Análisis de marcadores de bienestar en ortiguilla de mar ante variaciones en su entorno de cultivo

**Índice:**

1. Introducción
   1. Situación actual de la acuicultura y sostenibilidad. Papel de la diversificación de especies y cultivos multitróficos
   2. *Anemonia sulcata* como cultivo emergente. Características de interés para la acuicultura
   3. Bienestar animal y estrés. Estrés oxidativo como indicador de bienestar.
   4. Objetivos
2. Materiales y métodos
   1. Diseño experimental y muestro
   2. Determinaciones espectrofotométricas
   3. Histología
      1. PAS
      2. Inmunodetección de SOD
   4. Tratamiento estadístico
3. Resultados
4. Discusión
5. Conclusiones
6. **Introducción**

**1.1. Desarrollo sostenible en acuicultura**

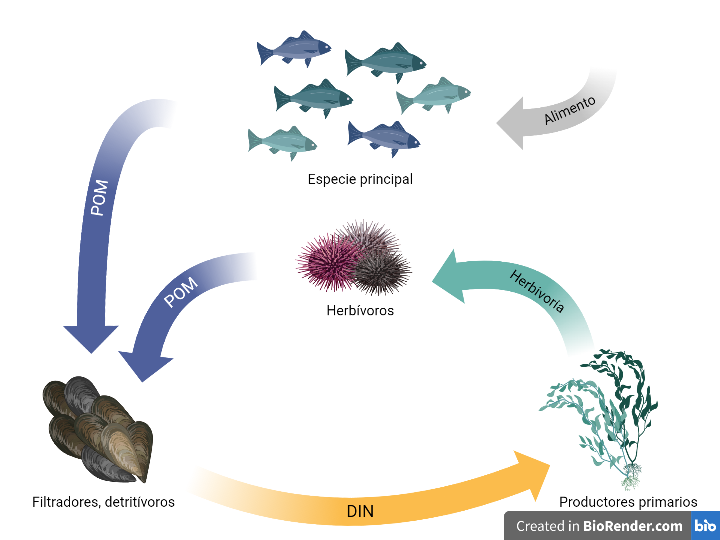
Los alimentos de origen acuático desempeñan un papel fundamental en la seguridad alimentaria y nutricional de muchas poblaciones en todo el mundo. Es por ello que la acuicultura y la pesca son actividades económicas clave en la constitución de sistemas de producción de alimentos que resulten sostenibles desde un punto de vista ecológico, social y económico (FAO, 2022b). Sin embargo, la producción y distribución de estos alimentos no está exenta de problemas, sino que se enfrentan a graves repercusiones a largo plazo fruto de la sobreexplotación, degradación de hábitats naturales, y desigualdad en el acceso a los recursos producidos (FAO, 2022b).

En las últimas décadas, la producción acuícola ha experimentado un gran impulso a nivel mundial, de forma que en 2020 ya suponía el 49 % de la producción de organismos acuáticos, excluyendo la alguicultura (FAO, 2022b). En su hoja de ruta para la transformación azul (FAO, 2022a), la FAO identifica como uno de los objetivos principales “la expansión y la intensificación sostenible de la acuicultura con el fin de apoyar las metas mundiales de seguridad alimentaria y atender la demanda mundial de alimentos acuáticos nutritivos y la distribución equitativa de los beneficios”.

Dos de los impactos más sobresalientes de la acuicultura desde el punto de vista ecológico son las materias primas usadas para los piensos, y la liberación de desechos metabólicos al medio natural. Por un lado, la alimentación de los organismos cultivados supone a menudo un problema ya que es altamente dependiente de la harina y aceite de pescado, obtenidos a partir de recursos pesqueros pelágicos (Barroso et al., 2021; FAO, 2022b; Hodar et al., 2020). Por otra parte, y también relacionado con la alimentación, está el problema de liberación de desechos metabólicos (heces, excretas y restos de pienso no ingerido) al medio natural. Todos estos desechos son susceptibles de contaminar el medio, y concretamente en aquellos sistemas de acuicultura en medio marino (Nissar et al., 2023).

En el ámbito de la acuicultura, existe, por tanto, una necesidad de utilizar de forma eficaz los recursos naturales evitando impactos severos sobre el ambiente (Buck et al., 2018). Es por ello que el desarrollo de sistemas integrados de producción se considera una de las herramientas con más potencial para contribuir al desarrollo sostenible en acuicultura, sobre todo en sistemas a pequeña y mediana escala (FAO, 2022b). Entre estos sistemas integrados, suscita cada vez más interés la propuesta de los sistemas de acuicultura multitrófica integrada (IMTA).

El enfoque IMTA consiste en el co-cultivo integrado de especies con nichos tróficos diferentes, de modo que los desechos metabólicos de unas especies, en vez de considerarse un contaminante a tratar, se utilicen como recurso para otras especies del cultivo. Este sistema integrado consigue un ciclado de nutrientes más eficiente, reduciendo la liberación de contaminantes orgánicos al medio e incrementando la productividad (Buck et al., 2018; FAO, 2022b; Nissar et al., 2023). El concepto es además extremadamente flexible, de modo que tiene aplicaciones tanto en sistemas en tierra como en el medio natural, y puede involucrar una gran diversidad de organismos, incluso plantas terrestres en sistemas de acuaponía (Chopin et al., 2012; Lennard et al., 2019; Nissar et al., 2023).

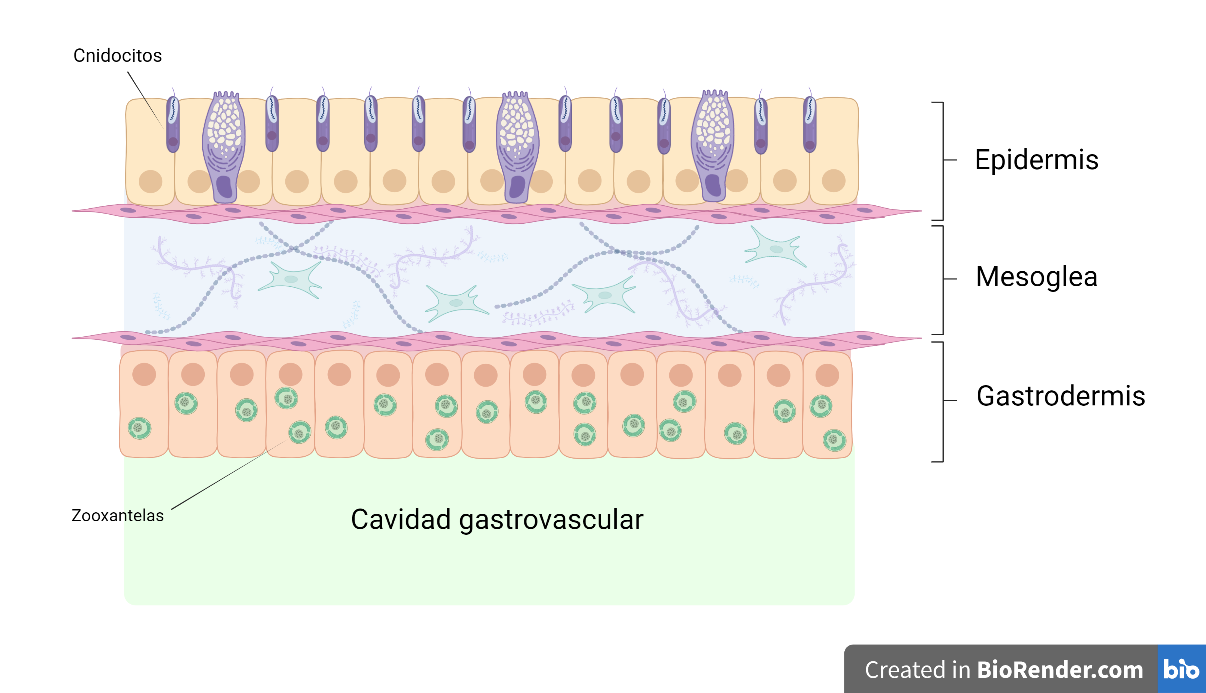


En general, un sistema IMTA estándar debería contar con una especie alimentada, y distintas especies extractivas. Las especies alimentadas, como su nombre indica, son las que se nutren a partir del pienso suministrado, y por tanto las que cargan con el mayor peso de la rentabilización de la explotación (Nissar et al., 2023). Es por ello que se suelen escoger especies de alto valor comercial como peces carnívoros o crustáceos, aunque ocasionalmente se utilizan también ciprínidos.

Las especies extractivas dependen de los desechos de la especie alimentada, bien sean extractivas de nutrientes inorgánicos (principalmente macroalgas), o extractivas de materia orgánica (invertebrados suspensívoros, filtradores y detritívoros) (Nissar et al., 2023). La flexibilidad del IMTA también radica en la diversidad de especies extractivas potenciales, que deberían cumplir distintos criterios: ser especies nativas, con un mercado ya establecido, y, o bien con una alta tasa de crecimiento, o bien con un alto valor comercial (Nissar et al., 2023).

**1.2. Ane*monia sulcata* como cultivo emergente**

La ortiguilla de mar(*Anemonia sulcata*)(Pennant, 1777) es una especie de cnidario de la clase Anthozoa, ampliamente distribuido por el Mar Mediterráneo y el Atlántico septentrional (Rodríguez et al., 2023). Se trata de una anémona marina de carácter solitario, que habita en entornos intermareales y someros sobre sustratos rocosos. Su cuerpo está conformado por un tronco o pie, por donde se adhiere al sustrato; y una corona de tentáculos, que rodea la boca y que utilizan para capturar alimento de la columna del agua. Desde un punto de vista histológico, su pared corporal está formada por dos epitelios (epidermis y gastrodermis), conectadas por una matriz extracelular intermedia: la mesoglea (Bocharova y Kozevich, 2011; Calvín Calvo y Eisman Valdés, 2020).

Son organismos heterótrofos, que capturan partículas y pequeñas presas gracias a las toxinas presentes en sus cnidocitos. No obstante, *A. sulcata* es una de las especies de antozoos que presentan una relación simbiótica con dinoflagelados del género *Symbiodinium*, que alojan en su gastrodermis (Casado-Amezúa et al., 2016). Estas microalgas, llamadas zooxantelas, complementan la nutrición heterótrofa de su hospedador animal con productos de su actividad fotosintética, en un complejo intercambio de nutrientes que aún no está completamente esclarecido (Davy et al., 2012).

Esta relación mutualista es de una profunda importancia en ecosistemas oligotróficos, como el mar Mediterráneo (Casado-Amezúa et al., 2016; Davy et al., 2012). La evolución de esta relación simbiótica ha supuesto una gran ventaja competitiva en entornos pobres en nutrientes, pero también ha conllevado una gran diversidad de adaptaciones fisiológicas en los antozoos hospedadores, que están ausentes en antozoos no simbióticos. Estas adaptaciones incluyen, entre otras, mecanismos de captación y concentración de bicarbonato para la actividad Rubisco, síntesis de sustancias fotoprotectoras frente a radiación ultravioleta (UV), y un sistema antioxidante enzimático muy eficiente para hacer frente a las grandes fluctuaciones en la concentración de oxígeno que experimentan diariamente en consecuencia a la actividad fotosintética (Davy et al., 2012; Furla et al., 2005; Richier et al., 2005).

La especie *A. sulcata* agrupa tres variedades (*vulgaris*, *smaragdina* y *rufescens)*, que se distinguen entre ellas por las proteínas fluorescentes que expresan en su epidermis. Todas ellas tienen en común la presencia de una cromoproteína no fluorescente rosa, que les da la coloración típica a los extremos del tentáculo y que las distingue de otras especies del género como *A. viridis* y *A. rustica*. No obstante, la taxonomía no está completamente consensuada y cada vez hay más evidencias de que las tres especies no son grupos monofiléticos, sino que conformarían una única especie (Mallien et al., 2017; Porro et al., 2019).

En España, la ortiguilla de mar es un producto consumido y muy apreciado localmente en zonas de Andalucía occidental, pero cuya popularidad se está extendiendo cada vez más en la gastronomía nacional (Daza Cordero et al., 2002). La Orden de 24 de abril de 2003 (BOJA) establece diferentes medidas de regulación de su explotación, entre las que destacan una talla mínima de 15 g, una cuota de 1 kg por recolector y día, y un periodo de veda que abarca los meses de enero y febrero. Pese a estas regulaciones, existe una elevada prevalencia de la recolección ilegal y/o no declarada, y con frecuencia los datos oficiales de capturas no aparecen publicados (Otero et al., 2017; Utrilla et al., 2019).

En el ámbito de la acuicultura, la ortiguilla de mar presenta un interés cada vez mayor, debido a diferentes aspectos. Además de ser un producto de interés gastronómico y muy valorada económicamente, tiene un gran potencial biotecnológico como fuente de distintos compuestos bioactivos (Cabeza et al., 2021; Ciccone et al., 2019; Piccialli et al., 2021). Es un organismo fácil de mantener y reproducir, lo que también promueve su utilización como modelo de estudio de distintos procesos biológicos, como el blanqueamiento o el metabolismo antioxidante (Merle et al., 2007; Pey et al., 2017; Richier et al., 2003, 2006). Adicionalmente, el alto valor económico y alimentación suspensívora de *A. sulcata* la convierten en un organismo con potencial como especie extractiva en sistemas IMTA (Guerrero y Cremades, 2012; Nissar et al., 2023).

La estandarización de técnicas para el cultivo de esta especie no solo sirve a los intereses ya descritos, sino que puede suponer una herramienta de estudio y de conservación de sus poblaciones naturales. Más allá de esto, puede servir como punto de partida para desarrollar el cultivo de otras especies de anémonas y corales de interés como especies ornamentales o con fines de conservación (Fraser et al., 2021; Watson y Younger, 2022). Todos estos factores han condicionado que se convierta en una especie emergente en acuicultura.

* 1. **Bienestar animal y estrés en acuicultura**

El bienestar animal se define, según APROMAR (2022) de forma amplia como “el estado de un animal en relación a su capacidad para relacionarse con su entorno”. Es un concepto algo complejo que puede afrontarse según distintas aproximaciones: el bienestar funcional (basado en la capacidad del animal para adaptarse al entorno), el bienestar natural (basado en la capacidad del animal para expresar comportamientos naturales de su especie), y el bienestar emocional (basado en los estados subjetivos que experimenta el animal: que esté cómodo, seguro, en ausencia de miedo y dolor innecesarios). Con mucha frecuencia, las diferentes definiciones de bienestar animal integran estos tres enfoques (APROMAR, 2022).

En el caso de los invertebrados, se suelen emplear aproximaciones funcionales del bienestar, que engloban aspectos relativos al estado fisiológico del animal, su capacidad de respuesta inmunológica o sus mecanismos de respuesta de estrés (Weil et al., 2019). La respuesta de estrés es una respuesta adaptativa que intenta mantener la homeostasis del animal frente a estímulos estresantes. Implica en una primera instancia una respuesta hormonal, que finalmente desemboca en una serie de alteraciones metabólicas dirigidas a generar energía y restablecer la homeostasis (Adamo, 2012; Stefano et al., 2002).

Estas alteraciones metabólicas generadas en una situación de estrés pueden conllevar un incremento en la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Las ROS se producen habitualmente en cloroplastos y mitocondrias como consecuencia del metabolismo aerobio, y los animales están provistos de diferentes sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que, en situaciones normales, evitan que generen daños a los componentes celulares (Lesser, 2006). Adicionalmente, en circunstancias fisiológicas las ROS y otras especies reactivas desempeñan un papel crítico de señalización celular, y son necesarias para el mantenimiento de la homeostasis celular (Lesser, 2006; Rosset et al., 2021).

Sin embargo, en una situación de estrés, la producción de ROS puede llegar a sobrepasar la capacidad antioxidante del animal, desembocando entonces en daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos celulares. Las principales especies reactivas de oxígeno son el radical superóxido (), peróxido de hidrógeno (), radical hidroxilo () y oxígeno singlete (*1*) (Lesser, 2006). La primera línea de defensa de la mayoría de organismos frente a las ROS es la enzima superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la reducción del radical superóxido en y agua. El siguiente paso en la secuencia es la eliminación del producido, que puede ser llevada a cabo por la catalasa (CAT), o por la glutatión peroxidasa (GPx), que utiliza el glutatión como donador de electrones. El glutatión oxidado es entonces regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) (Lesser, 2006).

En el caso de los antozoos, a pesar de ser una ventaja competitiva, vivir en simbiosis con zooxantelas implicó exponerse a fluctuaciones diarias de los niveles de oxígeno, fruto de su actividad fotosintética. (Richier et al., 2003) demostraron que la concentración de oxígeno en los tejidos de *A. viridis* puede llegar a triplicar la normoxia en algunas horas del día, mientras que durante la noche la respiración del cnidario y sus simbiontes llevaría a una hipoxia intracelular. Para hacer frente a estas fluctuaciones diarias de hipoxia-hiperoxia y a otras condiciones estresantes derivadas del entorno intermareal, *A. viridis* y otros antozoos simbióticos presentan distintas adaptaciones de su metabolismo antioxidante, y particularmente, de sus defensas enzimáticas (Casado-Amezúa et al., 2016; Davy et al., 2012; Furla et al., 2005).

En el caso de la SOD, los animales típicamente presentan las isoformas CuZnSOD y MnSOD, esta última normalmente ligada a las mitocondrias. *A. viridis*, además de estas isoformas, presenta FeSOD en las zooxantelas y en sus tejidos, siendo esta isoforma típica de plantas y procariotas. Las distintas isoformas de SOD en este organismo se distribuyen diferencialmente en diferentes tejidos y compartimentos celulares. (Plantivaux et al., 2004; Richier et al., 2003) Esta diversidad de isoformas no se encuentra en otros antozoos no simbióticos, sugiriendo que es un rasgo originado por las presiones selectivas derivadas de esta relación mutualista (Casado-Amezúa et al., 2016; Furla et al., 2005).

El producido por la SOD tiene una elevada capacidad de difundir a través de las membranas biológicas, por lo que debe ser rápidamente eliminado por peroxiadasas, como la GPx, CAT o la ascorbato peroxidasa. Si la actividad SOD no está acoplada a un eficiente sistema de eliminación del peróxido de hdirógeno, se puede producir citotoxicidad por esta especie de oxígeno reactivo (Den Hartog et al., 2003). Estudios previos ya han evaluado la expresión y actividad GPx y CAT en distintos tejidos y compartimentos de *A. viridis*, encontrando de nuevo varias isoformas con diferente distribución (Merle et al., 2007; Pey et al., 2017), pero todavía existen lagunas en el conocimiento sobre esta especie en cuanto a su metabolismo oxidativo frente a diferentes condiciones de cultivo.

* 1. **Objetivos**

El presente trabajo se realizó con el siguiente objetivo principal:

* Evaluar la influencia de las características del entorno de cultivo sobre el estado de bienestar de la ortiguilla de mar (*Anemonia sulcata*)

A partir de este objetivo, se derivaron los siguientes objetivos secundarios:

1. Determinar qué parámetros son más apropiados para su empleo como marcadores de bienestar en esta especie
2. Evaluar las alteraciones histológicas y enzimáticas que tienen lugar en este organismo bajo condiciones estresantes derivadas del entorno de cultivo.
3. Evaluar el posible efecto positivo del entorno multitrófico sobre el bienestar de la ortiguilla de mar (*A. sulcata*)
4. **Materiales y métodos**

**2.1. Diseño experimental**

Los ejemplares utilizados en el estudio se extrajeron del medio natural con la autorización de las autoridades competentes. Todos ellos proceden de la misma población en Salobreña (Granada), y tras su recogida fueron ubicados en las instalaciones de Andalmar Biotech S.L. en Carchuna (Granada). Los animales se estabularon distribuidos en tanques exteriores de hormigón, con cuatro tratamientos diferentes: control, penumbra, eflujo periódico de agua dulce, y cultivo multitrófico.

El sistema de cultivo se diseñó de manera que hubiera cinco réplicas de cada tratamiento, con un número variable de anémonas en cada réplica (generalmente 9-10 individuos). Las anémonas se mantuvieron en cestillos flotantes, de modo que se encontraban a pocos centímetros de la superficie del agua. Todos los tanques, salvo por sus distintos tratamientos, eran idénticos en cuanto a dimensiones y sistema de filtración, y la temperatura se mantuvo uniforme entre los cuatro durante todo el experimento.

El tratamiento de penumbra consistió en una cobertura de malla negra densa, que bloqueaba la mayor parte de la luz solar incidente sobre los organismos. El tratamiento de agua salobre consistió en la reposición del agua de cultivo con agua dulce, dos veces a la semana, lo que conllevó una disminución inmediata de la salinidad a unos 27 g/L, recuperada lentamente hasta llegar a unos 30 g/L. La salinidad del resto de tratamientos se mantuvo en torno a los 34-35 g/L. Finalmente, el tratamiento de cultivo multitrófico consistió en el co-cultivo de las anémonas con mejillones, erizos de mar y holoturias.

Los animales permanecieron en los tanques durante cuatro semanas desde el inicio del experimento, y fueron alimentados dos veces por semana con pienso húmedo a base de diferentes pescados de bajo valor comercial. Al finalizar el experimento, se muestreó un individuo de cada réplica (5 por situación experimental) para los análisis de espectrofotometría, separando pie y tentáculo para su medición de forma separada. Se tomaron también, en cada tratamiento, extensiones y muestras de mucus. (quitar luego si no se incluye).

Por otra parte, se escogieron al azar dos individuos de cada situación experimental para la extracción de tejido con destino a la obtención de cortes histológicos e inmunohistoquímica. Los tejidos utilizados fueron tentáculos completos y secciones del pie del animal.

**2.2. Determinaciones espectrofotométricas**

Se procesó por separado el material correspondiente al pie del animal de los tentáculos del mismo. Una muestra de tentáculos fue reservada para la determinación de clorofila. Para el resto de determinaciones, se homogenizó en tampón Tris 100 mM, EDTA 0.1 mM, y Tritón 0.1%, pH 7.8, en proporción 1:4. Los homogenados fueron centrifugados a 16 000 rpm durante 25 minutos en una centrífuga Sigma 3K30, y, finalmente, se recogió el sobrenadante y se reservaron alícuotas a -80 º C.

Se registró la actividad de las principales enzimas del metabolismo antioxidante: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Así mismo, se determinaron los niveles de peroxidación lipídica como marcador de daño oxidativo, y se estimó la capacidad antioxidante total (TEAC) de cada extracto. Todas las medidas se realizaron con un espectrofotómetro de microplacas PowerWave (Bio-Tek Instrument, Inc), a temperatura controlada de 25 ºC.

* **Actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)**

La determinación de la actividad SOD se realizó mediante el método de McCord y Fridovich (1969), que se fundamenta en una medida indirecta de la actividad según el grado de inhibición del citocromo c. Se elabora una reacción control con xantina y xantina oxidasa (EC 1.17.3.2) que genera radical superóxido () y reduce el citocromo c. La SOD es capaz de eliminar el , y por tanto, produce una disminución de la absorbancia respecto a la reacción control.

Para esta técnica, se airea previamente la solución de citocromo c para oxidar por completo este compuesto, y una vez oxidado, se registra la absorbancia a 550 nm de la reacción control. Finalmente, se determina la absorbancia a 550 nm de las muestras, midiendo durante 3 minutos cada 13 segundos.

Para esta enzima, se definió la unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para generar una inhibición del 50 % en la reducción del citocromo c. Se expresó estandarizada por miligramo de proteína de la muestra. El cálculo de la actividad se realizó siguiendo la siguiente fórmula:

(Fórmula 1)

Donde ΔDO/Δt es el decremento en densidad óptica por minuto, f es el factor de dilución del extracto, Ve es el volumen del extracto en mililitros, y P es la concentración de proteína en miligramos/mililitro.

* **Actividad catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)**

Se utilizó la técnica descrita por Aebi (1984) para determinar la actividad CAT a partir de la disminución de la absorbancia producida por el descenso de concentración de que genera la actividad de esta enzima. Para esta determinación, se preparó una solución extemporánea de en tampón fosfato potásico (50 mM, pH 7.0) y, se registró la absorbancia a 240 nm tras añadir la muestra durante 3 minutos, a intervalos de 12 segundos.

Para la catalasa y el resto de enzimas, salvo la SOD, se definió la unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para transformar un μmol de sustrato por minuto en las condiciones de medida, según la fórmula:

(Fórmula 2)

Donde ΔDO/Δt es la variación en densidad óptica por minuto, Vt es el volumen total de reacción en mililitros, Ve es el volumen de muestra en mililitros, f es el factor de dilución utilizado en la determinación, d es el paso óptico por el pocillo (0.6 cm en microplaca), P es el valor de proteína soluble de cada muestra y ελ es el coeficiente de extinción molar del compuesto a longitud de onda λ, expresado en M-1 cm-1.

* **Actividad glutatión reductasa (GR) (EC 1.8.1.7)**

Para determinar la actividad de la GR, se utilizó el método de Carlberg y Mannervik (1975) modificado. En esta determinación se midió la disminución de la absorbancia debida a la oxidación de NADPH que realiza la enzima para reducir el GSSG a GSH. Se prepararon soluciones extemporáneas de NADPH y GSSG en tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.5), y tras añadir la muestra, se leyó la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos, cada 15 segundos.

* **Actividad glutatión peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)**

La actividad GPx fue determinada siguiendo la técnica de Flohé y Günzler (1984), consistente en una determinación indirecta acoplando la reacción de esta enzima a la de la GR. Se preparó una solución extemporánea de azida sódica, GSH y NADPH en tampón fosfato potásico (50 mM, pH 7.1), además de GR comercial. La GPx de la muestra oxida el GSH aportado a GSSG, y la GR lo vuelve a reducir a GSH. Por ello, se vuelve a leer el decremento en absorbancia a 340 nm (que corresponde a la oxidación de NADPH) cada 15 segundos, durante 3 minutos.

* **Actividad glutatión S-transferasa (GST) (EC 2.5.1.18)**

Siguiendo el método de Frasco y Guilhermino (2002), se determinó la actividad GST de las muestras leyendo el incremento de absorbancia debido a la formación de un conjugado entre el glutatión y 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB). Se elaboró una solución extemporánea de GSH y CDNB en tampón fosfato potásico (0.1 M, pH 6.5), y se registró la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos, leyendo a intervalos de 20 segundos.

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

La actividad DTD se midió utilizando la técnica de Lemaire et al. (1996) modificada, basada en el decremento de absorbancia que produce la reducción del compuesto 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Para ello, se elaboró una solución de NADH y DCPIP en tampón Tris HCl (50 mM, Ph 7.3), y se mezcló el extracto de la muestra con 10 ul de albúmina 0.147 % para favorecer la actividad de la enzima. Finalmente se registró la absorbancia a 600 nm durante 5 minutos, a intervalos de 20 segundos.

* **Peroxidación lipídica**

Usando la técnica de Buege y Aust (1978) modificada, se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) mediante análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico. Se elaboró una solución de ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético y BHT, que se mantuvo en agitación y calentamiento cerca de dos horas. Posteriormente se mezclaron los extractos con el reactivo en proporción 1:4, y se calentaron rápidamente a 100 º C durante 15 minutos.

Una vez en frío, se centrifugó 10 minutos a 3 000 rpm y se midió la absorbancia a 535 nm del sobrenadante. Para poder interpolar la concentración de MDA, se elaboró una curva patrón a partir de una solución madre de MDA 1 mM.

* **Capacidad antioxidante total (TEAC)**

Siguiendo el método descrito por Erel (2004), se determinó la capacidad antioxidante total de la muestra a partir de la reducción de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etillbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). El ABTS, en su forma oxidada, presenta una coloración verde esmeralda intensa que se pierde con su reducción, por lo que se puede cuantificar su reducción midiendo la absorbancia a 595 nm. Para ello se prepararon dos soluciones: R1 (tampón acetato 0.4 Mm, pH 5.8), y R2 (h2o2 y ABTS en tampón acetato 30 Mm, pH 3.6). La solución R2 se dejó reposar hasta conseguir la oxidación completa del ABTS.

Para la determinación, se registró la absorbancia de los extractos con R1, se agregó R2, y se dejó incubar 10 minutos en oscuridad antes de volver a medir. Simultáneamente, se midió la absorbancia de un patrón de Trolox, un antioxidante análogo a la vitamina E, para la elaboración de una curva patrón en la que se interpolaron los resultados.

* **Determinación de proteína soluble**

La proteína soluble de los extractos se determinó mediante el método de Bradford (1976), basada en la utilización del reactivo de Bradford (azul de Coomaisse), capaz de formar un compuesto coloreado con las proteínas de una muestra, y que presenta un pico de absorbancia a 595 nm. Se midió simultáneamente un patrón de albúmina para elaborar una curva patrón en la que interpolar los resultados.

* **Determinación de clorofila**

Para la determinación de clorofila a, clorofila c2 y clorofila total, se incubaron las muestras en tampón de extracción (acetona 100%), a 4º C y en agitación durante la noche, y posteriormente se midió la absorbancia de los extractos a 663 nm y 630 nm. Se calculó el contenido en clorofila a, clorofila c2, y clorofila a + c2 siguiendo las fórmulas propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975). Los resultados fueron expresados como μg de clorofila total/g de tentáculo.

**2.3. Preparados histológicos**

Se tomaron muestras de tentáculos completos y secciones del pie de los animales, utilizando Fijador de Bouin y paraformaldehído 4%, y se preservaron en frío hasta su procesado. Las muestras ya fijadas fueron deshidratadas progresivamente en alcohol, benzol y finalmente incluidas en parafina. La confección de los bloques se llevó a cabo utilizando un centro de inclusión Leica EG1150, y a partir de ellos se obtuvieron secciones histológicas de 10 μm y 5 μm.

Las secciones histológicas fueron teñidas mediante dos técnicas: en primer lugar, la técnica del ácido peryódico–Schiff (PAS) y hematoxilina, con el fin de evidenciar diferentes polisacáridos y mucosustancias neutras; y, por otro lado, la tinción tricrómica de Masson-Goldner (Fucsina ácida, Naranja G y Azul de Anilina) y hematoxilina, para observaciones anatómicas y localización de tejido conjuntivo (Goldner, 1938).

Adicionalmente, los cortes de 5 micras procedentes de especímenes fijados en paraformaldehído fueron empleados para la detección inmunohistoquímica de la enzima superóxido dismutasa. (quitar si no se hace).

Finalmente se obtuvieron instantáneas de los preparados histológicos utilizando un microscopio X con cámara acoplada, y el software Y.

**2.4. Tratamiento estadístico y presentación de datos**

Todo el tratamiento de datos y análisis estadístico fue ejecutado usando R 4.3.0 Y RStudio 2023.03.1. Para comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre las variables de interés, se aplicó un ANOVA de una vía, comprobando las asunciones de normalidad de residuos y homocedasticidad. Los resultados fueron expresados como media ± error estándar de la media (SEM). Para evaluar la correlación y la idoneidad de los distintos parámetros medidos como indicadores de bienestar, se efectuó un análisis de componentes principales (PCA).

1. **Resultados**
2. **Discusión**
3. **Conclusiones**
4. **Bibliografía**

Adamo, S. A. (2012). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. En *Hormones and Behavior* (Vol. 62, Número 3). https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*(C), 121-126. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3

APROMAR. (2022). *Guía sobre el bienestar de los peces en la acuicultura española – Volumen 1: Conceptos y Generalidades* (Vol. 1). APROMAR.

Barroso, F. G., Trenzado, C. E., Pérez-Jiménez, A., Rufino-Palomares, E. E., Fabrikov, D., & Sánchez-Muros, M. J. (2021). Innovative Protein Sources in Aquafeeds. En J. M. Lorenzo & J. Simal-Gandara (Eds.), *Sustainable Aquafeeds* (pp. 139-184). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780429331664-8

Bocharova, E. S., & Kozevich, I. A. (2011). Modes of reproduction in sea anemones (Cnidaria, Anthozoa). *Biology Bulletin*, *38*(9), 849-860. https://doi.org/10.1134/S1062359011090020/METRICS

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*(1-2). https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

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). En *Frontiers in Marine Science* (Vol. 5, Número MAY). https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00165

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*(C). 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-oxoxidant compounds for colon cancer therapy: A preliminary in vitro study. *Biology*, *10*(2), 1-19. https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10020134

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

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 *The Cnidaria, past, present and Future: The World of Medusa and her Sisters*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4\_24

Chopin, T., Cooper, J. A., Reid, G., Cross, S., & Moore, C. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *4*(4), 209-220. https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2012.01074.X

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 V 3.4 Inhibitor Exerting a Neuroprotective Effect Against Amyloid-β Peptide. *Frontiers in chemistry*, *7*. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00479

Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(2). https://doi.org/10.1128/mmbr.05014-11

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*. https://www.juntadeandalucia.es/servicios/publicaciones/detalle/43547.html

Den Hartog, G. J. M., Haenen, G. R. M. M., Vegt, E., Van der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (2003). Superoxide dismutase: the balance between prevention and induction of oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, *145*(1), 33-39. https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00160-6

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

FAO. (2022a). *Blue Transformation - Roadmap 2022–2030: A vision for FAO’s work on aquatic food systems*. FAO. https://doi.org/10.4060/cc0459en

FAO. (2022b). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. https://doi.org/https://doi.org/10.4060/cc0461es

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, *105*(C), 114-120. 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 2002 26:2*, *26*(2), 149-156. https://doi.org/10.1023/A:1025457831923

Fraser, N., Mangubhai, S., Hall, K., & Scott, A. (2021). Sea anemones in the marine aquarium trade: Market preferences indicate opportunities for mariculture and conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *31*(12), 3594-3606. https://doi.org/10.1002/AQC.3733

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). https://doi.org/10.1093/icb/45.4.595

Goldner, J. (1938). A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *The American journal of pathology*, *14*(2), 237.

Guerrero, S., & Cremades, J. (2012). *Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia.* (C. J. Guerrero S., Ed.). Regional Government of Galicia (Spain). https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00743395

Hodar, A. R., Vasava, R. J., Mahavadiya, D. R., & Joshi, N. H. (2020). Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review. *Journal of Experimental Zoology, India*, *23*(1), 13-21.

Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, *167*(2), 191-194. https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3

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

Lennard, W., Goddek, S., Lennard, W., & Goddek, S. (2019). Aquaponics: The Basics. En S. Goddek, A. Joyce, B. Kotzen, & G. M. Burnell (Eds.), *Aquaponics Food Production Systems* (pp. 113-143). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6\_5

Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. En *Annual Review of Physiology* (Vol. 68). https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001

Mallien, C., Porro, B., Zamoum, T., Olivier, C., Wiedenmann, J., Furla, P., & Forcioli, D. (2017). Conspicuous morphological differentiation without speciation in Anemonia viridis (Cnidaria, Actiniaria). *https://doi.org/10.1080/14772000.2017.1383948*, *16*(3), 271-286. https://doi.org/10.1080/14772000.2017.1383948

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

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). https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038

Nissar, S., Bakhtiyar, Y., Arafat, M. Y., Andrabi, S., Mir, Z. A., Khan, N. A., & Langer, S. (2023). The evolution of integrated multi-trophic aquaculture in context of its design and components paving way to valorization via optimization and diversification. *Aquaculture*, *565*, 739074. https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.739074

Otero, M. M. (María del M., Numa, C. (Catherine), Bo, M. (Marzia), Orejas, C. (Covadonga), Garrabou, J. (Joaquim), Cerrano, C. (Carlo), Kružić, P. (Petar), Antoniadou, C. (Chryssanthi), Aguilar, R. (Ricardo), Kipson, S. (Silvija), Linares, C. (Cristina), Terrón-Sigler, A. (Alejandro), Brossard, J. (Justine), Kersting, D. (Diego), Casado-Amezúa, P. (Pilar), García, S. (Silvia), Goffredo, S. (Stefano), Ocaña, Ó. (Óscar), Caroselli, E. (Erik), … Cattaneo-Vietti, R. (Riccardo). (2017). Overview of the conservation status of Mediterranean anthozoans. En *Overview of the conservation status of Mediterranean anthozoa*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.RA.2.EN

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*. 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 Aβ1–42 oligomers by restoring [Ca2+]i transients and ER Ca2+ signaling. *Toxins*, *13*(1). https://doi.org/10.3390/TOXINS13010020

Plantivaux, A., Furla, P., Zoccola, D., Garello, G., Forcioli, D., Richier, S., Merle, P. L., Tambutté, É., Tambutté, S., & Allemand, D. (2004). Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(8). https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.043

Porro, B., Mallien, C., Hume, B. C. C., Pey, A., Aubin, E., Christen, R., Voolstra, C. R., Furla, P., & Forcioli, D. (2019). The many faced symbiotic snakelocks anemone (Anemonia viridis, Anthozoa): host and symbiont genetic differentiation among colour morphs. *Heredity 2019 124:2*, *124*(2), 351-366. https://doi.org/10.1038/s41437-019-0266-3

Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P. L., & Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, *208*(2). 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). https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00049-7

Richier, S., Sabourault, C., Courtiade, J., Zucchini, N., Allemand, D., & Furla, P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, Anemonia viridis. *FEBS Journal*, *273*(18). https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05414.x

Rodríguez, E., Fautin, D., & Daly, M. (2023). *WoRMS - World Register of Marine Species - Anemonia sulcata (Pennant, 1777)*. https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231858#sources

Rosset, S. L., Oakley, C. A., Ferrier-Pagès, C., Suggett, D. J., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2021). The Molecular Language of the Cnidarian–Dinoflagellate Symbiosis. *Trends in Microbiology*, *29*(4), 320-333. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.08.005

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. En *Neuroendocrinology Letters* (Vol. 23, Número 2).

Utrilla, O., Castro-Claros, J. D., Urra, 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*(8). https://doi.org/10.1007/s00227-019-3558-5

Watson, G. J., & Younger, J. (2022). Developing anemone aquaculture for the marine aquarium trade: A case study using the bubble-tip anemone Entacmaea quadricolor. *Aquaculture Research*, *53*(7), 2697-2707. https://doi.org/10.1111/ARE.15786

Weil, E., Weil-Allen, A., Weil, A., Weil, E., Weil-Allen, · A, & Weil, A. (2019). *Coral and Cnidarian Welfare in a Changing Sea*. 123-145. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13947-6\_6