

---

# 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-M48) - 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 altas temperaturas de cultivo sobre la pubertad precoz (1 año) y natural (2 años) en machos de lubina, y sobre la precocidad en hembras (2 años). Los peces se mantuvieron bajo condiciones naturales (control, CT) o con +3–4 °C (HT) durante 22 meses. En el primer año, el aumento térmico redujo crecimiento (87,4% vs CT), GSI (1,66% vs 2,74%) y los machos precoces (23% vs 78%), con Fsh significativamente menor. En el segundo año, el crecimiento del CT fue 89% del HT, el GSI fue similar (3–4%) y la espermiación superó el 80%. Aunque la Fsh siguió más baja en HT, no hubo efectos sobre esteroidogénesis (T y 11-KT) ni competencia reproductiva. En hembras, la proporción en vitelogénesis tardía y niveles hormonales (Fsh, E2) fue comparable. Los resultados indican que, pese al estrés térmico, la capacidad reproductiva se mantiene, aunque los machos acortan su periodo de fecundidad, lo que podría alterar el periodo reproductivo de la especie. También se ha estudiado los niveles de expresión de los TRPVs en este contexto. *In vitro*, se analizó la esteroidogénesis en células foliculares ováricas a 15 y 25 °C, cuantificando producción de T y E2, y expresión de cyp19a1. Las células fueron funcionales a ambas temperaturas, aunque a 25 °C disminuyó cyp19a1.

Se han evaluado los efectos combinados de onda de calor y plata (contaminante emergente) en la ostra *Magallana gigas*, analizando parámetros fisiológicos y la expresión de TRPV. Este trabajo se está estructurando en dos publicaciones; la primera de ellas en revisión en Comp. Biochem. .Physiol.

**Grado de consecución:** 100%

**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:** ICRA-IEO (Murcia), CSIC1

**Resultado:** Se identificaron los genes de los canales TRPV y TRPA en los genomas de anguila, dorada, lubina, lenguado y ostra del Pacífico. Para cada especie se diseñaron primers específicos: 3 genes en anguila (TRPV1, TRPV4, TRPV5), 4 en dorada, lubina y lenguado (TRPV1a, TRPV1b, TRPV4, TRPV5) y 4 en ostra (TRPVA, TRPVB y dos parálogos TRPVC/D). Ha quedado pendiente el estudio de los TRPAs.

Se muestrearon tejidos de machos y hembras, se extrajo el RNA, se sintetizó el cDNA y se evaluó la distribución tisular de los distintos TRPV mediante qPCR en anguila, dorada, lubina y ostra (no en

lenguado). Se observó una expresión diferencial de los TRPVs según la especie, el sexo y el gen, destacando en general una mayor expresión en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y en las branquias. Se probó el efecto de 8 antagonistas del TRPV1 en la motilidad del esperma de anguila. Se comprobó que dos de ellos (capsazepina y A784168) tienen un fuerte efecto inhibidor a 50 y 100  $\mu\text{M}$ , a los 30 min de incubación para el A784168, y a 15 min para la capsazepina. Para ambos inhibidores se observó que la incubación a temperatura ambiente produce una mayor inhibición que a 4 °C. En el esperma de dorada y de lubina se observaron resultados similares con A784168 y capsazepina, y la mayor inhibición se produjo a los 60 min de incubación. Con respecto a la mejora del esperma in vitro, se ha conseguido diseñar un diluyente con contenido modificado en sodio que ha mejorado la motilidad del esperma.

**Grado de consecución:** 100%

**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 esperma. Se han consolidado colaboraciones con equipos franceses y suecos. Se está finalizando una tesis doctoral (Fátima Fernández García, UPV) en colaboración con la Universidad de Aveiro (Portugal). Se han publicado varios artículos y hay algunos más enviados o en preparación.

**Tarea 2.1.3 (M1-M38) - Estudio del efecto de la temperatura y del pH en la movilidad del esperma 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 esperma por medio de sistemas CASA. Determinación de la resiliencia del esperma 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. Colaboración ICRA-IEO (Murcia) & CSIC1

**Resultado:** Se han realizado con esperma 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 esperma 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 esperma con distinta resiliencia a los cambios ambientales.

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

Un artículo que describe los efectos de la temperatura y pH en la calidad del esperma de dorada, lubina y lenguado, además del uso de challenge tests para seleccionar machos que producen esperma resiliente a altas temperaturas y bajos pH, ha sido enviado a revista para su publicación.

**Grado de consecución:** 100%

**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.

**Tarea 2.1.4 (M1-M48) - Efecto de la composición de piensos de reproductores sobre la calidad de la progenie en lubina** - Valoración de diferentes dietas sobre la competencia reproductiva de lubina. Efecto sobre la calidad del huevo y del esperma, las puestas y sus progenies. Aparición de la primera maduración sexual y calidad del filete.

**Participantes:** CSIC2. Colaboración CSIC8

**Resultado:** Se evaluó la supervivencia larvaria sin alimento externo en progenies de dos ensayos dietéticos: DT1 (relación alta, moderada o baja de DHA/EPA/ARA) y DT2 (niveles alto, medio o bajo de taurina). Los progenitores alimentados con niveles altos de ácidos grasos esenciales o de taurina produjeron más puestas y generaron larvas con mayor supervivencia, indicando una mayor robustez de las progenies. En DT1, el porcentaje de machos precoces no difirió entre dietas alta y moderada.

En coordinación con la Tarea 3.1.3 se analizó el perfil de ácidos grasos del músculo como indicador de calidad del filete en animales precoces y no precoces. No se detectaron diferencias asociadas al estado reproductivo en ninguno de los sexos, pero sí un efecto acumulativo de la dieta reflejado en variaciones entre peces de distintas edades. El estudio quimiométrico de filetes procedentes de individuos con diferentes grados de madurez corroboró la ausencia de un impacto claro de la madurez sexual sobre los perfiles lipídicos, mientras que la edad del pez sí condicionó la composición en ácidos grasos, indicando un efecto acumulativo de la composición de la dieta a nivel muscular.

**Grado de consecución:** 100%

**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-M48) - 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. Colaboración CSIC1

**Resultado:** Desarrollo de ELISAs para Fsh y Lh de dorada y anguila: Se diseñaron plásmidos para expresar Lh $\beta$  y Fsh $\beta$  en *P. pastoris*, seleccionándose los mejores clones. Las subunidades Lh $\beta$  recombinantes se produjeron y purificaron y se emplearon como antígenos para generar anticuerpos; los ELISAs están en fase de optimización. Para Fsh $\beta$ , los anticuerpos están en producción y se ajustarán los ensayos cuando se reciban.

Desarrollo de ELISAs para Amh de lubina y tortuga boba: Tras descartar un anticuerpo previo contra Amh de lubina, se produjo Amh recombinante en *P. pastoris*. Se clonó el gen de Amh de tortuga boba, se definió el tamaño de la proteína madura por western blot, se generaron los plásmidos, se seleccionaron clones óptimos. Se produjeron y purificaron ambas Amhs, se han producido sus anticuerpos y se están optimizando los ELISAs.

En el desarrollo de gonadotropinas recombinantes para inducir maduración en anguila, se diseñaron plásmidos de cadena única (Lhsc, Fshsc) y se obtuvieron clones estables en CHO. Se produjeron grandes cantidades de plásmidos y se realizaron tres ensayos de transferencia génica en machos y uno en hembras de anguila, demostrando eficacia mediante análisis endocrinos, histología y evaluación de gametos. Actualmente se prepara el manuscrito correspondiente.

**Grado de consecución:** 86%

**Impacto:** La terapia génica ha mostrado resultados muy positivos en la inducción de la maduración sexual de anguilas machos y hembras. Los ELISAs de gonadotropinas permitirán evaluar el efecto de tratamientos de inducción en la maduración de anguila y el estado de maduración en dorada, y los ELISAs de Amh permitirán la determinación del sexo en las especies estudiadas. Se está realizando una tesis doctoral (César Cruz Castellón, CSIC2-UPV4).