



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Facultad de Ciencias**

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**BC - 06**

**EVALUACIÓN DEL BIENESTAR  
ANIMAL EN ORTIGUILLA DE MAR  
(*Anemonia sulcata*) BAJO  
CONDICIONES DE CULTIVO**

Presentado por:

**D. Alberto Coll Fernández**

Junio 2022

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Biología de <i>Anemonia sulcata</i> .....	1
1.2. Explotación y cultivo.....	3
1.3. Bienestar animal e inmunidad .....	4
1.4. Estrés oxidativo .....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1. Diseño experimental y procesado de las muestras .....	7
3.2. Determinaciones enzimáticas .....	9
3.3. Determinación de proteína soluble.....	11
3.4. Capacidad antioxidante total (TEAC) .....	12
3.5. Peroxidación lipídica.....	12
3.6. Análisis estadístico .....	12
4. RESULTADOS .....	13
4.1. Efecto del cultivo en cautividad .....	13
4.2. Efecto de la reproducción inducida y maduración natural .....	17
5. DISCUSIÓN.....	21
6. CONCLUSIONES .....	26
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

**Resumen:** En los últimos años, las poblaciones de ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*, Cnidaria) en Andalucía se han deteriorado como consecuencia de su explotación desmedida. La acuicultura puede suponer una alternativa idónea para suplir esta demanda y para obtener ejemplares con fines de repoblación, siempre que asegure el bienestar de los animales durante su cultivo. Con esta finalidad, se seleccionaron ejemplares de *A. sulcata* de tres entornos naturales diferentes y se cultivaron en un sistema de acuicultura multitrófica integrada (IMTA) con el fin de evaluar su grado de bienestar mediante el estudio de parámetros relacionados con el estado oxidativo. De igual manera, se valoró el impacto de diferentes estrategias de reproducción (inmaduros, reproducción asexual inducida y maduración natural) en los animales cultivados. Se analizaron enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR, GST, DTD), capacidad antioxidante total (TEAC), y la oxidación de lípidos medida como concentración de malondialdehído (MDA). Los resultados obtenidos indican que el cultivo de la ortiguilla en entorno IMTA no provocó alteraciones drásticas sobre el estado oxidativo de los animales, aunque se observaron diferencias relativas al entorno de origen de los ejemplares. Por otro lado, la inducción de la reproducción asexual en individuos cultivados originó un incremento de la actividad antioxidante enzimática, posiblemente debido a un estrés agudo por manipulación, si bien, dicha respuesta fue efectiva previniendo el daño oxidativo en lípidos. La posterior maduración natural en entorno de cultivo no se asoció con un deterioro del estado oxidativo, aunque se detectó una gran influencia del punto de muestreo de los animales. Los resultados sugieren que el cultivo en sistema IMTA no altera de manera significativa el bienestar de la ortiguilla de mar, y que su tanto su multiplicación mediante reproducción asexual inducida como la maduración sexual natural son plausibles para generar un tamaño poblacional suficiente sin que su estado de bienestar se vea comprometido.

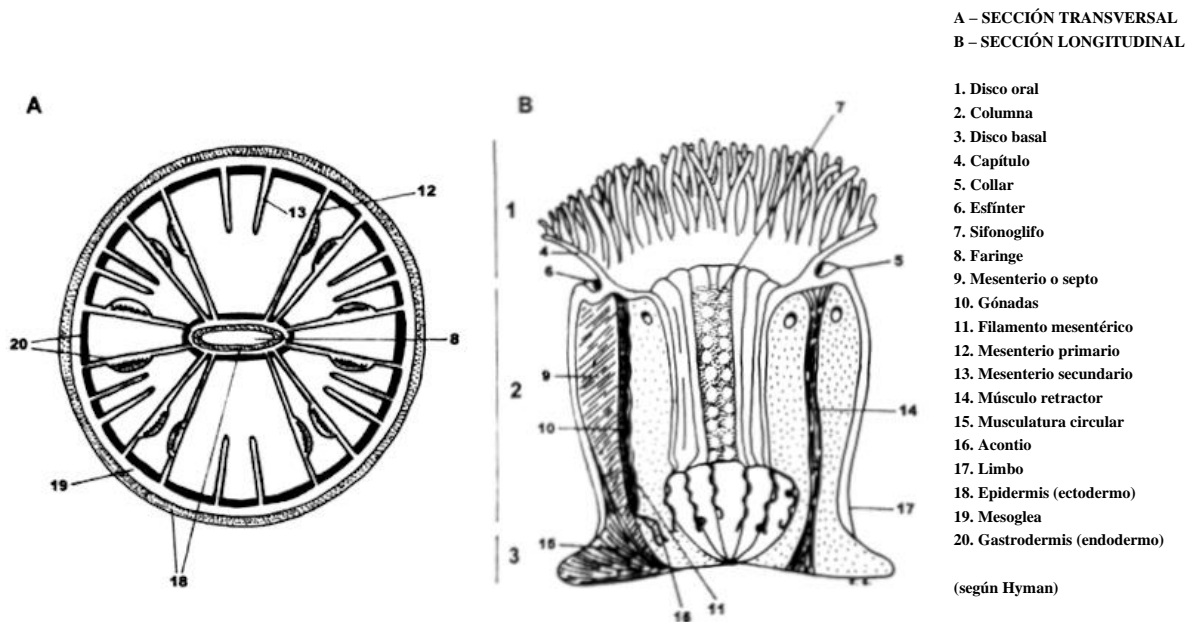
**Palabras clave:** *Anemonia sulcata*, bienestar animal, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, IMTA, peroxidación lipídica,

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biología de *Anemonia sulcata*

*Anemonia sulcata* (Pennant, 1777) es un cnidario antozoo del orden Actiniaria, comúnmente conocido como ortiguilla de mar. Esta anémona está ampliamente distribuida por el Mediterráneo, la costa Atlántica de Europa y norte de África (Rodríguez et al., 2022). Habita en zonas intermareales y sublitorales someras (< 20 m), siendo más abundante a menos de 10 m de profundidad, y se fija en sustratos rocosos donde puede llegar a crear mantos de anémonas que tapizan el fondo (Calvín-Calvo y Eisman-Valdés, 2020). Estos mantos proveen de estructura al ecosistema bentónico, y dan cobijo a distintas especies tanto de peces como de crustáceos (Calado et al., 2007; Suggett et al., 2012).

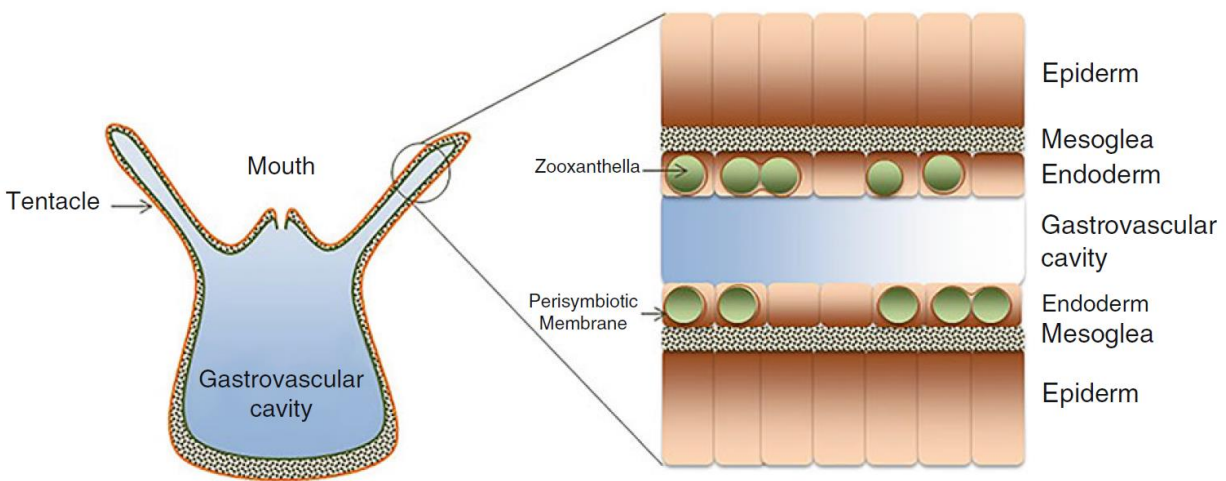
La estructura morfológica de *A. sulcata* sigue el patrón básico del orden Actiniaria, con una simetría birradial y tres capas en su pared corporal: dos capas de tejido epitelial (epidermis y gastrodermis) entre las que se encuentra una matriz extracelular intermedia (mesoglea). Su cuerpo se compone de una columna, un disco oral en la parte superior, y un disco pedio con el que se fijan al sustrato. La boca tiene forma de hendidura, y comunica con una faringe aplanada que se abre a la cavidad gastrovascular (Figura 1) (Calvín-Calvo y Eisman-Valdés, 2020).



**Figura 1.** Estructura básica de un actiniario, en sección transversal (A) y longitudinal (B). Modificado de Calvín Calvo y Eisman Valdés (2020).

En los extremos de la boca aparecen unos ensanchamientos llamados sifonoglifos, que facilitan la circulación del agua. La cavidad gastrovascular está dividida por una serie de septos radiales llamados mesenterios, que pueden ser completos o parciales, según alcancen la pared de la faringe. El borde de estos mesenterios es trilobulado y es donde se desarrollan las gónadas (Calvín-Calvo y Eisman-Valdés, 2020).

La coloración de los individuos varía desde un amarillo-pardo hasta tonos más verdosos, con la punta de los tentáculos morada, aunque hay diferencias entre distintos morfotipos (Calvín-Calvo y Eisman-Valdés, 2020). Esta coloración se debe principalmente a la presencia de microalgas o zooxantelas alojadas en su gastrodermis (Figura 2), pero también a los propios pigmentos que sintetiza la anémona como protección ante la intensa radiación UV del ambiente intermareal (Furla et al., 2005; Casado-Amezúa et al., 2016).



**Figura 2.** Estructura de la pared corporal en un actiniario simbiótico, con especial atención a la localización de las zooxantelas en las células de la gastrodermis. Extraído de Casado-Amezúa et al. (2016).

Respecto a su alimentación, las anémonas son animales típicamente carnívoros, que depredan peces y diversos invertebrados marinos, sirviéndose de sus numerosos tentáculos y cnidocitos para inmovilizar y manipular las presas (Calvín-Calvo y Eisman-Valdés, 2020). Por otro lado, *A. sulcata* complementa su nutrición heterótrofa gracias a la presencia de las microalgas endosimbióticas del género *Symbiodinium* (zooxantelas) en sus tejidos. De esta manera, las zooxantelas transfieren parte de su producción primaria al animal, obteniendo a cambio refugio y acceso a nutrientes (N, P y S) derivados del catabolismo de la anémona, que son muy limitantes en la columna de agua (Furla et al., 2005; Suggett et al., 2012; Casado-Amezúa et al., 2016).

En lo referente a su ciclo de vida, y como todos los antozoos, la ortiguilla carece de fase medusoide, de modo que los pólipos llevan a cabo todas las modalidades de reproducción. Esta especie es dioica, presentando cierto dimorfismo sexual en la pigmentación, y es capaz de reproducirse tanto sexual como asexualmente. La reproducción asexual (sea natural o inducida) se produce fundamentalmente mediante fisión longitudinal, aunque existen evidencias de gemación (Bocharova, 2016; Utrilla et al., 2019). La reproducción sexual se da por fertilización externa, aunque las larvas pueden desarrollarse en la cavidad gastrovascular de forma incidental. De la fecundación se origina una larva plánula de vida libre, que supone la única forma de dispersión antes de fijarse al sustrato (Bocharova, 2016; Coelho y Lasker, 2016).

## **1.2. Explotación y cultivo**

El interés gastronómico de la ortiguilla de mar se ha ido extendiendo durante las últimas décadas desde la provincia Cádiz hacia el resto de Andalucía, convirtiéndose en un producto muy apreciado a escala regional. En la actualidad, las poblaciones andaluzas están muy resentidas debido a la presión de la explotación, y, en las costas más occidentales, llegan a estar prácticamente agotadas debido a la fuerte recolección furtiva. Esto ha propiciado que la recolección de anémonas se traslade hacia las provincias más orientales, como Málaga, Granada y Almería (Daza Cordero et al., 2002).

La gestión de su explotación está regulada según la Orden de 24 de abril de 2003 (BOJA) por la que se establece un peso mínimo de 15 g, una veda estacional en enero y febrero, y una cuota de 12 kg por recolector y día. Estas medidas han sido discutidas recientemente (resultados preliminares proyecto ORTIMAR), alegando que no se adaptan adecuadamente a la biología y ciclo de vida de la especie, no garantizando la sostenibilidad de la explotación. Utrilla et al. (2019), tras analizar la reproducción y ciclo vital de *A. sulcata*, recomendaron utilizar el diámetro del disco pedio en lugar del peso para establecer la talla mínima, principalmente debido a la mayor facilidad de medición para los recolectores. En particular, su recomendación de talla mínima fue 21.5 mm de diámetro, la talla de madurez sexual (a la cual el 50 % de la población ha madurado sexualmente). Además, observaron que, aunque aparecen individuos sexualmente maduros durante todo el año, las poblaciones estudiadas presentaron un pico de desove en abril, lo que no se corresponde con la veda establecida actualmente.

Aunque la mayor parte de la atención que ha recibido esta especie en la literatura científica corresponde a su potencial como fuente de compuestos bioactivos (Ciccone et al., 2019; Cabeza et al., 2021; Piccialli et al., 2021), en los últimos años se ha comenzado a investigar y desarrollar su cultivo con otros propósitos, en especial en relación a los sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA) (Guerrero y Cremades, 2012; Sadeghi-Nassaj et al., 2018). En un sistema IMTA, además de la especie de interés, se cultivan especies complementarias o extractivas, pertenecientes a distintos niveles tróficos. De esta forma, los productos de excreción de la especie primaria funcionan como recursos para el resto de especies, y se disminuye la carga de materia orgánica y nutrientes en el agua efluente, favoreciendo la sostenibilidad de la explotación acuícola (Guerrero y Cremades, 2012; Buck et al., 2018).

No obstante, las ventajas de los sistemas multitróficos no se limitan a la sostenibilidad ecológica, sino que la mayor similitud del entorno de cultivo con el medio natural podría beneficiar al bienestar animal de los organismos cultivados. Este aspecto es cada vez más crucial en los sistemas de producción, teniendo una gran repercusión sobre la opinión de los consumidores (Alexander et al., 2016). Pese al potencial de este modelo de acuicultura, todavía está relativamente poco extendido en el sector. El paso de estudios piloto a la producción comercial a gran escala es crucial en este tipo de sistemas, ya que muchos de los procesos involucrados siguen una no-linealidad que dificulta su extrapolación a explotaciones con mayor biomasa (Troell et al., 2009).

### **1.3. Bienestar animal e inmunidad**

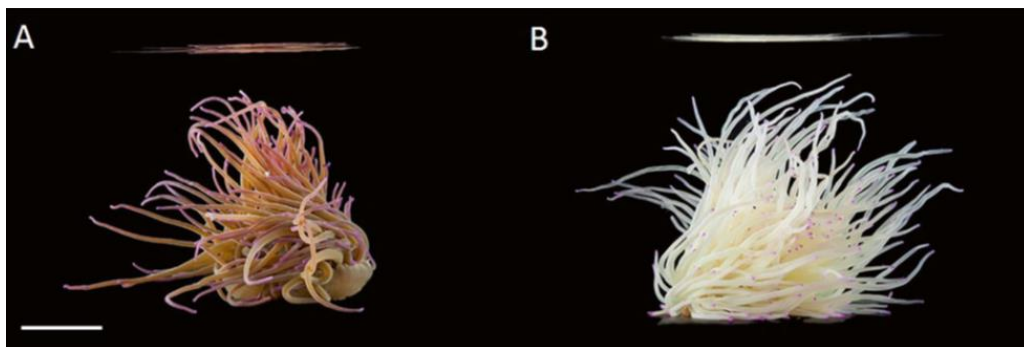
El estudio del bienestar animal es un campo relativamente reciente, que nació y se ha desarrollado casi exclusivamente en el ámbito de mamíferos y aves domésticas, muy ligado a la producción ganadera (Dawkins, 2015). Tradicionalmente, los invertebrados han sido excluidos de las evaluaciones de bienestar animal, y sólo recientemente se ha empezado a tener en cuenta, siendo los cefalópodos el grupo que más atención ha recibido (Weil et al., 2019).

Uno de los primeros conceptos de bienestar animal fueron las cinco libertades definidas por Webster (1994). Aunque posteriormente se han desarrollado y ampliado otras definiciones, la mayoría de ellas centran en tres aspectos: (1) la salud y estado físico del animal, (2) los estados afectivos conscientes que experimenta el animal, y (3) la capacidad del animal para expresar comportamientos naturales de la especie (Mellor, 2016; Weil et al., 2019). Debido a los problemas conceptuales y metodológicos que presentan los dos últimos puntos, la aplicación práctica del

bienestar animal se suele limitar (especialmente en invertebrados) al estudio de parámetros marcadores del estado de salud física, como alteraciones de mecanismos inmunológicos o la respuesta de estrés (Dawkins, 2015; Weil et al., 2019; Browning, 2020).

La respuesta de estrés es una respuesta adaptativa frente a estímulos que perturban la homeostasis del organismo. Implica generalmente una respuesta hormonal que desemboca en una serie de alteraciones metabólicas dirigidas a reestablecer esta homeostasis. Cuando el factor estresante es muy intenso y/o prolongado en el tiempo, la respuesta de estrés puede comprometer el funcionamiento básico del organismo, afectando al crecimiento, reproducción, y/o teniendo un efecto inmunosupresor (Stefano et al., 2002; Adamo, 2012).

Probablemente la respuesta de estrés más estudiada en antozoos es el blanqueamiento, que consiste en la expulsión masiva de zooxantelas frente a un estrés ambiental (Figura 3). Aunque principalmente ocurre en respuesta a estrés térmico, otros factores ambientales pueden actuar sinérgicamente y facilitar que se desencadene. Los mecanismos fisiológicos del blanqueamiento son complejos, pero diversos estudios han constatado el papel relevante que juega la producción de ROS por parte de los simbiontes en el proceso (Lesser, 2006; Merle et al., 2007; Weis, 2008).



**Figura 3.** Ejemplares de *Anemonia viridis* sin blanquear (A) y blanqueado (B). Barra de escala: 5 cm. Extraído de Casado-Amenzúa et al. (2016).

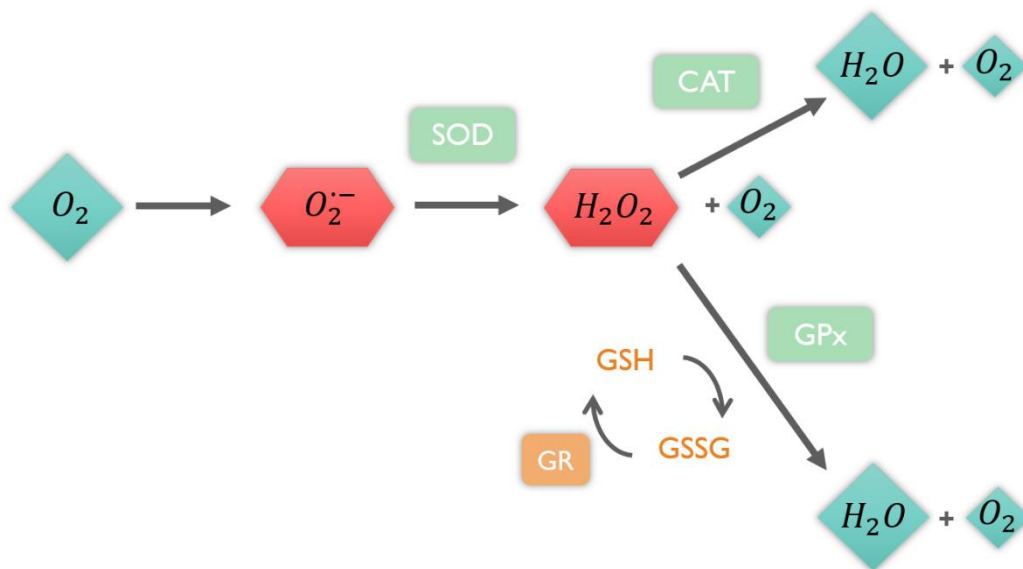
#### 1.4. Estrés oxidativo

El metabolismo aerobio de muchos seres vivos implica inevitablemente la generación de compuestos intermediarios muy inestables, agrupados bajo el término de especies de oxígeno reactivo (ROS). Todas las células generan ROS en cierta medida durante la fotosíntesis o la respiración y, aunque pueden actuar como mensajeros intracelulares o moléculas defensivas, su producción y acumulación descontrolada puede afectar la funcionalidad celular. Las principales especies de oxígeno reactivo son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el peróxido



de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), siendo este último el que más potencial tiene para producir daño oxidativo (Lesser, 2006).

Los seres vivos están adaptados para afrontar aumentos de ROS en sus células, y presentan una serie de mecanismos de defensa antioxidantes de distinta naturaleza, que se pueden clasificar según su carácter enzimático o no enzimático. Los principales antioxidantes enzimáticos (Figura 4) son la superóxido dismutasa (SOD), responsable de la reducción del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno; la catalasa (CAT), que cataliza la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno; y la glutatión peroxidasa (GPx), la cual lleva a cabo la reducción de peróxidos utilizando el tripéptido glutatión (GSH) como donador de electrones y oxidándolo a GSSG. Posteriormente, el glutatión es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) (Lesser, 2006; Ochoa y González, 2008). Además de estas enzimas, existen otras moléculas orgánicas (tanto de origen endógeno como exógeno) con capacidad de neutralizar ROS, como el ascorbato, el glutatión, el  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, etc (Suh et al., 2003; Lesser, 2006).



**Figura 4.** Esquema de las reacciones de las tres principales enzimas antioxidantes. SOD: superóxido dismutasa. CAT: catalasa. GPx: glutatión peroxidasa. GR: glutatión reductasa. GSH/GSSG: glutatión oxidado/reducido. Elaboración propia.

Pese a presentar este sistema de defensas antioxidantes, bajo determinadas circunstancias se puede propiciar un incremento en la producción de ROS que supere las capacidades de detoxificación del organismo, llegando entonces a una situación de estrés oxidativo en la que los componentes celulares (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) pueden verse dañados (Lesser, 2006;

Valavanidis et al., 2006). Entre los desencadenantes de esta situación se encuentran perturbaciones en el ambiente (intensidad lumínica, temperatura, presión de oxígeno), presencia de compuestos tóxicos en el medio de cultivo u otros factores estresantes como la manipulación del animal.

Debido a la correlación que existe entre estrés y el aumento de la producción de ROS, las alteraciones en la actividad de las principales enzimas antioxidantes podrían considerarse indicadores de pérdida del estado de bienestar. Similarmente, la evaluación de otros parámetros como el malondialdehído (MDA), derivado de la peroxidación lipídica; y la actividad de otras enzimas con un papel detoxificador, como la glutatión S-transferasa (GST) o DT-diaforasa (DTD), pueden suponer un aspecto clave en la determinación del estado oxidativo de los organismos y en definitiva de su estado de bienestar (Richier et al., 2005; Lesser, 2006; Ochoa y González, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo se basa en la evaluación del estado de bienestar de la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*) mediante el estudio de una serie de parámetros bioquímicos implicados en el mantenimiento del equilibrio oxidativo en el organismo. De este objetivo general derivan dos objetivos específicos:

1. Valorar si el efecto del cultivo en cautividad de *A. sulcata* en un sistema de acuicultura multitrófica integrada (IMTA) afecta al estado de bienestar de individuos procedentes de tres entornos naturales diferentes.
2. Analizar si la reproducción asexual inducida y/o la maduración sexual llevada a cabo de manera natural en entorno de cultivo pueden plantearse como estrategias de reproducción de *A. sulcata* sin que se vea comprometido su bienestar.

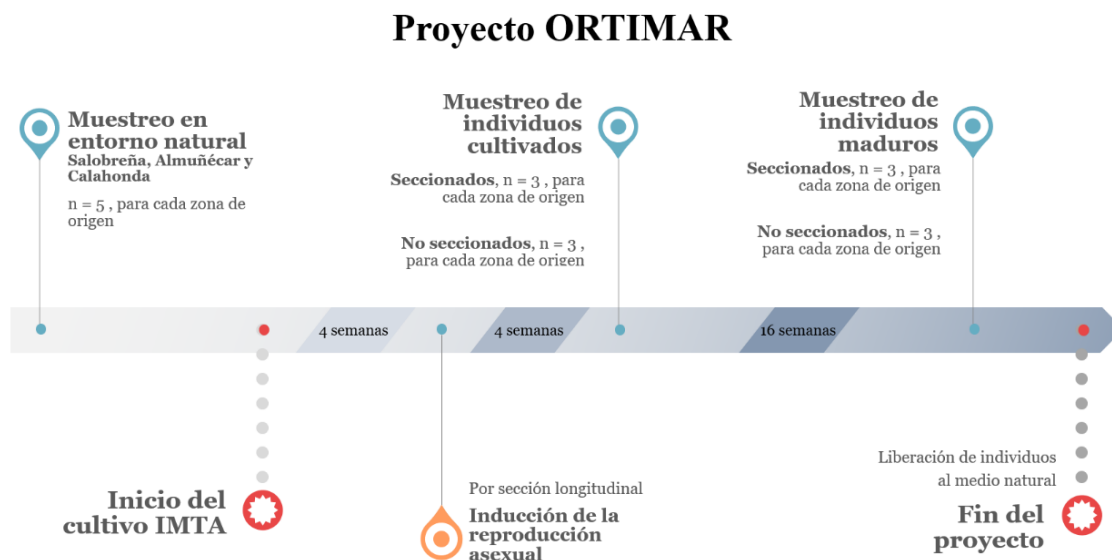
## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Diseño experimental y procesamiento de las muestras**

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto de investigación (ORTIMAR-Fundación Biodiversidad) centrado en el cultivo de *A. sulcata* mediante tecnología IMTA con fines de repoblación en diferentes puntos de la costa de Granada. Los ejemplares se obtuvieron del medio natural, con la autorización de la autoridad competente, de tres playas de la costa de Granada (Salobreña, Almuñécar y Calahonda) y se ubicaron en las instalaciones de la piscifactoría Andalmar Biotech (Carchuna, Granada) en un tanque cúbico de hormigón (8000 litros) ubicado en

una zona exterior bien iluminada. Los animales estuvieron en todo momento separados en cestillos según su punto de muestreo, y en el tanque se introdujeron también organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos con el fin de establecer el sistema de cultivo IMTA: detritívoros y carroñeros, productores primarios, filtradores y herbívoros.

Para la toma de muestras (Figura 5), se seleccionaron individuos salvajes de cada punto de muestreo, que, tras su captura, fueron sacrificados por congelación y reservados a  $-80^{\circ}$  para su análisis. Respecto a los animales cultivados, a un grupo de individuos de cada localización se les realizó un corte longitudinal a las 4 semanas para inducir su reproducción sexual. Tras otras 4 semanas, se tomaron muestras de estos individuos y de ejemplares no manipulados. 16 semanas después, se recolectaron muestras de individuos maduros previamente manipulados e individuos que habían madurado sexualmente de forma natural.



**Figura 5.** Línea de tiempo de los distintos muestreos y actuaciones del proyecto ORTIMAR.

Para el procesamiento de las muestras, estas se descongelaron y se separó el pie de los tentáculos. Cada muestra se pesó y homogenizó utilizando una solución tampón (Tris 100 mM, EDTA 0.1 mM, y Tritón 0.1%, pH 7.8), en proporción 1:4 (p/v). Seguidamente, los extractos se centrifugaron a 16 000 rpm durante media hora (Centrífuga Sigma 3K30), y se alicuotaron en tubos Eppendorf de 500  $\mu$ l que se congelaron para posteriores análisis.

### 3.2. Determinaciones enzimáticas

Se realizaron determinaciones de la actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), DT-diaforasa (DTD) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

#### ▪ Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

Para determinar la actividad SOD, se siguió el método de McCord y Fridovich (1969), basado en la medida indirecta de la actividad atendiendo al grado de inhibición de la reducción del citocromo c. Esta reducción se da gracias al  $O_2^{\cdot -}$  generado por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa (EC 1.17.3.2). La SOD elimina el superóxido impidiendo la reducción del citocromo c, y generando así una disminución de absorbancia respecto a la reacción control.

Se preparó en primer lugar una solución de citocromo c, xantina y EDTA en tampón fosfato potásico (50 mM, pH 7.8), que se aireó durante 45 minutos a 25 ° C, con el fin de oxidar por completo el citocromo c. Una vez oxidado, se midió la reacción control en ausencia de extracto. Por último, se midió la reacción problema y se registró la absorbancia a 550 nm cada 13 segundos durante 3 minutos.

Para esta medición, la actividad fue definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la reducción del citocromo c en un 50%, y fue expresada, igual que el resto de enzimas, por mg de proteína. El cálculo de la actividad se realizó conforme a la siguiente fórmula:

$$U/mg \text{ proteína} = \left( \frac{\Delta DO/\Delta t_{control} - \Delta DO/\Delta t_{problema}}{\Delta DO/\Delta t_{control}} \right) \cdot \frac{1}{0.5} \cdot \frac{f}{V_e \cdot P} \quad (\text{Fórmula 1})$$

Donde  $\Delta DO/\Delta t$  es el decremento en densidad óptica por minuto,  $f$  es el factor de dilución del extracto,  $V_e$  es el volumen del extracto en ml, y  $P$  es la concentración de proteína en mg/ml.

#### ▪ Catalasa (EC 1.11.1.6)

La actividad CAT se midió siguiendo el método de Aebi (1984), basado en la lectura de la disminución de la absorbancia conforme decrece la concentración de  $H_2O_2$  debido a la actividad de la enzima. Para ello, se preparó una solución extemporánea de  $H_2O_2$  10.5 mM en tampón fosfato potásico (50 mM, pH 7.0), y, tras añadir la muestra, se midió la absorbancia a 240 nm cada 12 segundos, durante 3 minutos.

- **Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)**

La determinación de la actividad GPx se realizó mediante el método de Flohé y Günzler (1984), que consiste en una medida indirecta acoplando la reacción de interés a la de la GR, que reduce con NADPH el glutatión oxidado (GSSG) producido por la GPx. De esta manera, se puede determinar la actividad GPx leyendo el decremento de absorbancia por oxidación de NADPH. Se preparó la solución de reacción en tampón fosfato potásico (50 mM, pH 7.1), diluyendo azida sódica 15.5 M, glutatión reducido (GSH) 25.8 M, EDTA 3.9 mM y NADPH 1.5 mM. Por último, se disparó la reacción con una solución extemporánea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM, y se midió la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 3 minutos.

- **Glutación reductasa (EC 1.8.1.7)**

Se siguió el método de Carlberg y Mannervik (1975) modificado, midiendo el descenso en absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado por la enzima para reducir el GSSG a GSH. Para ello, se prepararon dos soluciones extemporáneas en tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.5): una de NADPH 0.7 mM, y otra de GSSG 3.25 mM. La reacción se disparó con el sustrato, y se registró la absorbancia a 340 nm cada 15 segundos durante 3 minutos.

- **Glutación S-transferasa (EC 2.5.1.18)**

La determinación de la GST se realizó siguiendo la técnica de Frasco y Guilhermino (2002), basado en la lectura del incremento en absorbancia debida a la formación de un conjugado de glutatión y 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB). Para ello, se preparó una solución extemporánea de GSH 10 mM y CDNB 60 mM en tampón fosfato potásico (0.1 M, pH 6.5). La reacción se disparó con la muestra, y se registró la absorbancia a 340 nm cada 20 segundos, durante 5 minutos.

- **DT-diaforasa (EC 1.6.99.2)**

Se siguió el método de Lemaire et al. (1996) modificado, mediante la lectura del decremento en absorbancia provocado por la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Para ello se preparó una solución extemporánea en tampón Tris HCl (50mM, pH 7.3), usando NADH 5 mM y DCPIP 0.42 mM. Para esta determinación, se mezcló el extracto con 10 µl de albúmina 0.147% con el fin favorecer la actividad de la enzima. Se realizaron medidas a 600 nm, cada 20 segundos, durante 5 minutos.

▪ **Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)**

La determinación de la actividad G6PDH se realizó siguiendo el método de Löhr y Waller (1965) modificado, midiendo el incremento de absorbancia provocado por la reducción de NADP. Para ello, se preparó en tampón imidazol (71.4 mM, pH 7.4) una solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM y NADP 20 mM. La reacción se disparó con 20 µl de glucosa-6-fosfato 10 mM, y se midió a 340 nm, cada 15 segundos durante 10 minutos.

Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro de microplacas PowerWave (Bio-Tek Instrument, Inc, USA), con temperatura controlada a 25 ° C. La actividad enzimática fue expresada como actividad específica (por mg de proteína), definiendo una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para transformar un µmol de sustrato por minuto en las condiciones de medida. La fórmula utilizada para calcular esta actividad fue la siguiente:

$$U/mg \text{ proteína} = \frac{(\Delta DO/\Delta t) \cdot V_t \cdot f}{\epsilon_\lambda \cdot 10^{-3} \cdot V_e \cdot d \cdot P} \quad (\text{Fórmula 2})$$

Donde  $\Delta DO/\Delta t$  es la variación en densidad óptica por minuto,  $V_t$  es el volumen total de reacción (ml),  $V_e$  es el volumen de muestra (ml),  $f$  es el factor de dilución del extracto,  $d$  es el paso óptico por el pocillo (0.6 cm),  $P$  es el valor de proteína soluble y  $\epsilon_\lambda$  es el coeficiente de extinción molar del compuesto medido, a longitud de onda  $\lambda$ , expresado en  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Esta fórmula se aplicó a todas las determinaciones salvo a la de la SOD, para la que se aplicó la fórmula descrita en su apartado.

### **3.3. Determinación de proteína soluble**

Para la expresión de la actividad enzimática específica (por mg de proteína), se analizó la proteína soluble de los extractos problema según el método de Bradford (1976). La técnica se basa en la utilización del azul de Coomassie o reactivo de Bradford, un compuesto que forma un complejo coloreado con la proteína y tiene un pico de absorbancia a 595 nm. De esta manera, se añadió el reactivo a la muestra y se dejó reposar 15 minutos en oscuridad. Tras ese tiempo, se registró la absorbancia de las muestras y se utilizó una curva patrón con albúmina para interpolar la concentración de proteína.

### **3.4. Capacidad antioxidante total (TEAC)**

La determinación del TEAC se basó en la técnica de Erel (2004). Se basa en la utilización de una solución de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) oxidado en medio ácido, que presenta una coloración verde esmeralda intensa. Esta coloración se pierde al reducirse el compuesto por exposición a un antioxidante, de manera que la pérdida de color es proporcional a la capacidad antioxidante del extracto. Para la determinación se prepararon dos soluciones extemporáneas: R1, consistente en tampón acetato (0.4 M, pH 5.8); y R2, con peróxido de hidrógeno 2 mM y ABTS 10 mM diluidos en tampón acetato (30 mM, pH 3.6). La solución R2 se dejó reposar un mínimo de 24 horas para permitir la oxidación completa del ABTS.

Finalmente, se midió la muestra con R1, se agregó R2 y se esperó 10 minutos en oscuridad antes de volver a medir. La medición inicial se utilizó como blanco, ya que los extractos presentaban coloración. Para cuantificar la capacidad antioxidante, se midió simultáneamente un patrón con Trolox (análogo de la vitamina E), y se construyó una recta patrón para interpolar los resultados.

### **3.5. Peroxidación lipídica**

Para determinar la peroxidación lipídica se usó la técnica de Buege y Aust, (1978) modificada, basada en la medida de los niveles de MDA según el análisis de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico). Para la técnica, se preparó un reactivo en una solución de ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico y BHT, mezclando por agitación y calentamiento durante aproximadamente dos horas. Las muestras se mezclaron con el reactivo en proporción 1:4 (v/v), y tras agitar vigorosamente, se calentaron a 100 ° C en termoblock durante 15 minutos. Tras enfriar se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 535 nm del sobrenadante, previamente retirado teniendo cuidado de no resuspender el precipitado. Para determinar la concentración, se realizó simultáneamente una curva patrón con una solución madre de MDA 1 mM, y se interpolaron los datos de absorbancia de las muestras.

### **3.6. Análisis estadístico**

Todo el tratamiento de datos se realizó con el software R 4.0.2 y RStudio 2022.02.2. Los resultados obtenidos se expresaron como media y error estándar de la media (SEM). Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para las distintas combinaciones de factores y variable respuesta, según los objetivos del trabajo, y posteriormente se complementó el análisis con

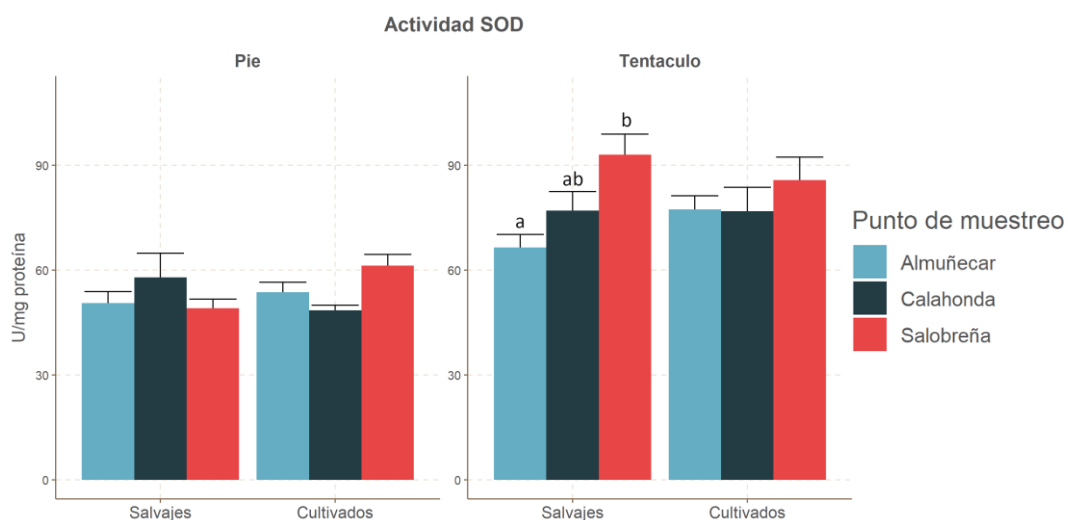
ANOVA de dos vías para examinar la interacción entre factores. A aquellas variables que no se distribuían normalmente se les aplicó una transformación logarítmica para conseguir la normalidad. Las asunciones de homocedasticidad y normalidad de residuos fueron comprobadas por medio del test de Levene y el test de Shapiro-Wilk, respectivamente. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, se realizó un análisis post hoc (test de Tukey) para examinar dichas diferencias. El nivel de confianza escogido para todos los análisis fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto del cultivo en cautividad

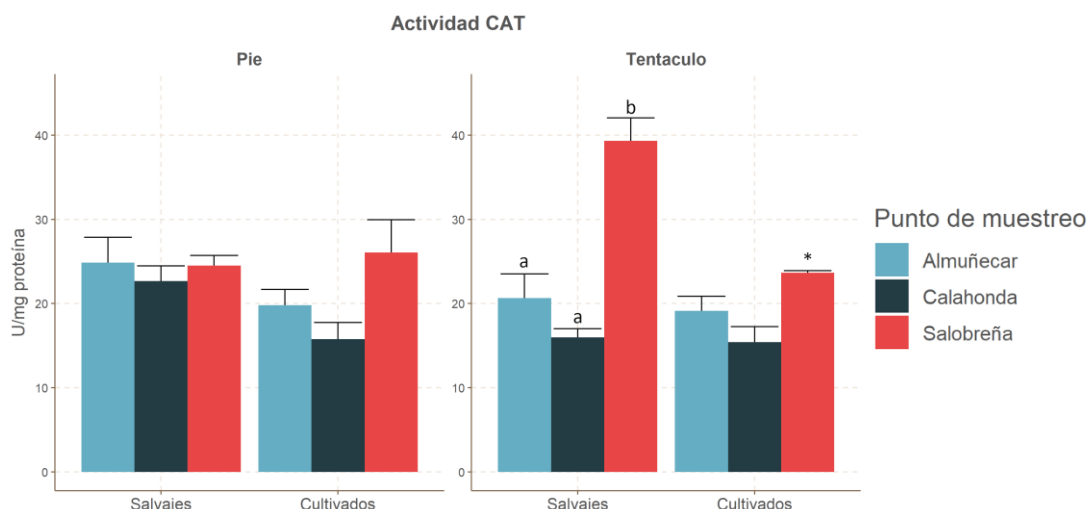
Para la actividad superóxido dismutasa (SOD), no se encontraron diferencias significativas entre ejemplares salvajes y cultivados en ninguno de los tejidos analizados (Figura 6). En tentáculo sí que se observaron diferencias asociadas al origen natural de los organismos salvajes, mostrando mayor actividad los individuos muestreados en Salobreña ( $p < 0.01$ ).

La actividad catalasa (CAT) (Figura 7), en general, presentó un perfil similar a la SOD, no mostrándose variaciones significativas entre salvajes y cultivados, a excepción de los individuos salvajes procedentes de Salobreña, que mostraron valores de actividad significativamente elevados ( $p < 0.05$ ) en el medio natural. Estas diferencias se atenuaron en los individuos cultivados, no existiendo diferencias asociadas al punto de muestreo.



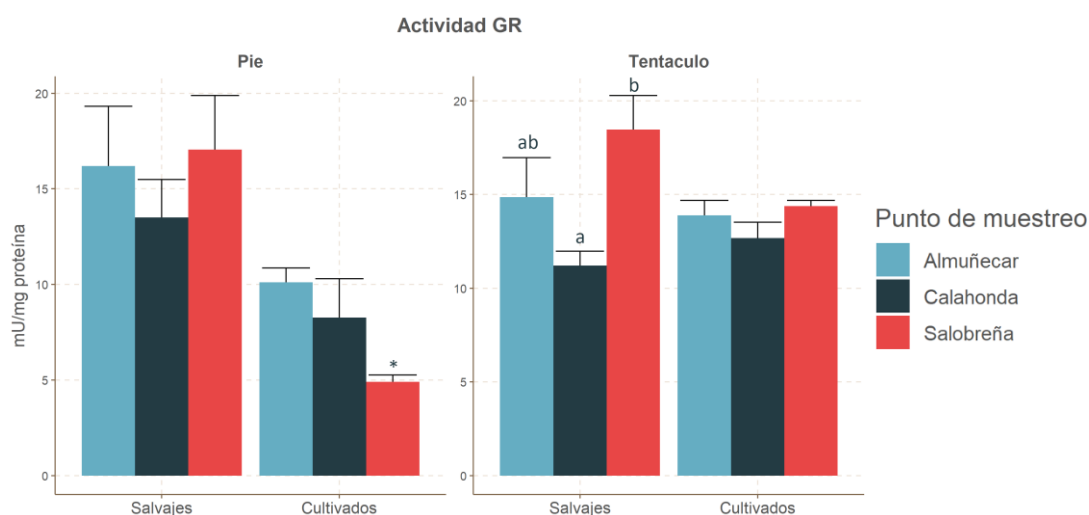
**Figura 6.** Valores de actividad SOD en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental ( $p \leq 0.05$ ).





**Figura 7.** Valores de actividad CAT en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas entre individuos salvajes y cultivados, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

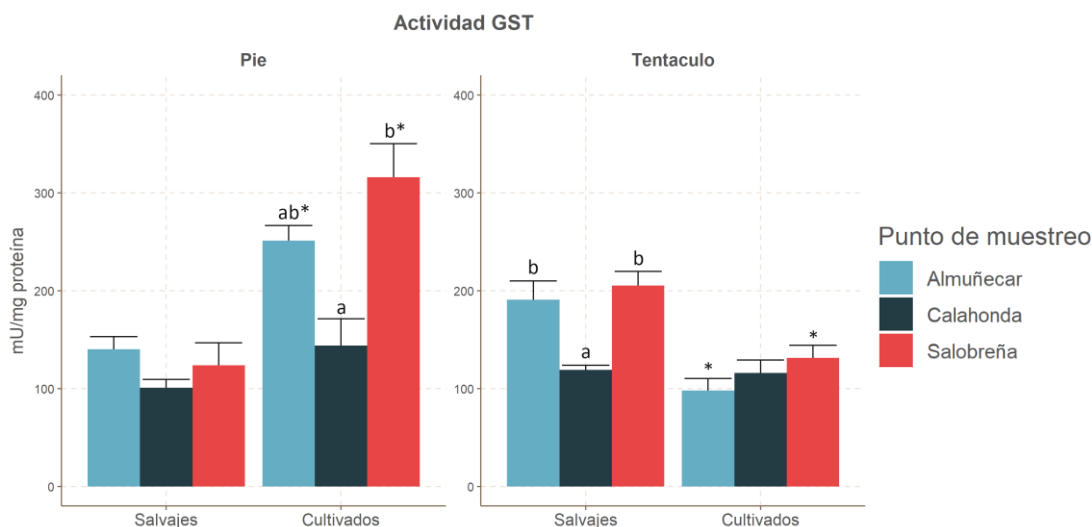
La actividad glutatión reductasa (GR) (Figura 8) sufrió en el pie un descenso generalizado en los individuos cultivados respecto a los salvajes, que se mostró significativo en aquellos procedentes de Salobreña. Por otro lado, el comportamiento en tentáculo fue similar al observado para CAT y SOD, observándose diferencias significativas en individuos salvajes y mostrando Salobreña los valores más altos de actividad.



**Figura 8.** Valores de actividad GR en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas entre individuos salvajes y cultivados, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

La actividad glutatión-S-transferasa (GST) (Figura 9) en el pie experimentó un incremento generalizado ( $p < 0.001$ ) en la mayoría de animales cultivados con respecto a los salvajes, mientras que en el tentáculo sufrió un ligero (pero significativo) descenso ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, en tentáculo, se observaron de nuevo diferencias entre individuos salvajes con diferente procedencia, mostrando los valores más altos Salobreña y Almuñécar.

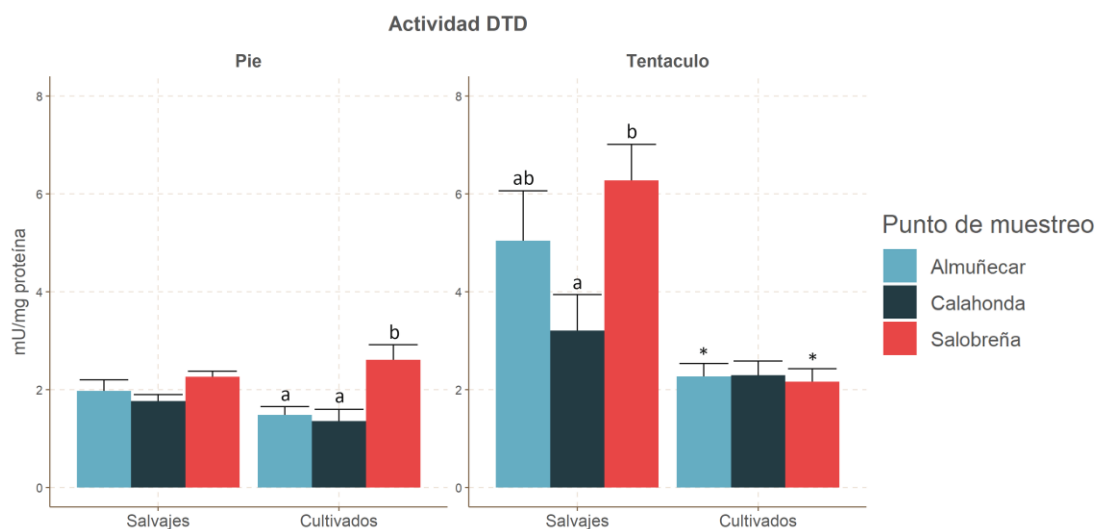
En cuanto a la actividad DT-diaforasa (DTD) (Figura 10), se observó un incremento general en tentáculo asociado al cultivo ( $p = 0.001$ ), salvo en los animales procedentes de Calahonda. De nuevo, en tentáculo e individuos salvajes, la actividad fue mayor para aquellos procedentes de Salobreña y Almuñécar.



**Figura 9.** Valores de actividad GST en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas entre individuos salvajes y cultivados, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

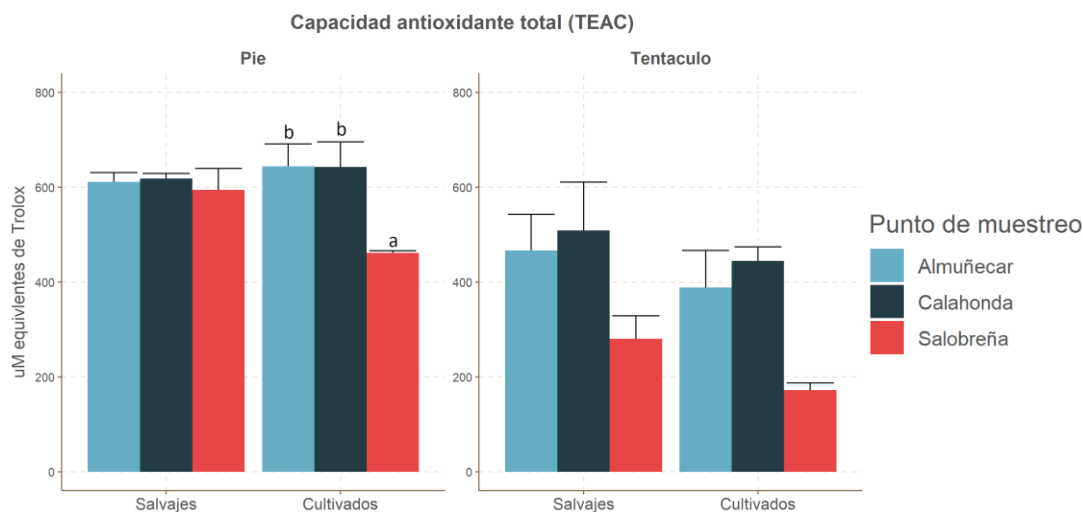
La capacidad antioxidante total (TEAC) (Figura 11), en general, siguió una tendencia a valores menores en el tentáculo con relación al pie. No se pusieron de manifiesto diferencias asociadas al cultivo en cautividad ni en general al origen de los individuos. Únicamente en el pie de individuos cultivados se observaron valores significativamente más bajos de actividad en Salobreña ( $p < 0.05$ ).

En cuanto al grado de peroxidación lipídica (MDA) (Figura 12), se observaron en general valores más altos en el pie con respecto al tentáculo. En este último tejido, se puso de manifiesto un incremento significativo de actividad ( $p < 0.001$ ) en los individuos cultivados de Calahonda y Salobreña, con respecto a los salvajes.

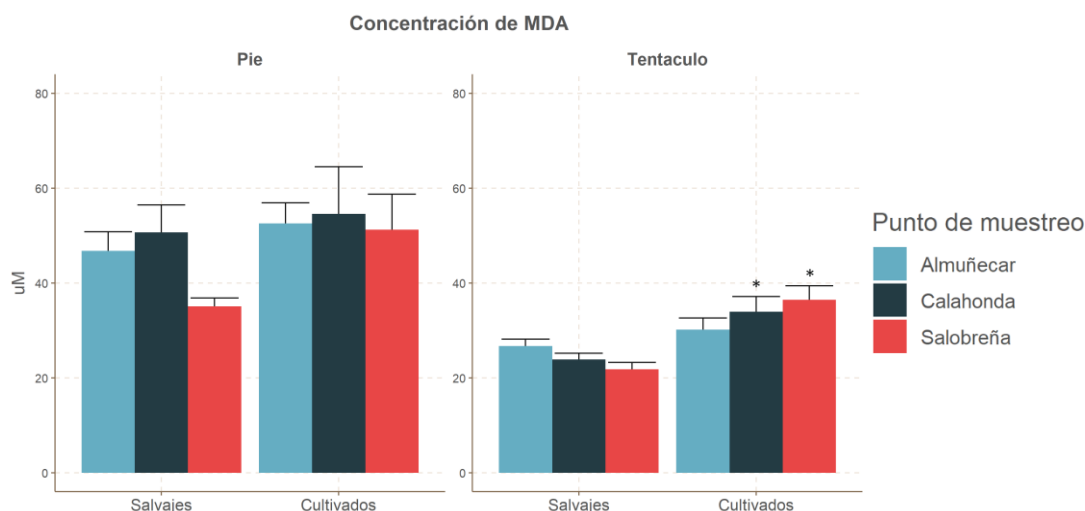


**Figura 10.** Valores de actividad DTD en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas entre individuos salvajes y cultivados, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, contemplando tanto el punto de muestreo y el cultivo en cautividad, puso de manifiesto una interacción de ambos factores en muchos de los parámetros analizados (Tabla 1). Los valores obtenidos para las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) presentaron una alta dispersión y no fueron concluyentes, llegándose a no detectar actividad en algunos individuos. Por este motivo, se excluyeron del análisis estadístico.



**Figura 11.** Capacidad antioxidante total (TEAC) en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 12.** Concentración de MDA en *A. sulcata*. \*: diferencias significativas entre individuos salvajes y cultivados, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 1.** Conjunto de p-valores obtenidos en el ANOVA de dos vías para cada parámetro, en pie y para tentáculo, al comparar individuos salvajes con cultivados. \*: significación estadística ( $p \leq 0.05$ ).

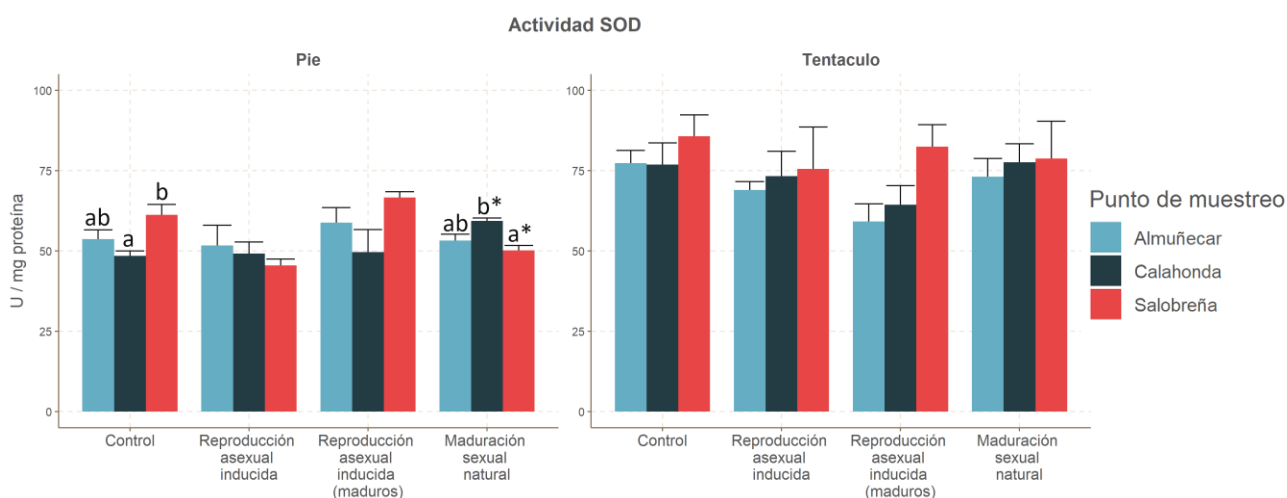
Pie	SOD	CAT	GST	GR	DTD	TEAC	MDA
Efecto cultivo	0.495	0.102	< 0.001 *	0.132	0.272	0.393	0.062
Efecto playa	0.888	0.136	0.007 *	0.555	0.002 *	0.040 *	0.158
Efecto cultivo*playa	0.095	0.226	0.013 *	0.947	0.102	0.049 *	0.511
Tentáculo	SOD	CAT	GST	GR	DTD	TEAC	MDA
Efecto cultivo	0.783	0.014 *	< 0.001 *	0.573	< 0.001 *	0.316	< 0.001 *
Efecto playa	0.008 *	< 0.001 *	0.002 *	0.006 *	0.059	0.028 *	0.820
Efecto cultivo*playa	0.319	0.024 *	0.012 *	0.223	0.170	0.972	0.043 *

## 4.2. Efecto de la reproducción inducida y maduración natural

Para estos análisis se utilizaron las ortiguillas cultivadas sin manipular como control, y se compararon por pares con otros tres grupos experimentales: (1) individuos manipulados por fisión para estimular la reproducción asexual, (2) individuos manipulados por fisión que posteriormente maduraron sexualmente, e (3) individuos que maduraron sexualmente de forma natural. De nuevo, se excluyeron del análisis la actividad GPx y G6PDH por los motivos anteriormente expuestos.

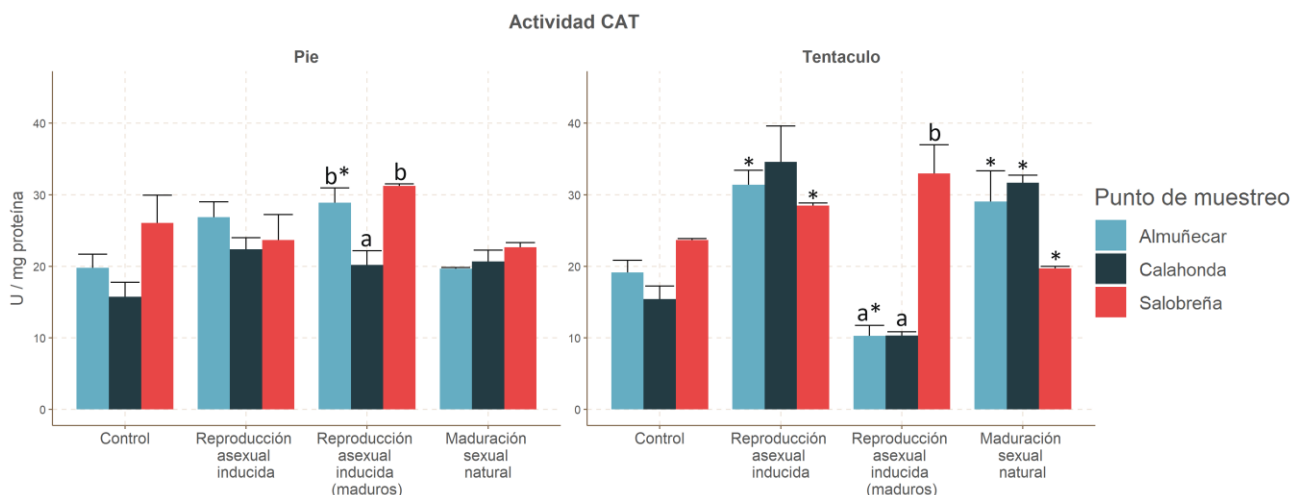
La actividad SOD (Figura 13) en general mostró valores más elevados en tentáculo que en pie. Independientemente del tejido, no presentó diferencias significativas debidas a la reproducción asexual inducida. La maduración posterior de estos individuos (procedentes de reproducción asexual inducida) siguió sin mostrar variaciones significativas respecto al control. Tampoco se observaron diferencias debidas a la maduración sexual natural con respecto al control en tentáculo, si bien en el pie algunos individuos mostraron variaciones dependientes del punto de origen.

La actividad CAT (Figura 14) mostró en tentáculo diferencias significativas asociadas tanto a la reproducción inducida como a la maduración natural. Así, mostraron valores mayores de actividad los individuos con reproducción sexual inducida respecto al control ( $p < 0.001$ ). La maduración sexual natural provocó, en el mismo tejido, un incremento de actividad respecto al control para los individuos de Almuñécar y Calahonda ( $p < 0.01$ ). En el pie, se observó cierto incremento de actividad en los individuos maduros de reproducción asexual inducida, que sólo resultó significativo en el caso de Almuñécar.



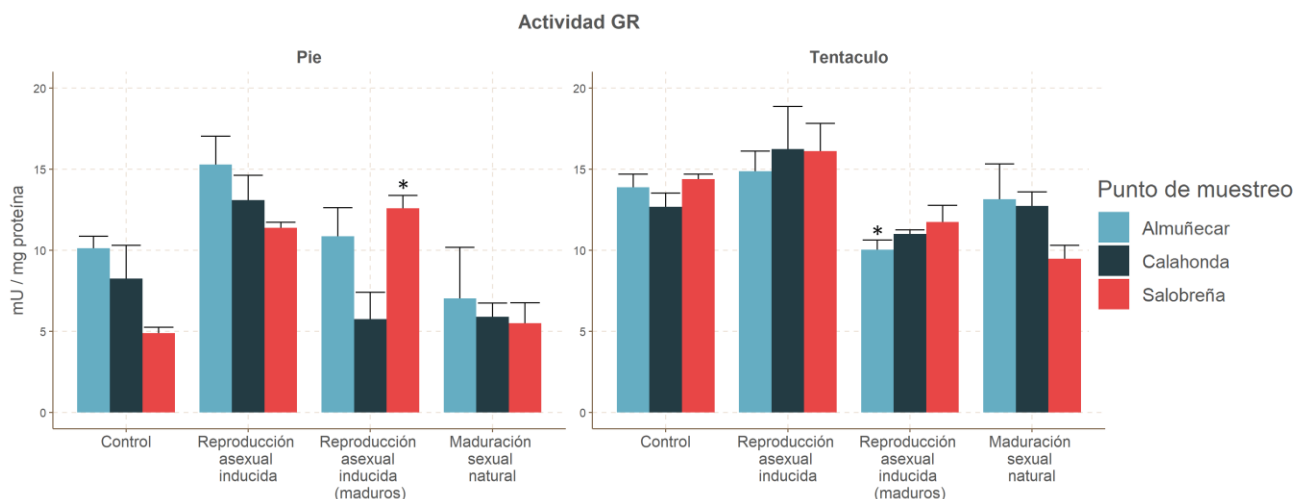
**Figura 13.** Actividad SOD en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

La GR (Figura 15) mostró generalmente mayor actividad en tentáculo que en pie, pero no se encontraron diferencias destacables en relación al efecto de la maduración inducida o natural respecto al control. Respecto a la actividad GST (Figura 16), en general, el pie mostró valores superiores al tentáculo, mostrándose en el primer tejido las principales diferencias significativas respecto al control. Así, la manipulación y posterior maduración de estos individuos provocó un incremento y descenso significativo de actividad en Almuñécar y Salobreña (respectivamente) acorde con la marcada interacción entre los factores manipulación y punto de muestreo (Tabla 2). Aparte de este efecto, no se observaron diferencias debidas a la maduración natural de los individuos respecto al control.



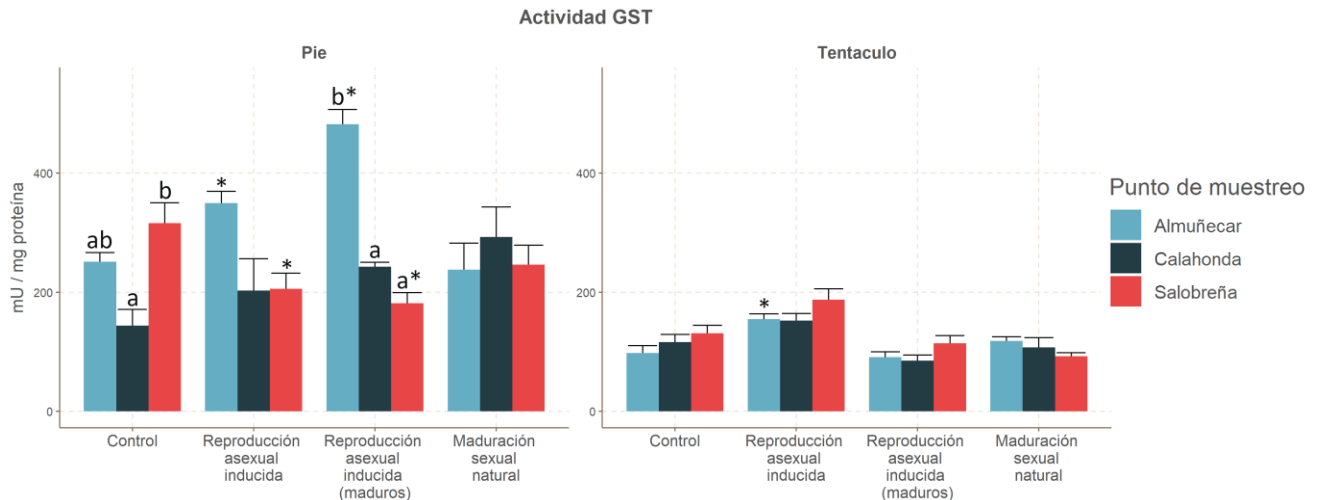
**Figura 14.** Actividad CAT en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

El análisis de la actividad DTD (Figura 17) mostró en tentáculo un efecto significativo de la inducción de la reproducción asexual, apareciendo en la mayoría de grupos valores más elevados respecto al control ( $p < 0.001$ ). En relación al efecto de la reproducción, se observó en el mismo tejido un marcado incremento respecto al control para los individuos de Almuñecar ( $p < 0.001$ ). El análisis de la TEAC (Figura 18) detectó en general valores más altos de actividad en pie con respecto al tentáculo. En general, ambos tejidos no mostraron diferencias asociadas a la manipulación ni maduración. En pie se observaron diferencias asociadas al punto de muestreo en individuos maduros de forma natural. En tentáculo, sólo se observó un incremento de actividad en los individuos maduros de reproducción asexual que procedían de Salobreña.

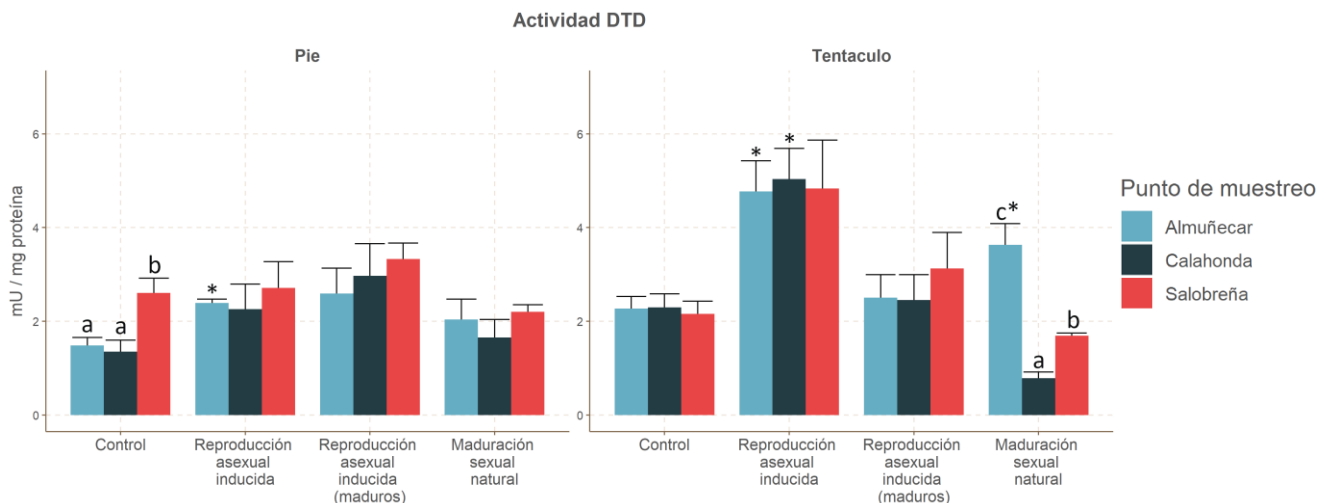


**Figura 15.** Actividad GR en *A. sulcata*. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

La concentración de MDA (Figura 19), en general, fue de nuevo algo superior en pie que en tentáculo. Con respecto al efecto de la inducción y maduración, los valores fueron aproximadamente similares en todos los tratamientos, sin mostrar efectos significativos, salvo un ligero decremento de actividad en pie para los individuos de Almuñécar con respecto al control. De nuevo, el ANOVA de dos vías puso de manifiesto distintas interacciones en las variables analizadas (Tabla 2).



**Figura 16.** Actividad GST en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

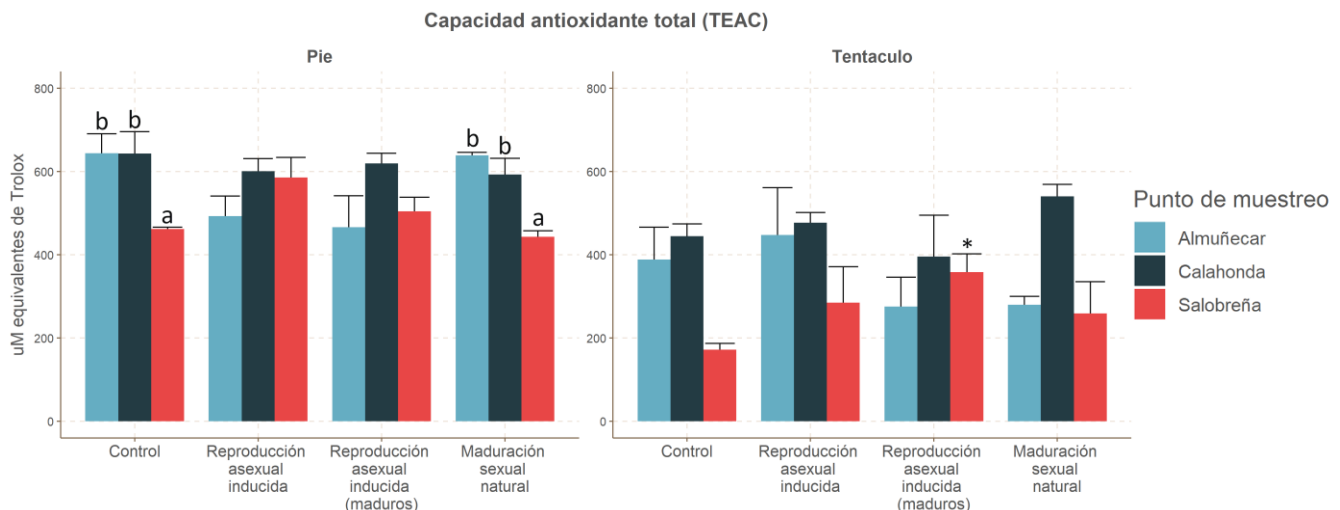


**Figura 17.** Actividad DTD en *A. sulcata*. a, b, c: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

La ortiguilla de mar (*A. sulcata*) es una especie que en los últimos años ha sufrido una pérdida de sus poblaciones en el entorno natural al incrementarse sus capturas dado el creciente interés que se ha ido generando por esta especie, no solo con fines comerciales para su consumo sino como fuente de sustancias bioactivas. En este sentido, la incorporación de la ortiguilla de mar en el campo de la acuicultura se presenta como una buena alternativa dirigida a cubrir parte de esta demanda, y con fines de repoblación de zonas afectadas. Así, los sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA) se valoran como una opción para el cultivo de esta especie fuera de su entorno natural.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, *A. sulcata* parece ser una especie resistente y que se adapta bien a las condiciones de cultivo. La tasa de supervivencia de las ortiguillas cultivadas en este estudio fue mayor del 90 %, y no se detectaron casos aparentes de blanqueamiento, siendo esta una de las respuestas de estrés más drásticas que experimentan estos cnidarios. Estudios previos constatan que en general, las especies de antozoos simbióticos suelen ser más resistentes ante diversos tipos de estrés ambiental que antozoos no simbióticos (Richier et al., 2005).



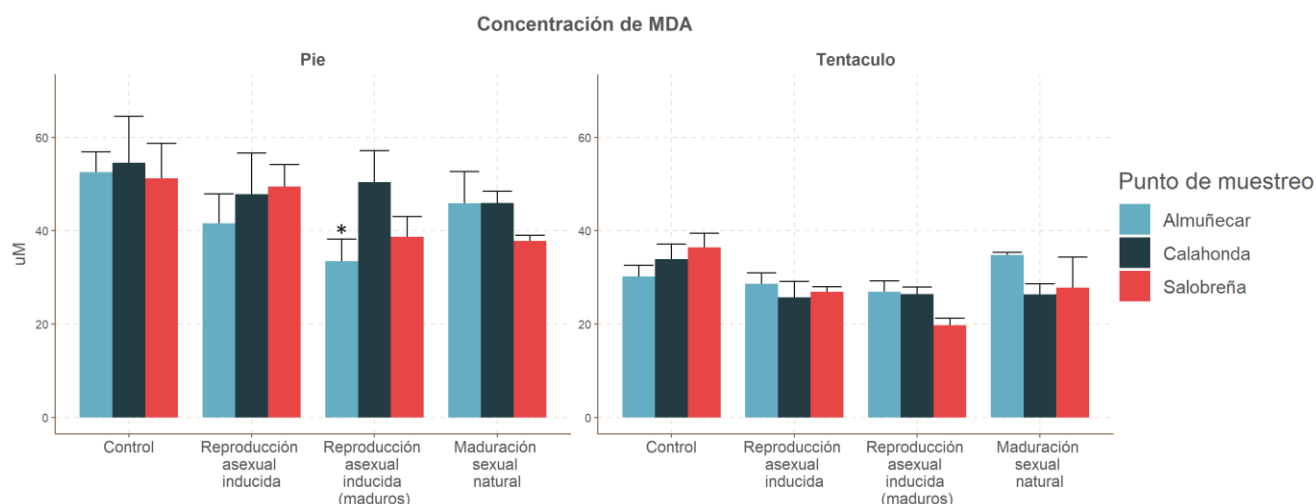
**Figura 18.** Capacidad antioxidante total (TEAC) en *A. sulcata*. a, b: diferencias significativas entre puntos de muestreo, dentro de cada situación experimental. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

La evolución de la simbiosis entre antozoos y zooxantelas supuso grandes costes y presiones evolutivas, ya que el animal está sometido a ciclos diarios de hipoxia-hiperoxia debido a la actividad fotosintética de las microalgas en sus tejidos. En las fases de hiperoxia, la concentración de oxígeno celular llega a triplicar los valores de normoxia, y supone unas condiciones



prooxidantes que favorecen la sobreproducción de ROS. Para hacer frente a esta situación los corales y anémonas que albergan zooxantelas han desarrollado defensas antioxidantes enzimáticas muy eficientes, como SOD, CAT o GPx, y muchas de ellas con una gran diversidad de isoformas de enzimas (Furla et al., 2005; Richier et al., 2005; Casado-Amezúa et al., 2016; Pey et al., 2017).

En este estudio se realizó un análisis del estado oxidativo teniendo en cuenta por separado la fracción correspondiente a los tentáculos (donde existe mayor densidad de zooxantelas) y el pie (con mayor contenido visceral). En general, para todos los grupos se encontraron valores de SOD cualitativamente mayores en tentáculo que en pie, lo que posiblemente se deba a la mayor densidad de zooxantelas en estos órganos. Las zooxantelas son una vía importante de producción de ROS, por lo que resulta coherente que la actividad SOD se concentre en los tentáculos. Estudios previos apoyan estos resultados, ya que se han encontrado niveles constitutivos de actividad SOD especialmente elevados en *A. viridis*, y se ha corroborado que la actividad SOD es mayor en las zooxantelas y la gastrodermis (Richier et al., 2003).



**Figura 19.** Concentración de MDA en *A. sulcata*. \*: diferencias significativas con el grupo control, dentro de cada punto de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

En cambio, la concentración medida de MDA parece ser siempre mayor en pie que en tentáculo, independientemente del grupo experimental. Por un lado, esto puede deberse a la presencia de componentes viscerales lipídicos en el pie, que serían más susceptibles a sufrir peroxidación en condiciones de estrés. Por otra parte, la intensa actividad SOD encontrada en los tentáculos podría ser capaz de prevenir eficientemente la peroxidación lipídica en estos órganos, que estarían más expuestos en relación a la actividad fotosintética de las zooxantelas como fuente de ROS.

Con relación al efecto del cultivo en los ejemplares extraídos de su medio natural, los resultados obtenidos parecen indicar que el entorno de cultivo no se asoció una evidente pérdida de bienestar ni deterioro del estado oxidativo respecto a las ortiguillas salvajes. La actividad de las dos principales enzimas antioxidantes medidas, SOD, y CAT, no se incrementó significativamente respecto a los animales salvajes, y tampoco hubo alteraciones en la capacidad antioxidante total (TEAC), representada por moléculas antioxidantes no enzimáticas.

Por otro lado, la actividad GST mostró alteraciones destacables en individuos cultivados, viéndose esta incrementada en pie para las anémonas cultivadas. Es bien conocido que la GST está implicada en mecanismos de detoxificación de xenobióticos, conociéndose su relevancia como indicador de la calidad del medio en organismos acuáticos (Almar et al., 1998). El hecho de que los animales se encuentren en un sistema de recirculación podría haber propiciado valores más altos en respuesta a alguna alteración en la calidad del agua de cultivo. Por otro lado, los valores de DTD en pie se mantuvieron estables con el paso a cultivo, y en tentáculo sufrieron un descenso significativo para animales procedentes de ciertos puntos de muestreo.

**Tabla 2.** Conjunto de p-valores obtenidos en el ANOVA de dos vías de cada parámetro, para pie y tentáculo, y separados por grupos experimentales. \*: significación estadística ( $p \leq 0.05$ ).

Reproducción asexual inducida	<b>Pie</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto manipulación	0.068	0.111	0.693	0.403	0.053	0.511	0.292
	Efecto playa	0.476	0.121	0.010 *	0.850	0.079	0.103	0.839
	Efecto manip.*playa	0.099	0.178	0.013 *	0.655	0.468	0.020 *	0.820
	<b>Tentáculo</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto manipulación	0.275	< 0.001 *	< 0.001 *	0.104	< 0.001 *	0.375	0.026 *
	Efecto playa	0.759	0.924	0.103	0.733	0.907	0.078	0.752
	Efecto manip.*playa	0.890	0.095	0.623	0.663	0.992	0.909	0.332
Reproducción asexual inducida (maduros)	<b>Pie</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto manip. + maduración	0.336	0.006 *	0.137	0.452	0.006 *	0.179	0.046 *
	Efecto playa	0.010 *	0.002 *	< 0.001 *	0.113	0.097	0.022 *	0.350
	Efecto m+m * playa	0.821	0.560	< 0.001 *	0.042 *	0.584	0.082	0.542
	<b>Tentáculo</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto manip. + maduración	0.047 *	0.438	0.122	< 0.001 *	0.346	0.887	0.001 *
	Efecto playa	0.052	< 0.001 *	0.103	0.208	0.861	0.263	0.501
Maduración sexual natural	<b>Pie</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto maduración	0.984	0.781	0.742	0.180	0.655	0.382	0.128
	Efecto playa	0.603	0.029 *	0.428	0.877	0.038 *	< 0.001 *	0.718
	Efecto maduración*playa	0.001 *	0.169	0.045 *	0.794	0.366	0.793	0.882
	<b>Tentáculo</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>	<b>GR</b>	<b>DTD</b>	<b>TEAC</b>	<b>MDA</b>
	Efecto maduración	0.599	0.003 *	0.510	0.051	0.095	0.962	0.302
	Efecto playa	0.728	0.576	0.945	0.389	< 0.001 *	0.011	0.764
	Efecto maduración*playa	0.829	0.014 *	0.088	0.093	< 0.001 *	0.260	0.194

El hecho de contar con individuos procedentes de tres entornos naturales diferentes permitió valorar si este factor podría ser determinante en su capacidad de adaptación al sistema de cultivo. A este respecto, las ortiguillas procedentes de Salobreña registraron valores inusualmente elevados de actividad SOD, GR, DTD, y especialmente de actividad CAT en individuos salvajes. Estas diferencias enzimáticas se manifiestan de manera más evidente en el tentáculo, por lo que este tejido podría ser más sensible a las alteraciones del entorno natural.

Además, fueron el único grupo en el que se detectó un incremento significativo de la concentración de MDA en animales cultivados, aunque en términos cuantitativos fuera bastante leve. Es posible que las anémonas de esta población contaran con un peor estado oxidativo en el momento del muestreo, lo cual habría incrementado sus actividades de enzimas antioxidantes y podría haber repercutido en una peor adaptación a las condiciones de cultivo. Entre las posibles causas de este fenómeno destaca la presencia de dos emisarios de aguas residuales urbanas en el punto de muestreo de Salobreña, que podrían haber afectado a la calidad del agua.

En condiciones de cultivo controlado, esta especie ofrece la posibilidad de llevar a cabo una fisión longitudinal del individuo, con el objetivo de estimular la reproducción asexual de las anémonas. Sin embargo, en muchas ocasiones esta manipulación puede suponer una causa de estrés que comprometa su bienestar. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un incremento generalizado de la actividad CAT, GST y DTD en varios de los grupos que sufrieron la sección longitudinal. En cambio, la actividad SOD se mantuvo estable, posiblemente debido a que ya presentaban una elevada actividad constitutiva de esta enzima. La SOD es la primera línea de defensa frente a las ROS, generando peróxido de hidrógeno, pero la producción de esta molécula debe estar controlada por enzimas que lo utilicen como sustrato, evitando así su acumulación y citotoxicidad. La catalasa es especialmente relevante en este rol debido a que es más eficiente a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$ , y por tanto un incremento de su actividad ayudaría a mantener el balance SOD/CAT, evitando el daño oxidativo (Merle et al., 2007).

De hecho, a pesar del incremento de actividades antioxidantes, la fisión artificial no implicó una mayor concentración de MDA respecto al control, por lo que se puede concluir que, aunque inducir la reproducción asexual generó un estrés a las anémonas (posiblemente asociado a ciertos cambios metabólicos que propiciaran la producción de ROS), la respuesta antioxidante que desarrollaron fue suficiente para evitar daño oxidativo en sus lípidos. Este hecho es especialmente

relevante para proyectos de repoblación o reforzamiento poblacional, ya que implica que es posible multiplicar la ortiguilla de mar mediante reproducción asexual sin que su estado oxidativo, y por tanto su bienestar, se vean drásticamente perjudicados.

La combinación de reproducción asexual inducida y posterior maduración sexual produjo alteraciones significativas en algunos de los parámetros medidos, pero siempre dependiente de la población de origen y sin una tendencia clara. Además, no se observó una mayor concentración de MDA respecto a los individuos inmaduros, manifestándose incluso un descenso significativo en el pie de los individuos procedentes de Almuñécar. Todo parece indicar que el proceso de maduración en los individuos seleccionados no desembocó en un estado de estrés oxidativo, si bien una mayor sensibilidad de algunos individuos atendiendo a su población de origen podría haber condicionado el perfil de su respuesta antioxidante.

De igual manera, la maduración natural en el entorno de cultivo multitrófico mostró también distintos efectos sobre el estado oxidativo de las ortiguillas en función de su población de origen, de modo que para algunos parámetros, como la CAT (Tabla 2,  $p = 0.014$ ) o la SOD (Tabla 2,  $p = 0.001$ ), se detectaron cambios en sentido opuesto según el punto de origen de los individuos. Las alteraciones sobre las distintas actividades enzimáticas son irregulares y no generalizadas, y, de nuevo, no se vieron acompañadas en ningún caso de un incremento significativo en la concentración de MDA.

Todo esto sugiere que el punto de muestreo parece condicionar la respuesta antioxidante generada durante la maduración sexual, siendo un factor incluso más relevante que el propio hecho de estar bajo cultivo. Estos resultados parecen indicar que el grado de bienestar de los ejemplares en su entorno natural sería determinante a la hora de favorecer su posterior adaptación a las condiciones de cultivo. Por tanto, bajo estas premisas, parece plausible combinar ambos modos de reproducción en un sistema de cultivo, con el objetivo de incrementar rápidamente el tamaño de población y a la vez conseguir cierto grado de diversidad genética antes de la liberación de ejemplares en el medio natural.

El presente estudio supone un avance más en el conocimiento de la ortiguilla de mar, proponiendo la evaluación del estado oxidativo como indicador de su bienestar. Otros ensayos nos permitirán aclarar cuestiones y completar las conclusiones de estos resultados. En concreto, la

evaluación de posibles diferencias entre individuos madurados en cultivo y madurados en entorno natural podría ser de utilidad a la hora de perfilar la estrategia de reproducción en cautividad.

Por otra parte, la separación de las zooxantelas de los tejidos analizados en *A. sulcata* permitirá determinar el nivel de implicación de los simbiontes en la maquinaria antioxidante de los cnidarios. Finalmente, la búsqueda de parámetros indicadores del estado de bienestar debería ampliarse en futuros estudios a otros parámetros inmunológicos y al análisis de la microbiota del mucus, como sugiere la literatura previa en otros antozoos, y especialmente en corales (Stabili et al., 2018; Parisi et al., 2020).

## 6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. La actividad de las principales enzimas antioxidantes analizadas (SOD y CAT) no mostró diferencias destacables entre individuos salvajes y cultivados. Este comportamiento, unido a la ausencia de daño oxidativo en lípidos, parece ser indicativo de que el cultivo en cautividad no afectó de manera significativa al bienestar de la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*).

- 2.1. La inducción de la reproducción asexual mediante manipulación en la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*) desencadenó variaciones en parámetros antioxidantes, entre los que destacó principalmente un aumento de la actividad CAT. Dichas variaciones podrían ser en respuesta a una situación de estrés agudo por manipulación, aunque se mostraron efectivas manteniendo el equilibrio oxidativo en los animales.

- 2.2. Las respuestas enzimáticas asociadas a un estado de maduración sexual bajo condiciones de cultivo estuvieron significativamente condicionadas por el entorno natural de procedencia de los animales (con independencia de si se hizo o no escisión artificial previa). No obstante, la ausencia de daño oxidativo en lípidos sugirió la validez de la estrategia de reproducción en cautividad de la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*), sin que se vea afectado su estado de bienestar.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adamo, S. A. (2012). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. In *Hormones and Behavior*, 62(3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Alexander, K. A., Freeman, S., Potts, T. (2016). Navigating uncertain waters: European public perceptions of integrated multi trophic aquaculture (IMTA). *Environmental Science & Policy*, 61, 230–237. <https://doi.org/10.1016/J.ENVSCI.2016.04.020>
- Almar, M., Otero, L., Santos, C., González Gallego, J. (1998). Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 33(6), 769–783. <https://doi.org/10.1080/03601239809373177>
- Bocharova, E. (2016). Reproduction of sea anemones and other hexacorals. En: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham, 239–248. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_15)
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Browning, H. (2020). The Natural Behavior Debate: Two Conceptions of Animal Welfare. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 23(3), 325–337. <https://doi.org/10.1080/10888705.2019.1672552>
- Buck, B. H., Troell, M. F., Krause, G., Angel, D. L., Grote, B., Chopin, T. (2018). State of the art and challenges for offshore Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). In *Frontiers in Marine Science* (5), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00165>
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–210. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Cabeza, L., Peña, M., Martínez, R., Mesas, C., Galisteo, M., Perazzoli, G., Prados, J., Porres, J. M., Melguizo, C. (2021). *Anemonia sulcata* and its symbiont symbiodinium as a source of anti-tumor and anti-oxidant compounds for colon cancer therapy: A preliminary in vitro study. *Biology*, 10(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10020134>
- Calado, R., Dionísio, G., Dinis, M. T. (2007). Decapod crustaceans associated with the snakelock anemone *Anemonia sulcata*. Living there or just passing by? *Scientia Marina*, 71(2), 287–292. <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n2287>
- Calvín Calvo, J. C., Eisman Valdés, C. (2020). *El ecosistema marino mediterráneo: guía de su flora, fauna y hábitats*. Juan Carlos Calvín.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5475–5480. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41206-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41206-4)
- Casado-Amezúa, P., Terrón-Sigler, A., Pinzón, J. H., Furla, P., Forcioli, D., Allemand, D., Ribes, M., Coma, R. (2016). General ecological aspects of anthozoan- symbiodinium interactions in the mediterranean sea. En: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham, 375–386. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_24)

- Ciccone, R., Piccialli, I., Grieco, P., Merlino, F., Annunziato, L., Pannaccione, A. (2019). Synthesis and Pharmacological Evaluation of a Novel Peptide Based on *Anemonia sulcata* BDS-I Toxin as a New K<sup>+</sup> V<sub>3.4</sub> Inhibitor Exerting a Neuroprotective Effect Against Amyloid- $\beta$  Peptide. *Frontiers in Chemistry*, 7(479). <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00479>
- Coelho, M. A. G., Lasker, H. R. (2016). Larval dispersal and population connectivity in anthozoans. En: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham, 291–315. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_19)
- Dawkins, M. (2015). Animal Welfare and the Paradox of Animal Consciousness. *Advances in the Study of Behavior*, 47, 5–38. <https://doi.org/10.1016/BS.ASB.2014.11.001>
- Daza Cordero, J. L., del Castillo y Rey, F., Márquez Pascual, I. (2002). *La Pesquería del Erizo y Anémona de Mar en el Litoral de Cádiz y Málaga*. Junta de Andalucía. <https://www.juntadeandalucia.es/servicios/publicaciones/detalle/43547.html>
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2003.11.015>
- Flohé, L., Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Frasco, M. F., Guilhermino, L. (2002). Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(2), 149–156. <https://doi.org/10.1023/A:1025457831923>
- Furla, P., Allemand, D., Shick, J. M., Ferrier-Pagès, C., Richier, S., Plantivaux, A., Merle, P. L., Tambutté, S. (2005). The symbiotic anthozoan: A physiological chimera between alga and animal. *Integrative and Comparative Biology*, 45(4), 595–604. <https://doi.org/10.1093/icb/45.4.595>
- Guerrero, S., Cremades, J. (2012). *Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia*. (C. J. Guerrero S., Ed.). Xunta de Galicia (Spain). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00743395>
- Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., Livingstone, D. R. (1996). Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-Diaphorase function in liver of fish species. *Marine Environmental Research*, 42(1–4), 317–321. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)00042-9)
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. In *Annual Review of Physiology*, 68, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Löhr, G. W., Waller, H. D. (1965). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase: (Zwischenferment). *Methods of Enzymatic Analysis*, 744–751. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50135-3>
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mellor, D. J. (2016). Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living.” *Animals*, 6(3), 21. <https://doi.org/10.3390/ani6030021>
- Merle, P. L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., Furla, P. (2007). Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038>

- Ochoa, D. M., González, J. F. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(II), 115–126.
- Orden de 24 de abril de 2003, por la que se regula la pesca del Erizo y la Anémona de Mar en el Litoral Andaluz. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía, 86, de 8 de mayo de 2003, 9628-9631. Recuperado de: <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2003/86/1>
- Parisi, M. G., Parrinello, D., Stabili, L., Cammarata, M. (2020). Cnidarian immunity and the repertoire of defense mechanisms in anthozoans. *Biology*, 9(9), 283. <https://doi.org/10.3390/biology9090283>
- Pey, A., Zamoum, T., Christen, R., Merle, P. L., Furla, P. (2017). Characterization of glutathione peroxidase diversity in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Biochimie*, 132, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.016>
- Piccialli, I., Tedeschi, V., Boscia, F., Ciccone, R., Casamassa, A., de Rosa, V., Grieco, P., Secondo, A., Pannaccione, A. (2021). The *Anemonia sulcata* toxin BDS-I protects astrocytes exposed to A $\beta_{1-42}$  oligomers by restoring [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients and ER Ca<sup>2+</sup> signaling. *Toxins*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13010020>
- Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P. L., Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 208(2), 277-285. <https://doi.org/10.1242/jeb.01368>
- Richier, S., Merle, P. L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., Allemand, D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1621(1), 84-91. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00049-7)
- Rodríguez, E., Fautin, D., Daly, M. (2022). World List of Actiniaria: *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777). World Register of Marine Species. Recuperado de: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231858> on 2022-06-07
- Sadeghi-Nassaj, S. M., Catalá, T. S., Álvarez, P. A., Reche, I. (2018). Sea cucumbers reduce chromophoric dissolved organic matter in aquaculture tanks. *PeerJ*, 6(e4344). <https://doi.org/10.7717/peerj.4344>
- Stabili, L., Parisi, M. G., Parrinello, D., Cammarata, M. (2018). Cnidarian interaction with microbial communities: From aid to animal's health to rejection responses. In *Marine Drugs*, 16(9), 296. <https://doi.org/10.3390/md16090296>
- Stefano, G. B., Cadet, P., Zhu, W., Rialas, C. M., Mantione, K., Benz, D., Fuentes, R., Casares, F., Fricchione, G. L., Fulop, Z., Slingsby, B. (2002). The blueprint for stress can be found in invertebrates. In *Neuroendocrinology Letters*, 23(2), 85-93.
- Suggett, D. J., Hall-Spencer, J. M., Rodolfo-Metalpa, R., Boatman, T. G., Payton, R., Tye Pettay, D., Johnson, V. R., Warner, M. E., Lawson, T. (2012). Sea anemones may thrive in a high CO<sub>2</sub> world. *Global Change Biology*, 18(10), 3015-3025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02767.x>
- Suh, H.-J., Lee, H.-W., Jung, J. (2003). Mycosporine Glycine Protects Biological Systems Against Photodynamic Damage by Quenching Singlet Oxygen with a High Efficiency. *Photochemistry and Photobiology*, 78(2), 109–113. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780109MGPBSA2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780109MGPBSA2.0.CO2)
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., Fang, J. G. (2009). Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, 297(1–4), 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.09.010>
- Utrilla, O., Castro-Claros, J. D., Urrea, J., Navas, F. D., Salas, C. (2019). Reproduction of the anthozoan *Anemonia sulcata* (Pennant, 1777) in southern Spain: from asexual reproduction to putative maternal care. *Marine Biology*, 166, 111. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3558-5>



- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2005.03.013>
- Webster, J. (1994). Assessment of animal welfare: The five freedoms. *Animal Welfare: A Cool Eye Towards Eden; Blackwell Science: Oxford, UK*, 10–14.
- Weil, E., Weil-Allen, A., Weil, A., Weil, E., Weil-Allen, A., Weil, A. (2019). En: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham, 123–145. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6_6)
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3059–3066. <https://doi.org/10.1242/JEB.009597>