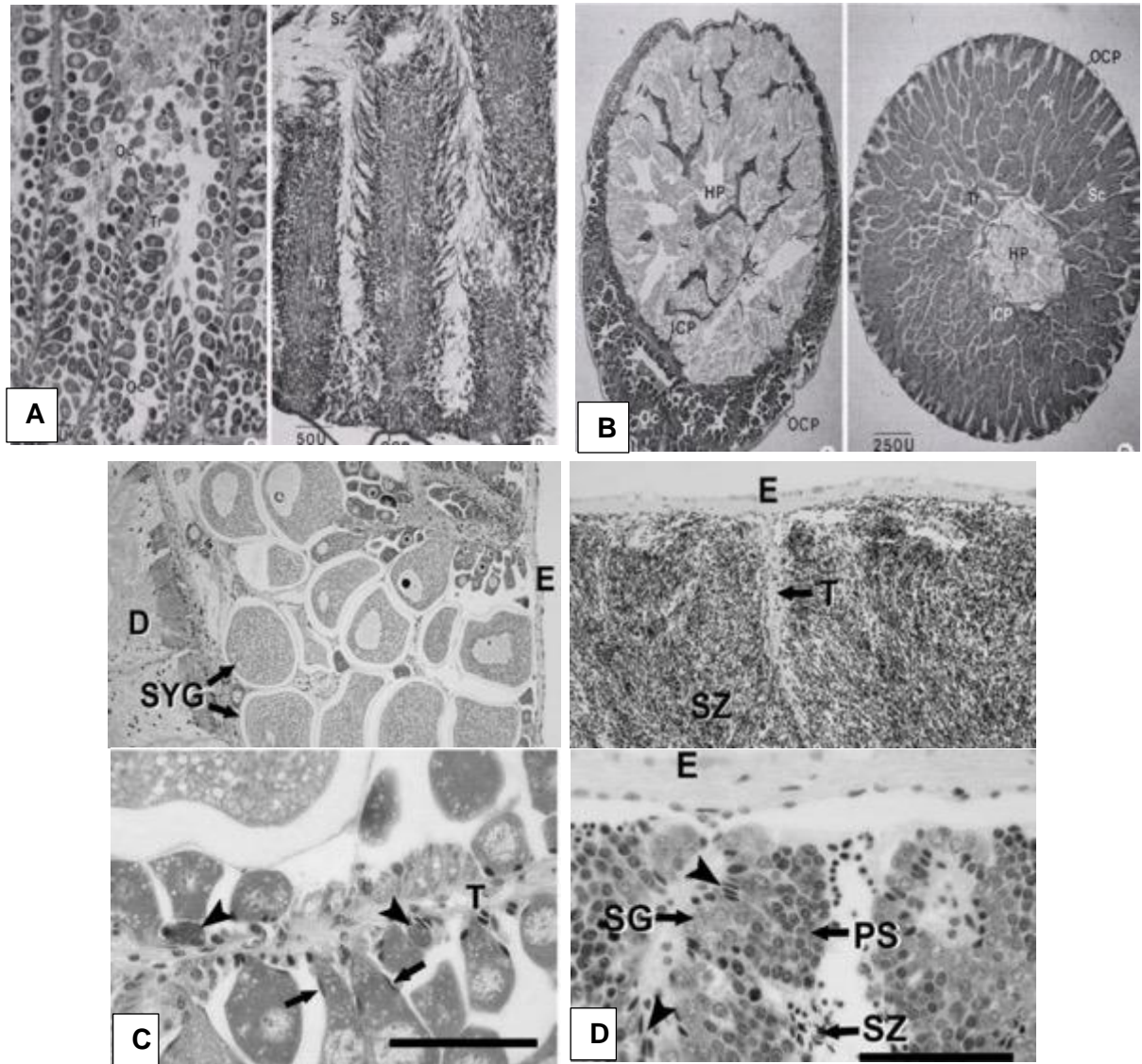


Figura 5. Interior de la gónada. A) Cortes transversales de gónadas. Gónada femenina (Izquierda) con ovocitos y Gónada masculina (Derecha) con espermatozoides (tomado de: Apizawetakan et al., 2001). **B) Corte trasversal de la gónada de *Haliotis asinina*.** Gónada femenina (Izquierda) y gónada masculina (Derecha) HP: hepatopáncreas; ICP: capsulas interiores que rodean al hepatopáncreas; OCP: capsulas exteriores que rodean a la gónada; OC: ovocitos en desarrollo; TR: trabéculas; Sc: espermatozoides (tomado de: Apizawetakan et al., 2001). **C) Localización de células granulosas en trabéculas de *Haliotis asinina*.** Gónada femenina madura con ovocitos en etapa V (SYG) (superior e inferior izquierdo), Gónada masculina madura. SZ: espermatozoides; D: Divertícula digestiva; E: Epidermis; T: Trabécula; Flechas negras: células granulosas acidofílicas en trabéculas con ovocitos; SG: espermátogonia; PS: espermatoцитos primarios (superior e inferior derecho) (tomado de Awaji y Hamano, 2004).

El inicio de cada una de las fases de reproducción es inducido mediante la percepción de señales o estímulos a través del sistema sensorial, que convierte una señal física o química (cambios en la temperatura, fotoperiodo, salinidad, pH, estrés oxidativo y manipulación) en una señal bioquímica (cambios en el potencial de membrana celular). Las señales bioquímicas producen una respuesta en el sistema neuroendocrino mediante la liberación de sustancias como péptidos, metabolitos u hormonas que dan inicio a la fase de liberación de gametos (Hahn, 1994_B; Chase, 2002).

1.1.3. Órganos para recepción de estímulos en haliótididos

En moluscos las estructuras identificadas como quimiosensitivas son: el osofradio que es un epitelio laminar especializado en detectar cambios en pH y calidad de agua localizado en las bases branquiales de gasterópodos y los tentáculos cefálicos (dispuestos en el rostro de los moluscos) que cuentan con epitelio sensorial. En algunos moluscos los tentáculos del manto también tienen capacidad quimiosensitiva. Sin embargo, existen estructuras encargadas de traducir señales lumínicas o señales térmicas. Las señales lumínicas son detectadas principalmente por los ojos (Kataoka y Yamamoto, 1981). La piel también funciona como un órgano fotosensitivo (Figura 6). La percepción de señales lumínicas está asociada a una respuesta de hiperpolarización de la membrana dependiente de K^+ mientras que las señales térmicas se traducen a un incremento en el metabolismo (ritmo cardiaco, estallido respiratorio) de los organismos (Chase, 2002).

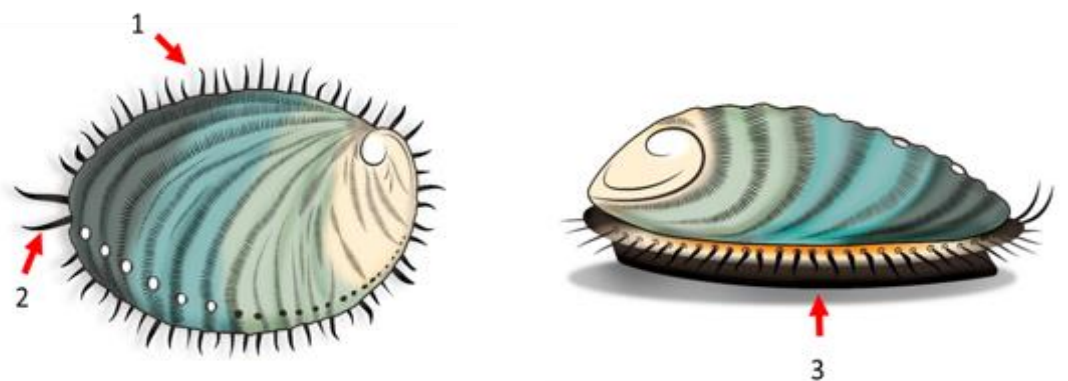


Ilustración: Jonás Martínez

Figura 6. Órganos quimiorreceptores en moluscos gasterópodos. Los órganos quimiorreceptores y fotorreceptores son: (1) tentáculos, (2) tentáculos paliales (3) pie.

1.1.4. Sistema neuroendocrino en haliótidos

El sistema endócrino en moluscos está asociado a el sistema nervioso central (SNC). El SNC comprende los ganglios bucal, cerebral, pleural, pedal y branquial antes de la torsión (Chase, 2002). Posterior a la torsión, el ganglio branquial se divide y da origen a dos ganglios intestinales que son supraesofageal y subesofageal (Chase, 2002; Figura 4). Los ganglios están compuestos por células neurosecretoras que tienen la forma y talla de las neuronas convencionales (Hahn, 1994b). Yahata (1971) identificó, describió y nombró a los tipos de células existentes en los ganglios de *Haliotis discus hannai*. Adicionalmente, demostró que la cantidad de los diferentes tipos celulares neuronales varían conforme a la estación o etapa reproductiva en la que se encuentran. Los tipos de células neuronales fueron llamados A, B, C y D (Tabla 3). Posteriormente, en la misma especie se demostró que la intensidad de las células neurosecretoras de tipo A muestran correlación con la vitelogénesis en el ovario, mientras que el tipo celular B no muestra correlación con ningún evento reproductivo (gametogénesis, vitelogénesis o liberación de gametos (Hahn, 1994b).

Tabla 3. Clasificación de células neurosecretoras en ganglio cerebral de *Haliotis discus hannai*. Los ganglios están formados por diferentes tipos neuronales, cada tipo neuronal tiene diferentes funciones como segregación de péptidos o proteínas que señalizan alguna respuesta biológica (Yahata, 1971; Hahn, 1994b).

Tipo celular	Localización	Características	Tamaño (µm)
Células tipo A	En la periferia de los ganglios cerebral, pleural y pedal	Se encuentran solas o en agregados y en su interior contienen gránulos neurosecretores (asociados a síntesis de hormonas y péptidos)	20-32
Células tipo B	Forma una capa en la periferia del ganglio cerebral	Es el tipo celular más numeroso	13-15
Células tipo C	Están en cantidades individuales o formando una capa en la médula del ganglio	Células con poco citoplasma y sin gránulos	5-7
Células tipo D	Médula del ganglio cerebral	Células con forma de cometa	7

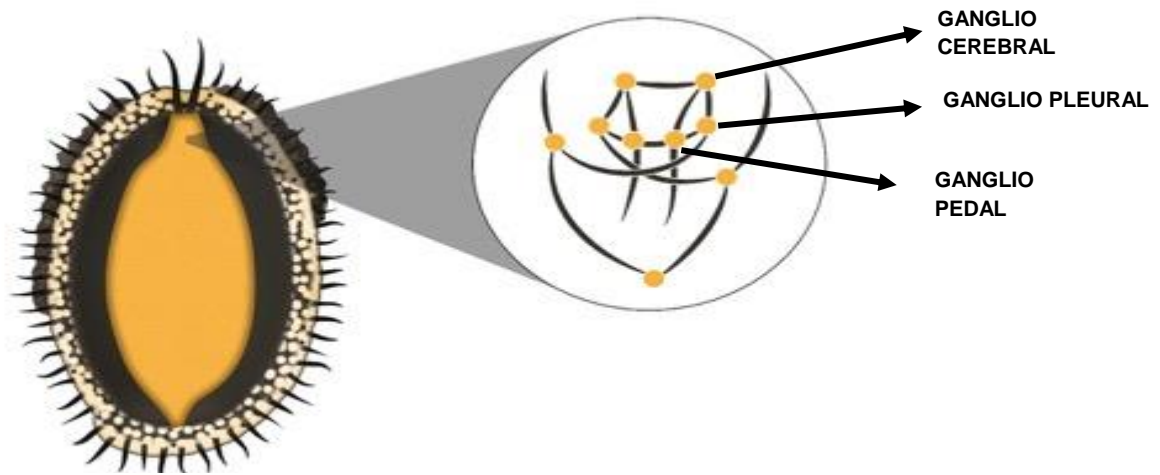


Figura 7. Sistema nervioso central en *Haliotis* spp. El sistema nervioso central de los haliótidos está formado por grupos de neuronas de diferentes tipos (A, B, C y D) a los grupos de neuronas se les conoce como ganglios (tomado y modificado de Dorsset, 1986).

1.1.5. Metabolitos asociados a la liberación de gametos

Los organismos vivos en general producen diferentes tipos de metabolitos que pueden iniciar o finalizar respuestas biológicas de los organismos (Manduzio *et al.*, 2005). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son metabolitos producto de la respiración (Ahmad, 1995). Si hay un incremento en la producción de ERO se produce lo que se conoce como estrés oxidativo que es la pérdida de capacidad antioxidante de un sistema biológico (Saleuddin y Mukai, 2017). En organismos silvestres, el incremento de ERO está relacionado con la respuesta natural ante la presencia de agentes patógenos como bacterias o condiciones ambientales que aceleran el metabolismo por lo que, incrementa el estallido respiratorio (Hooper *et al.*, 2007). En organismos en cautiverio, la producción de especies reactivas de oxígeno puede deberse al mantenimiento de altas densidades de organismos en espacios restringidos, diversidad genética, incremento de patógenos, infestación de parásitos y diversidad de nutrientes (Lovejoy y Barside, 2011).

Los sistemas biológicos tienen una capacidad limitada para conservar ERO, debido a que incremento excesivo de ERO en los organismos puede causar disrupción de la membrana celular, destrucción de proteínas y degradación de ADN (Lovejoy y Barside, 2011). La homeostasis (el equilibrio) se mantiene mediante la capacidad antioxidante de los organismos (Saleuddin y Mukai, 2017). La capacidad antioxidante está determinada por un grupo de enzimas que son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa

y glutatión peróxidasa (Lovejoy y Barside, 2011). Estas enzimas convierten los radicales libres como $2O_2^- + 2H^+$ en $H_2O_2 + O_2$, la conversión de las ERO permiten que no haya daño celular (Manduzio *et al.*, 2005). Lo que complementa a las enzimas para contrarrestar el estrés oxidativo son químicos disponibles en el alimento como vitamina C, vitamina E y melatonina (Lovejoy y Barside, 2011).

La presencia de H_2O_2 en los organismos al finalizar la etapa de maduración, induce un proceso denominado peroxidación lipídica que consiste en el desprendimiento de ácido araquidónico de la membrana celular (Gutteridge y Halliwell, 1990). La peroxidación lipídica está correlacionada con la reducción de enzimas antioxidantes (Manduzio *et al.*, 2005). El ácido araquidónico al quedar disponible inicia un proceso mediante el cual la enzima ciclooxigenasa (COX) induce la síntesis de prostaglandinas (Farooqui y Farooqui, 2011). En abulón el incremento de las prostaglandinas (PG's) se ha asociado a eventos de liberación de gametos (Morse *et al.*, 1977; Reza, 2009). Las formas inducidas de suministrar especies reactivas de oxígeno para inducir a la liberación de gametos son adicionando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Morse *et al.*, 1977) y agua de mar irradiada con luz UV (Uki y Kikuchi, 1984).

1.1.6. Hormonas y péptidos asociados a la liberación de gametos

La cantidad de células neuronales puede ser diferente durante las diferentes épocas reproductivas, principalmente las células tipo A que se caracterizan por tener gránulos secretores (Hahn, 1994_B). En la última década se ha estudiado la expresión molecular de péptidos, proteínas y metabolitos asociada a eventos reproductivos como maduración y liberación de gametos (York *et al.*, 2012; Mendoza-Porras *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018). Estos autores coinciden en que existe una asociación entre las células de tipo A y los eventos de maduración y liberación de gametos. Las neuronas de tipo A contienen gránulos secretores que liberan sustancias durante las épocas de reproducción (Hahn, 1994_B). Actualmente se han identificado macromoléculas, como proteínas, péptidos y hormonas, relacionadas con la reproducción de abulón utilizando proteómica (Nurai *et al.*, 2010a; York *et al.*, 2012; Mendoza-Porras *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018). Sin embargo, los estudios *in vivo*, respecto a estas moléculas son escasos (Chansela *et al.*, 2008; Van In *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018). Por ejemplo, se identificó el gen de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH = Gonadotropin-releasing hormone) en el ganglio pleuro-pedal y se reportó el efecto *in vivo* de la hormona Has-GnRH para estimular el desarrollo gonadal en la especie *H. asinina* (Nurai *et al.*, 2016). Por otro lado, se probó el efecto de la hormona de la puesta de huevos (ELH = Egg-laying hormone) en la maduración gonadal de *H. asinina* donde observó un incremento en gónada

al finalizar el experimento (Nuurai *et al.*, 2010b). Hasta el momento existen pocos estudios que han probado el uso de péptidos u hormonas en la maduración gonadal de abulón. De la misma forma se han identificado moléculas relacionadas con la liberación de gametos como el tetrapéptido Alanina-Prolina-Glicina-Triptófano (APGWamida); (Lange y Minnen, 1998; Chansela *et al.*, 2008; York *et al.*, 2012; Botwright *et al.*, 2015; Mendoza-Porras *et al.*, 2015; Van In *et al.*, 2016). También se han reportado proteínas como Has-MAP 2 y Has-MAP 3 aisladas del mucus de *Haliotis asinina* que se correlacionan con etapas reproductivas y podrían funcionar como inductores durante la etapa de reproducción (Kuanpradit *et al.*, 2011).

1.1.7. Métodos de inducción a la liberación de gametos

Existen diferentes tipos de inductores a la liberación de gametos y de diferente origen, que puede ser químico, físico o biológico empleados para moluscos (FAO, 1990). En abulones, los inductores probados son: peróxido de hidrógeno con TRIS (H_2O_2 -TRIS), choque térmico, desecación, aereación vigorosa, agua de mar irradiada con UV e inclusive agregar al agua, donde se encuentran los organismos, una suspensión de espermatozoides desactivados (Leighton, 2000; Setyono, 2006). Algunas veces son utilizados de forma individual o en combinación. Sin embargo, la combinación de los métodos de inducción no se recomienda debido al alto grado de estrés que ocasiona en los organismos (Vosloo y Vosloo, 2017). El método H_2O_2 -TRIS, es el más utilizado debido a su mayor efectividad en diferentes especies de haliótidos (Morse *et al.*, 1977; Moss *et al.*, 1995; Setyono, 2006). Recientemente han surgido nuevas alternativas de inductores biológicos como el neuropéptido APGWamida que se ha estudiado en *Haliotis asinina* y *Haliotis discus hannai* en donde se evidencia la eficiencia del tetrapéptido como inductor a la liberación de gametos en machos.

1.1.8. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 -TRIS) como inductor

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) conocido también como dióxido de hidrógeno o agua oxigenada es usado como inductor en la liberación de gametos debido a que forma radicales libres en el agua. Estos radicales desprenden ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) como lo es el ácido araquidónico (20:3n-4), ácido dihomo- γ -linolénico (20:3n-6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA o 20:5n-3), para activar a la enzima ciclooxigenasa (Reza, 2009). La ciclooxigenasa asociada a la reproducción de moluscos es la ciclooxigenasa

2 (COX-2) que permite la síntesis de metabolitos entre los cuales se encuentran las prostaglandinas (Morse *et al.*, 1977; Setyono, 2006; Deridovich y Reunova, 1993). Las prostaglandinas (PG) se expresan en el sistema nervioso y su localización intracelular se asocia al retículo endoplásmico y membrana nuclear (Reza, 2009). Las PG actúan uniéndose a receptores que se encuentran acoplados a proteínas G. Estos receptores pueden ser: Guanosin difosfato (GDP), Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), Diacilglicerol (DAG) (Bos *et al.*, 2004). La prostaglandina asociada a la reproducción en haliótidos es la prostaglandina F. La función de la prostaglandina F es estimular la contracción del músculo liso que lleva a la liberación de gametos (Leighton, 2000; Reza, 2009). El efecto que tienen las PG en invertebrados está relacionado con la contracción del músculo liso de la gónada (Brea y Mico, 2000). La metodología para la aplicación de la solución de H₂O₂-TRIS que se usa para la inducción a la liberación de gametos en abulón es la descrita por Morse *et al.* (1977) que consiste en agregar una solución de H₂O₂ al 6% V/V con TRIS al 2M a agua de mar en la que se encuentran los organismos durante dos o tres h como máximo (depende de la especie) (Morse *et al.*, 1977; Setyono, 2006). En abulón rojo (*H. rufescens*) el tiempo de estímulo es de aproximadamente dos h para hembras y de 1 h 45 min para machos (*com. pers.* González-Aragón; CICESE, 2018). Mientras que, ensayos previos realizados con las especies de abulón amarillo (*H. corrugata*) y azul (*H. fulgens*) se ha observado que estos tardan de cuatro a seis horas en estimularse a la concentración de peróxido propuesta por Morse *et al.* (1977) (*com. pers.* González-Aragón; CICESE, 2018). La utilización del H₂O₂-TRIS como inductor en la liberación de gametos es especie-específico, por lo que las dosis y tiempos de respuesta varían entre especies (Leighton y Lewis, 1982). De acuerdo a diversos autores, la efectividad de este inductor en abulones puede variar del 30 al 76 %; observándose que los machos generalmente liberan gametos con el método y en menor tiempo, mientras que en hembras la respuesta es de porcentajes menores al 50 %, en ocasiones es nula (Tabla 4). Por otra parte, existen evidencias de que hay un daño al ADN de hemocitos en abulones adultos expuestos a este agente oxidante (Vosloo y Vosloo 2017).

1.1.9. Tetrapéptido APGWamida como inductor

Los neuropéptidos actúan de forma más rápida que los neurotransmisores, ya que las señales se envían a través de las terminales nerviosas que generalmente terminan en proteínas de la membrana plasmática de órganos blanco (Yu *et al.*, 2015). Los péptidos median estados metabólicos como estado reproductivo, equilibrio iónico, la integración sensorial del entorno homeostático y ritmos circadianos (Fieber, 2017). El neuropéptido que se ha asociado con la liberación de gametos es el tetrapéptido APGWamida (York *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015). El efecto en la liberación de gametos de abulones del tetrapéptido APGWamida

(Ala-Pro-Gly-Trp-NH₂) ha sido probado en *H. asinina* y *H. discus hannai* (Chansela *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2018).

La presencia de APGWamida ha sido evidenciada en moluscos a través de diversos estudios donde coinciden en que la síntesis se lleva a cabo en el ganglio cerebral de moluscos como: *Fusinus ferrugineus* (Kuroki *et al.* 1990), *Helix aspersa* (Chen y Walker, 1992) y *Lymnaea stagnalis* (De Lange *et al.*, 1998). Incluso se puede encontrar en el oviducto de *Octopus vulgaris* (Di cristo *et al.*, 2005) y en células neuronales de machos en *Idiosepius pigmaeus* (Morishita *et al.*, 2010). En *H. discus hannai* se observó que la expresión del neuropéptido se presenta en los ganglios pleuro-pedal, branquial y cerebral (Kim *et al.*, 2018). Aunque se conoce el sitio de expresión del tetrapéptido el mecanismo de acción no es claro, pues en *Helix aspersa* el tetrapéptido no tiene un efecto en el potencial de membrana, es decir, no actúa como un neurotransmisor si no que induce la producción de dopamina (Chen y Walker, 1992). La estructura primaria de APGWamida es una preprohormona esto se deduce por una secuencia de cADN que precede a una prohormona. El precursor de APGWamida en *Aplysia* sp. contiene 209 aminoácidos y en *Mytilus* sp. 196 aminoácidos. El gen precursor de APGWamida se expresa en el lóbulo anterior derecho del ganglio cerebral (Kastin, 2013; Yu *et al.*, 2015).

APGWamida es un péptido neuromodulador común en moluscos que se relaciona en el desarrollo reproductivo y crecimiento (Yu *et al.*, 2015). El mecanismo de acción de APGWamida no está totalmente elucidado. Se sabe que en moluscos funciona como un neuromodulador del movimiento peristáltico de los vasos deferentes durante la cópula (Oberdörster *et al.*, 2005). Además controla diversas funciones del músculo como contracción, relajación, tensión y espasmos (Yu *et al.*, 2015). La acción de APGWamida en *Haliothis asinina* está dada en las regiones pre y postsináptica, que provocan contracciones musculares en la gónada (York *et al.*, 2012).

En *H. asinina*, se ha evaluado el efecto del tetrapéptido APGWamida (*Has-APGWamida*) como inductor mediante inyección directa, observándose una respuesta del 87 % de los machos sin observar respuesta en hembras (Chansela *et al.*, 2008). Por otra parte, York *et al.* (2012) encontró que la expresión de *Has-APGWamida* aumenta durante el ciclo reproductivo de la especie *H. asinina*, alcanzando su pico máximo el día de la liberación de gametos y viéndose reducida al día siguiente de la liberación. Aunque el péptido se expresa en ambos sexos, las hembras tienen una mayor expresión que los machos. Recientemente, se ha probado el efecto de APGWamida *in vivo* en la inducción a la liberación de gametos en machos de *H. discus hannai*. En el estudio, los machos inyectados con solución salina (control) mostraron liberación de

gametos al igual que los abulones inducidos con el tetrapéptido APGWamida (1 mM); sin embargo, la cantidad de gametos obtenidos fue mayor con el tetrapéptido APGWamida (Kim *et al.*, 2018) (Tabla 5).

Tabla 4. Antecedentes del uso del inductor H₂O₂-TRIS. Diferentes respuestas y especies en que se ha probado.

Especie	Número de abulones (n)	Org. que respondieron	Machos	Hembras	Fertilización	Autor
		(%)	(%)	(%)	(%)	
<i>H. rufescens</i>	31	96	46	54	-	Morse <i>et al.</i> (1977)
<i>H. iris</i>	-	-	43	15	89	Moss <i>et al.</i> (1995)
<i>H. asinina</i>	-	-	30	20	32	Setyono (2006)
<i>H. fulgens</i>	109	21	14.6	6.5		(Reynolds <i>et al.</i> , 2015)
<i>H. fulgens</i>	38	0	0	0	0	Com. pers. González-Aragón; CICESE (2018)
<i>H. fulgens</i>	30	2	2	0	0	Com. pers. Aguilar-Osuna; S.C.P.P. PROGRESO, 2018

Tabla 5. Antecedentes del uso del inductor APGWamida. Diferentes respuestas y especies en que se ha probado.

Especie	Número de abulones (n)	Org. que respondieron	Machos	Hembras	Fertilización	Autor
		(%)	(%)	(%)	(%)	
<i>Saccostrea glomerata</i>	24	-	No se midió	70-80	No se midió	Van In <i>et al.</i> (2016)
<i>H. asinina</i>	48	20	87	0	No se midió	Chansela <i>et al.</i> (2008)
<i>H. asinina</i>	Se verificó la expresión del gen de APGWamida previo y durante la liberación de gametos en machos y hembras					York <i>et al.</i> (2012)
<i>H. discus hannai</i>	-	7	75	No fueron expuestas	No se midió	Kim <i>et al.</i> (2018)

1.2 Justificación

El abulón azul es una especie con potencial de cultivo. Sin embargo, hasta el momento, no hay unidades de producción y solo existen cuatro laboratorios de producción de larvas de abulón con fines de repoblamiento. Las limitantes para la producción de larvas y cultivar esta especie son, por una parte la falta de acondicionamiento a la maduración gonadal de los reproductores en cautiverio por lo que, la producción depende de los organismos maduros en el medio natural y por otro lado de la eficiencia de los inductores usados para la liberación de gametos. Generalmente, la inducción para la liberación de gametos en abulón se realiza utilizando inductores que provoquen estrés oxidativo. Por ejemplo, utilización de H₂O₂-TRIS, desecación o agua de mar irradiada con UV o la combinación de estos métodos. La utilización de estos inductores puede causar una resistencia a nuevos estímulos y cabe la posibilidad de que no respondan al inductor. El inductor más efectivo para la liberación de gametos en abulones ha sido el H₂O₂-TRIS; sin embargo, la eficiencia es especie-específica y no todas las especies responden a este. Por otra parte, en los últimos años se han probado como alternativa inductores biológicos como el tetrapéptido APGWamida, el cual ha resultado ser eficaz para inducir a la liberación de esperma en *H. asinina* y *H. discus hannai*. El H₂O₂-TRIS es el inductor químico tradicionalmente usado y APGWamida es el único inductor biológico que se encuentra en proceso de investigación como inductor para abulón, por lo que sería importante probar la efectividad de estos dos inductores en la liberación de gametos de abulón azul. Este trabajo aportará nuevas perspectivas la investigación de inductores para la liberación de gametos en abulón, así como nuevas alternativas para los productores.

1.3 Hipótesis

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂-TRIS) aplicado a una concentración de 9 % V/V, aumentará el porcentaje de liberación de gametos en abulón azul, comparado con la concentración estándar (6 % V/V) usada en otras especies.

El tetrapéptido APGWamida en sus dos concentraciones (2.5 y 5 µg/g organismo), tendrá un efecto inductor a la liberación de gametos masculinos en machos de abulón azul, y el porcentaje de machos incrementará a dosis más altas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 -TRIS) y el neuropéptido APGWamida en la liberación de gametos del abulón azul (*Haliotis fulgens*).

1.4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 -TRIS) administrado en dos concentraciones (6 y 9 % V/V) en el éxito de la liberación de gametos, el tiempo de respuesta y la cantidad de gametos del abulón azul (*Haliotis fulgens*).

Evaluar el efecto del neuropéptido APGWamida administrado a 2.5 y 5 μ g/g de organismo en el éxito de la liberación de gametos, el tiempo de respuesta y la cantidad de gametos del abulón azul (*Haliotis fulgens*).

Capítulo 2. Metodología

2.1 Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos utilizando organismos con Índice Visual Gonadal 1 (IVG 1), IVG 3 y organismos en reabsorción. En todos los experimentos se probaron dos inductores a la liberación de gametos: el inductor 1) peróxido de hidrógeno-TRIS (H_2O_2 -TRIS) a dos concentraciones (6 y 9 % V/V) y un control con agua de mar sin solución inductora y 2) el neuropéptido APGWamida suministrado vía intramuscular en dos concentraciones (2.5 y 5 μ g de APGWamida por gramo de organismo) y un control que fue la solución fisiológica de Ringers sin APGWamida. El tamaño de muestra varió entre experimentos debido a la disponibilidad de organismos (ANEXO 1; Tabla 6). Para realizar el primer experimento se utilizó un total de 72 abulones de primera generación en cautiverio (G1) con un IVG 1, longitud promedio de 7 ± 0.6 cm y un peso promedio de 52 ± 10 g. Para cada tratamiento se utilizaron 12 abulones (6 machos y 6 hembras). Para el segundo experimento se usaron 24 abulones silvestres con un IVG 3 longitud promedio de 16.6 ± 1.3 cm y un peso promedio de 688.7 ± 191.4 g. Para cada tratamiento se utilizaron 2 machos y 2 hembras. Finalmente, para el tercer experimento, se usaron 24 abulones G1 de cultivo con gónadas en reabsorción con una longitud promedio de 8.3 ± 1.1 cm y un peso promedio de 76.2 ± 27.4 g. Para cada tratamiento se utilizaron 4 abulones (3 machos y 1 hembra).

2.2 Identificación de sexo y grado de madurez en organismos seleccionados

Los organismos fueron identificados y separados por sexo con base en la coloración de las gónadas (Cox, 1962). En el caso del abulón azul, los machos presentan una coloración que varía de blanco-cremoso a amarillo, mientras que, las hembras presentan una gónada de color grisáceo-verdoso a café claro (Leighton, 2000). Una vez seleccionados los lotes de hembras y machos, se determinó el grado de madurez gonadal individual utilizando el IVG descrito por (Leighton, 2000; Vélez-Arellano *et al.*, 2016).

2.3 Inducción a la liberación de gametos

2.3.1 Peróxido de hidrógeno-TRIS (H₂O₂-TRIS)

Posterior a la selección y toma de datos biométricos los organismos fueron separados por sexo y colocados en contenedores individuales de 0.5 L y se dejaron en desecación por dos horas. Posteriormente, se agregó 400 ml de la solución inductora al 6 o 9 % V/V (ANEXO 2). En el tratamiento control solamente se adicionó 400 ml de agua de mar filtrada. Una vez agregada la solución inductora, los contenedores fueron cubiertos con plástico negro y los organismos se incubaron por 2 horas. Cada 30 min los organismos fueron revisados y se registró su comportamiento. Terminada la exposición al peróxido, se retiró el agua que contenía la solución inductora y los organismos fueron enjuagados con agua de mar filtrada para eliminar residuos. Después, los organismos se colocaron en el recipiente que contenía 400 ml de agua de mar y aireación constante. A partir de aquí, se registró la respuesta de los organismos durante las siguientes 12 h (el protocolo de inducción usado se muestra en el anexo 4).

2.3.2 Neuropeptido APGWamida

Se preparó una solución del neuropeptido APGWamida (GeneScript) a 5 µg/ml (0.0116 M) en solución fisiológica de Ringer (ANEXO 3). Para cada tratamiento, los organismos fueron inyectados con los volúmenes ajustados a partir de la solución madre del neuropeptido APGWamida para que finalmente se mantuviera una concentración de 2.5 o 5 µg de APGWamida por gramo de organismo. La inyección se realizó vía intramuscular en el seno arterial linfático (Figura 8) utilizando una jeringa para insulina (aguja 13 mm), según la metodología descrita por *Com. pers.* Hernández-Rodríguez; CICESE (2017). El volumen de inyección por organismo varió de 150 a 400 µl, dependiendo del peso de los organismos, sin rebasar los 400 µl para evitar daño en los organismos siguiendo las observaciones indicadas por *com. pers.* Hyde; NOAA, (2018) Posterior a la inyección, los organismos fueron colocados en contenedores individuales con 0.5 L de agua de mar filtrada y aireación. Los organismos se mantuvieron en observación durante 12 h (el protocolo de inducción usado se muestra en el anexo 5).

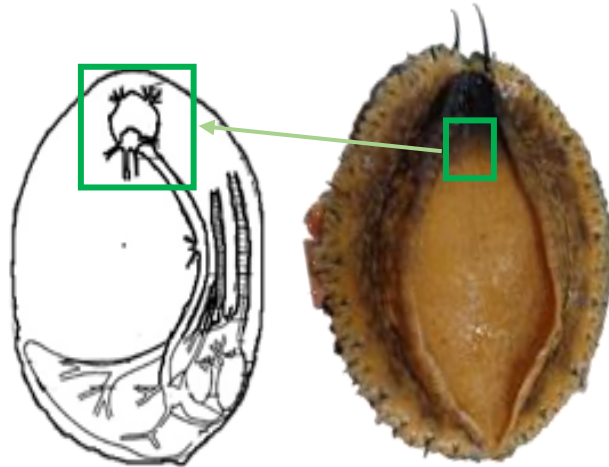


Figura 8. Localización del sistema circulatorio de abulón. Seno arterial cefálico (cuadro verde). Sitio de inyección del neuropéptido APGWamida (Bourne, 1977).

2.3.3 Respuestas observadas post-inducción

Para determinar el efecto en la liberación de gametos de los dos inductores se evaluaron las siguientes respuestas durante el periodo de observación: (1) éxito en la liberación de gametos, (2) tiempo de respuesta al estímulo, (3) cantidad de gametos liberados. El éxito en la liberación de gametos se definió como una respuesta dicotómica. Es decir, se registró si los abulones liberaron o no liberaron gametos después de haber sido expuestos a los inductores. El tiempo de respuesta al estímulo se definió como el tiempo transcurrido desde que se aplicó el estímulo hasta el momento en que los organismos iniciaron la liberación de gametos. Para cuantificar la cantidad de gametos, los ovocitos fueron lavados con agua de mar filtrada y tamizados a 200 μm para eliminar residuos y fueron retenidos en un tamiz de 180 y 150 μm . Los ovocitos limpios y seleccionados por tamaño se depositaron en un recipiente de 2 L para homogenizar, posterior a ello se tomaron muestras por triplicado para cuantificarlos. La cantidad de ovocitos se cuantificó colocando 1 ml de ovocitos en una cámara de Sedgewick-Rafter. En el caso de los espermatozoides, estos fueron pasados por un tamiz de 45 μm para eliminar residuos y fueron homogenizados en un recipiente de 2 L. El número de espermatozoides fue cuantificado en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz (Marca VWR mod. N-WF). La determinación de la concentración de espermatozoides por mililitro se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula (Brand, 2016):

$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células} * 10,000}{\text{Número de cuadros} * \text{dilución}} \quad (1)$$

2.3.4 Análisis estadístico

Las variables éxito en la liberación de gametos y tiempo de respuesta al estímulo se describen de manera porcentual. La variable de número de gametos por organismos no cumplió con los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas por lo que se realizó el análisis estadístico no paramétrico Kruskal wallis. El nivel de significancia fue de $\alpha=0.05$. El procesamiento de datos se realizó con el paquete estadístico Minitab 17 (Minitab Inc., 2015).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Éxito en la liberación de gametos

Las hembras de abulón azul en IVG 1 expuestas al inductor H_2O_2 -TRIS respondieron en ambas concentraciones. Al ser expuestas a la concentración 6 % respondió el 33 % de las hembras. Mientras que, el 83 % de las hembras que fueron inducidas con la concentración H_2O_2 al 9 % respondió al inductor. Únicamente los machos inducidos con la concentración de 9 % del inductor H_2O_2 -TRIS respondieron, con un porcentaje del 50 %, los organismos del control no liberaron gametos. Por otro lado, las hembras de abulón azul que se indujeron con el tetrapéptido APGWamida mostraron liberación de gametos al ser expuestas en ambas concentraciones, a la concentración 2.5 $\mu\text{g/g}$ respondió el 33 % y a la concentración 5 $\mu\text{g/g}$ respondió el 66 %. Para el caso de los machos solo respondieron a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$. El porcentaje de machos que liberó gametos a esta concentración fue del 50 % los organismos del control no mostraron liberación de gametos (Figura 9).

Por otro lado, en el experimento realizado con abulón azul en IVG 3 mostró que las hembras respondieron únicamente a la concentración de 6 % del inductor H_2O_2 -TRIS, mientras que, los machos no respondieron a ninguna concentración. Los organismos control del inductor H_2O_2 -TRIS no mostraron liberación de gametos. Por otra parte, las hembras expuestas al inductor APGWamida mostraron liberación de gametos a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ (100 %) y a la concentración de 5 $\mu\text{g/g}$ (50 %) incluso las hembras el control mostraron liberación de gametos (50 %). El 100 % de los machos inducidos a la concentración de 2.5 y 5 $\mu\text{g/g}$ mostraron liberación de gametos, al igual que el 100 % de los machos control (inyectados solamente con solución de Ringer's) respondieron (Figura 11A).

Adicionalmente, se realizó un experimento con organismos en reabsorción, los abulones no liberaron gametos debido a la etapa reproductiva en la que se encontraban. El objetivo de incluir este experimento fue para la observación de una posible respuesta, en términos de comportamiento, diferente o igual a cuando los abulones tienen gametos. Se observó que los abulones expuestos al inductor H_2O_2 -TRIS no mostraron comportamientos diferentes al control, sin embargo, los machos expuestos a las concentraciones de 2.5 y 5 $\mu\text{g/g}$ mostraron contracciones musculares posteriores a la inyección del tetrapéptido, sin embargo, no liberaron gametos. La respuesta posterior a la inyección fue similar a la respuesta de los abulones en IVG 1 e IVG 3, dicha respuesta consistió en la relajación del manto e intensificación del color de los epipodios (Figura 13).

3.2 Tiempo de respuesta

Las hembras con IVG 1 expuestas al inductor H_2O_2 -TRIS en la concentración 6 % liberaron gametos después de 5 h en promedio (rango de 4-6 h), mientras que, las hembras expuestas a la concentración 9 % respondieron a las 7 h en promedio (rango de 7-8 h). Los machos expuestos a la misma concentración liberaron gametos a las 6 h promedio (rango de 5-7 h). Las hembras expuestas a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ de APGWamida liberaron gametos a las 5.5 h promedio (rango de 5-6 h), mientras que, las hembras expuestas a la concentración 5 $\mu\text{g/g}$ de APGWamida respondieron 5 h promedio (rango de 4-6h). Los machos a la concentración 2.5 $\mu\text{g/g}$ de APGWamida respondieron a las 5 h promedio.

Las hembras IVG 3 expuestas al inductor H_2O_2 a la concentración 6% presentan un tiempo de respuesta de 5 h promedio (rango de 4-6 h). Por otro lado, las hembras inducidas con APGWamida a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ tienen un tiempo de respuesta promedio de 7 h (rango de 5-8 h), mientras que, las hembras expuestas a 5 $\mu\text{g/g}$ y el grupo control respondieron en un tiempo aproximado de 8 h (rango de 8-10 h). Los machos del grupo control respondieron a las 6 h aproximadamente, mientras que, los machos expuestos a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ respondieron en un tiempo aproximado de 5 h, y finalmente los organismos expuestos a la concentración de 5 $\mu\text{g/g}$ respondieron a las 9 h promedio (Figura 9).

3.3 Cantidad de gametos

En el presente trabajo, se muestra que las hembras de abulón azul en IVG 1 (Figura 10) de cultivo respondieron a H_2O_2 -TRIS 6 % con una cantidad de ovocitos por hembra de $2,250 \pm 281$; Mientras que, H_2O_2 -TRIS 9 % con una cantidad de ovocitos de $4,700 \pm 940$ ovocitos por hembra; 2.5 μg de APGWamida/g, con una cantidad de ovocito de $3,000 \pm 288$ y a la 5 μg de APGWamida/g con una cantidad de gametos de $7,666 \pm 945$ ovocitos por hembra. Los machos IVG 1 únicamente respondieron al inductor H_2O_2 -TRIS 9 % V/V y al inductor APGWamida, pero no se midió la cantidad de gametos en machos. Sin embargo, se realizó una fertilización, pero no hubo fecundación que se adjudica a la posible inmadurez de los gametos femeninos. Mientras que, en abulones IVG 3 la respuesta de las hembras a los inductores fue de: H_2O_2 -TRIS 6 % V/V con una cantidad de ovocitos de 168 000 por hembra; control APGWamida 460, 000 ovocitos; 2.5 μg de APGWamida/g, con una cantidad de ovocito de $610,000 \pm 3000$ ovocitos por hembra y a la concentración 5 μg de APGWamida/g (50 %) 552, 000 ovocitos por hembra. Los machos IVG 3 (Figura 12)

respondieron al inductor APGWamida únicamente a las concentraciones de control APGWamida con una cantidad de espermatozoides de 5.8×10^5 por macho; $2.5 \mu\text{g}$ de APGWamida/g con una cantidad de espermatozoides de 5.7×10^5 y a la concentración $5 \mu\text{g}$ de APGWamida/g (50 %) entre las 8-11 h con una cantidad de gametos de 6.8×10^5 por macho.

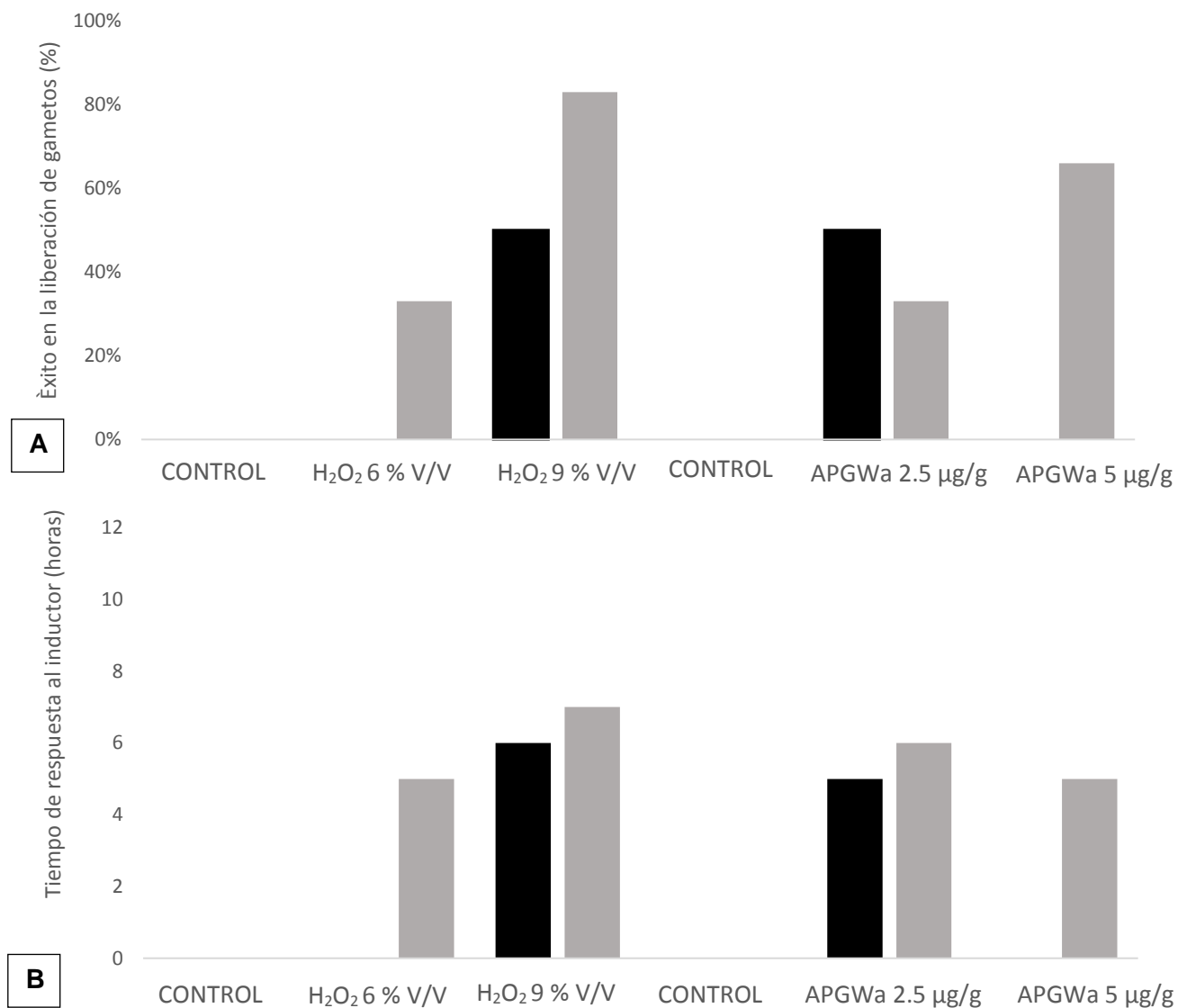


Figura 9. Liberación de gametos en porcentaje de respuesta a los inductores y tiempo de respuesta de abulones con IVG 1. A) porcentaje de abulones que respondieron a los inductores (n= 72). B) tiempo en que los abulones iniciaron la liberación de gametos, los controles de ambos inductores no liberaron gametos. La respuesta de las hembras está representada por la barra color gris y la respuesta de machos por la barra negra (Las líneas en las barras representan el error estándar).

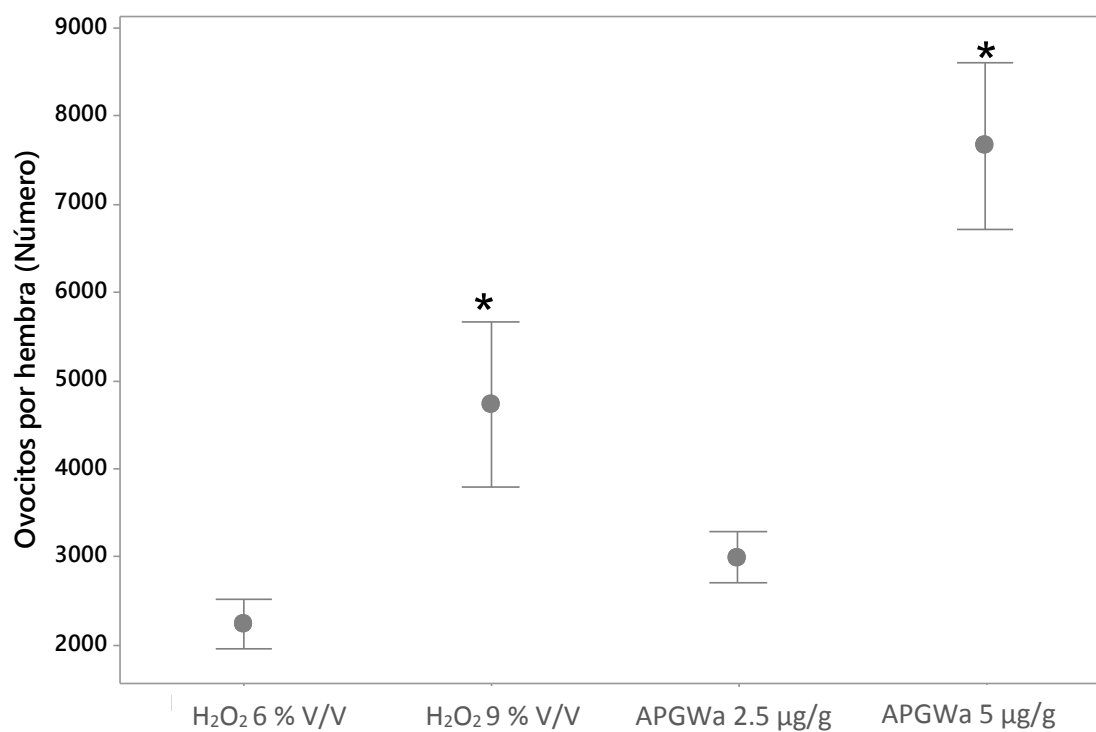


Figura 10. Cantidad de gametos femeninos liberados de abulones con IVG 1. Los puntos muestran el promedio y las barras la desviación estándar. La cantidad de ovocitos muestra diferencias estadísticas en el número de gametos liberados con un valor de $\alpha < 0.05$ ($P = 0.014$). Las diferencias estadísticas se muestran con (*)

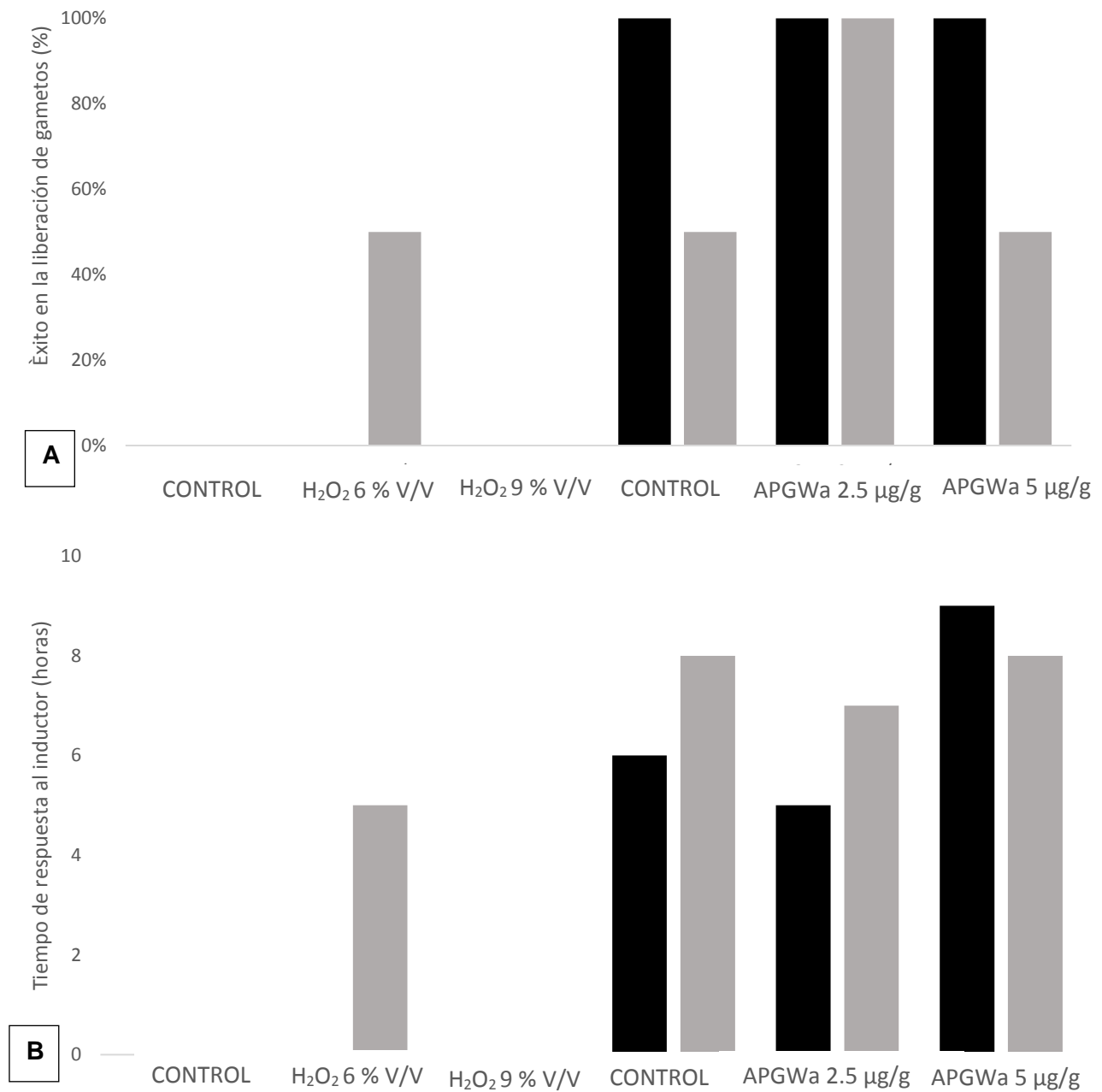


Figura 11. Liberación de gametos en porcentaje de respuesta a los inductores y tiempo de respuesta de abulones con IVG 3. A) porcentaje de abulones que respondieron a los inductores (n= 24). B) tiempo en que los abulones iniciaron la liberación de gametos, los controles de ambos inductores no liberaron gametos. La respuesta de las hembras está representada por la barra color gris y la respuesta de machos por la barra negra (Las líneas en las barras representan el error estándar).

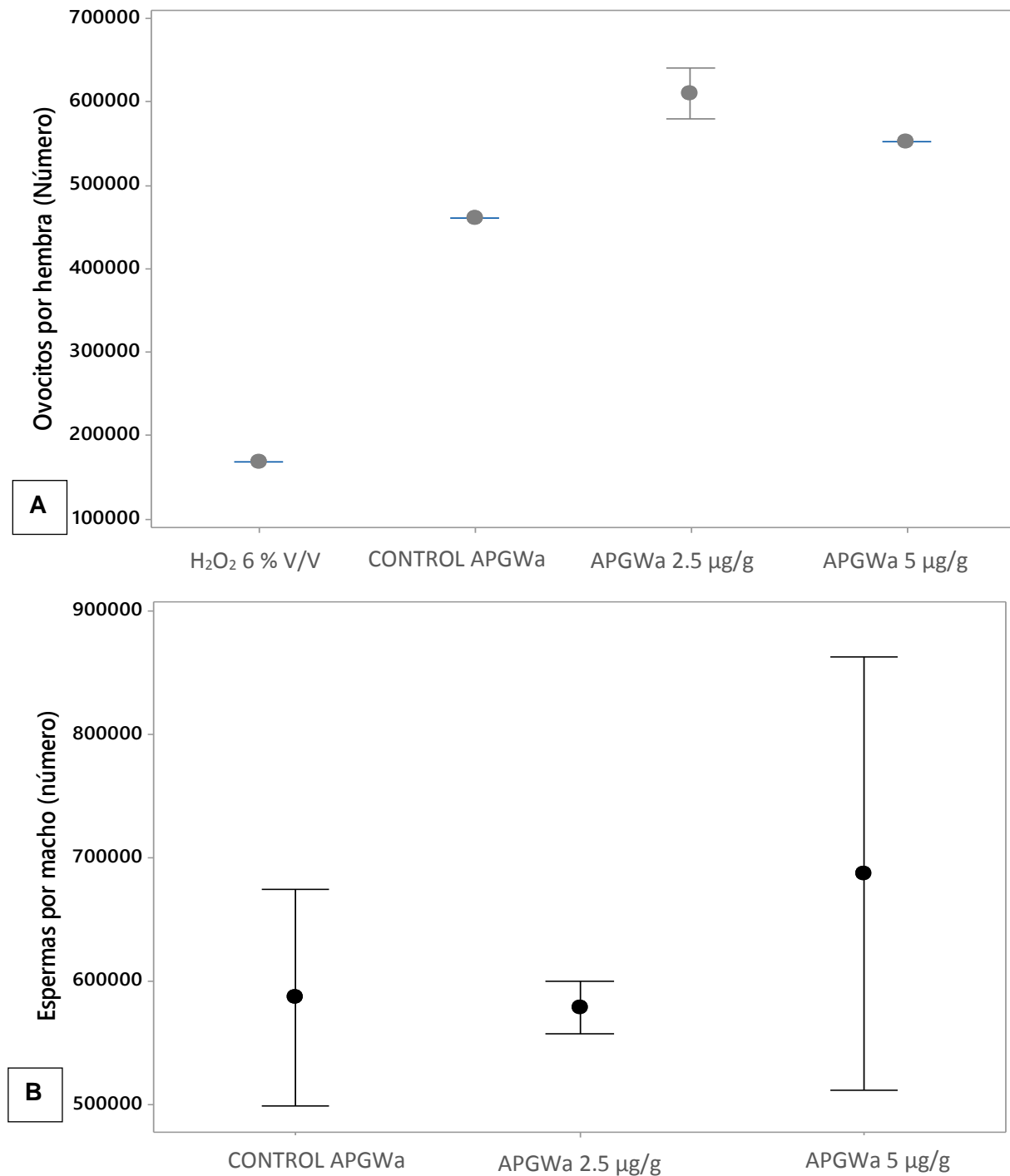


Figura 12. Cantidad de gametos liberados de abulones con IVG 3. A) La cantidad de ovocitos por hembra no muestra diferencias estadísticas en el número de gametos liberados con un valor de $\alpha > 0.05$ ($P = 0.2$). B) La cantidad de espermatozoides por macho no muestra diferencia estadística $\alpha > 0.05$ ($P = 0.8$). En los graficos los puntos muestran el promedio y las barras de error estándar.

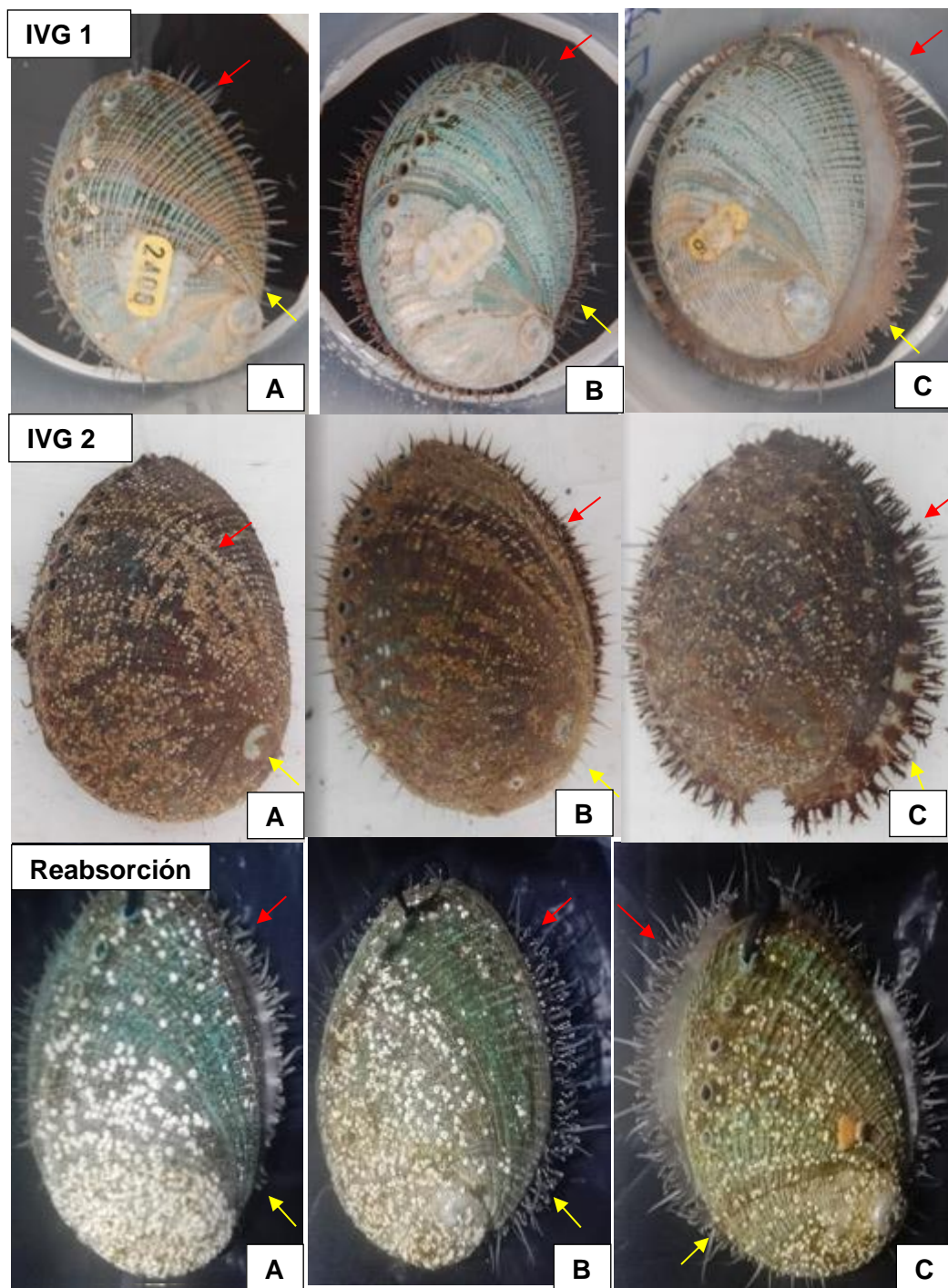


Figura 13. Respuesta al inductor APGWamida en IVG 1, 3 y reabsorción. A) abulón azul sin inyectar, B) Abulón azul inyectado con solución fisiológica de Ringer's, C) abulón inyectado con APGWamida 2 min después de ser colocado en agua. Las flechas rojas señalan la expansión de epipodios, mientras que, las flechas amarillas muestran la expansión del manto. Las Figuras A) (únicamente en agua de mar irradiada con UV) y las figuras B) (inyectada con solución de Ringer's) pertenecen a los controles; sin embargo, la Figura C) muestra expansión del manto y epipodios al ser inyectado con APGWamida.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Éxito en la liberación de gametos

En el ambiente natural, los episodios de liberación de gametos (desoves) en abulones han sido asociados a cambios en temperatura y en condiciones del océano. En el caso del abulón azul, dada su distribución batimétrica, exhibe un cierto grado de periodicidad lunar relacionado con la amplitud de las mareas a las cuales son expuestos durante las lunas nuevas y llenas (Leighton, 2000). Para hacer acuicultura con una especie silvestre es necesario recrear las condiciones del medio natural, para que los organismos induzcan procesos reproductivos como la liberación de gametos con forme al ciclo natural. Sin embargo, es muy complicado, ejemplo de ello, es el caso del abulón de labios verdes (*H. laevigata*), recurso de gran importancia socio-económica en Australia, en el cual aún no se ha logrado tener un control total en la reproducción (Botwright *et al.*, 2015). En el caso de la inducción a la liberación de gametos de organismos criados en cautiverio únicamente el 18% de las hembras responden a los inductores como agua irradiada con luz UV e incremento en la temperatura del agua (choque térmico) (Mendoza-Porras *et al.*, 2017a).

En general, la utilización de H₂O₂-TRIS 6 % ha sido muy exitoso como inductor a la liberación de gametos en especies tales como abulón rojo (*H. rufescens*), pua (*H. iris*) y labio verde (*H. laevigata*) (Morse *et al.*, 1977; Moss *et al.*, 1995; Setyono, 2006). Sin embargo, en el caso del abulón azul, con el método tradicional usando el inductor H₂O₂ al 6 %, se han reportado valores que varían del 0-17 % en machos y del 0-7 % en hembras en el éxito en la liberación de gametos utilizando abulones silvestres (Reynolds *et al.*, 2015; *Com. Pers.* González-Aragón; CICESE, 2018; Aguilar-Osuna; S.C.P.P.PROGRESO, 2018).

En nuestro estudio, se observó una respuesta diferencial entre abulones de cultivo con un IVG 1 y abulones silvestres con IVG 3 al ser expuestos al inductor H₂O₂-TRIS. Los abulones de cultivo con IVG 1 (fase inicial de maduración) mostraron que el porcentaje de éxito en la liberación de gametos incrementó de 30 a 80 % en hembras y 0 a 50 % en machos al aumentar de 6 al 9 % la concentración del inductor H₂O₂-TRIS. Mientras que, los resultados con abulones silvestres con IVG 3 (completamente maduros) mostraron que solamente el 50 % de las hembras inducidas con H₂O₂ al 6 % respondieron y no hubo respuesta en la concentración al 9%. Esta respuesta diferencial entre organismos con un mismo IVG, pudiera estar relacionada con la valoración subjetiva de este indicador de madurez sexual en abulones. El cual, aunque es frecuentemente usado por la industria mundial de abulón, por ser rápido y no invasivo, es un método que se basa en el abultamiento de la gónada y puede ser enmascarado por el efecto del abultamiento del

hepatopáncreas y la experiencia del operador en la granja (*com. pers.* diversos técnicos de abulones). Esto ha sido puesto en evidencia recientemente por los trabajos de Mendoza-Porras *et al.* (2017a y 2017b), quienes identificaron 28 proteínas reproductivas diferencialmente expresadas entre abulones que liberaron gametos (4 h post-inducción) y aquellos que fallaron en liberar gametos (12 h post-inducción). En este trabajo, la mayoría de las proteínas reproductivas estuvieron sub-expresadas (p. ej. vitelogenina en hembras y lisina en machos) en abulones que no liberaron gametos indicando un menor grado de madurez sexual en ellos.

En el presente estudio se evaluó a organismos con IVG 1 y en reabsorción (de cultivo) y organismos IVG 3 (silvestres). Por lo que, el origen de los organismos pudo ser un factor que influyó en los resultados del presente trabajo, debido a que los abulones como todos los sistemas biológicos mantienen su equilibrio respondiendo a un estímulo estresor. El inductor H_2O_2 -TRIS de origen oxidante y la producción de ERO es contrarrestado mediante la capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante en abulón depende de factores involucrados en su historia de vida. Tales como; la dieta, temperatura, oxígeno, salinidad y la presencia de contaminantes, entre otros (De Zoysa *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011; Vosloo *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2018). La diversidad de algas disponibles en el medio natural, su composición nutricional (alto contenido de antioxidantes) y la sobrevivencia a condiciones ambientales no controladas permiten a los organismos responder mejor al estrés oxidativo (Manduzio *et al.*, 2005). Mientras que las condiciones de cultivo en tanques pueden presentar agentes estresores y limitantes para los organismos (Lovejoy y Barside, 2011), como, por ejemplo, los niveles de oxígeno, las densidades de cultivo, y la composición y calidad de la dieta, entre otros (Morash y Alter, 2016). En gasterópodos se ha probado que la respuesta ante cualquier agente oxidante está en función de la capacidad antioxidante del organismo (Saleuddin y Mukai, 2017). Por lo que, deduce que a mayor capacidad antioxidante menor es la cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el organismo, ya que la defensa antioxidante, que puede ser enzimática o no-enzimática, permite eliminar los radicales libres (RL) que inducen la peroxidación lipídica (Farooqui y Farooqui, 2011; Farooqui, 2014). Observaciones previas han puesto de manifiesto que cuando los organismos son colectados directamente del medio son particularmente difíciles de inducir al desove con los métodos tradicionales de las granjas, aún y cuando presenten una madurez total (Hahn, 1994). Sin embargo, al exponer a los organismos silvestres a altas concentraciones de H_2O_2 (9%), se observó que perdieron su capacidad de adhesión al sustrato mostrando un fácil desprendimiento al ser movidos. Posterior a retirar el inductor y colocar a los organismos en agua de mar fresca estos se recuperaron. Durante el experimento no se presentó mortalidad alguna en ninguna dosis, Independientemente de la

procedencia del lote usado (cultivo vs natural), se observó una respuesta de algunos organismos al inductor H_2O_2 tanto en organismos con IVG 1 como 3.

En moluscos se produce la liberación de gametos como resultado del incremento de las prostaglandinas F (Reza, 2009), cuando las ERO incrementan en las células y provocan daño en la membrana permitiendo el desprendimiento de ácido araquidónico. El ácido araquidónico es el sustrato de la enzima COX-2 para producir prostaglandinas y así estimular la contracción del músculo liso que conlleva a la liberación de gametos (Stanley-Samuels, 1987; Leighton, 2000; Reza, 2009). Además, dado que el desarrollo de los gametos dentro de la gónada de los abulones es asincrónico y aquellos gametos en estadios de maduración más avanzados pueden ser liberados como resultado de las contracciones producidas (Martin *et al.*, 1983). Es posible explicar que organismos evaluados con un IVG 1, donde podemos observar un epitelio que cubre el hepatopáncreas con coloración (ver Tabla 1, Figura 3), los cuales se encuentran al inicio de maduración en la fase de proliferación con gametos en diferentes estadios de desarrollo (la mayoría inmaduros (ver Tabla 2, Figura 4) presentaron la liberación de gametos. Por otra parte, en el caso de los organismos evaluados con un IVG de 3, con una gónada con abultamiento pronunciado y la coloración intensa, que indican una gónada totalmente madura con gametos listos para ser expulsados al medio, el hecho que respondieran menos organismos al inductor H_2O_2 , puede estar explicado cómo se mencionó con anterioridad con la capacidad antioxidante de estos organismos provenientes del medio natural y con el hecho de que los efectos del estrés oxidativo decaen con el tiempo (Alam y Ohgaki, 2002), ya que con este protocolo de inducción, el inductor se suministra de forma inicial y en una sola dosis (6 o 9 %). Desde hace siete años aproximadamente las cooperativas “Buzos y Pescadores” y “La Bocana” han usado el inductor basado en agua de mar irradiada con luz UV, que tiene el mismo mecanismo que el inductor H_2O_2 , pero presenta la ventaja de generar RL y ERO de forma constante y aun cuando no produce un 100 % de éxito en la liberación de gametos, aumenta significativamente el porcentaje de organismos con IVG 3 que responden al estímulo y resulta completamente seguro para los gametos liberados (Hahn, 1994a). Mientras que, la desventaja de este método es el costo del equipo con la capacidad para proveer a los organismos la cantidad de energía necesaria para el desove (2.42 W/L, Hahn, 1994a). Por su parte, el método usando como inductor H_2O_2 es mucho más económico, pero dado que es un agente químico altamente oxidante es necesario eliminarlo del medio antes de que los gametos sean liberados por su toxicidad y el daño que provoca en ellos (Hahn, 1994a).

Por otra parte, comparando los resultados en abulón azul con los que se han obtenido en otras especies como abulón rojo donde el porcentaje de liberación en hembras fue del 46 % (Morse *et al.*, 1977 H₂O₂-TRIS al 6 %), dicho porcentaje es alto con respecto al que se obtuvo para abulón azul. En el caso de abulón pava las hembras respondieron en un 15 % (Moss *et al.*, 1995), lo que nos prueba que la respuesta al inductor depende de la especie en que se aplique. Esta respuesta es similar a la que se obtuvo con abulón azul (Reynolds *et al.*, 2015). Otro ejemplo es, el abulón oreja de burro (*Haliotis asinina*) donde a una concentración de inductor del 0.015 % V/V respondió el 20 % de las hembras (Moss *et al.*, 1995). Al comparar los porcentajes de respuesta, nos indica la eficiencia del inductor a esta concentración. Aunque los tamaños de muestra son diferentes, los porcentajes muestran que el inductor es especie específico. En el caso de abulón azul el porcentaje de respuesta al inductor es bajo con respecto a los porcentajes en otras especies por lo que, es necesario probar otro tipo de inductores químicos o biológicos.

En cuanto al tipo de inductor usado la respuesta de los inductores oxidantes es variable y es complicado estandarizarla para organismos del medio silvestre que podrían estar consumiendo alimento rico en antioxidantes lo que les da cierta “resistencia” a los inductores oxidantes. Por lo que, la respuesta de estos métodos es variable y es complicado estandarizarla para organismos del medio silvestre principalmente, ya que la capacidad antioxidante es variable. El presente trabajo con abulón azul determinó la eficiencia del inductor a la concentración 6% V/V únicamente para hembras, previo a este trabajo se ha demostrado el daño del inductor en hemocitos de la especie *H. asinina* (Voosloo y Voosloo, 2017), Aunque para la industria del abulón rojo el peróxido de hidrógeno es el inductor por excelencia en machos y hembras sin problemas de mortalidad, la eficiencia podría verse afectada en un futuro, debido a que los organismos podrían incrementar su capacidad antioxidante y podrían tener mayor sensibilidad a los inductores oxidantes, dado que, se están seleccionando organismos que responden a estos métodos.

En la última década, la identificación de moléculas (proteínas, neuropéptidos hormonales, neurotransmisores, entre otros) relacionadas con el proceso reproductivo en abulones ha cobrado gran interés con la finalidad de controlar el proceso reproductivo en granjas (York *et al.*, 2012; Mendoza-Porras *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018). Entre las moléculas estudiadas para estimular la maduración sexual en abulones se encuentran la hormona liberadora de gonadotropina GnRH (Nuurai *et al.*, 2016) y la hormona de la puesta de huevos ELHs (Nuurai *et al.*, 2010b). Mientras que, el neuropéptido APGWamida ha sido estudiado en relación con su efecto en inducir la liberación de gametos (Chansela *et al.*, 2008; York *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018). En estudios previos, usando este neuropéptido mediante inyección directa en organismos maduros, se ha observado una respuesta en machos del 87.5 % de *H. asinina*

(Chansela *et al.*, 2008) y del 75 % en *H. discus hannai* (Kim *et al.*, 2018) usando una concentración de 2.4 µg de APGWamida por gramo de organismo (1 mM). Mientras que, en el estudio de *H. asinina* las hembras no respondieron al evaluarse el efecto *in vivo* de APGWamida (Chansela *et al.*, 2008). En nuestro estudio, tanto hembras como machos respondieron al neuropéptido, con las dosis más altas usadas en los trabajos previos (Chansela, 2008; Kim *et al.*, 2018) y el doble de esta. En abulones azules cultivados con IVG 1 las hembras respondieron a las dos dosis utilizadas con 33 % y 66 % a 2.5 y 5 µg/g org, respectivamente; mientras que, el 50 % de los machos respondieron a la menor concentración. Por otra parte, en abulones azules silvestres con IVG 3, tanto hembras como machos respondieron en ambas concentraciones, 100 % ambos sexos a 2.5 µg/g org y 100 % machos – 50 % hembras a 5 µg/g org. Por lo que el éxito en la liberación de gametos en machos fue superior en abulón azul al evaluado en otras especies, además de lograrse la liberación de gametos en hembras. Siendo este el primer reporte que evidencia una respuesta exitosa de este neuropéptido en hembras al inicio de su maduración (IVG 1) y totalmente maduras (IVG 3), lo que apoya la hipótesis que este neuropéptido provoca contracciones musculares en la gónada (York *et al.*, 2012), aunque es necesario realizar estudios que permitan saber el mecanismo de acción de APGWa, debido a que podría actuar como un mensajero secundario que inicie con la producción de alguna hormona esteroidea (York y Twarog, 1972; Chen y Walker, 1991).

APGWamida es un tetrapéptido que se expresa en ambos sexos de abulones, sin embargo, parece que lo hace durante la maduración gonadal y durante la liberación de gametos, por lo que el mecanismo no es muy claro, en el caso de *H. asinina* se observó que la expresión en hembras es mayor a la de los machos durante la liberación de gametos (York *et al.*, 2012). La expresión del tetrapéptido se ha observado en el ganglio neural, además de en otras partes del cuerpo como el testículo y el hepatopáncreas durante la liberación de gametos (Chansela *et al.*, 2008). En *H. discus hannai* se observó que APGWamida no únicamente podría estar asociado con la liberación de gametos si no también con la maduración de los ovocitos (Kim *et al.*, 2018). En un ovario completamente desarrollado, los ovocitos permanecen arrestados en la profase I (PI) de la primera división meiótica, estadio denominado vesícula germinal (GV). Uno de los primeros indicadores de maduración de los ovocitos es la ruptura de la GV, denominada GVBD (por sus siglas en inglés) en preparación para la continuación de las divisiones meióticas (Kim *et al.*, 2018). York *et al.* (2012) probaron que, tanto en hembras como en machos de *H. asinina*, la expresión del gen *Has-APGWamida* presenta su mayor expresión durante el desove y disminuye posteriormente. Sugiriendo que el incremento en la expresión de este neuropéptido, en conjunto con otros, puede estar relacionado con la GVBD y la disociación de la primera cohorte de ovocitos de la trabécula (tejido conectivo y estructural que retiene a los ovocitos en el ovario). Asimismo, investigaciones más recientes en *H. discus hannai* al

realizarse bioensayos *in vitro* para evaluar el efecto del neuropéptido APGWamida en la maduración final de los ovocitos a través del porcentaje de ovocitos que presentan la GVBD, evidencian un aumento significativo del 18 al 40 % en ovocitos sin neuropéptido (control) y ovocitos tratados con APGWamida

(0.1 μM y 1 μM), respectivamente (Kim *et al.*, 2018). Evidenciando con ello, que el neuropéptido APGWamida puede estar jugando un rol importante en la maduración final del ovocito y su viabilidad. Por lo cual, sería recomendable para la continuidad de este trabajo realizar pruebas de fecundación en ovocitos liberados con este método de inducción.

En ambos experimentos con el inductor APGWamida los organismos en el tratamiento control fueron únicamente inyectados con solución de Ringers (excipiente usado para disolver neuropéptido) en los volúmenes acordes a su peso. En abulones silvestres con IVG 3, se observó liberación de gametos en los organismos control posiblemente debido al estrés provocado por su manipulación (desprendimiento de estanques e punción). Mientras que, en los abulones cultivados con IVG 1 usados como control no hubo tal efecto relacionado con la manipulación, quizás como reflejo de que estos abulones están expuestos continuamente a manejo en los sistemas de cultivo (limpieza, desdobles, desprendimientos, etc). Los efectos del estrés por la manipulación en reproductores de abulones provenientes del medio natural son desconocidos aún y puede ser un factor que en sinergia con otros como cambios en temperatura e irradiación UV en el agua, puede estimular el desove (Morash y Alter, 2016). En los experimentos de Kim *et al.* (2018), antes mencionados, donde indujeron a la especie *H. discus hannai* con APGWamida, observaron que un 32 % de machos del tratamiento control, inyectados con solución fisiológica de Ringer's, liberaron gametos; lo que corrobora, que independientemente de la especie, el estrés ocasionado por la punción en un estadio de madurez final puede provocar la liberación de gametos.

Como observación adicional los resultados de este trabajo muestran que el tetrapéptido APGWamida tuvo efecto en la liberación de gametos de ambos sexos. La respuesta de los organismos fue mediante la relajación total del cuerpo, manto y extensión total de epipodios (Figura 13), además de que mostraron mucho movimiento (desplazamiento en todo el contenedor). Posterior a los 60 min de la inyección los organismos se mostraban iguales con respecto a control (fijos en un solo lugar o con poca actividad). Previo a la liberación de gametos los organismos alzaban la concha y la contraían con respecto al pie. Al momento no se conoce claramente la ruta del tetrapéptido APGWamida; sin embargo, con base en la literatura y las observaciones mencionadas anteriormente podríamos adjudicar esta respuesta a dos situaciones: la primera es que APGWamida actúa como una neurohormona y llega a gránulos neurosecretores en la gónada lo que permite la liberación de hormonas esteroideas que producen la liberación de gametos. La

segunda es que APGWamida promueve el incremento de neurotransmisores como serotonina en abulones. La serotonina tiene una acción dual en moluscos bivalvos que provoca relajación y contracción potente (York y Twarog, 1973). En la gónada de *H. asinina* se identificó que la aplicación de serotonina mostraba un incremento en la contracción y la relajación (Panasophonkul *et al.*, 2009). Existen estudios que muestran la eficiencia de APGWamida y serotonina en la liberación de gametos y los resultados son similares por lo que creemos que el mecanismo es similar o el mismo en ambos inductores.

4.2 Tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta para ambos inductores fue mayor a 4 h para que los organismos iniciaran con la liberación de gametos de abulón azul. Las hembras de abulón azul respondieron al inductor H₂O₂-TRIS 6% en un tiempo promedio de 5 h; mientras que, en los estudios realizados con diferentes especies muestran que el rango de liberación de las hembras es de 2-4 h. La respuesta ante este inductor de carácter estresor podría estar relacionado con la distribución batimétrica y la respuesta antioxidante de los organismos (Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta de diferentes especies de abulón al inductor H₂O₂-TRIS y distribución batimétrica.

Especie	Machos (%)	Hembras (%)	Distribución batimétrica (m)	Autor
<i>H. rufescens</i>	46	54	17.5-25.5	Morse <i>et al.</i> (1977)
<i>H. iris</i>	43	15	Intermareal	Moss <i>et al.</i> (1995)
<i>H. asinina</i>	30	20	1-7	Setyono (2006)
<i>H. fulgens</i>	14.6	6.5	1-8	(Reynolds <i>et al.</i> , 2015)
<i>H. fulgens</i>	0	0	Acondicionados en laboratorio CICESE	<i>Com. pers.</i> González-Aragón; CICESE (2018)
<i>H. fulgens</i>	2	0	1-8	<i>Com. pers.</i> Aguilar-Osuna; S.C.P.P. PROGRESO (2018)

Los organismos que se distribuyen de forma superficial podrían tener una capacidad antioxidante mayor, dado que están más expuestos a agentes estresores, desecación e irradiación de forma natural y pese a

ello requieren de mantener su homeostasis interna (Saleuddin y Mukai, 2017). Por lo que, el tiempo de respuesta al inductor podría ser mayor en especies que se encuentran en la región del intermareal y menor en las que se distribuyen infralitoral.

El tiempo de respuesta del inductor APGWamida para abulón azul en hembras fue de 7-8 h y en machos de 5-7 h que comparado con los tiempos de respuesta en *H. discus hannai* muestran que el tiempo de respuesta en machos fue de 4 h (Kim *et al.*, 2018), mientras que, en *H. asinina* el tiempo de respuesta en machos fue de entre 2-4 h. Al comparar los resultados de abulón azul con respecto a las otras especies probadas se observó que, en abulón azul, el tiempo en que los organismos son inducidos es mayor a las demás especies.

El inductor APGWamida para abulón azul fue efectivo en la liberación de gametos en machos y en hembras en las dos concentraciones que se manejaron en este trabajo. El 100% de los organismos expuestos a 2.5 $\mu\text{g/g}$ respondieron entre las 4 a 8 h. Esto comparado con los resultados en *H. asinina* se muestra similar pues al usar una concentración de 2.4 $\mu\text{g APGWamida/g}$ se obtuvo el 87.5% de abulones machos que liberaron gametos en un tiempo aproximado de 2-3 h y obteniendo una cantidad de esperma de 2.8×10^7 a 2×10^9 por mililitro en este estudio no se reportan resultados en hembras (Chansela *et al.*, 2008). Mientras que, con los resultados del presente trabajo, se muestra que la dosis de 2.5 $\mu\text{g APGWamida/g}$ induce a hembras de abulón azul a la liberación de gametos. El 100% de los machos y el 50% de las hembras expuestas a 5 $\mu\text{g APGWamida/g}$ respondieron al estímulo los machos respondieron entre 8-10 h y las hembras entre las 6-8 h.

En cuanto a la cantidad de gametos se mostraron diferencias entre las dosis, y la cantidad de gametos obtenida en el control. Los organismos del control quizá respondieron debido a la punción dado que estaban en IVG 3 (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de respuesta de abulones ante el uso del inductor APGWamida.

Especie	Concentración APGWamida $\mu\text{g/g org}$	% Éxito en la liberación de gametos		Tiempo de respuesta (h)		Cantidad de gametos		Movilidad del esperma	Autor
		M	H	M	H	M	H		
<i>H. asinina</i>	2.4 (10^{-3} M)	87.5	0	3-4	**	1.04-2x10 ⁹	--	+++	Chansela <i>et al.</i> (2008)
	0.0024 (10^{-6} M)	43.8	0	2-3	**	2x10 ⁹	--	++	
<i>H. discus hannai</i>	2.4 (10^{-3} M)	23	----*	4	*	17x10 ⁷	--	--	Kim <i>et al.</i> (2018)
	0.024 (10^{-5} M)	15	----*	4	*	7.5 x10 ⁷	--	--	
<i>H. fulgens</i>	2.5 (10^{-3} M)	50	33	4-6	5-6	--	3,000 ± 288	++	Este estudio
<i>IVG 1-G1</i>	5.0 (2 x 10^{-3} M)	--	66	--	4-6	--	7,666 ± 945	++	
<i>H. fulgens</i>	2.5 (10^{-3} M)	100	100	4-6	5-6	5.7 x 10 ⁵	610,000	++	Este estudio
<i>IVG 3 - Silvestres</i>	5.0 (2 x 10^{-3} M)	50	50	8-11	7-9	6.8 x 10 ⁵	552,000	++	

___* ensayo in vitro de ovocitos expuestos al inductor APGWamida, *No fue probado en hembras, **se probó, pero no hubo respuesta
 +++ alta motilidad, ++ Motilidad media, + Baja motilidad.

4.3 Cantidad de gametos

La cantidad de gametos que libera un organismo depende directamente del tamaño del individuo y su madurez gonadal (Leighton, 2000). Cuando se evalúan inductores generalmente se mide como respuesta la cantidad de gametos y la calidad de ellos. Sin embargo, la cantidad y calidad de los gametos está en función de factores de acondicionamiento gonadal como la alimentación, la determinación del IVG y la temperatura durante la gametogénesis. En *H. asinina* se probaron dos dietas y se observó que el incremento en el volumen de la gónada fue mayor al alimentar *ad libitum* que al alimentar con una ración al 10% (Jumah *et al.*, 2016). El método usado para la determinación del grado de madurez gonadal es subjetivo, es decir, depende de la experiencia de la persona que lo asigne. La respuesta de los inductores está influenciada por el grado de madurez gonadal, por lo que si el grado de madurez gonadal está mal asignado, la respuesta al estímulo se verá influenciada.

En *H. rufescens* se demostró que los organismos silvestres que eran expuestos durante el acondicionamiento gonadal a temperaturas más altas que la óptima mostraban fallas reproductivas como la baja cantidad de espermatozoides, malformaciones y bajo porcentaje de motilidad (Rogers-Bennet *et al.*, 2010). En el caso de las hembras no mostraron afectación en cuanto a la temperatura, si no hubo afectación en el tamaño de los ovocitos cuando las hembras estaban expuestas a inanición (Rogers-Bennet *et al.*, 2010). En cuanto a la cantidad de gametos el inductor H₂O₂-TRIS a la concentración 6% para abulón azul es de 168 mil ovocitos totales. Con respecto al resto de las especies, que se han evaluado la cantidad de ovocitos que se manejan oscila entre 113 mil (Reynolds *et al.*, 2015) y 945 mil (Moss *et al.*, 1995). La cantidad de gametos que liberaron los machos, no fue registrada en machos debido a una falla logística. Sin embargo, la cantidad de gametos no está determinada por el inductor, sino por la calidad de acondicionamiento de los organismos. En abulón azul IVG 3 con el inductor APGWamida a una concentración de 2.5 µg APGWamida/g en hembras fue de 610 mil ovocitos totales y en machos de 5.7 x 10⁵ espermias totales, a la concentración de 5 µg APGWamida/g fue de 552 mil ovocitos totales por hembra y 5.8 X 10⁵ de espermias totales por macho. Aunque no hay estudios para el inductor APGWamida en hembras podemos compararlo con la cantidad de gametos de las hembras del inductor H₂O₂-TRIS 6% la cantidad de 500 mil ovocitos fue similar. La cantidad de gametos nos prueba que en el caso de los controles liberaron gametos por el estrés de la punción, ya que el número de gametos fue menor con respecto a los organismos que fueron inyectados con las dosis de APGWamida. Previo a este trabajo no se han reportado resultados del efecto *in vivo* para hembras con el inductor APGWamida, sin embargo, los ovocitos se encontraban empaquetados y con un mucus.

Por último, en este experimento, los ovocitos fueron fertilizados con el esperma obtenido. Sin embargo, no hubo fecundación, aunque la motilidad del esperma era de 80 % (++) , lo cual se considera una motilidad adecuada para poder decir que tenían buena calidad. Por lo que la falta de fecundación se puede deber a que los ovocitos no estaban maduros y que no eran de buena calidad, además de que no se conoce la concentración óptima de esperma necesario para fecundar ovocitos de abulón azul.

Capítulo 5. Conclusiones

El H₂O₂-TRIS aplicado a dos concentraciones (6 y 9 %) indujo la liberación de gametos en organismos de abulón azul (*Haliotis fulgens*) al inicio de la maduración gonadal (IVG 1) y en organismos maduros (IVG 3).

En abulones de cultivo al inicio de su maduración (IVG 1) se observó que tanto hembras como machos liberaron gametos a la concentración más alta de H₂O₂-TRIS (9 %). Además, se observó un aumento en el porcentaje de hembras (33 al 83 %) y la cantidad de ovocitos en concentración más alta de H₂O₂-TRIS (9 %) con respecto a la concentración estándar usada en otros abulones (6 %).

En abulones silvestres con gónadas totalmente maduras se observó de forma generalizada que no hubo un efecto del inductor H₂O₂-TRIS en ningún sexo, posiblemente asociado con la capacidad antioxidante de estos organismos en respuesta a su historia de vida (por ejemplo: dieta, régimen térmico, etc.).

El tetrapéptido APGWamida en sus dos concentraciones (2.5 y 5 µg/g organismo) tuvo un efecto inductor a la liberación de gametos tanto en machos como hembras de abulón azul al inicio de la maduración gonadal (IVG 1) y en organismos completamente maduros (IVG 3).

En hembras de cultivo con IVG 1, se observó un aumento en el porcentaje de hembras (33 al 66 %) y la cantidad de ovocitos en concentración más alta de APGWamida (5 µg/g) con respecto a la concentración más baja (2.5 µg/g). Mientras que, en hembras silvestres con IVG 3 la relación fue inversa, a mayor concentración de tetrapéptido menor respuesta (100 al 50 %).

En machos de cultivo con IVG 1 y los machos silvestres con IVG 3, el 100% de ellos respondieron en la menor concentración (2.5 µg/g) del tetrapéptido APGWamida; resultado que coincide con observaciones realizadas en machos de *H. asinina* y *H. discus hannai*.

En los tres estadios de desarrollo gonadal (inicio maduración, maduración completa y reabsorción) se observó un comportamiento similar en los organismos inyectados con el tetrapéptido APGWamida, mostrando elongación de los epipodios, relajación del manto y en algunos casos intensificación de color. Los organismos mostraron contracciones del músculo del pie con la concha, comportamiento que permite corroborar que la acción del tetrapéptido APGWamida como un inductor a la contracción es lo que produce finalmente la liberación de gametos.

Los tiempos de respuesta promedio variaron de 5-6 h con el inductor H_2O_2 -TRIS y de 5-7 h tetrapéptido APGWamida, siendo mayores en organismos de talla comercial (> 15 cm).

La combinación de ambos métodos en la industria podría garantizar liberación de gametos de ambos sexos de forma sincronizada. Con base en el presente estudio, el inductor H_2O_2 -TRIS a la concentración de 6 % es funcional para inducir a hembras silvestres, mientras, que el tetrapéptido APGWamida es funcional para que los machos liberen gametos a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/g}$ de organismo. Los tiempos de respuesta de estos inductores varían entre 1-2 h por lo que sería necesario inducir 2 h antes a las hembras y posteriormente a los machos.

Capítulo 6. Recomendaciones

Es necesario continuar probando otros inductores biológicos. Dado que, los organismos silvestres están sometidos al estrés químico y físico del medio lo que podría generar cierta resistencia a los métodos oxidantes en un futuro. Sugerimos probar inductores biológicos como Serotonina, ELH (Egg Laying Hormone) en la liberación de gametos y GnRH (Gonadotropin Release Hormone) en la maduración gonadal.

Se recomienda realizar más pruebas con el inductor APGWamida utilizando un tamaño de muestra mayor al usado en este estudio. Además de combinar el método con un método físico como choque térmico, aireación vigorosa o agua de mar irradiada con luz UV pues creemos que el tiempo de respuesta podría disminuir al combinar el efecto del inductor.

Con base en la experiencia de este trabajo se recomienda que los organismos que sean seleccionados como reproductores no se encuentren con laceraciones en el pie, que es muy común al momento de usar arrancadores, ya que puede afectar la liberación de gametos.

Literatura citada

- Ahmad, S. 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Springer, Boston, MA. 238-272.
- Alam, M. Z., Ohgaki, S., 2002. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in producing the residual effect of ultraviolet radiation. *Water environment research*, 74(3), 248-255.
- Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E. S. Sobhon, P., 2001. Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research*, 20(2), 717-724.
- Ault, J. S., 1985. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1-4), 398-425.
- Awaji, M., Hamano, K., 2004. Gonad formation, sex differentiation and gonad maturation processes in artificially produced juveniles of the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture*, 239(1-4), 397-411.
- Booolootian, R. A., Farmanfarmaian, A., Giese, A. C., 1962. On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *The Biological Bulletin*, 122(2), 183-193.
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P., Versteeg, H. H., 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), 1187-1205.
- Botwright, N. A. (2015). Karyotype comparison between *Haliotis rubra*, *H. laevigata* and the interspecific hybrid. *Aquaculture Research*, 46(1), 236-241.
- Botwright, N. A., Colgrave, M., Cook, M., Elliott, N., 2014. Prevention and Control of Maturation to Address Multiple Key Abalone Production Constraints, Australian Seafood Cooperative Research Center, Bedford Park, South Australia.1–37.
- Bourne, G. B., Redmond, J. R., 1977. Hemodynamics in the pink abalone, *Haliotis corrugata* (Mollusca, Gastropoda). I. Pressure relations and pressure gradients in intact animals. *Journal of Experimental Zoology*, 200(1), 9-16.
- Brand., 2016. Cámaras de recuento. Consultado el 15 de Agosto de 2017, de: https://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkaammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkaammern_s.pdf

- Chansela, P., Saitongdee, P., Stewart, P., Soonklang, N., Stewart, M., Suphamungmee, W., Sobhon, P., 2008. Existence of APGWamide in the testis and its induction of spermiation in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Aquaculture*, 279(1-4), 142-149.
- Chase, R. B. 2002. Sensory Systems. En: Behavior & its neural control in gastropod molluscs. Oxford University Press on Demand. pp. 34-51
- Chen, M. L., Walker, R. J., 1992. Actions of APGW-amide and GW-amide on identified central neurons of the snail, *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 102(3), 509-516.
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). 2017. Carta Nacional de Pesca (CNP). Consultado el 10 septiembre de 2018, de <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/carta-nacional-acuícola>.
- Coutellec M.A., Caquet T., 2017. GASTROPOD ECOPHYSIOLOCAL RESPONSE TO STRESS. En: Saleuddin, S., Mukai, S., (Eds.), 2017. *Physiology of Molluscs: A Collection of Selected Reviews*. CRC Press. pp. 304-362.
- Cox, K. W. (1962). Fish Bulletin No. 118. California Abalones, Family Haliotidae.
- De Lange, R. P. J., Van Minnen, J., 1998. Localization of the Neuropeptide APGWamide in Gastropod Molluscs by in Situ Hybridization and Immunocytochemistry. *General and comparative endocrinology*, 109(2), 166-174.
- De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J. S., Lee, J., 2009. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(4), 387-395.
- Deridovich, I. I., Reunova, O. V., 1993. Prostaglandins: reproduction control in bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 104(1), 23-27.
- Di Cosmo, A., Polese G., Molluscan Bioactive Peptides. (2013). En: Kastin, A. (Ed.), *Handbook of biologically active peptides*. Academic press. pp.276-285.
- Di Cristo, C., Van Minnen, J., Di Cosmo, A., 2005. The presence of APGWamide in *Octopus vulgaris*: a possible role in the reproductive behavior. *Peptides*, 26(1), 53-62.
- Dorsett, D. A. 1986. Brains to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In *The Mollusca*, 9(1) 101-187.

- FAO (Food and Agriculture Organization). 1990. Biology and culture of abalone. The reproduction of abalone. Consultado el 17 de noviembre de 2017 de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB731E/AB731E01.htm>.
- Farooqui, A. A., 2014. PGs, LTs, TXs, and PAF in Neuroinflammation. En: Inflammation and oxidative stress in neurological disorders: effect of lifestyle, genes, and age. Springer Science & Business Media. pp.58-59.
- Fieber, L. A. (2017). Neurotransmitters and Neuropeptides of Invertebrates. En: The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology. pp. 1-7.
- Gobierno del estado de Baja California. 2000-2015. Carta Estatal Pesquera (CEP). Consultado el 20 de Abril de 2017, de: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/salaDePrensa/difusionAcciones/docs/CartaEstatalPesquera.pdf>
- Guo, Y., Lei, Y., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, W., Mai, K., 2018. Protective effects of dietary selenium on abalone *Haliotis discus hannai* against the toxicity of waterborne cadmium. Aquaculture Research, 49(10), 3237-3244.
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends in biochemical sciences, 15(4), 129-135.
- Hahn K. O., 1994a. Induction of Spawning *Haliotis Fulgens*. Abalone technique manual series. Pacific Aquaculture Consulting. pp 32.
- Hahn, K. O., 1994b. The neurosecretory staining in the cerebral ganglia of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, and its relationship to reproduction. General and comparative endocrinology, 93(3), 295-303.
- Heasman, M. P., Savva, N., 2007. Manual for Intensive Hatchery Production of Abalone: Theory and Practice for Year-Round, High Density Seed Production of Blacklip Abalone (*Haliotis rubra*). NSW Department of Primary Industries, Port Stephens Fisheries Centre.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., Ober, W. C., Garrison, C., 2001. Molluscs. En: Integrated principles of zoology (Vol. 15). New York: McGraw-Hill. pp. 332-360
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. Fish & Shellfish Immunology, 22(4), 363-379.

- Jumah, Y. U., Traifalgar, R. F., Jumah, D. S., Reyes, L. R., Mero, F. F., 2016. Feeding rate and sexes affect gonad growth of donkey ear abalone *Haliotis asinina* Linnaeus, 1758. *Animal Biology & Animal Husbandry*, 8(1), 10-10.
- Kataoka, S., Yamamoto, T. Y., 1981. Diurnal changes in the fine structure of photoreceptors in an abalone, *Nordotis discus*. *Cell and tissue research*, 218(1), 181-189.
- Kim, K. S., Kim, T. H., Kim, M. A., Lee, J. S., Sohn, Y. C., 2018. Expression profile and reproductive regulation of APGWamide in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 222, 26-35.
- Krishnan, N., Kodrik, 2012. Endocrine Control of Oxidative Stress in Insects. En: Farooqui, T., Farooqui, A. A., (Eds.). *Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: Molecular aspects of cell signaling*. John Wiley & Sons. pp. 261-267.
- Kuanpradit, C., Stewart, M. J., York, P. S., Degnan, B. M., Sobhon, P., Hanna, P. J., Cummins, S. F., 2012. Characterization of mucus-associated proteins from abalone (*Haliotis*) candidates for chemical signaling. *The FEBS journal*, 279(3), 437-450.
- Kuroki, Y., Kanda, T., Kubota, I., Fujisawa, Y., Ikeda, T., Miura, A., Muneoka, Y., 1990. A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, RPCH. *Biochemical and biophysical research communications*, 167(1), 273-279.
- Leighton, D. L., 2000. *The biology and culture of the California abalones*. Dorrance Publishing Company.
- Leighton, D. L., Lewis, C. A., 1982. Experimental hybridization in abalones. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5(5), 273-282.
- Lovejoy, D. A., Barysyt, D., 2011. Species in captivity: stress in agriculture and aquaculture and effects on habitat loss. En: *Sex, stress and reproductive success*. John Wiley & Sons. pp. 124-131
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ*, 2(2), 91-104.
- Martin, G. G., Romero, K., Miller Walker, C., 1983. Fine structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Zoomorphology*, 103(2), 89-102.
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., McWilliam, S. M., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., Colgrave, M. L., 2014. Exploiting genomic data to identify proteins involved in abalone reproduction. *Journal of proteomics*, 108, 337-353.
- Mendoza-Porras, O., Harris, J. O., Wijffels, G., Reverter, A., Cook, M. T., Botwright, N. A., Colgrave, M. L., 2017a. Gonadal reproductive and metabolic proteins of male abalone *Haliotis laevigata*

(Donovan, 1808) assessed by targeted mass spectrometry after artificial induction of spawning. *Aquaculture Research*, 48(12), 6009-6015.

- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., Reverter, A., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., Colgrave, M. L., 2017b. Identification of differentially expressed reproductive and metabolic proteins in the female abalone (*Haliotis laevis*) gonad following artificial induction of spawning. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 24, 127-138.
- Morash, A. J., Alter, K., 2016. Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Reviews in Aquaculture*, 8(4), 342-368.
- Moreno Brea, M. R., Micó, J. A., 2000. Inhibidores de la COX-2: Mecanismo de acción. *Revista Sedolor*, 4, 3-6.
- Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Minakata, H., 2010. Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. *Canadian Journal of Zoology*, 88(9), 825-845.
- Morse, D. E., Duncan, H., Hooker, N., Morse, A., 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, 196(4287), 298-300.
- Moss, G. A., Illingworth, J., Tong, L. J., 1995. Comparing two simple methods to induce spawning in the New Zealand abalone (paua), *Haliotis iris*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29(3), 329-333.
- Nuurai, P., Cummins, S. F., Botwright, N. A., Sobhon, P., 2016. Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation. *Aquaculture*, 450, 116-122.
- Nuurai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., Wanichanon, C., 2010. Stimulatory effects of egg-laying hormone and gonadotropin-releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 627-635.
- Oberdörster, E., Romano, J., McClellan-Green, P., 2005. The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integrative and comparative biology*, 45(1), 28-32.
- Panasophonkul, S., Apisawetakan, S., Cummins, S. F., York, P. S., Degnan, B. M., Hanna, P. J., Sretarugsa, P., 2009. Molecular characterization and analysis of a truncated serotonin receptor gene expressed in neural and reproductive tissues of abalone. *Histochemistry and cell biology*, 131(5), 629-642.

- Peña, J. B., 1986. Preliminary study on the induction of artificial spawning in *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck (1975). *Aquaculture*, 52(1), 35-41.
- Ragg, N. L. C., 2003. Respiratory circulation in the abalone *Haliotis iris*. Thesis of Philosophy. School of Biological Sciences University of Canterbury. pp. 296.
- Reynolds A., Burdick H., Ford T., 2015. Southern California Green Abalone and kelp forest restoration project. Consultado el 15 de julio de 2016 de: <http://www.santamonicabay.org/wp-content/uploads/2014/04/Southern-California-Green-Abalone-Restoration-September-2015-Report.pdf>
- Reza Sánchez, M. A., 2009. Implementación del análisis de prostaglandinas en tejidos de ostión y comparación de prostaglandina E2 después de un estrés por muestreo en ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*) y ostión japonés (*C. gigas*) y durante el desove de *C. gigas*. tesis de maestría en ciencias. Centro De Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C. La Paz B.C.S. 167 pp.
- Rogers-Bennett, L., Dondanville, R. F., Moore, J. D., Vilchis, L. I., 2010. Response of red abalone reproduction to warm water, starvation, and disease stressors: implications of ocean warming. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 599-611.
- Russell, C. W., Evans, B. K., 1989. Cardiovascular anatomy and physiology of the black-lip abalone, *Haliotis ruber*. *Journal of Experimental Zoology*, 252(2), 105-117.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M. R., Altamira, B., 2010. Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573-576.
- Setyono, D. D., 2006. Induction spawning for the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in the laboratory. *Indonesian Aquaculture Journal*, 1(1), 17-27.
- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Poomthong, T., 1999. Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Sci. Asia*, 25(1), 3-21.
- Stanley-Samuelson, D. W., 1987. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. *The Biological Bulletin*, 173(1), 92-109.
- Uki, N., Kikuchi, S., 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*, 39(1-4), 247-261.
- Van In, V., Ntalamagka, N., O'Connor, W., Wang, T., Powell, D., Cummins, S. F., Elizur, A., 2016. Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides*, 82, 109-119.

- Velez-Arellano M.N., 2016. Tacticas reproductivas de *Haliotis fulgens*. PHILIPPI, 1985 y *Haliotis corrugata* W. WOOD, 1828 (GASTROPODA: ARCHAEOGASTROPODA) en dos zonas de pesca en la costa Occidental de Baja California Sur. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Vélez-Arellano, N., García-Domínguez, F. A., Lluch-Cota, D. B., Gutiérrez-González, J. L., Sánchez-Cárdenas, R., Vélez-Arellano, N., Sánchez-Cárdenas, R., 2015. Histological validation of morphochromatically-defined gonadal maturation stages of green abalone (*Haliotis fulgens*) Philippi, 1845 and pink abalone (*Haliotis corrugata*) Wood, 1828. *Int. J. Morphol*, 33(3), 1054-1059.
- Vosloo, D., Van Rensburg, L., Vosloo, A., 2013. Oxidative stress in abalone: the role of temperature, oxygen and L-proline supplementation. *Aquaculture*, 416, 265-271.
- Vosloo, D., Vosloo, A., 2017. Short postspawning recovery time affects ADN integrity and fertilization success of south African abalone (*Haliotis midae*) oocytes. *Journal of Shellfish Research*, 36(1), 169-174.
- Wang, T., Nurai, P., McDougall, C., York, P. S., Bose, U., Degnan, B. M., Cummins, S. F., 2016. Identification of a female spawn-associated Kazal-type inhibitor from the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Journal of Peptide Science*, 22(7), 461-470.
- Webber, H. H., Giese, A. C., 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Marine biology*, 4(2), 152-159.
- Yahata, T., 1971. Demonstration of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of the abalone, *Nordotis discus* Reeve. 北海道大學水産學部研究彙報= Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 22(3), 207-214.
- York, B., Twarog, B. M., 1973. Evidence for the release of serotonin by relaxing nerves in molluscan muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44(2), 423-430.
- York, P. S., Cummins, S. F., Degnan, S. M., Woodcroft, B. J., Degnan, B. M., 2012. Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*. *Frontiers in zoology*, 9(1), 9.
- Yu, Q., Liang, Z., OuYang, C., Li, L., 2015. Biologically Active Peptides in Invertebrates: Discovery and Functional Studies. In *Colloquium Series on Neuropeptides* (Vol. 3, No. 1, pp. 1-182). Morgan & Claypool Life Sciences.
- Zhu, X., Zhou, J., Cai, Z., 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor* supertexta). *Marine pollution bulletin*, 63(5-12), 334-338.

ANEXOS

Anexo 1. Descripción de los abulones usados para los experimentos.

Tabla 8. Datos biométricos y número de organismos expuestos a los métodos de inducción.

	<i>Tratamiento</i>	<i>Número de organismos</i>	<i>Hembras</i>	<i>Machos</i>
IVG 1	H ₂ O ₂ -TRIS 0% V/V	12	6	6
Longitud prom: 7 ±0.63 cm	H ₂ O ₂ -TRIS 6% V/V	12	6	6
Peso prom: 52 ±10 g	H ₂ O ₂ -TRIS 9% V/V	12	6	6
Especie: abulón azul	APGWamida 0 µg/g de organismo	12	6	6
Total de organismos: 72	APGWamida 2.5 µg/g de organismo	12	6	6
Fecha: 17 de Nov 2017	APGWamida 5 µg/g de organismo	12	6	6
Origen de organismos: BUZOS y PESCADORES (cultivo)				
Lugar: Isla Natividad, Baja California Sur.				
IVG 3	H ₂ O ₂ -TRIS 0% V/V	4	2	2
Longitud prom: 16.64 ± 1.30 cm	H ₂ O ₂ -TRIS 6% V/V	4	2	2
Peso prom: 688.75 ± 191.36 g	H ₂ O ₂ -TRIS 9% V/V	4	2	2
Especie: Abulón azul	APGWamida 0 µg/g de organismo	4	2	2
Total de organismos: 24	APGWamida 2.5 µg/g de organismo	4	2	2
Origen de organismos: S.C.P.P. La Purísima (silvestre)	APGWamida 5 µg/g de organismo	4	2	2
Fecha: 20 de agosto de 2018				
Lugar: Punta Eugenia, Baja California Sur.				
IVG: Reabsorción	H ₂ O ₂ -TRIS 0% V/V	4	1	3
Longitud prom: 8.3 ± 1.14 cm	H ₂ O ₂ -TRIS 6% V/V	4	1	3
Peso prom: 76.2 ± 27.64 g	H ₂ O ₂ -TRIS 9% V/V	4	1	3
Especie: Abulón azul	APGWamida 0 µg/g de organismo	4	1	3
Total de organismos: 24	APGWamida 2.5 µg/g de organismo	4	1	3
Origen de organismos: PROGRESO (Cultivo)	APGWamida 5 µg/g de organismo	4	1	3
Fecha: 17 de Nov 2017				
Lugar: La bocana, Baja California Sur.				

Anexo 2. Preparación de inductor: peróxido de hidrógeno-TRIS (H₂O₂-TRIS)

Peróxido de hidrogeno-TRIS (Morse *et al.*, 1977)

Solución inductora de peróxido de hidrógeno-TRIS 6 % v/v

1. Agregar 42.85 ml de peróxido de hidrógeno al 35 % en 250 ml de agua
2. Tomar 6.6 ml de la solución del inciso 1 por cada litro de solución inductora

Solución inductora de peróxido de hidrógeno-TRIS 9 % v/v

1. Se usaron 64.28 ml de peróxido de hidrógeno al 35 % para preparar 250 ml de la solución
2. Tomar 9.9 ml de la solución del inciso 1 por cada litro de solución inductora

Anexo 3: Preparación de inductor: *Tetrapéptido Ala-Pro-Gli-Trp-NH₂* (APGWamida)

A) **Solución fisiológica salina para moluscos Ringer's** (Chansela *et al.*, 2008; Chansela *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018)

Tabla 9. Reactivos para solución fisiológica de Ringers

Cantidad	Concentración molar (mol ⁻¹)	Reactivo
13 g	0.054	HEPES
25.66 g	0.439	NaCl
0.82 g	0.010	KCl
1.69 g	0.152	CaCl ₂
10.17 g	0.1068	MgCl ₂
2.56 g	0.0180	Na ₂ SO ₄
1 litro		H ₂ O destilada

Indicaciones para la preparación de la solución:

- 1) Esterilizar el material de laboratorio a usar (opcional)
- 2) Minimizar el tamaño de las partículas con ayuda de un mortero (opcional)
- 3) Tamizar los polvos (tamiz 200 µm) (opcional) y pesar las cantidades necesarias para su formulación
- 4) Colocar en un vaso de precipitados la mitad del volumen final al que llegará la solución
- 5) Agregar cloruro de potasio poco a poco y agitar hasta disolver
- 6) Agregar cloruro de calcio hasta disolver
- 7) Agregar cloruro de sodio hasta disolver

- 8) Agregar el resto de sales y homogenizar, si es necesario realizar un ligero calentamiento que no sobrepase los 60 °C (de preferencia a 50 °C).
- 9) Colocar en recipientes
- 10) Ajustar a pH 7.2
- 11) Pasar por filtro (5 µm)
- 12) Esterilizar

Indicaciones de tiempo de vida y almacenaje

- 1) Almacenamiento: Almacene en el área de almacenamiento general (almacenamiento verde) con otros artículos sin riesgos específicos de almacenamiento. Almacene en un almacén cerrado, fresco, seco, bien ventilado, lejos de materiales incompatibles.
- 2) Estabilidad: Estable en condiciones normales de uso y almacenamiento.
- 3) Vida de anaquel: Almacenamiento indefinido si se almacena correctamente
- 4) Guarde a temperatura ambiente entre 15 a 30°C lejos de la luz y la humedad.

B) Preparación de solución origen (péptido)

Disolver 50 mg del neuropéptido APGWamida en 10 ml de solución fisiológica salina para moluscos Ringers (preparada en el inciso A). La concentración de la solución queda a 0.0116 M.

C) Preparación de solución de APGWamida 2.5 µg/g de org.

1. Por cada 1 ml que se tome de la solución origen (péptido) agregar 1 ml de la solución fisiológica salina para moluscos Ringer's (preparada en el inciso A).

- Tomar la cantidad que corresponda al peso del organismo y añadir la solución fisiológica salina para moluscos de Ringer's hasta completar 200 μL (Tabla 10).

Tabla 10. Ejemplo de las cantidades a inyectar con respecto al peso de los organismos la cantidad de 2.5 $\mu\text{g/g}$ de org.

Peso del organismo	Cantidad de solución a 2.5 $\mu\text{g/g}$ de org	Cantidad de SSFM Ringer's	Cantidad a inyectar a los organismos
50 g	50 μL	150 μL	200 μL
65 g	65 μL	135 μL	200 μL
90 g	90 μL	110 μL	200 μL

D) Preparación de solución de APGWamida 5 $\mu\text{g/g}$ de org.

- Tomar directamente la cantidad deseada de la solución origen (péptido)
- Tomar la cantidad que corresponda al peso del organismo y añadir la solución fisiológica salina para moluscos de Ringer's hasta completar 200 μL (Tabla 11).

Tabla 11. Ejemplo de las cantidades a inyectar con respecto al peso de los organismos la cantidad de 5 $\mu\text{g/g}$ de org.

Peso del organismo	Cantidad de solución a 5 $\mu\text{g/g}$ de org	Cantidad de SSFM Ringer's	Cantidad a inyectar a los organismos
50 g	50	150 μL	200 μL
65 g	65	135 μL	200 μL
90 g	90 μL	110 μL	200 μL

Anexo 4: Protocolo para inducción a la liberación de gametos de abulón azul con H₂O₂ –TRIS 6 % y 9 % V/V (Morse *et al.*, 1977)

A) Selección de reproductores

1. Seleccionar a los organismos que tengan una edad mayor a cinco años y que se encuentren en un índice visual gonadal grado 2 y 3.
2. Separar a los organismos que se usarán como reproductores en un estanque donde NO se les suministrará alimento durante 1 o 2 días previos a la inducción.

B) Previo a la inducción

1. Tomar datos biométricos de los organismos (longitud, peso, diferenciación de sexo, IVG, coloración del pie, etiquetado de organismos).
2. Colocar en bandejas de plástico a los organismos sin agua con la finalidad de desecarlos entre 40-60 min (en oscuridad preferentemente).

C) Inducción a la liberación de gametos al 6%

1. Colocar los abulones en un recipiente de plástico oscuro con 0.5 L de agua de mar a temperatura ambiente.
2. Agregar 6.6 ml por litro de agua de mar de TRIS 2M y agitar ligeramente.
3. Incubar durante 15 min colocando una cubierta oscura sobre el recipiente.
4. Agregar 3 ml de H₂O₂ al 6 % por litro de agua de mar y homogeneizar.
5. Incubar en oscuridad durante ~2 h.
6. Agitar ligeramente el agua en el recipiente cada 30 min.

7. Al inicio del desove, sacar los abulones y colocarlos en recipientes individuales de plástico con capacidad de 400 ml.

D) Inducción a la liberación de gametos al 9%

1. Colocar los abulones en un recipiente de plástico oscuro con 0.5 L de agua de mar a temperatura ambiente.
2. Agregar 6.6 ml por litro de agua de mar de TRIS 2M y agitar ligeramente.
3. Incubar durante 15 min colocando una cubierta oscura sobre el recipiente.
4. Agregar 3 ml de H₂O₂ al 9% por litro de agua de mar y homogeneizar.
5. Incubar en oscuridad durante ~2 h.
6. Agitar ligeramente el agua en el recipiente cada 30 min.
7. Al inicio del desove, sacar los abulones y colocarlos en recipientes individuales de plástico con capacidad de 400 ml.

E) Fertilización

1. Por cada 100 ml de ovocito agregar 10 ml de esperma a una concentración de 1×10^6 esp./ml.
2. Homogenizar ovocitos y esperma a través de movimientos suaves.
3. Después de 30 minutos verificar que los ovocitos presentan primer cuerpo polar.

Anexo 5: Protocolo para inducción a la liberación de gametos de abulón azul con el neuropéptido APGWamida

(Chansela *et al.*, 2008)

A) Selección de reproductores

1. Seleccionar a los organismos que tengan una edad mayor a cuatro años y que se encuentren en un índice visual gonadal grado 2 y 3.
2. Separar a los organismos que se usarán como reproductores en un estanque donde NO se les suministrará alimento durante 1 o 2 días previos a la inducción.

B) Previo a la inducción

1. Determinar la cantidad de APGWamida a inyectar con base en el peso del organismo considerando la siguiente fórmula

$$\mu L \text{ de APGWa a inyectar} = \text{Peso del organismo (g)} * \mu g \text{ de APGWa/g organismo} \quad (2)$$

2. Aforar a 200 μ l con solución salina fisiológica para moluscos de Ringer.

C) Inducción a la liberación de gametos

1. Sitio de inyección

La inyección se realizará en el seno arterial cefálico que se localiza a 2 cm aproximadamente de la parte posterior de los organismos (Figura 8).

2. Seguido a la inyección de los organismos se colocarán en contenedores plásticos con agua de mar filtrada a 200 μm hasta cubrir totalmente el cuerpo (350 ml aprox.).
3. Durante cada hora se estará cambiando el agua hasta obtener los gametos.

D) Fertilización

1. Por cada 100 ml de ovocito agregar 10 ml de esperma a una concentración de 1×10^6 esp./ml.
2. Homogenizar ovocitos y esperma a través de movimientos suaves.
3. Después de 30 min verificar que los ovocitos presentan primer cuerpo polar.