

---

# OBJETIVO 2.1

---

Producir especies de peces de alto valor comercial y de especies amenazadas o vulnerables. Estudiar la fisiología de la reproducción y calidad de los gametos y puestas de peces cultivables, para un mejor conocimiento sobre su control rítmico y su modulación por factores ambientales, en especies de acuicultura y en un contexto de cambio global.

## Conexión con las líneas de actuación del plan nacional

**Líneas de actuación A2:** Acuicultura sostenible, inteligente y de precisión

**Actuación A2.1:** Diversificación de los cultivos mediante la potenciación de líneas de investigación y producción de especies de alto valor comercial y de especies amenazadas o vulnerables, para contribuir a su preservación y a restaurar o reforzar las poblaciones naturales.

**Actuación A2.2:** Estudios de fisiología, patología y reproducción de peces cultivables para mejorar el conocimiento sobre procesos que afectan al desarrollo, crecimiento, calidad de las puestas y progenie, y salud y bienestar animal, así como al control rítmico de procesos fisiológicos y su modulación por factores ambientales en especies modelo y de acuicultura.

## Descripción de tareas

**Tarea 2.1.1 (M1-M45) - Alta temperatura y función gonadal en peces.** Se estudiará *In vivo* el efecto de las altas temperaturas previstas para el Mediterráneo sobre lubinas y lenguados en las fases de cultivo en el mar (preengorde y engorde), para conocer su influencia sobre el eje reproductor y poder prevenir y mitigar efectos adversos. *In vitro* se estudiarán las bases moleculares del efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis.

**Participantes:** CSIC2, UPV4

**Resultado:** Se evaluó *in vivo* el efecto de las altas temperaturas de cultivo sobre la incidencia de la pubertad precoz (1 año de edad) y pubertad natural (2 años) en machos de lubina y la precocidad en hembras juveniles (2 años) mantenidos en condiciones naturales (grupo control, CT) y condiciones experimentales (i.e.: 3-4 °C por encima de CT) (grupo de temperatura alta, HT; 22 meses de duración). En el primer año, la temperatura afectó al crecimiento (87,4% respecto al CT), el grupo HT mostró un índice gonadosomático (GSI) menor ( $1,66 \pm 0,33\%$ ) que el grupo CT ( $2,74 \pm 0,26\%$ ) y un porcentaje menor de machos precoces (23% en HT vs 78% en CT). Los niveles plasmáticos de Fsh fueron más bajos en el grupo HT. Durante el segundo año, el crecimiento en el grupo CT fue 89% respecto al HT, que mostraron un GSI similar al de los CT (3-4%) y un porcentaje de espermiación >80% en ambos grupos. Los niveles Fsh continuaron siendo más bajos en HT, sin afectar a la síntesis de esteroides sexuales. El porcentaje de hembras con desarrollo gonadal avanzado fue similar en ambos grupos. *In vitro* se evaluó el efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis en cultivos primarios de células foliculares (CF) de ovario de lubina: 15°C (baja) y 25°C (alta) y tratados con distintos precursores. Las CF fueron capaces de realizar toda la ruta esteroidogénica a 15°C y 25°C donde se observó una disminución de los niveles de expresión de *cyp19a1* pero sin afectar a su capacidad esteroidogénica.

**Grado de consecución:** 85%

**Impacto:** Se estudia por primera vez *in vivo* la influencia de la temperatura alta del agua de mar a largo plazo sobre el inicio de la pubertad y la gametogénesis en la lubina. Estudios *in vitro* han evaluado el efecto de la temperatura sobre la esteroidogénesis ovárica. Estos estudios, a nivel reproductivo y en un contexto de cambio climático, permiten evaluar potenciales repercusiones en otras especies de interés acuícola, así como implicaciones en el medio natural (biodiversidad).

**Tarea 2.1.2 (M1-M42)- Estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes en los efectos de la temperatura y del pH sobre la calidad del esperma de peces** - Identificación de los parálogos de receptores implicados en la termosensación (TRPVs y TRPA) en 4 especies: anguila europea, atún rojo, dorada y lubina (ausencia del genoma del lenguado), y se realizará un estudio de su distribución tisular. Análisis del efecto de los agonistas/antagonistas de TRPVs en la motilidad espermática de estas especies y en lenguado, y detección de su presencia por inmunohistoquímica en los espermatozoides. Determinación de la relación entre el potencial de membrana del espermatozoide y las concentraciones de iones, y su relación con su capacidad de movimiento. Mejora de la calidad del esperma *in vitro* usando un diluyente que contenga determinados iones y hormonas.

**Participantes:** CSIC2, UPV4.

**Colaboradores:** CSIC1 & ICRA-IEO (Murcia).

**Resultado:** Se identificaron los genes de TRPVs y TRPA en genomas de anguila, dorada, lubina y lenguado (no en atún). Se diseñaron primers para anguila (3 genes), dorada, lubina y lenguado (4 genes). Se pusieron a punto las qPCR en anguila, dorada y lubina (pendiente en lenguado), y se usaron para determinar la distribución tisular de los distintos genes en machos y de hembras de estas especies. Se observaron diferentes niveles de expresión de TRPVs según la especie, el sexo y el gen.

Se probó el efecto de 8 antagonistas del TRPV1 en la motilidad del esperma de anguila. Capsazepine y A784168 mostraron un fuerte efecto inhibitor (a 50 y 100 microM), que aparecía a los 30 min de

incubación para el A784168 y a 15 min para el capsazepine, y que era más intenso cuando la incubación con inhibidor se hizo a temperatura ambiente en comparación con la inhibición a 4 °C.

En semen de dorada y lubina se probó el efecto inhibitor de 3 inhibidores (A784168, capsazepine, rutenium red), y se observó inhibición con los mismos inhibidores que con anguila, A784168 y capsazepine. La mayor inhibición se produjo a los 60 min de incubación en ambos casos.

Con respecto a la estimación del potencial de membrana de los espermatozoides, en colaboración con la Universitat de València (Dr. E. O'Connor) y el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIFP) se ha intentado poner a punto la técnica, por citometría de flujo, lo que se retomará en diciembre de 2024.

**Grado de consecución:** 70%

**Impacto:** Ha mejorado el conocimiento sobre aspectos evolutivos de los TRPVs, y sobre su papel fisiológico en el proceso reproductivo de las especies objeto de estudio. También sobre el mecanismo de activación del espermatozoide. Se han consolidado colaboraciones con equipos franceses y suecos, de la UV y del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se está realizando una tesis doctoral (Fátima Fernández García, UPV) en colaboración con la Universidad de Aveiro (Portugal). Se han publicado 3 artículos.

**Tarea 2.1.3 (M1-M38)- Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del espermatozoide de distintas especies de peces marinos** - Estudio del efecto del pH y de la temperatura del agua de mar sobre los parámetros de motilidad del espermatozoide por medio de sistemas CASA. Determinación de la resiliencia del espermatozoide frente a disminuciones del pH y aumentos de la temperatura en las 5 especies de peces marinos objeto de este estudio (anguila, lubina, dorada, lenguado, atún).

**Participantes:** CSIC2, UPV4

**Colaboradores:** CSIC1 & CRA-IEO (Murcia)

**Resultado:** Se han realizado con espermatozoides de las distintas especies (a excepción del atún) los challenge tests definidos en el proyecto, con el objetivo de poder llegar a identificar muestras de espermatozoides con una especial resiliencia a los cambios ambientales previstos como consecuencia del cambio climático: aumento de la temperatura y acidificación del agua del mar. Se han analizado los efectos de la variación del pH del agua de mar, del pH del diluyente y del agua de mar, de la temperatura del agua de mar, y el efecto combinado de la variación del pH y de la temperatura del agua de mar. Este último challenge test, combinando el efecto de ambos parámetros es el que mejores resultados proporciona a la hora de discriminar muestras de espermatozoides con distinta resiliencia a los cambios ambientales.

En resumen, los resultados indican que la movilidad del espermatozoide de anguila y de dorada es sensible al pH del agua de mar, mientras en lubina y lenguado la movilidad espermática no se ve afectada por el mismo. Las temperaturas elevadas redujeron la movilidad espermática en lubina y lenguado.

Ha quedado pendiente la realización del test de fertilización con diferentes temperaturas y pHs del agua de mar. Se intentará abordar durante la última época de puesta de cada especie en el periodo del proyecto. Tampoco se han podido abordar los trabajos previstos con muestras de atún al no disponer de reproductores accesibles.

**Grado de consecución:** 85%

**Impacto:** Se han usado técnicas CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) para evaluar el efecto de la variación del pH y/o la temperatura del agua del mar (challenge tests) en especies de interés para la acuicultura mediterránea, y eso ha permitido valorar cuál de los challenge tests resulta más apropiado para identificar muestras/machos resilientes a esos cambios ambientales en cada especie. Estas herramientas han servido de base a los trabajos de la Tarea 2.3.2. Se han publicado 2 artículos.

**Tarea 2.1.4 (M1-M45) - Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la prole en lubina** - Valoración de diferentes dietas sobre la competencia reproductiva de lubina. Efecto sobre la calidad del huevo y del espermatozoide, las puestas y sus progenies. Aparición de la primera maduración sexual y calidad del filete.

**Participantes:** CSIC2

**Colaboradores:** CSIC8

**Resultado:** Se evaluó la supervivencia (en días) sin aporte de alimento externo de larvas provenientes de dos experimentos (DT1, DT2) en los que los progenitores se habían alimentado con las siguientes dietas: DT1, relación alta, moderada y baja de ácidos grasos esenciales (DHA/EPA/ARA) y DT2, nivel de taurina alto, medio y bajo. Los resultados obtenidos mostraron que los animales alimentados con niveles altos en la relación DHA/EPA/ARA (DT1) y de taurina (DT2) tuvieron un número mayor de puestas. Además, estos animales mostraron un aumento de la supervivencia larvaria, lo que se interpretó como una mayor robustez de las progenies. Estos resultados demuestran que tanto la relación de ácidos grasos en la dieta como los niveles de taurina son factores críticos para el desarrollo gonadal y la competencia reproductiva de animales adultos. El porcentaje de machos precoces de las progenies provenientes de animales alimentados con una relación alta y moderada de ácidos grasos esenciales (DT1) no mostró diferencias significativas. En coordinación con la Tarea 3.1.3 (WP3; CSIC8) se ha analizado asimismo el perfil de ácidos grasos en músculo como indicador de la calidad del filete de animales precoces y no precoces. Los resultados obtenidos no muestran, en esta especie, diferencias de acuerdo con el estado reproductivo en ninguno de los sexos, pero sí un efecto acumulativo de la dieta, plasmado en diferencias entre los perfiles de ácidos grasos de los peces de distinta edad.

**Grado de consecución:** 90%

**Impacto:** La composición en aminoácidos y ácidos grasos de la dieta afecta a la competencia reproductiva de animales reproductores de lubina y a la calidad de su progenie. Esto supone la necesidad de re-evaluar los requerimientos de taurina y balance EPA/DHA/ARA en las dietas de reproductores. Asimismo, el perfil de ácidos grasos del filete de animales en cultivo refleja la composición de la dieta con independencia de su estado de maduración (pubertad).

**Tarea 2.1.5 (M1-M45) - Herramientas biotecnológicas** - Se desarrollarán, validarán y testarán métodos inmunológicos no invasivos para evaluar el estado reproductivo o el sexo de especies de interés en acuicultura y/o amenazadas, y para el control endocrino de la reproducción.

**Participantes:** CSIC2, UPV4

**Colaboradores:** CSIC1

**Resultado:** 1. ELISAs para Fsh y Lh en dorada y anguila: Se diseñaron plásmidos para la expresión de Lh $\beta$  y Fsh $\beta$  en *Pichia pastoris*, seleccionando clones óptimos para ambas especies. La proteína Lh $\beta$  recombinante de dorada y anguila está lista para enviar a una empresa que producirá los anticuerpos. Se siguen analizando los clones obtenidos de Fsh $\beta$ . 2. ELISAs para Amh en lubina y tortuga boba: Se probó un anticuerpo anti-Amh en lubina ya disponible, pero no fue adecuado. Se produjo Amh recombinante de lubina en *P. pastoris* como antígeno, y está pendiente la producción de anticuerpos. Se clonó el gen amh de tortuga boba y se determinó el tamaño de su Amh madura mediante western blot. Con esta información, se diseñó un plásmido para producir Amh en *P. pastoris*, y se inició la producción y purificación a gran escala con el mejor clon. 3. Gonadotrofinas (Gths) recombinantes homólogas para maduración sexual en anguila: Se generaron plásmidos de expresión para Gths de cadena única (single-chain, sc), obteniendo clones estables en células CHO productoras de Lhsc o Fshsc de anguila. Tras producir grandes cantidades de plásmidos, se realizaron dos experimentos de transferencia génica en anguilas en las instalaciones del grupo UPV4, demostrando su efectividad para inducir maduración sexual mediante análisis hormonales e histología gonadal. Se están realizando nuevos experimentos con machos (septiembre 2024 a enero 2025) y se planea un segundo experimento con hembras.

**Grado de consecución:** 60%

**Impacto:** Los experimentos de terapia génica han mostrado resultados muy positivos en cuanto a la inducción de la maduración sexual de anguilas (machos y hembras), aunque hay que optimizar los protocolos. Los ELISAs de gonadotrofinas resultarán herramientas muy útiles a la hora de evaluar en un futuro el efecto endocrino de cualquier tratamiento de inducción de la maduración en esta especie. Se está realizando una tesis doctoral (César Cruz Castellón, CSIC2-UPV4). Se ha publicado 1 artículo.