



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Efectos de la anestesia sobre el estrés oxidativo en ejemplares de *Seriola dumerili*

Effects of anesthesia on oxidative stress in specimens of *Seriola dumerili*



Trabajo de Fin de Grado
YAIZA PÉREZ DÍAZ

Tutorizado por Covadonga Rodríguez González y M. Virginia Martín Martín
Grado en Biología.

Julio 2022

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. La acuicultura y su desarrollo.....	3
1.2 El bienestar animal en la acuicultura	5
1.3 Anestésicos y sus usos en la acuicultura.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 Diseño experimental	9
3.2 Protocolo de muestreo	11
3.3 Análisis de daño oxidativo y respuestas antioxidantes: TBARS, SOD, CAT, GST en hígado, branquias, cerebro y músculo.....	11
3.4 Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Tiempos de inducción y recuperación de los diferentes anestésicos.....	14
4.2 Peroxidación lipídica	15
4.3 Respuesta antioxidante: actividad catalasa	17
4.4 Respuesta antioxidante: actividad Glutación S-Transferasa.....	19
4.5 Respuesta antioxidante: actividad Superóxido Dismutasa.....	21
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES	26
CONCLUSIONS.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

Resumen

Seriola dumerili es una especie de alto valor para la diversificación de las actividades de la acuicultura, una industria en crecimiento que plantea retos como diseñar procedimientos y condiciones idóneas para asegurar el bienestar y desarrollo de los animales. En este estudio empleamos dos anestésicos usados actualmente en la acuicultura y en la experimentación con peces, el aceite de clavo (eugenol) y el clorobutanol, y se investigan las variaciones en los niveles de peroxidación lipídica y enzimas antioxidantes en los ejemplares de esta especie sometidos a ambos compuestos.

Los tiempos de inducción de la anestesia muestran valores equivalentes a los observados con otros anestésicos más usados en la industria como el MS222. El aceite de clavo, aplicando dosis menores, combinado a su facilidad de producción y bajo coste, se muestra como una alternativa potencialmente interesante.

Ambos anestésicos tuvieron como resultado cambios de distinta consideración en los niveles de estrés oxidativo de los ejemplares, sin embargo, las variaciones son menores que en otros estudios previos con otras especies comunes como la trucha, sugiriendo que el medregal puede tener una respuesta antioxidante más robusta que estas, siendo este otro aspecto positivo para su producción acuícola.

Palabras clave

Seriola dumerili, Aceite de Clavo, Clorobutanol, Peroxidación lipídica, Respuesta antioxidante

Abstract

Seriola dumerili is a species of high value for the diversification of aquaculture, a growing industry that poses challenges such as designing suitable procedures and conditions to ensure the welfare and development of the animals. In this study we assayed two anesthetics currently used in aquaculture and in fish experimentation, clove oil (eugenol) and chlorobutanol, and investigated the variations in the values of tissues lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of specimens.

Anesthesia induction times show values equivalent to those observed for other anesthetics commonly used in the industry such as MS222. Clove oil which we used at lower doses, combined with its ease of production and low cost, is shown as a potentially interesting alternative.

Both anesthetics resulted in changes of different consideration in the levels of oxidative stress of the specimens, however, the variations are more subtle than in other previous studies with other common species such as trout, suggesting that amberjack may have a more robust antioxidant response, making it ideal for production in aquaculture.

Key words:

Seriola dumerili, Clove oil, Chlorobutanol, Lipid peroxidation, Antioxidant responses

1. Introducción

1.1. La acuicultura y su desarrollo

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. (FAO, 2020).

El consumo global de pescado y productos derivados del mar ha visto un aumento significativo en las últimas décadas, creciendo un 122% en 2018 respecto a 1990 (Figura 1). La producción de la acuicultura ha experimentado un crecimiento aún más pronunciado con un 527% en el mismo periodo (FAO, 2020). Se trata por tanto del sector alimenticio que más se ha desarrollado y tiene ya una mayor producción por peso que las capturas de peces globales, llegando a producir 120 millones de toneladas de animales marinos para el consumo en 2019, lo que supone el 56% del total. (Informe Apromar, 2021)

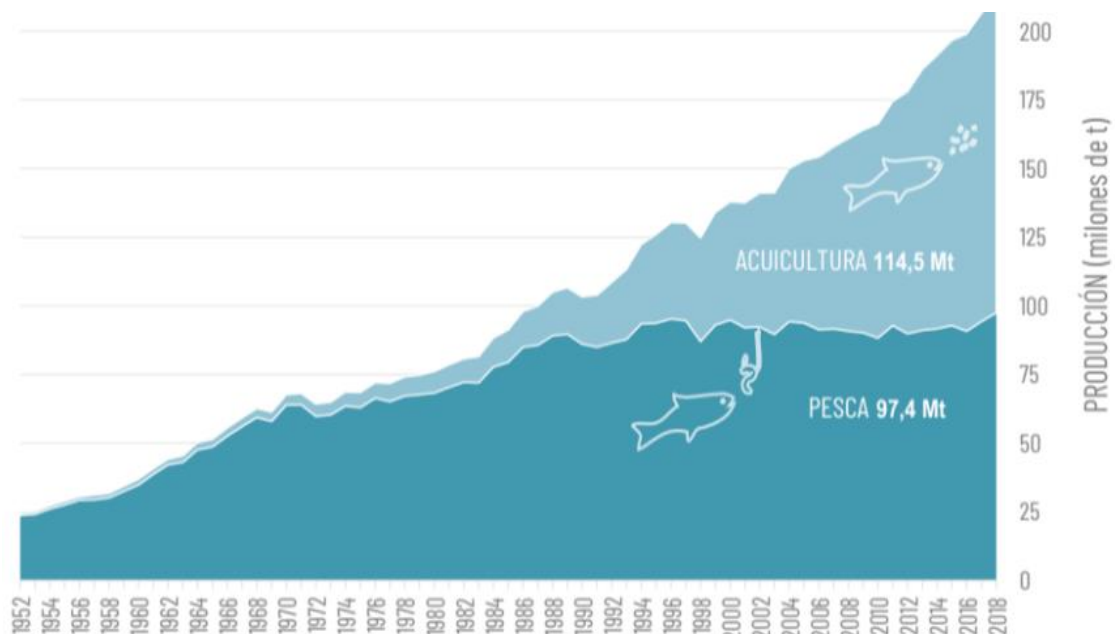


Figura 1: Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1952-2018 (FAO, 2020).

Este crecimiento se ve también condicionado por la sobreexplotación que sufren muchos recursos marinos. Se estima que un 50% de los stocks de peces marinos han sufrido un declive de más del 60% respecto a sus poblaciones originales (Minderoo Foundation, 2021)

Esto ha llevado también a la necesidad de experimentar con nuevas técnicas y especies para la diversificación de la actividad acuícola. Actualmente cerca de 580 especies marinas se cultivan en todo el mundo.

La acuicultura no se ha desarrollado de igual manera en todas las partes del mundo. En Asia, donde la demanda ha sufrido el mayor aumento estas últimas décadas, la producción ha sido mucho mayor, representando hoy en día un 85% de la producción total.

Aunque la producción europea sólo suponga un pequeño porcentaje total del global, España es el primer productor de la Unión Europea con un 23% de su producción (Labarta, 2007). Pero la producción española no solo es destacable por su cantidad sino también por su calidad y por presentar muchos avances tecnológicos en cuanto a la acuicultura tradicional. Desde una mayor inversión en ingeniería y manejo de las instalaciones, prestando atención a materiales y sistemas que evitan escapes o epidemias, el que sean seguros para el medioambiente en el que se encuentren, hasta técnicas para asegurar el bienestar de los peces y la calidad del producto, como puede ser el desarrollo de nuevos piensos, métodos de sacrificio o un aumento en la diversidad genética de las especies empleadas (MAPAMA, 2015).

Esto último es especialmente importante, pues un cultivo biodiverso garantiza características nutricionales variadas para el consumidor y una mayor resiliencia frente a posibles amenazas como enfermedades o el cambio climático.

La producción acuícola de España ha pasado de estar dominada por el cultivo de moluscos como el mejillón a una más diversa, con un mayor énfasis en especies de peces teleósteos como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*) o más recientemente el medregal (*Seriola dumerili*).

La seriola o medregal (*Seriola dumerili*, Risso 1810) constituye un importante candidato para potenciar la acuicultura marina dada su excelente calidad de carne, elevado precio de mercado y rápido crecimiento. La reproducción de este pez se consiguió por primera vez de manera íntegra en el instituto oceanográfico de Canarias (Figura 2).



Figura 2: Ejemplares de *Seriola dumerili*.
Imagen tomada en las instalaciones del IEO.

1.2 El bienestar animal en la acuicultura

La diversidad biológica también trae consigo otros desafíos tecnológicos como la búsqueda de piensos y tratamientos zootécnicos específicos para las necesidades de cada especie. El medregal, al ser una especie de comercialización reciente en la acuicultura, requiere de más investigación en estos campos para mejorar la tasa de crecimiento y reproducción a niveles óptimos. Mientras que los piensos utilizados son principalmente comerciales y adaptados a la dorada, especie más común en la acuicultura en Canarias, los tratamientos aún son un campo en desarrollo en el cultivo de peces en general.

Estos tratamientos deben tener en cuenta no solo la supervivencia de los ejemplares sino también su bienestar, entendiendo bienestar como una combinación de factores puramente fisiológicos como el funcionamiento normal de los organismos, estando sanos y alimentados, así como otros conductuales, brindándoles la capacidad de expresar conductas normales de la especie y emocionales procurando la ausencia de dolor y el miedo crónico

En el caso de la acuicultura a los factores fisiológicos le tenemos que añadir también la productividad. Un bajo nivel de bienestar animal está ligado con una reducción en la producción industrial. Por ello en la industria se han desarrollado modelos para determinar el grado de bienestar de los animales. Los indicadores de bienestar (en inglés "welfare indicators" WIs), son parámetros relacionados con la salud desde la aproximación funcional al bienestar, denominándose indicadores operacionales de bienestar (en inglés "operational welfare indicators" OWI), a aquellos que se pueden corregir al instante, o indicadores de bienestar estratégicos, cuando no se pueden corregir de forma inmediata. Estos pueden ser directos si

están relacionados con los peces, o indirectos si están relacionados con las condiciones del cultivo. Cada especie tiene OWI específicos según sus necesidades individuales. Además de un alto grado de efectividad abordando la calidad del cultivo, estos OWI son repetitivos y comparables, cuyo control tiene un costo asumible y siendo fáciles de medir en las granjas.

Aun teniendo una utilidad demostrada, existen hoy día pocos OWI validados para el cultivo de peces. Este desconocimiento sobre el bienestar en peces, se debe a una carencia de estudios que traten los aspectos biológicos de peces en general, lo que sumado a la gran variedad de especies cultivadas, cada una de ellas con ciclos de vida diferentes, pone de manifiesto una insuficiencia de regulaciones en esta materia.

Los peces lidian con el estrés de diferentes maneras. Las condiciones estresantes se pueden detectar a 3 niveles fisiológicos. Inicialmente un estímulo estresante activa la respuesta neuro-endocrina a dos niveles, la liberación rápida de catecolaminas desde el tejido cromafínico (Reid *et al.*, 1998; Kim & Kang, 2016; Cowan *et al.*, 2017), y la activación más lenta del eje hipotálamo-hipófisis- glándula interrenal (HPI) (Vijayan *et al.*, 1997; De Mercado *et al.*, 2018). Esta respuesta primaria trae consigo la liberación de hormonas como la adrenalina, la noradrenalina y el cortisol. Por tanto, la presencia o elevación de estas hormonas como el cortisol se puede usar para medir el estrés en peces. Esta respuesta primaria principalmente hormonal conlleva una respuesta secundaria metabólica como un incremento de la glucosa, y el lactato en sangre, cambios en la osmorregulación, en distintos parámetros hematológicos, y en la actividad celular de varios sistemas biológicos. Por último, en situaciones en las que el estrés se prolonga en el tiempo, existe una respuesta terciaria que implica disminuciones de la resistencia a enfermedades, disfunciones en la reproducción, una reducción del crecimiento y alteraciones en los comportamientos natatorios, produciendo a la larga una disminución de la supervivencia (Barton *et al.*, 2002).

Características como estas están estudiadas de manera desigual, disfrutando las especies con mayor desarrollo comercial de un mayor número de estudios sobre las condiciones óptimas de su medio. Es el caso de la dorada se sabe que el bienestar de esta se altera fundamentalmente tras un estrés crónico (ruido, salinidad alterada, métodos de manejo, etc.) (Altimiras *et al.*, 1994; Tort, 2011; Filiciotto *et al.*, 2017). Pero bajo situaciones de estrés agudo, es capaz de recuperarse tras un periodo de 4-24 horas, dependiendo del tipo de estrés y de su intensidad (Molinero *et al.*, 1997).

Sin embargo, en especies de más reciente introducción en la acuicultura estos datos son mucho más limitados. Pese a las prometedoras cualidades que ofrece el medregal, aún se dispone de escasa información sobre los factores inductores de estrés en esta especie y que incluyen los efectos de las diferentes condiciones de cultivo como temperatura, densidad de stock, calidad del agua, mayor o menor presencia de parásitos o el uso de anestésicos, que pueden afectar a los ejemplares en cultivo (Jerez *et al.*, 2017a, b; Martín *et al.*, 2019; Fernández-Montero *et al.*, 2020). En los pocos estudios existentes, se puso de manifiesto una alta especificidad de la respuesta fisiológica al estrés. En el medregal los estreses termales apenas supusieron un aumento de los niveles de cortisol, mientras que una elevada densidad de stock sí causó un aumento significativo. Los diferentes estímulos pueden también causar diferentes respuestas. Así, esta densidad alta, no produjo una respuesta en el sistema inmunológico, pero sí lo hizo una deficiencia alimenticia.

Dado que la respuesta fisiológica al estrés de los peces parece ser altamente específica de la especie, y verse afectada por la duración e intensidad del estrés aplicado, se hace necesaria la caracterización de los cambios que se producen en indicadores bioquímicos y respuesta antioxidante, que puedan usarse para evaluar la condición de estrés inducido en esta especie.

1.3 Anestésicos y sus usos en la acuicultura

Un importante factor en la acuicultura, y uno muy poco estudiado, es el uso de anestésicos. Los anestésicos se definen como agentes físicos o químicos, que inicialmente tienen un efecto calmante y que, si se mantiene su aplicación, inducen una pérdida de movilidad, de equilibrio y de conciencia, produciendo al final una pérdida de la capacidad de desarrollar acciones reflejas, permitiendo esto superar los procesos de estrés (Summerfelt & Smith, 1990; Javahery *et al.*, 2012). Existen una amplia variedad de anestésicos para peces cada uno con protocolos de manejo y efectos distintos. Es por ello que a la hora de elegir anestésico es importante tener en cuenta factores como su eficacia (actuar en menos de 3 minutos), su disponibilidad en el mercado, la relación coste/efectividad y su seguridad tanto para los peces como para los humanos y el medio ambiente (Cho & Heath., 2000; Iversen *et al.*, 2003; Mylonas *et al.*, 2005).

Por tanto, se hace evidente que, con el crecimiento de la acuicultura y la diversidad de especies usadas, es necesario un constante estudio de los procesos de estrés y anestesia, con el fin de determinar los parámetros de bienestar animal adecuados a cada especie y generar, al mismo tiempo, protocolos de manejo que garanticen dichos parámetros.

Uno de los anestésicos más comúnmente usados en la acuicultura, en especies como el medregal, es el aceite de clavo, un destilado de las hojas del árbol de clavo, *Eugenia caryophyllata* (fam. Myrtaceae); cuyo principal componente es el eugenol (4-alil-2-metoxifenol). Sus cualidades anestésicas se han conocido desde hace décadas, siendo comúnmente usado en anestesia para procedimientos dentales. Es eficaz en varias familias de peces y se considera seguro para el consumo humano en dosis inferiores a 2,5 mg Kg⁻¹ día⁻¹ (Maricchiolo *et al.*,2011).

El clorobutanol [1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol], por su parte, también es usado comúnmente en la anestesia de peces teleósteos, específicamente en experimentación animal con peces de tamaño medio y grande. Es un polvo cristalino de fuerte olor acre, que tiene una alta solubilidad en alcohol (1g/1mL [Merck *et al.*, 1989]), aunque también se puede disolver en agua (McFarland & Klontz, 1969). Las soluciones madre se pueden preparar mucho antes de su uso y ser almacenadas durante largos períodos de tiempo a 4°C.

Actualmente, se sabe bastante poco sobre las respuestas fisiológicas de los ejemplares de *S. dumerili* sometidos a anestesia, haciendo esto que sea bastante difícil el generar protocolos específicos para controlar el estrés en esos procesos de manejo. Los anestésicos pueden aumentar los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede ocurrir por la activación de su síntesis o por un desequilibrio en las defensas antioxidantes (Teles *et al.*, 2019). Entre las defensas antioxidantes, las respuestas enzimáticas (catalasa, glutatión S-transferasa - GST y superóxido dismutasa -SOD) se evalúan con frecuencia como biomarcadores del estrés oxidativo.

Por todo lo expuesto, se hace necesario desarrollar protocolos objetivamente cuantificables con el fin de determinar los parámetros de bienestar animal adecuados para esta especie, bajo condiciones de anestesia.

2. Objetivos

El objetivo general de este TFG fue determinar los efectos que produce la exposición a diferentes anestésicos de uso común en la acuicultura (aceite de clavo y clorobutanol), sobre distintos indicadores bioquímicos (daño oxidativo y respuesta antioxidante) en ejemplares de medregal (*Seriola dumerili*), con el fin de determinar parámetros indicadores de estrés en esta especie.

Para la consecución del mismo, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de los tiempos de sedación e inducción de anestesia bajo el efecto del aceite de clavo y clorobutanol en *S. dumerili*.
2. Variaciones en los niveles de peroxidación lipídica, medidos en tejido branquial, cerebral, hepático y muscular, como indicador del estrés bajo el efecto de la anestesia con aceite de clavo y clorobutanol en *S. dumerili*.
3. Efectos de la anestesia con aceite de clavo y clorobutanol sobre la respuesta antioxidante mediante la monitorización de los valores de las distintas enzimas asociadas a esta función en branquias, cerebro, hígado y músculo de *S. dumerili*.

3. Material y métodos

Este estudio se realizó en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía (IEO-CSIC) en Canarias. Todos los peces utilizados en el experimento fueron nacidos y criados en las citadas instalaciones.

Los ejemplares en cultivo de *Seriola dumerili* fueron sometidos a dos anestésicos de uso habitual en las instalaciones acuícolas (clorobutanol y aceite de clavo). Después de la inducción de la anestesia, se permitió que los peces se recuperaran en tanques nuevos, y se sacrificaron, siguiendo la normativa de bienestar animal sobre sacrificios para la experimentación, establecida en el Artículo 7 Capítulo II del Real Decreto 53/2013, con el objetivo de obtener muestras a distintos tiempos tras la recuperación: 0h, 1h y 24h.

3.1 Diseño experimental

Se usaron ejemplares adultos de *Seriola dumerili* con un peso medio de $3.880,9 \text{ g} \pm 1.007 \text{ g}$ y una talla media de $55,31 \text{ cm} \pm 5,125 \text{ cm}$.

Se realizaron experimentos con los dos anestésicos:

- Ensayo 1. Anestesia con Clorobutanol
- Ensayo 2. Anestesia con Aceite de clavo

Para ello, se disolverían los anestésicos clorobutanol y aceite de clavo en agua de mar (Figura 3) a una concentración capaz de generar sedación total, entendida esta como la pérdida total de actividad refleja y la pérdida total del tono muscular en menos de cinco minutos, según lo descrito por Keene *et al.*, (1998) (Purbosari *et al.*, 2019).



Figura 3: Proceso de sedación con aceite de clavo en ejemplares de *S. dumerili*.

Imagen tomada en las instalaciones del IEO.

Las concentraciones usadas fueron de 60 μL de aceite de clavo por litro de agua salada y 350 μL de clorobutanol (1,1,1-tricloro 2-metil 2- propanol disuelto en 1 L de alcohol etílico) por litro de agua salada.

El procedimiento experimental fue el siguiente: los peces fueron colocados individualmente en la concentración anestésica señalada. Después de la inducción de anestesia ligera, los peces fueron inmediatamente tallados y pesados. Posteriormente, los ejemplares se colocaron en un tanque que contenía agua de mar aireada para su recuperación.

Para cada grupo experimental se tomaron 4 ejemplares y para cada anestésico se organizaron los ejemplares de la siguiente manera:

Un grupo de control el cual se sacrifica inmediatamente después de la primera anestesia y 3 grupos experimentales, atendiendo al tiempo de recuperación entre la primera dosis anestésica y la segunda anestesia previa al sacrificio.

El grupo experimental de 0 horas fue sometido a la segunda anestesia, inmediatamente después de la recuperación de la primera y posteriormente sacrificado. El grupo 1 h se sometió al mismo proceso de anestesia, recuperación (de una hora), segunda anestesia y sacrificio y al tercer grupo, el de 24 horas, se le dio un día de tiempo de recuperación entre los dos procedimientos de anestesia.

Los procesos de recuperación tuvieron lugar en tanques cilíndricos aproximadamente de 1,5 metros de alto y 1m^3 de agua salada.

Para cada uno de estos grupos se anotó inicialmente el tiempo de pérdida de equilibrio, el tiempo de pérdida de actividad refleja y el tiempo de recuperación de cada uno de los peces anestesiados, así como el tiempo de pérdida de equilibrio y el tiempo de pérdida de actividad refleja en la segunda anestesia, previa al muestreo de los grupos experimentales, realizándose una comparación de ambas.

3.2 Protocolo de muestreo

El total de individuos muestreados en los dos experimentos llevados a cabo fue de 32 peces (4 peces x 2 tratamientos x 4 tiempos de recuperación). Para el protocolo de muestreo se procedió a la recolección de tejidos de distintos órganos de los ejemplares. En primer lugar, se registró el peso y talla de los especímenes. Posteriormente se procede a la disección para obtener muestras de hígado, músculo, cerebro y branquias. Todas las muestras se limpiaron inmediatamente después de su obtención con agua destilada para impedir posibles anomalías en los resultados causadas por coágulos de sangre. Aproximadamente 200- 400mg de cada tejido por individuo, los cuales se ubicaron en criotubos de 2 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido para una congelación rápida con el objetivo de preservar la actividad enzimática. Posteriormente fueron transportados y mantenidos en un ultracongelador.

3.3 Análisis de daño oxidativo y respuestas antioxidantes: TBARS, SOD, CAT, GST en hígado, branquias, cerebro y músculo.

3.3.1 Preparación de los homogeneizados

Antes de la realización de estas pruebas se procedió a la homogeneización de las muestras ultra-congeladas en tampón TRIS con un inhibidor de las proteasas (complete y tritón, para evitar la formación de lípidos), con una relación 1:2. Se utilizaron alrededor de 300 mg de muestra en cada tejido, que fueron homogeneizadas utilizando un ultraturrax. Una vez las muestras se han homogeneizado, centrifugado y separado el sobrenadante, se alicuotan en eppendorf de 0,5 ml, conservados en el ultracongelador y que serán usados para la realización de las diferentes pruebas.

3.3.2 TBARS (determinación de las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico)

Con esta prueba se pretende medir las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) generadas durante el estrés oxidativo. La degradación oxidativa de los lípidos por

especies reactivas de oxígeno (ROS), llamada peroxidación lipídica, da como resultado la formación de peróxidos lipídicos altamente reactivos e inestables. La descomposición de estos peróxidos de lípidos resulta en la formación final de TBARS, incluido el malondialdehído (MDA). Esta respuesta oxidativa se evalúa usando una curva de calibrado con el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Ohkawa *et al.*, 1979).

En presencia de calor y ácido, el MDA reacciona con TBA para crear un producto final que muestra un color llamativo “bright pink”, que se corresponde con el nivel de peroxidación lipídica y que se puede medir espectrofotométricamente a 532 nm. Los contenidos de TBARS fueron expresados en nmol/mg de proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar de 13,7 mM⁻¹ cm⁻¹ del TMP.

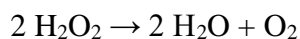
3.3.3 Superóxido dismutasa (SOD):

La enzima superóxido dismutasa es una de las primeras líneas de defensa celulares ante sustancias que producen daño oxidativo. Esta enzima cataliza la conversión del anión superóxido (O²⁻) a peróxido de hidrógeno H₂O₂ y oxígeno O₂ (Halliwell B. 1982).

Para medir la actividad SOD en las muestras empleamos una adaptación del método de Marklund y Marklund (1974) (Mesa-Herrera *et al.*, 2014). La técnica se basa en la autooxidación del pirogalol, un compuesto que genera radicales superóxido cuando se encuentra en soluciones alcalinas. La acumulación de estos radicales en suficiente concentración produce la autooxidación del pirogalol (Boerinnger Mahnheim, 1988) dando lugar a la formación de purpurogalina. Sin embargo, si hay SOD presente en el medio, esta compete con el pirogalol por el radical superóxido, lo que implica una menor formación de purpurogalina. Gracias a que la purpurogalina es susceptible de ser medida espectrofotométricamente podemos cuantificar así la actividad SOD de nuestra muestra, midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto a un control.

3.3.4 Catalasa

Enzima antioxidante que se encarga de eliminar especies reactivas de oxígeno. La actividad se determina por el método descrito por Aebi, (1984), basado en la reacción:



El ensayo se lleva a cabo siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 240 nm, debida a la transformación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua

(H₂O) y oxígeno (O₂), catalizada por la enzima catalasa (CAT), siguiendo la reacción durante 1 min.

3.3.5 Glutation S-Transferasa (GST):

La GST es una enzima multifuncional y ubicua que juega también un papel importante en la detoxificación celular. La enzima protege la célula de los oxidantes, conjugándolos a glutaciones neutralizando así sus sitios electrofílicos y transformándolos en productos solubles en agua (Boyland, E. *et al.*, 1969).

El objetivo de la prueba es medir la actividad total de GST en los tejidos mediante la conjugación del (1-cloro-2,4-dinitrobenceno, CDNB) y un glutatión reducido (Habig, W.H *et al.*, 1974). La conjugación va acompañada de un aumento de la absorbancia a 340 nm que puede ser determinada mediante métodos fotométricos. Esta tasa de aumento es proporcional a la actividad de GST en la muestra.

3.4 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como medias \pm error estándar. Para determinar la bondad de ajuste de los datos numéricos a una distribución normal, se usó el test de normalidad para una muestra, de Kolmogorov-Smirnoff, mientras que para comprobar la homogeneidad de varianzas se usó el test de Levene.

Con el fin de detectar diferencias entre los diferentes tratamientos (control, 0 horas, 1 hora, 24 horas) se llevó a cabo un test de ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

Ya que el tamaño de la muestra era pequeño se usó una distribución de T-student para determinar las diferencias de los grupos experimentales frente al grupo control.

En todos los test estadísticos utilizados, el nivel de confianza de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente diferente. El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SPSS (Versión 25).

4. Resultados

4.1. Tiempos de inducción y recuperación de los diferentes anestésicos

Las tablas 1 y 2 muestran los tiempos de sedación y de anestesia con clorobutanol y aceite de clavo de los diferentes grupos experimentales (0 hora, 1 hora, 24 horas).

Lo primero que podemos observar partiendo de las anotaciones tomadas sobre los tiempos de anestesia en cada uno de los grupos, es que en los ejemplares anestesiados con clorobutanol, en la segunda anestesia, tras el periodo de recuperación, el tiempo de pérdida de actividad es mayor, una diferencia que se acentúa en los grupos con tiempos de recuperación más largos. En el grupo con el periodo de recuperación de 24 horas, anestesiado con clorobutanol, la diferencia fue de 219 segundos, es decir, pasaron de tardar 109 s a que el periodo de anestesia fuera de 328 s.

Tabla 1: Tiempos de sedación y de anestesia con clorobutanol de los diferentes grupos de control y experimentales (0 horas, 1 hora, 24 horas). Los valores se expresan como medias \pm error estándar.

	PRIMER ANESTESIADO		SEGUNDO ANESTESIADO	
	Sedación (s)	Anestesia (s)	Sedación (s)	Anestesia (s)
Control	244 \pm 52	266 \pm 25		
0 hora	164 \pm 15	126 \pm 12	209 \pm 121	137 \pm 57
1 hora	275 \pm 59	139 \pm 45	272 \pm 18	171 \pm 27
24 hora	250 \pm 66	109 \pm 22	343 \pm 78	328 \pm 70

No observamos la misma diferencia en los grupos tratados con aceite de clavo, no habiendo diferencia aparente entre los tiempos de anestesia iniciales y los posteriores a la recuperación, en ninguno de los grupos (Tabla 2).

Tabla 2: Tiempos de sedación y de anestesia con aceite de clavo de los diferentes grupos de control y experimentales (0 horas, 1 hora, 24 horas). Los valores se expresan como medias \pm error estándar.

	PRIMER ANESTESIADO		SEGUNDO ANESTESIADO	
	Sedación (s)	Anestesia (s)	Sedación (s)	Anestesia (s)
Control	72 \pm 28	152 \pm 34		
0 hora	146 \pm 67	144 \pm 73	91 \pm 18	99 \pm 33
1 hora	103 \pm 22	196 \pm 82	109 \pm 52	132 \pm 32
24 hora	95 \pm 15	213 \pm 44	141 \pm 100	241 \pm 51

Los experimentos realizados con Clorobutanol no tuvieron mortalidad asociada a los procedimientos, sin embargo, durante el transcurso de la experimentación con el aceite de clavo uno de los ejemplares del grupo 1h murió durante el periodo de recuperación posterior a la primera anestesia, a consecuencia probablemente de un peor estado de salud previo a las pruebas. Por tanto, los resultados del grupo de 1h en los ensayos con aceite de clavo corresponden a un tamaño muestral de n=3.

4.2 Peroxidación lipídica

4.2.1. Ensayo de anestesia con Clorobutanol

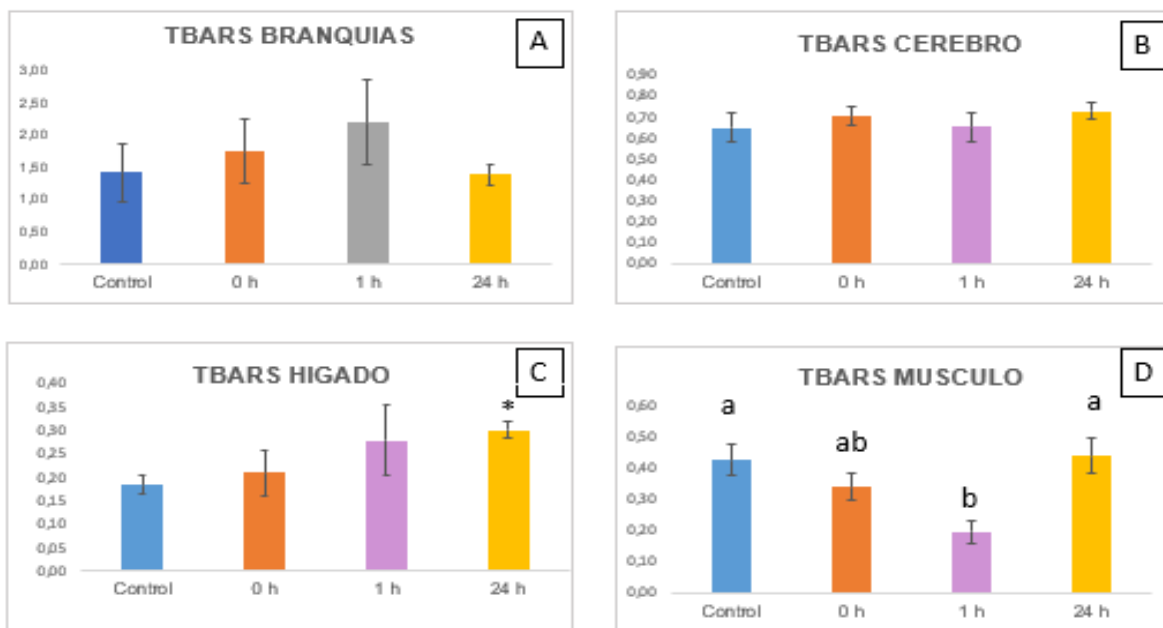


Figura 4: Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) (nmol MDA/mg de proteína) de branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de *S. dumerili* anesthesiados con clorobutanol. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (n=4, p<0,05).

El tejido que presenta mayor peroxidación lipídica es el branquial, alcanzando una actividad de $2,180 \pm 0,653$ nmol TBARS/mg de proteína en el grupo de 1h (Figura 4, A). Vemos diferencias notables en este grupo respecto a los otros, sobre todo en el tejido muscular alcanzando valores mínimos de $0,194 \pm 0,036$ nmol TBARS/mg proteína, evidenciándose además, una diferencia significativa entre los grupos de 1h y 24h (Figura 4, D). En el hígado el grupo de 24h presenta un incremento significativo de peroxidación lipídica frente al grupo de control (Figura 4, C).

4.2.2. Ensayo de anestesia con Aceite de Clavo

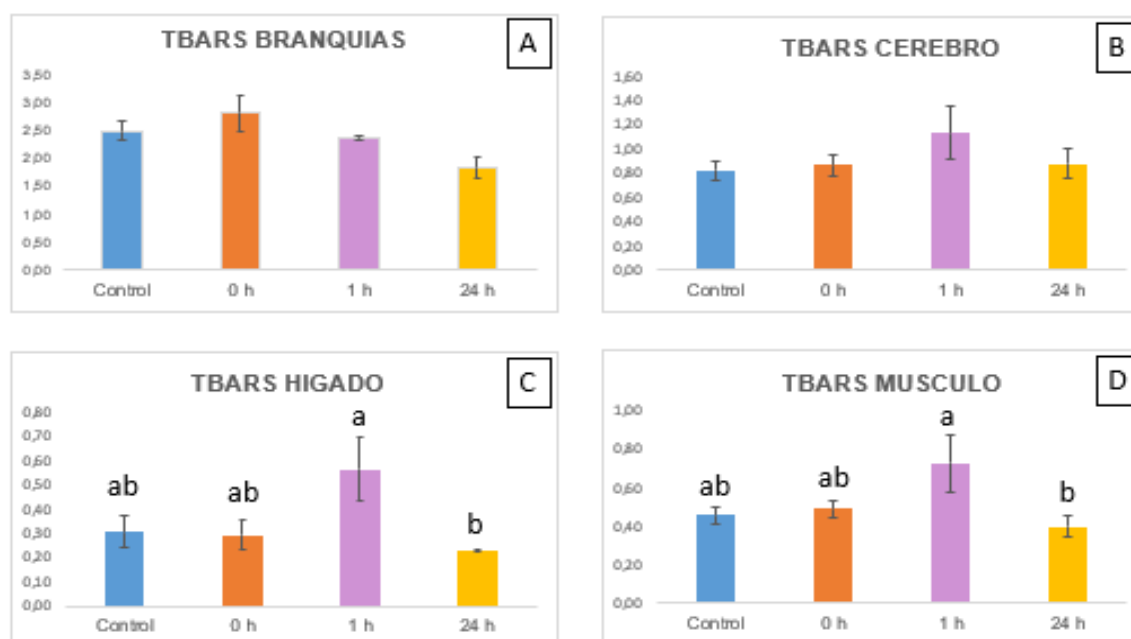


Figura 5: Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) (nmol MDA/mg de proteína) de branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de *S. dumerili* anestesiados con aceite de clavo. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (grupos 0h, 24h y control n = 4, grupo 1h n = 3; $p < 0,05$).

En la figura 5 podemos observar que el tejido que presenta mayor peroxidación lipídica es el branquial (A), llegando a tener una actividad de $2,798 \pm 0,643$ nmol TBARS/mg de proteína en el grupo experimental de 0 h. En cambio, en el tejido muscular (D) y en el hígado (C), el grupo experimental de 1h es el que presenta mayor actividad ($0,727 \pm 0,257$ nmol TBARS/mg de proteína y $0,562 \pm 0,26$ nmol TBARS/mg de proteína, respectivamente), pudiéndose observar una diferencia significativa frente al grupo de 24h en ambas muestras. En todos los tejidos se observa una tendencia a incrementar los niveles de peroxidación lipídica en el grupo de 1 h con respecto al control, aunque no llega a ser significativa estadísticamente ($P > 0,05$). En el hígado, los niveles superiores de peroxidación lipídica se detectan en el grupo de 1h a diferencia de la anestesia con clorobutanol (mayor peroxidación en el grupo de 24 h).

4.3 Respuesta antioxidante: actividad catalasa

4.3.1 Ensayo de anestesia con Clorobutanol

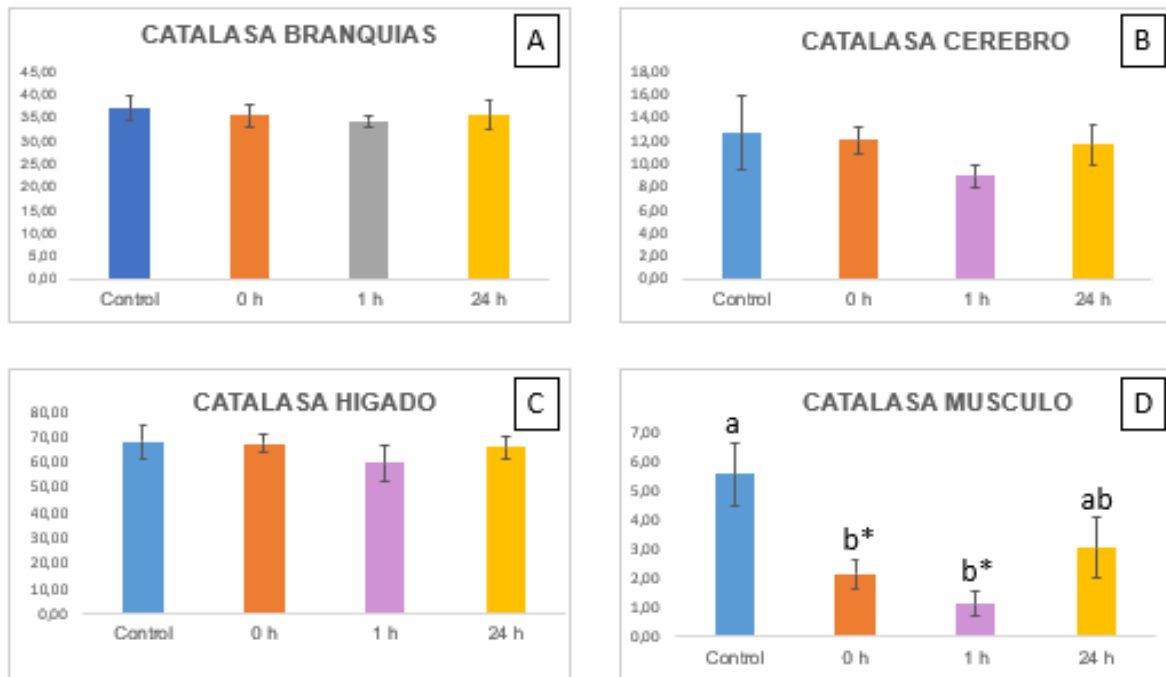


Figura 6: Actividad de la enzima catalasa ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anestesiados con clorobutanol tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control ($n = 4$, $p < 0,05$).

En el caso de la enzima catalasa, el órgano que presenta mayor actividad es el hígado, alcanzando valores máximos de $68,137 \pm 6,552$ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Figura 6, C), aunque en este tejido no encontramos variaciones importantes en los niveles de esta enzima en los diferentes grupos. Las diferencias más destacables en esta respuesta antioxidante las encontramos en el tejido muscular, teniendo los grupos experimentales de 0h y 1h actividades que presentan una diferencia significativa respecto al grupo de control (Figura 6, D).

4.3.2. Ensayo de anestesia con Aceite de Clavo

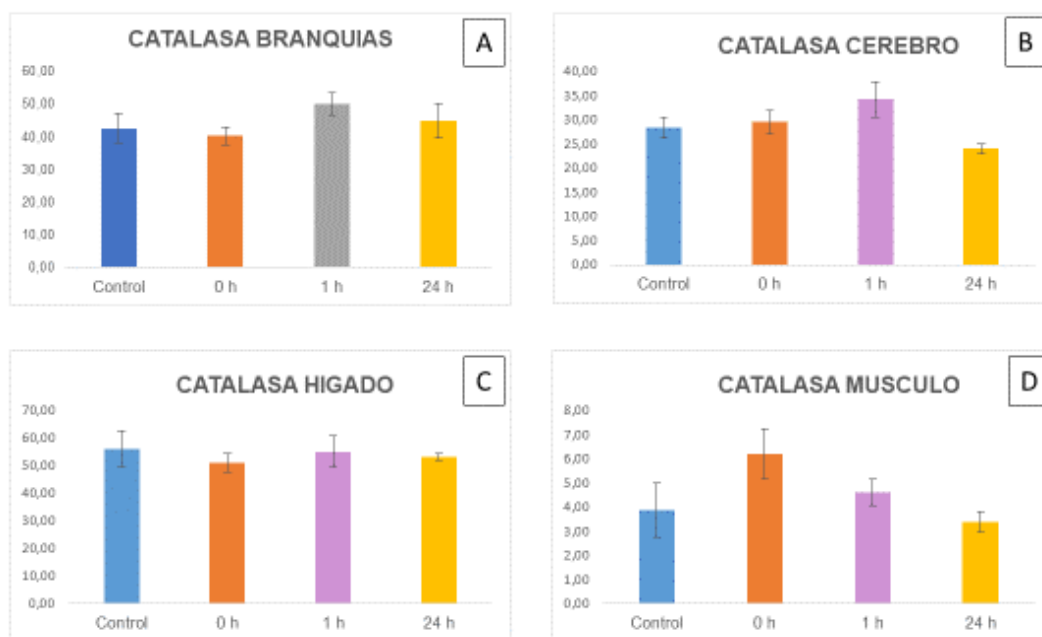


Figura 7: Actividad de la enzima catalasa ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anestesiados con aceite de clavo tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (grupos 0h, 24h y control: n = 4, grupo 1h: n = 3; p < 0,05).

En la figura 7 observamos que el tejido que presenta mayor actividad de la enzima catalasa es el hígado llegando a alcanzar una respuesta oxidativa de $56,119 \pm 13,26$ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (C), sin embargo, este tejido al igual que el branquial y el cerebro, no presentan diferencias significativas entre los grupos experimentales con respecto al grupo control. En el tejido muscular (D) podemos llegar a ver algunas tendencias entre los grupos 0h, 1h y 24h, sobre todo en el de 0h, siendo este el que presenta un valor de actividad más elevada ($6,207 \pm 2,066$ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

4.4 Respuesta antioxidante: actividad Glutación S-Transferasa

4.4.1 Ensayo de anestesia con Clorobutanol

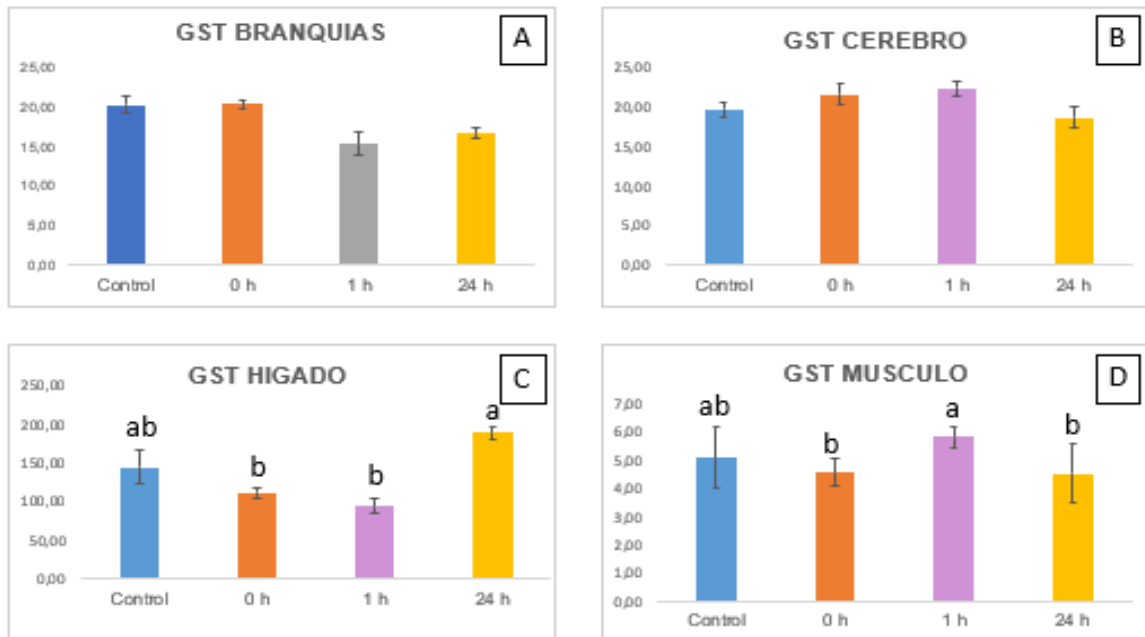


Figura 8: Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (nmol/ min * mg proteína) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anestesiados con clorobutanol tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (n = 4, p < 0,05).

En el hígado (Figura 8, C) encontramos la mayor actividad de glutatión S- transferasa ($189,238 \pm 8,695$ nmol/ min * mg proteína) en el grupo de 24 h. En este mismo tejido, es donde podemos apreciar una diferencia significativa entre el grupo experimental 24 h frente al de 0 h ($111,543 \pm 6,131$ nmol/ min * mg proteína), y 1 h ($93,696 \pm 9,649$ nmol/ min * mg proteína). Estos dos no presentan importantes variaciones entre ellos. En el músculo (Figura 8, D), además, podemos encontrar una menor actividad GST en el grupo 1h frente al resto de grupos experimentales.

4.4.2 Ensayo de anestesia con Aceite de Clavo

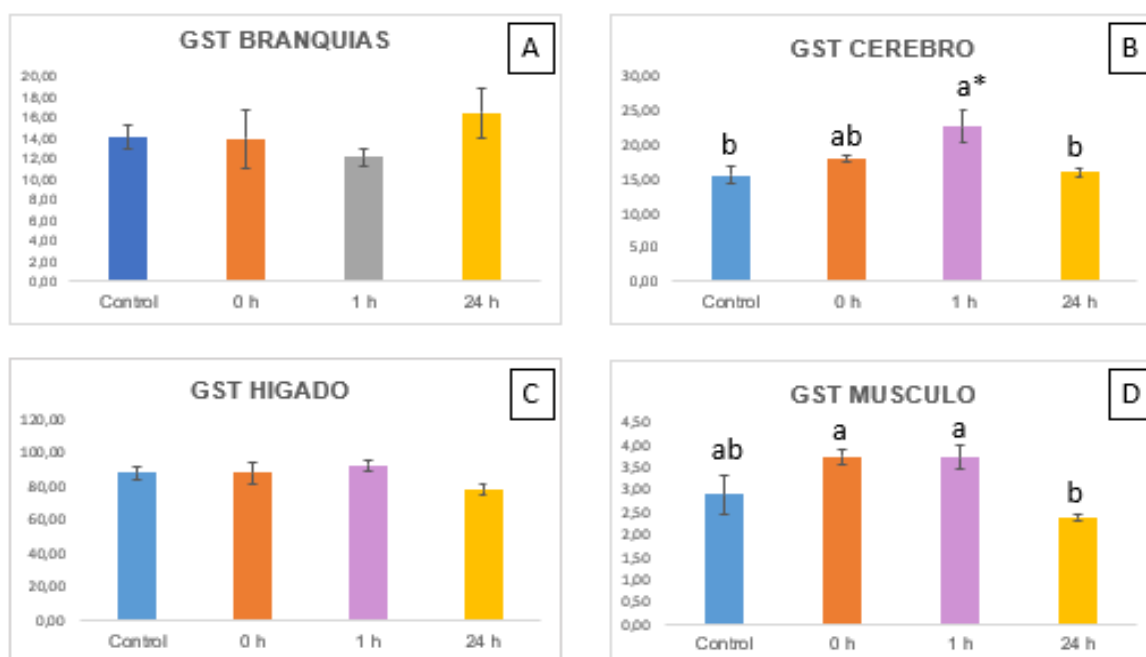


Figura 9: Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (nmol/ min * mg proteína) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anestesiados con aceite de clavo tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (grupos 0h, 24h y control: n = 4, grupo 1h: n = 3; p<0,05).

En la figura 9 se observan diferencias significativas de la actividad GST en el tejido muscular (D), siendo en el grupo de 1 h significativamente superior al control ($2,377 \pm 0,083$ nmol/ min * mg proteína). El cerebro (B) presenta una variación significativa del grupo de 1h, que alcanza valores significativamente superiores al control ($22,660 \pm 2,420$ nmol/ min * mg proteína). El hígado (C) es el órgano que presenta mayor respuesta oxidativa, alcanzando una actividad de $92,751 \pm 3,199$ nmol/ min * mg proteína.

4.5 Respuesta antioxidante: actividad Superóxido Dismutasa

4.5.1 Ensayo de anestesia con Clorobutanol

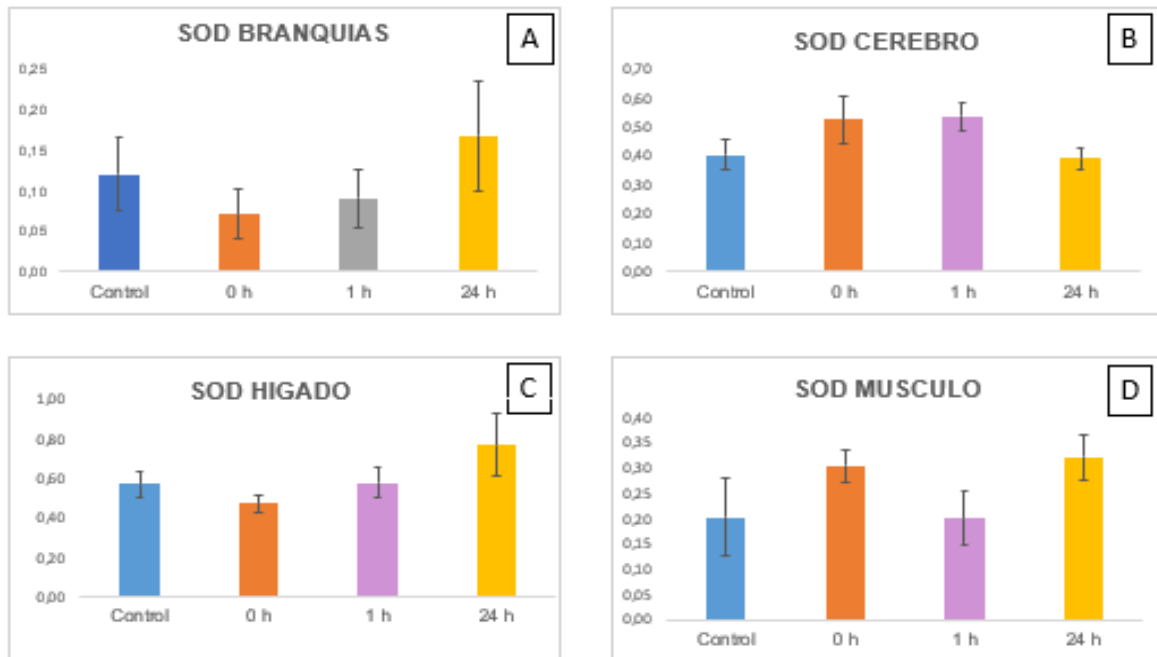


Figura 10: Actividad de la enzima superóxido dismutasa (Unidades/mg proteínas) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anesthesiados con clorobutanol tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control ($n = 4$, $p < 0,05$).

Encontramos la mayor actividad de esta enzima en el hígado, con valores alcanzando las $0,767 \pm 0,159$ Unidades/mg proteínas (Figura 10, C), observándose también que la actividad enzimática es mucho menor en las branquias que en el resto de tejidos, con valores en su mayor parte por debajo de 0,1 Unidades/mg proteínas, exceptuando el grupo de 24 horas que presentó una actividad de $0,168 \pm 0,069$ Unidades/mg proteínas. Sin embargo, esta diferencia no es suficiente para considerarla significativa ($P \geq 0,05$) (Figura 10, A).

4.5.2 Ensayo de anestesia con Aceite de Clavo

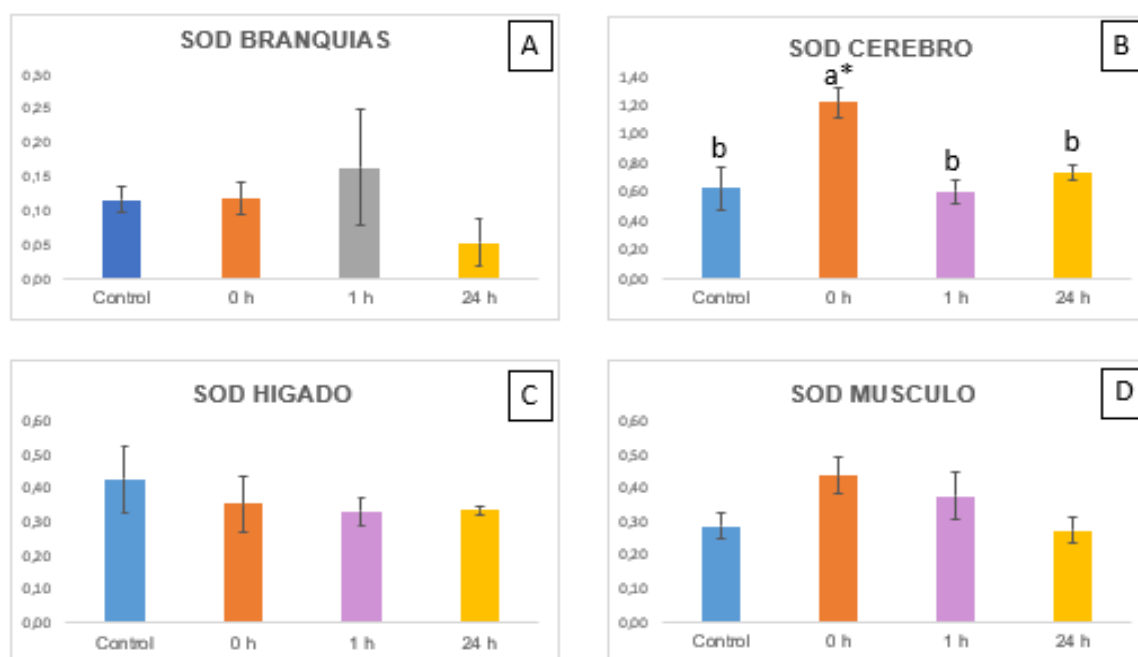


Figura 11: Actividad de la enzima superóxido dismutasa (Unidades/mg proteínas) en branquias (A), cerebro (B), hígado (C) y músculo (D) de ejemplares de *S. dumerili* anestesiados con aceite de clavo tomados en cada grupo experimental. Los valores se expresan como medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del tratamiento a lo largo del tiempo; el asterisco indica significativamente diferente del control (grupos 0h, 24h y control: n = 4, grupo 1h: n = 3; $p < 0,05$).

La actividad de la enzima superóxido no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales en hígado, músculo o branquias. La respuesta antioxidante más alta se puede observar en el grupo de 0h en el cerebro, en el que encontramos un valor máximo de $1,221 \pm 0,100$ Unidades/ mg proteína, significativamente superior al resto de grupos experimentales y al control (Figura 11, B). Cabe destacar que el tejido branquial presenta una actividad aparentemente menor frente a los otros tejidos.

5. Discusión

Esta investigación evalúa la respuesta antioxidante que provocan dos anestésicos, aceite de clavo y clorobutanol, en ejemplares adultos de *Seriola dumerili*. Se eligieron estos anestésicos por sus interesantes cualidades y buenos resultados en estudios anteriores de índole similar. El clorobutanol se ha usado tradicionalmente en la acuicultura y la experimentación mientras que el aceite de clavo (eugenol) está actualmente aprobado para su uso en animales destinados al consumo humano en la Unión Europea según lo establecido por la Agencia Europea de Medicamento (EMA/CMDv/650880/2018 rev. 3) por lo que su estudio puede ser beneficioso para la industria de la acuicultura a corto plazo.

Para ello empleamos, para cada anestésico, 16 peces repartidos en un grupo de control y 3 grupos experimentales que tenían tiempos de recuperación variables antes de una segunda anestesia. Todos los ejemplares tenían pesos y tallas similares para reducir al máximo el error estándar en los resultados y se sometieron a las mismas condiciones. Todos los grupos se anestesiaron en un tanque separado al utilizado para la recuperación y en el que se quedaban, en el caso de los grupos experimentales, hasta su sacrificio. Debido a la legislación vigente y para evitar el sufrimiento innecesario de los peces se realizaba una segunda anestesia antes del sacrificio y recolección de las muestras de tejidos. Cabe destacar que esto podría producir diferencias en los resultados frente a otros estudios que no llevaban a cabo este procedimiento como es el de Velisek *et al.*, (2011)

Debido a que cada especie de pez tiene características metabólicas propias, es necesario evaluar las dosis de anestésicos para que sean efectivas en una rápida sedación de los individuos, que permita su manejo y otras prácticas rutinarias en la industria. Se usaron cantidades mayores que en estudios previos, 57,52 mg/L frente a los 40 mg/L en el caso de Maricchiolo *et al.*, (2011), debido a que en nuestro estudio se emplearon ejemplares adultos de mayor talla frente a otros juveniles.

Los tiempos de inducción que observamos están dentro de los valores normales de otros estudios realizados (Maricchiolo *et al.*, 2011 y García-Gómez *et al.*, 2002) y no hubo grandes variaciones entre los ejemplares, perdiendo todos la movilidad en pocos minutos con ambos anestésicos. En el caso del aceite de clavo vemos que nuestros tiempos de inducción son ligeramente menores que los obtenidos en Maricchiolo *et al.*, (2011), lo que se puede deber a la ya mencionada diferencia entre este estudio en el que se utilizaron ejemplares juveniles para la experimentación, mientras que en nuestro estudio se usaron individuos adultos. En el caso

del clorobutanol vemos cómo los tiempos son mucho mayores en todos los grupos experimentales en comparación al aceite de clavo, hecho que ya se ha comprobado en estudios anteriores como en García-Gómez *et al.*, (2002), donde se demuestra que el aceite de clavo es igual de efectivo que sus alternativas más caras, y con dosis menores.

Podemos observar también que los tiempos de inducción variaban en el caso de la segunda anestesia, aplicada con el propósito de sacrificio. Eran algo menores en los grupos experimentales de 0h y 1h pero mayores en el grupo de 24 horas. Esto se podría explicar porque los periodos de recuperación más cortos no eran suficientes para que el organismo se recuperase de la anestesia inicial y el aumento tras las 24 horas, puede deberse a sistemas de protección mejorados por la reciente exposición, aunque esto no se puede comprobar ya que no existe bibliografía relacionada que haya requerido de una segunda anestesia o que haya registrado los tiempos de inducción de esta, por lo que sería necesario realizar nuevos estudios para comprobar esta hipótesis.

El estrés en peces puede propiciar la aparición de enfermedades que repercuten en la viabilidad económica de su cultivo (Tort, 2011; Fernández-Montero *et al.*, 2020; Magnoni *et al.*, 2020). El estrés oxidativo, entendido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y la respuesta oxidativa, genera daños celulares. Este efecto no se aprecia de igual manera en todos los tejidos. Los anestésicos ingresan al organismo a través de las branquias, pero no es en este tejido donde vemos mayores concentraciones de enzimas antioxidantes, los mayores valores los vemos en el hígado en el caso de ambos anestésicos. Esto se puede explicar por la naturaleza del propio órgano, muy metabólicamente activo y que tiene función detoxificante y antioxidante (Velisek *et al.*, 2011)

La peroxidación lipídica experimenta un ligero incremento respecto al grupo control en los ejemplares anestesiados con aceite de clavo del grupo 1 hora post-anestesia, pero en los anestesiados con clorobutanol, solo el grupo de 24 horas es significativamente superior al control en el hígado. Por tanto, nuestro estudio revela que la anestesia con ambos reactivos provoca un aumento variable en los niveles de peroxidación lipídica. Esto puede deberse en algunos casos a una inhibición de la respuesta antioxidante, como la que observamos en otros estudios con distintas especies como el de Velisek *et al.*, (2011).

En el caso de estas respuestas antioxidantes, vemos resultados diferentes entre cada una de ellas. La enzima catalasa encargada de la reducción del peróxido de oxígeno no experimentó grandes cambios respecto al grupo de control, exceptuando una reducción en el tejido muscular

de los ejemplares anestesiados con aceite de clavo. Este dato contrasta con la bibliografía previa como es el caso de Velisek *et al.*, (2011), que observaron una disminución significativa de enzimas asociadas tras la anestesia. Esta variación puede deberse a la diferencia de la especie usada en la investigación. Así, la trucha usada en su estudio podría tener un sistema antioxidante menos efectivo frente a los productos del hidróperóxido, que el medregal.

La superóxido dismutasa, encargada de dismutar el superóxido a peróxido de hidrógeno, por su lado aumenta en el tejido cerebral, especialmente en los ejemplares anestesiados con aceite de clavo, aumento que es el resultado de una primera respuesta antioxidante frente al estrés de la anestesia y que concuerda con bibliografía previa (Velisek *et al.*, 2011), que encontraron este mismo aumento tras el uso de aceite de clavo.

Los niveles de GST que juegan un importante papel en los procesos de ajuste de las rutas metabólicas, experimentaron un aumento significativo en el tejido cerebral de los ejemplares anestesiados con aceite de clavo, esto contrasta con otros estudios previos como el de Teles *et al.*, (2019) que no encontraron cambios en los niveles de esta hormona tras la aplicación de la anestesia. Dicha diferencia se puede deber al uso de anestésicos con diferentes propiedades, ya que usó MS222 para esta investigación, siendo posible, por tanto, que el aceite de clavo tenga un efecto mayor sobre la ruta metabólica del GST, específicamente. La disminución encontrada en el hígado de los ejemplares anestesiados con clorobutanol, que sí concuerda con los resultados obtenidos en el estudio ya mencionado, parece corroborar la variabilidad de los anestésicos sobre cada una de las hormonas estudiadas.

En resumen algunos órganos presentan ligeros aumentos en la peroxidación lipídica que indican un incremento de los niveles de estrés en los ensayos realizados con ambos anestésicos, sin embargo, vemos variaciones menores que en otros estudios en la respuesta oxidativa, lo que puede deberse al uso de ejemplares adultos frente a los juveniles con los que se ha trabajado anteriormente en la investigación de la respuesta oxidativa en peces o bien, a una mejor respuesta de esta especie frente a los agentes oxidantes.

6. Conclusiones

- 1) Ambos anestésicos usados en el estudio demostraron una eficacia comparable o incluso mejor que las alternativas más comunes en cuanto a tiempo de inducción y coste asociado.
- 2) Se detectaron ligeros incrementos en los niveles de peroxidación lipídica en hígado y musculo de los ejemplares tratados con ambos anestésicos, si bien, estos fueron variables entre los tiempos post-anestesia estudiados.
- 3) Los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes presentan un alto grado de variabilidad, pero encontramos respuestas marcadas que demuestran la robustez del sistema antioxidante del medregal (*Seriola dumerili*).
- 4) En líneas generales, en las condiciones analizadas en el presente estudio, se demuestra que los ejemplares de *S. dumerili* tienen mecanismos para hacer frente a la producción de ROS inducida por cambios metabólicos asociados a la exposición a anestésicos siendo capaces de adaptarse sin mostrar un estado oxidativo característico de situaciones de estrés. Los hallazgos del estudio actual tienen un significado práctico para establecer mejores prácticas de cultivo y manejo de esta especie.

Conclusions

- 1) Both anesthetics used in this study demonstrated comparable or, in some cases, even better effectiveness in both induction times and associated costs, than their most common alternatives.
- 2) Slight increases were detected in the levels of lipid peroxidation in the liver and muscle of the specimens treated with both anesthetics, although these varied between each of the groups with different post-anesthesia resting periods.
- 3) The changes in the activities of the antioxidant enzymes present a high degree of variability, even though we found marked responses that demonstrate the robustness of the antioxidant system of amberjack *Seriola dumerili*.
- 4) In general, under the conditions analyzed in this study, it is shown that *S. dumerili* specimens have mechanisms to deal with the production of ROS induced by metabolic changes associated with exposure to anesthetics, without showing an oxidative state characteristic of stressful situations. These findings have practical significance in establishing better farming and management practices for this species.

7. Bibliografía

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 121–126.
- Altimiras, J., Champion, S.R., Puigcerver, M., & Tort, L. (1994). Physiological responses of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to hypoosmotic shock. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108 (1), 81-85.
- APROMAR. (2021). La acuicultura en España. <https://apromar.es/>
- Barton, B.A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
- Boehringer Mannheim (1988) Manual de técnicas y datos de bioquímica (Mannheim, Alemania).
- Boylard, E., & Chasseaud, L. (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* 32, 173-219.
- Cho, G.K., & Heath, D.D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture research*, 31(6), 537-546.
- CMDv (2021) Authorised fish products: situation in Europe. Amsterdam, 06/04/ 2021(EMA/CMDv/650880/2018 rev3)
- Cowan, M., Azpeleta, C., & López-Olmeda, J. (2017). Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *Journal of Comparative. Environmental toxicology and pharmacology*, 43, 128-133
- De Mercado, E., Larrán, A.M., Pinedo, J., & Tomás-Almena, C. (2018). Skin mucous: a new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, 484, 90-97.
- Fernández Montero, A., Torrecillas, S., Tort, L., Ginés, R., Acosta A. F., Izquierdo, M., & Montero, D. (2020). Stress response and skin mucus production of greater amberjack (*Seriola dumerili*) under different rearing conditions. *Aquaculture*. 520. 735005. 10.1016/j.aquaculture.2020.735005.
- Filiciotto, F., Cecchini, S., Buscaino, G., Maccarrone, V., Piccione, G., & Fazio, F. (2017). Impact of aquatic acoustic noise on oxidative status and some immune parameters in gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture research*, 48(4), 1895-1903.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, pp. 1-224.
- García-Gómez, A. & de la Gándara, Fernando & Raja, T. (2002). Use of clove, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. and Perry), oil as a cost-effective anaesthetic for routine tasks in handling cultured marine fish. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*. 18. 21-23.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Halliwell B. (1982) Production of superoxide hydrogen peroxide and hydroxy radical by phagocytic cells, a cause of chronic inflammatory disease. *Cell Biol Int Rep*, 529-2.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S & Eliassen, R.A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, Aqu-Sk and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*. 221, 549-566.
- Javahery, S., Moradlu, A.H., & Ghorbani, R. (2012). Efficacy of clove oil as an anaesthetic for two sizes of *Rutilus frisii kutum*. *Global Vet*, 9, 319-322.
- Jerez, S., Martín, M. V., Santamaría, F. J., Felipe, B. C., Misol, A., & Lago, M. J. (2017). Effects of stocking density on growth performance and health of greater amberjack (*Seriola dumerili*) juveniles. *Aquaculture Europe 2017 European Aquaculture Society Dubrovnik, Croacia*
- Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., & Soto, C.G (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 29, 89–101.

- Kim, J.H., & Kang, J.C. (2016). The toxic effects on the stress and immune responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* exposed to hexavalent chromium.
- Labarta, U. (2007). El desarrollo de la acuicultura en España. *Arbor*, 183(727), 669–685.
- McFarland W. N. & Klontz G. W. (1969). "Anesthesia in fishes". *Federation Proceedings*. 28 (4): 1535–1540.
- Magnoni, L. J., Martos-Sitcha, J. A., Prunet, P., Mancera, J. M., eds. (2020). *Welfare and Stressors in Fish: Challenges Facing Aquaculture*. Lausanne: Frontiers Media SA. doi: 10.3389/978-2-88963-625-9
- Maricchiolo, G., & Genovese, L. (2011). Some Contributions to Knowledge of Stress Response in Innovative Species with Particular Focus on the Use of the Anaesthetics. *The Open Marine Biology Journal*. 511. 24-33.
- Marklund, S. Marklund, G. (1974) Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47,469-474.
- Martín M.V., Jerez S., Chaves-Pozo E., Pérez J.A., & Santamaría F.J., (2019). A Sensitive, Accurate, and Versatile Method for the Quantification of Superoxide Dismutase Activities in Biological Preparations. *Reactive Oxygen Species* 7(19):10–20
- Merck, C. C., Sonnenwald, B. M., & Rallwage, H. (1989) Studies on the use of homeopathic medicines for the treatment of acute mastitis in cows. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenzeitschrift* 102.
- Mesa-Herrera, F. (2014) Efectos plasmáticos de nuevos derivados del Tamoxifeno. (Trabajo fin de grado) Universidad de la Laguna.
- Minderoo Foundation, (2021). "The Global Fishing Index: Assessing the sustainability of the world's marine fisheries." Perth, Western Australia,
- Molinero, A., Gomez, E., Balasch, J., & Tort, L. (1997). Stress by fish removal in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*: A time course study on the remaining fish in the same tank. *Journal of applied aquaculture*, 7(2), 1-12.
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., & Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1-4), 467-481.
- Ohkawa H., Ohishi N., & Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., & Santoso, J. (2019) Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquacult. Fish*, 4, 129–133.
- Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. 1 de febrero de 2013. BOE-A-2013-1337.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., & Perry, S.F. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(1), 1-27.
- Resolución de 8 de octubre de 2015, de la Secretaría de Estado de Medio Ambiente, por la que se formula declaración ambiental estratégica del Programa Operativo del Fondo Europeo Marítimo y de Pesca 2014-2020. Boletín oficial del Estado. BOE-A-2015-11386.
- Summerfelt, R. C and Smith, L.S. (1990). Anesthesia, surgery, and related techniques. Pages 213- 272 in C. B. Schreck and P. B. Moyle, editors. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Teles M, Oliveira M, Jerez-Cepa I, Franco-Martínez L, Tvarijonaviciute A, Tort L, Mancera JM (2019) Transport and recovery of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) sedated with Clove Oil and MS222: Effects on oxidative stress status. *Front. Physiol.* 10:523.
- Tort L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol.* 35(12):1366-1375
- Velisek, J., Stara, A., Li, Z., Silovska, S., & Turek, J. (2011). Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in Rainbow trout. *Aquaculture*. 310. 369-375.

Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., & Iwama, G.K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1), 89-95.