

ACTAS DEL
XV

CONGRESO NACIONAL Y
I CONGRESO IBÉRICO DE
ACUICULTURA

CASA COLÓN 13/16 OCTUBRE
HUELVA 2015
ACUICULTURA, CULTIVANDO EL FUTURO



ORGANIZAN:



Sociedad
Española de
Acuicultura



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

ACTAS DEL
XV CONGRESO NACIONAL
Y
I CONGRESO IBÉRICO DE ACUICULTURA

"ACUICULTURA, CULTIVANDO EL FUTURO"

Huelva, 13-16 de octubre de 2015

Gastroenteritis por <i>Vibrio parahaemolyticus</i> : problema emergente de salud pública en Chile durante el periodo 2013-2014 <i>J. Quiroga</i>	326
Evaluación del estado zoonosario del berberecho común, <i>Cerastoderma edule</i> (L.) en cultivo suspendido en la Ría de Vigo <i>J.J. Rodríguez et al.</i>	328
Genética y genómica	
<i>Comunicaciones orales</i>	
Apolipoproteína D, múltiples genes con distintas funciones en lenguado (<i>Solea senegalensis</i>) <i>J. Román-Padilla et al.</i>	332
Evidencias de la existencia de un proto-cromosoma sexual en <i>Solea senegalensis</i> <i>Rebordinos, L. et al.</i>	334
Caracterización genética y primeras estimas de heredabilidad para crecimiento en lenguado senegalés <i>M. Manchado et al.</i>	336
Diferencias notables en la expresión génica y la morfología de la piel lesionada entre rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>) y coruxo (<i>Scophthalmus rhombus</i>) <i>J. Estêvão et al.</i>	338
Evolución de indicadores genéticos y de crecimiento en <i>Sparus aurata</i> , bajo presión de selección en condiciones de cultivo intensivo (PROGENSA) <i>J. M. Afonso et al.</i>	340
Jugando con los genes: de la detección a la evaluación funcional de marcadores SNP en genes candidatos para crecimiento en dorada, <i>Sparus aurata</i> L. <i>C. García et al.</i>	342
Obtención de fitoplancton funcional mediante ingeniería genética <i>R. León et al.</i>	344
<i>Paneles</i>	
Potenciales nuevos marcadores sexuales en peces: clonaje, secuenciación y expresión de genes <i>Brd1</i> y <i>Tert</i> en la lubina, <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>M. Ubeda-Manzanaro et al.</i>	346
Identificación de parentales en merluza europea (<i>Merluccius merluccius</i>) mediante análisis de microsatélites <i>J.M. Martínez et al.</i>	348
Uso del ensayo del cometa para evaluar el daño oxidativo inducido por ácido ocaidaico en hemocitos de mejillón <i>M. V. Prego-Faraldo et al.</i>	350
Estudio de variabilidad genética de tres stocks de reproductores de corvina utilizando marcadores microsatélites <i>M. Manchado et al.</i>	352
Genotipado de polimorfismos mediante High Resolution Melting (HRM) en poblaciones naturales de ostras con alto valor comercial, <i>C. angulata</i> y <i>C. gigas</i> , de la costa atlántica europea <i>I. Cross et al.</i>	354
Establecimiento de cultivos celulares en híbridos de esturión <i>Acipenser naccarii</i> x <i>Acipenser baerii</i> <i>F. Robles et al.</i>	356
Estudio de diversidad genética y diferenciación poblacional en la coquina <i>Donax trunculus</i> mediante el marcador mitocondrial 16S <i>J. Fernández-Pérez et al.</i>	358

Detección de QTL para deformidades esqueléticas en dorada (<i>Sparus aurata</i>) <i>R. Ginés et al.</i>	360
Análisis comparativo de la variabilidad genética de dos poblaciones de mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) y su implicación en el cultivo <i>R. de la Herrán et al.</i>	362
Inmunología y proteómica	
<i>Comunicaciones orales</i>	
Efectos de la administración en dieta de la semilla de la alholva (<i>Trigonella foenum graecum</i>) sobre el crecimiento y el estado inmunológico de la dorada (<i>Sparus aurata</i> L.) <i>F.A. Guardiola et al.</i>	366
Alteraciones en las constantes inmunológicas del mucus como indicativas de estrés de cultivo en la trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) <i>S. García-Mesa et al.</i>	368
Vacunas DNA frente a nodavirus. Administración oral y transferencia materna para proteger los estadios larvarios más vulnerables de lubina <i>Y. Valero et al.</i>	370
Estimulación de la respuesta citotóxica en cerebro y gónada de lubina tras una infección con nodavirus <i>Y. Valero et al.</i>	372
<i>Paneles</i>	
Diferencias sexuales en la respuesta inmune innata de la gónada en lubinas <i>E. Chaves-Pozo et al.</i>	374
Variaciones de la bioquímica sanguínea y estado oxidativo e inmunológico del plasma ante el cultivo de alta densidad en trucha y esturión <i>S. García-Mesa et al.</i>	376
Componentes inmunitarios humorales y caracterización físico-química del moco de la piel del lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i> , Kaup) <i>F.A. Guardiola et al.</i>	378
Inducción de las proteínas Mx por interferón tipo I en células de dorada y de trucha <i>J. Béjar et al.</i>	380
Diversificación	
<i>Comunicaciones orales</i>	
Un meta-análisis sobre el crecimiento de las paralarvas de pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>) alimentadas con diferentes presas vivas <i>D. Garrido et al.</i>	384
Metabolismo lipídico en paralarvas de pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>). Implicaciones en la alimentación de las paralarvas <i>D.B. Reis et al.</i>	386
Predación en paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> : efecto del color del tanque, tipo de luz y tipo de presa <i>J. Estefanell et al.</i>	388
Efecto de la dieta sobre el proteoma de paralarvas de <i>Octopus vulgaris</i> <i>I. Varó et al.</i>	390
Estimación de la edad y determinación del perfil de ácidos grasos en paralarvas salvajes de pulpo común (<i>Octopus vulgaris</i>) <i>D. Garrido et al.</i>	392

Establecimiento de cultivos celulares en híbridos de esturión *Acipenser naccarii* x *Acipenser baerii*

F. Robles¹, J.L. Cortés², E. Tamayo¹, R. Navajas-Pérez¹, R. de la Herrán¹ y C. Ruiz Rejón¹

¹ Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada. E-mail: frobles@ugr.es

² Eppendorf Ibérica S.L.U. Avda. Tenerife 2, 28703 San Sebastián de los Reyes, Madrid

Abstract

The main objective of this study is to compare the influence of different variables on the viability of different tissues of a hybrid between *Acipenser naccarii* x *Acipenser baerii*. The first variable that we have changed for this study is the temperature, which has been set at 37°C. The second variable we have modified during the study has been the culture medium, we have used two alternative medium, IMDM and DMEM in order to check its influence on cell growth. Finally, the third variable to be considered was the use of different types of tissue, such as, liver, nerve, gonad and heart tissue.

Resumen

El objetivo principal del presente estudio es contrastar la influencia de diversas variables sobre la viabilidad del cultivo celular procedente de cuatro tejidos de un híbrido de esturión entre las especies *Acipenser naccarii* x *Acipenser baerii*. La primera variable que se ha tenido en cuenta es la temperatura, que ha sido establecida a 37°C. La segunda variable ha sido el medio de cultivo utilizado, probando dos medios alternativos (IMDM y DMEM) con la finalidad de comprobar si existen diferencias en el crecimiento celular. La última variable ha sido el origen de los tejidos utilizados: hepático, nervioso, gonadal y cardíaco.

Justificación

En la actualidad, existen cultivos de diversas líneas celulares para numerosas especies de peces, muchas de ellas son utilizadas rutinariamente para la diagnosis y estudio de enfermedades infecciosas que suelen afectar a los peces cuando se cultivan de forma intensiva (Lakra *et al.*, 2011). Asimismo, las líneas celulares pueden aplicarse a estudios de ecotoxicología, carcinogénesis, regulación y expresión génica así como a estudios de replicación y reparación de ADN. En contraste con los cultivos celulares de mamíferos y aves, los cultivos celulares de peces usualmente son desarrollados a temperaturas menores de 30°C y, en muchos casos, temperaturas menores de las óptimas no impiden el crecimiento celular (Bols *et al.*, 2005). Hoy en día, sólo existen dos líneas celulares establecidas para esturiones: una de tejido cardíaco del esturión *Acipenser oxyrinchus* (Li *et al.*, 1985) y otra de aleta del híbrido entre *Huso huso* y *A. ruthenus* (Hedrick, 1991). Por otro lado, se vienen realizando diversos estudios para determinar las condiciones óptimas de cultivo para células de otras especies de esturiones, como en *A. baerii* (Ciba *et al.*, 2008), en *A. oxyrinchus* (Grunow *et al.*, 2011) y *A. transmontanus* (Huynh *et al.*, 2011).

El propósito de este trabajo es optimizar las condiciones de cultivo primario para el crecimiento celular del esturión híbrido entre las especies *Acipenser naccarii* (Bonaparte 1836) y *Acipenser baerii* (Brandt 1869) en cuatro tejidos (corazón, hígado, gónada y cerebro).

Material y métodos

Los ejemplares de esturión híbrido *A. naccarii* x *A. baerii* fueron obtenidos de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Granada, España). Se tomaron biopsias de gónada, hígado, corazón y de cerebro, y las muestras de cada tipo de tejido fueron colocadas como explante en placas adherentes de cultivo de 35 mm conteniendo 3 ml de medio. Los medios de cultivo utilizados en este trabajo han sido IMDM y DMEM (Gibco) y eran reemplazados cada 3-4 días. El mantenimiento de los cultivos se ha realizado en una estufa de dióxido de carbono, con un porcentaje establecido al 4% y a 37°C. El crecimiento celular fue controlado mediante observación en microscopio óptico invertido (Motic AE31) y fotografiado.

Resultados y discusión

En ambos medios de cultivo el índice de crecimiento fue similar para todos los tejidos analizados. El medio DMEM se emplea fundamentalmente para la diferenciación celular y numerosos estudios han demostrado buenos resultados en cultivos celulares de esturión (Grunow *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). El medio IMDM es una variante enriquecida del anterior y es la primera vez que se ha utilizado en cultivos de células de esturión, obteniendo buenos resultados.

Nuestros resultados demuestran que la temperatura de cultivo celular, al menos en este híbrido de esturión *A. naccarii* x *A. baerii*, no está limitada por la temperatura a la cual se crían los peces, ya que esta se encuentra alrededor de los 15-16°C, muy por debajo de la utilizada en este estudio para el cultivo celular (37°C).

También, esta elevada temperatura es más alta que la encontrada hasta ahora en diferentes estudios realizados en cultivos celulares de esturiones, donde el rango de temperaturas óptimas varía entre los 15-18°C de *A. transmontanus* (Hedrick, 1991) y la más alta de 28°C en el caso de las especies *A. naccarii* (Viegas *et al.*, 2010) y *A. baerii* (Kim *et al.*, 2014).

El crecimiento celular comenzó en las 24 horas siguientes a la siembra de los explantes en el medio y a partir de los bordes del tejido.

Así, los tejidos hepático y cardíaco crecen en forma de monocapa. En el cultivo hepático, a los once días, se puede reconocer un único tipo celular, con una morfología más o menos redondeada. La formación de una monocapa es habitual en el cultivo de hepatocitos de otros peces, así en *Cyprinus carpio* se puede observar esta disposición a los cuatro días de cultivo (Bickley *et al.*, 2009). En el cultivo de células cardíacas, a los siete días, son reconocibles al menos tres tipos celulares diferentes en morfología: células redondas y opacas de mayor o menor tamaño y células ovaladas de mayor tamaño y relativamente abundantes en el tejido.

En gónada y cerebro el crecimiento se produce o bien en células individuales o formando pequeños agregados. A los siete días de cultivo de las células de gónada se pueden identificar cuatro tipos celulares diferentes: células con forma elíptica de tamaño intermedio y aisladas, células de gran tamaño con un núcleo prominente y de aspecto granuloso, células de pequeño tamaño circulares y aisladas, y células con aspecto irregular. En el caso del tejido cerebral, a la semana de encontrarse en cultivo se pueden diferenciar morfológicamente dos tipos celulares en nuestro cultivo primario: por un lado, células opacas de morfología redondeada y otras células prácticamente translúcidas.

Bibliografía

- Bols, N.C., V.R Dayeh, L.E.J Lee y K. Schirmer. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes. Environmental toxicology*. Elsevier, Amsterdam. T.P. Mommsen y T.W. Moon (Eds.) 6: 43–84.
- Ciba P., S. Schickanz, E. Anders, E. Siegl, A. Stielow, E. Klink y C. Kruse. 2008. Long-term culture of a cell population from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. *Fish physiology and biochemistry* 34: 367–372.
- Grunow, B., S. Noglick, C. Kruse y M. Gebert. 2011. Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* and optimization of culture conditions. *Aquatic Biology* 14: 67–75.
- Hedrick, R.P., T.S. McDowell, R. Rosemark, D. Aronstein y C.N. Lannan. 1991. Two cell lines from White Sturgeon. *American fisheries Society* 120: 528-534.
- Huynh, K.T., D.W. Baker, R. Harris, J. Church y C.J. Brauner. 2011. Capacity for intracellular pH compensation during hyperapnia in White sturgeon primary liver cells. *Journal of Comparative Physiology B* 181: 893-904.
- Kim, M.S., Y.K. Nam, C. Park, H.W. K, J. Ahn, J.M. Lim y S.P. Gong. 2014. Establishment condition and characterization of heart-derived cell culture in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 50: 909-917.
- Lakra W.S., T.R. Swaminathan y K.P. Joy. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 1-20.
- Li, M., V. Marrayatt, C. Annand y P. Odense. 1985. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology* 63: 2867-2874.
- Viegas, C.S.B., N. Conceição, C. Fazenda, D.C Simes y M.L. Cancela. 2010. Expression of Gla-rich protein (GPR) in newly developed cartilage-derived cell cultures from sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Journal of Applied Ichthyology* 26: 214-218.

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Domezain, de la Piscifactoría Sierra Nevada, por suministrarnos el material. A la Dra. Nieves Rodríguez, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada por sus recomendaciones. A las doctoras María José Rosales Lombardo y Clotilde Marín Sánchez del Departamento de Parasitología de la UGR, por brindarnos los medios necesarios para realizar este trabajo. Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Investigación de Excelencia P07-CVI-03296. Junta de Andalucía, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa.



ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES EN HÍBRIDOS DE ESTURIÓN *ACIPENSER NACCARII* X *ACIPENSER BAERII*



F. Robles¹, J.L. Cortés², E. Tamayo¹, R. Navajas-Pérez¹, R. de la Herrán¹ y C. Ruiz Rejón^{1*}

¹Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Avda. Fuentenueva s/n, 18071, Granada. carmelo@ugr.es*

²Eppendorf Ibérica S.L.U. Avda. Tenerife 2, 28703 San Sebastián de los Reyes, Madrid.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen cultivos de diversas líneas celulares para numerosas especies de peces. Muchas de ellas son utilizadas rutinariamente para la diagnosis y el estudio de enfermedades infecciosas que suelen afectar a los peces cuando se cultivan de forma intensiva (Lakra *et al.*, 2011). Asimismo, las líneas celulares pueden aplicarse a estudios de ecotoxicología, carcinogénesis, regulación y expresión génica, así como a estudios de replicación y reparación de ADN. En contraste con los cultivos celulares de mamíferos y aves, los cultivos celulares de peces usualmente son desarrollados a temperaturas menores de 30°C lo que en muchos casos, no impiden el crecimiento celular (Bols *et al.*, 2005). Hoy en día, sólo existen dos líneas celulares establecidas para esturiones: una de tejido cardíaco del esturión *Acipenser oxyrinchus* (Li *et al.*, 1985) y otra de tejido muscular procedente de aleta del híbrido *Huso huso* x *A. ruthenus* (Hedrick, 1991). Por otro lado, se vienen realizando diversos estudios para determinar las condiciones óptimas de cultivo para células de otras especies de esturiones, como en *A. baerii* (Ciba *et al.*, 2008), en *A. oxyrinchus* (Grunow *et al.*, 2011) y *A. transmontanus* (Huynh *et al.*, 2011). El propósito de este trabajo es optimizar las condiciones de cultivo primario para el crecimiento celular del esturión híbrido entre las especies *Acipenser naccarii* (Bonaparte 1836) y *Acipenser baerii* (Brandt 1869) en cuatro tejidos (corazón, hígado, gónada y cerebro).



Fig. 1: Ejemplar de esturión híbrido *A. naccarii* x *A. baerii*.



Fig. 2: Corte longitudinal de cabeza de esturión para tomar una muestra de cerebro.

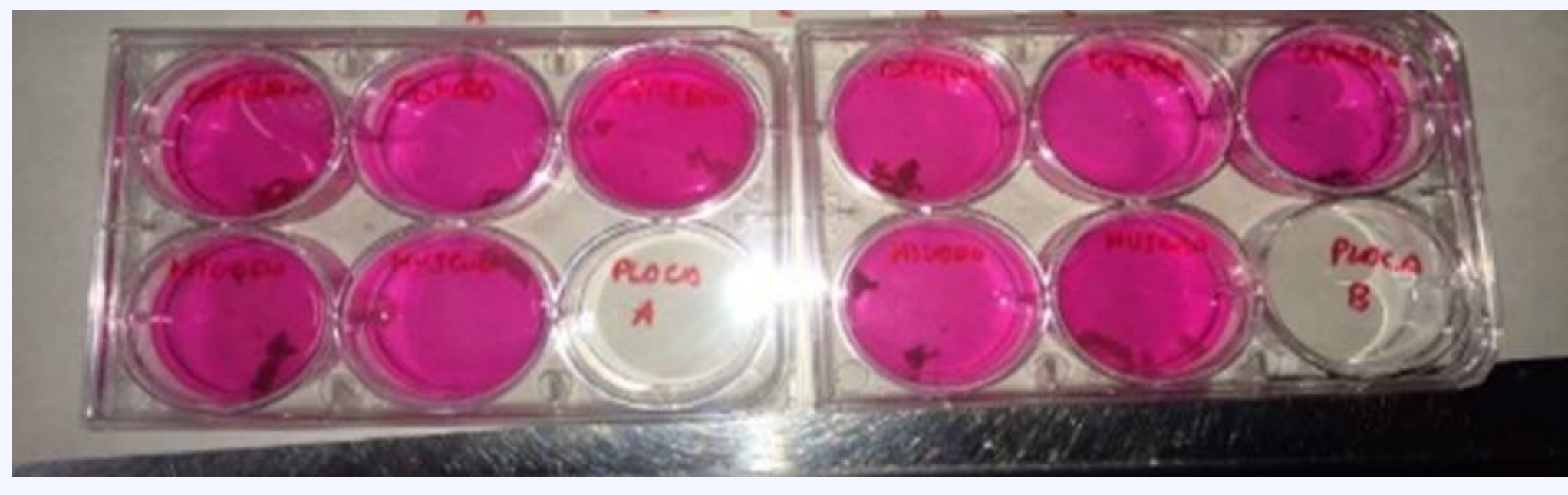


Fig. 3: Placas con explantes de los distintos tejidos en dos medios de cultivos, placa A con IMDM y placa B con DMEM (Gibco).

TEJIDO	HÍGADO	CEREBRO	CORAZÓN	GÓNADA
SEMANA 1	+	+	+	+
SEMANA 2	+	+	+	+
SEMANA 3	+	+	+	+
SEMANA 4	+	+	+	+
SEMANA 5	-	+	-	+
SEMANA 6	-	-	-	-

Tabla 1: Semanas de viabilidad de los cultivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de esturión híbrido *A. naccarii* x *A. baerii* (Fig. 1), de aproximadamente 2 años de edad, fueron obtenidos de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Se tomaron muestras de gónada, hígado, corazón y de cerebro (Fig. 2), y las muestras de cada tipo de tejido fueron colocadas como explante en placas adherentes de cultivo de 35 mm conteniendo 3 ml de medio (Fig. 3). Los medios de cultivo utilizados en este trabajo han sido IMDM y DMEM y eran reemplazados cada 3-4 días. El mantenimiento de los cultivos se ha realizado en una estufa de dióxido de carbono, con un porcentaje establecido al 4% y a 37°C. El crecimiento celular fue controlado mediante observación en microscopio óptico invertido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

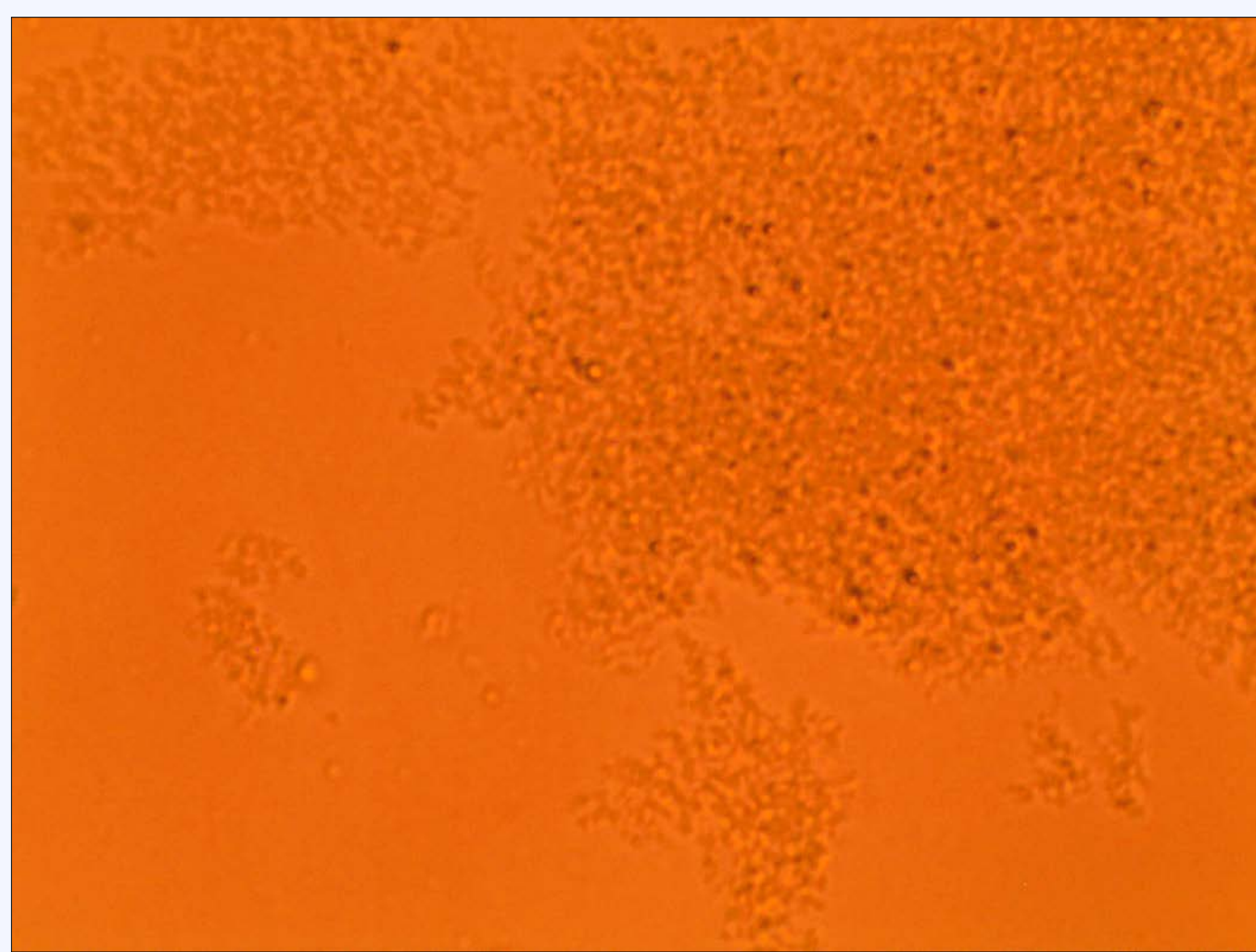
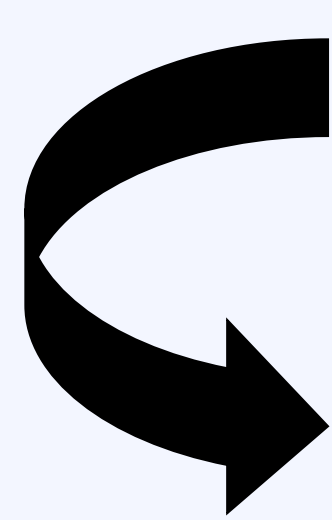
En ambos medios de cultivo el índice de crecimiento fue similar para todos los tejidos analizados. El medio DMEM se emplea fundamentalmente para la diferenciación celular y en anteriores estudios se ha obtenido buenos resultados en cultivos celulares de esturión (Grunow *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). El medio IMDM es una variante enriquecida del anterior y es la primera vez que se ha utilizado en cultivos de células de esturión, obteniendo idénticos resultados.

Una primera conclusión de este estudio es que la temperatura de cultivo celular (37°C), al menos en este híbrido de esturión *A. naccarii* x *A. baerii*, no está relacionada con la temperatura a la cual se crían los peces (alrededor de los 15-16°C), muy por debajo de la anterior.

La Tabla 1 recoge un resumen de la viabilidad celular de los distintos tejidos analizados a lo largo de este trabajo.

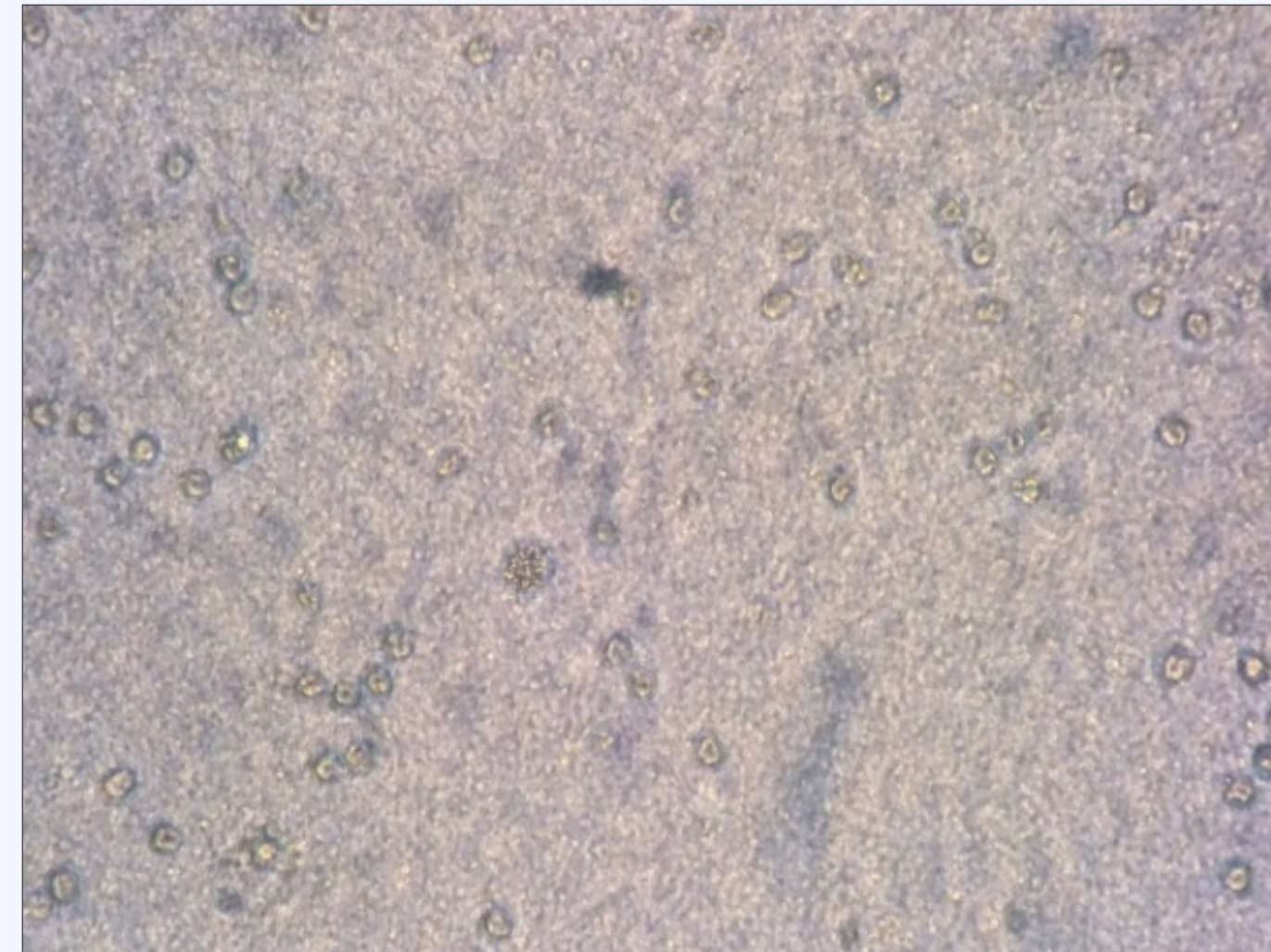
Las células de cerebro crecen de forma aislada, las de gónada en forma de agregados y por último, los tejidos hepático y cardíaco crecen en forma de monocapa. La formación de una monocapa es habitual en el cultivo de hepatocitos de otros peces, como el caso de *Cyprinus carpio* a los cuatro días de su cultivo (Bickley *et al.*, 2009).

Resultados obtenidos en los distintos cultivos a las 48 horas. Imágenes del Microscopio óptico invertido para cada tipo de tejido. Objetivo 10x.



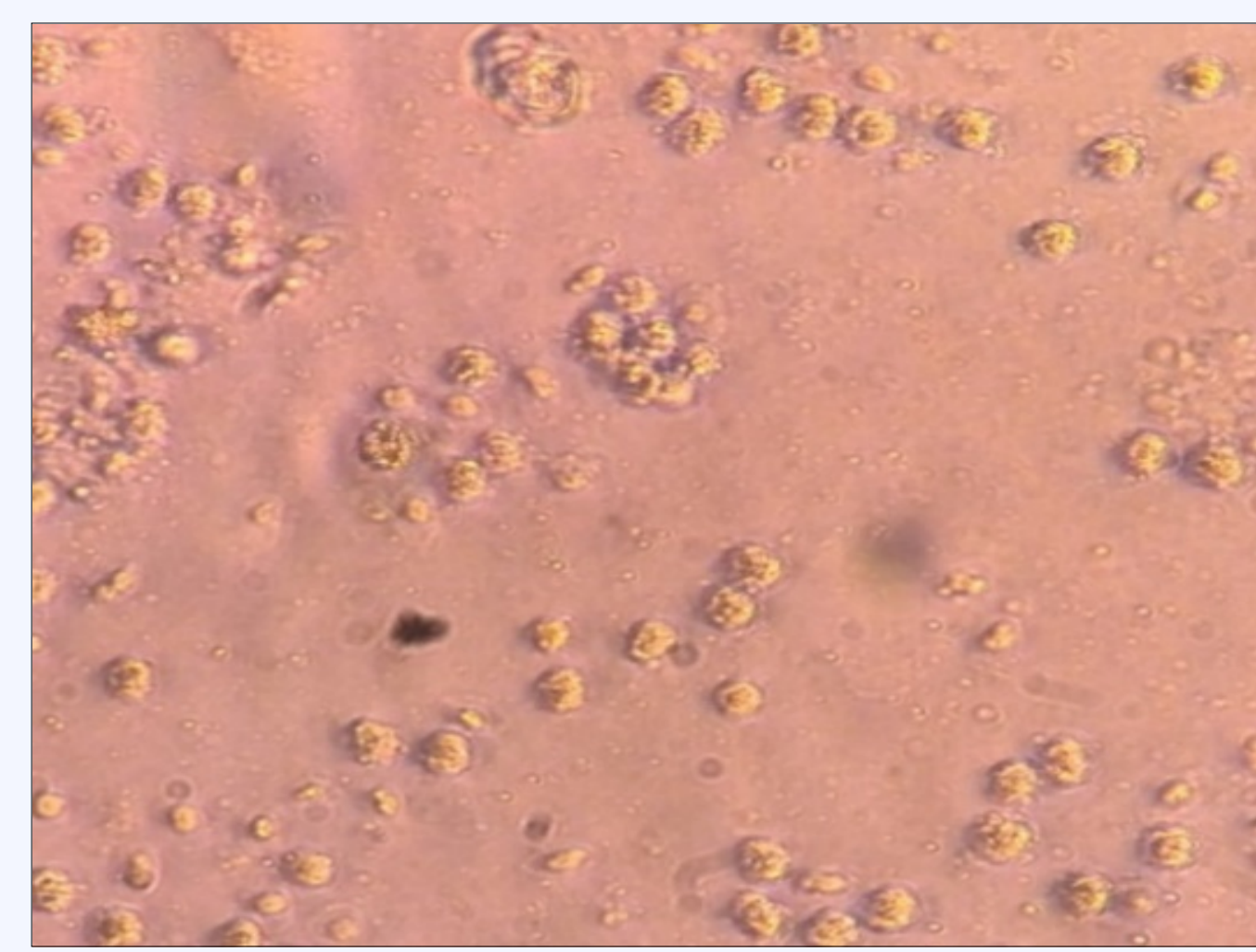
HÍGADO

Células dispuestas en monocapa.
Una única forma celular.



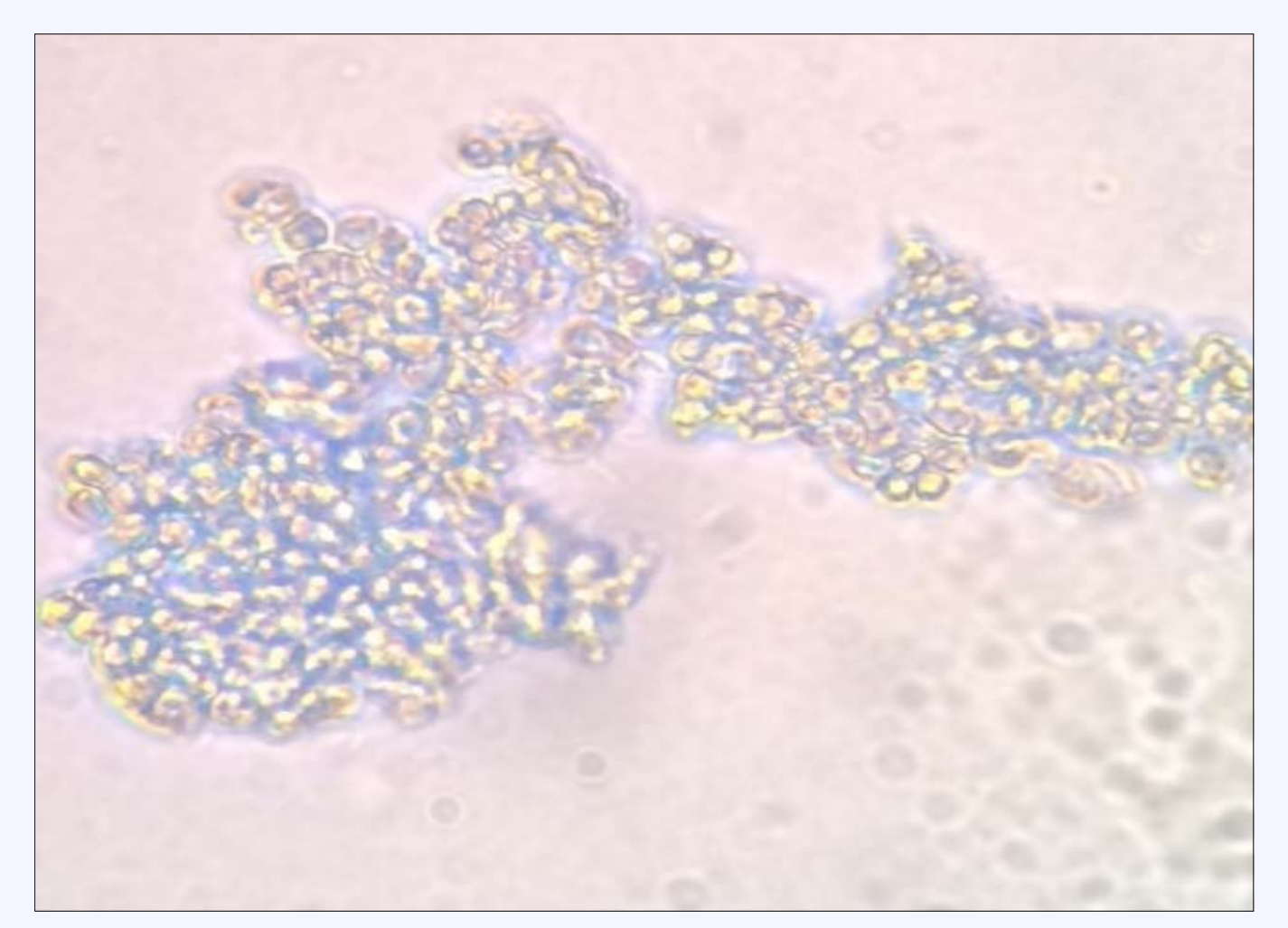
CORAZÓN

Células dispuestas en monocapa.
Tres formas celulares.



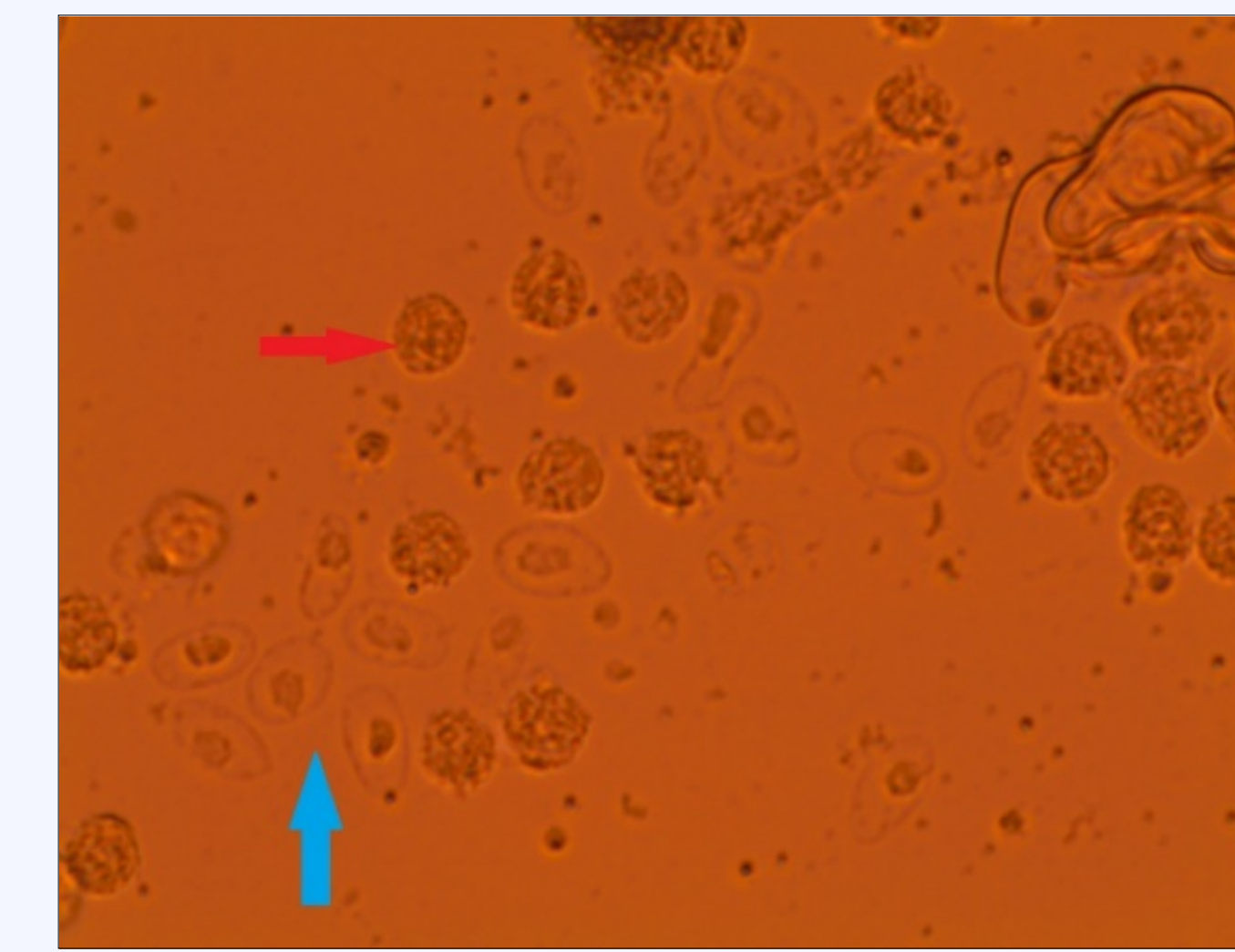
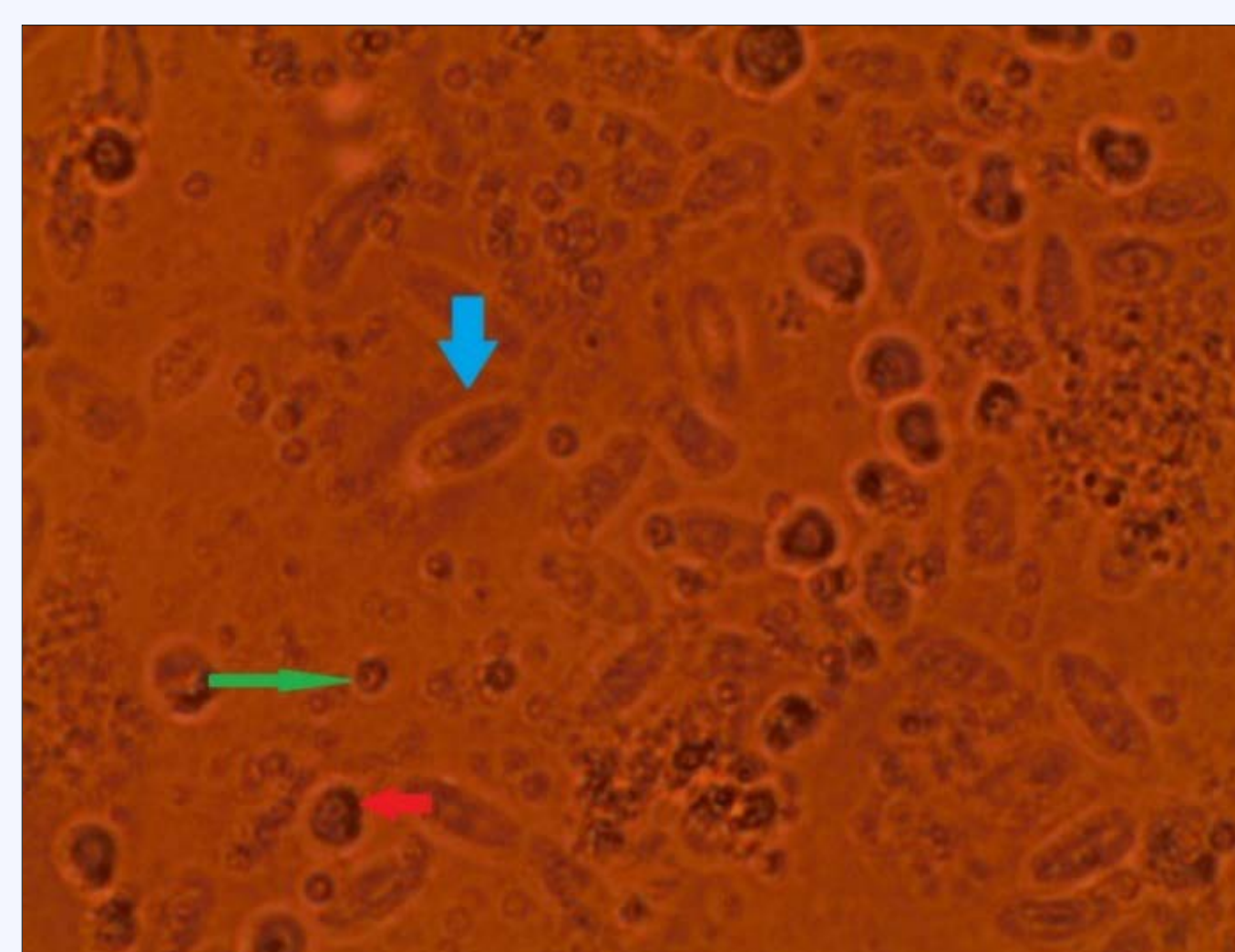
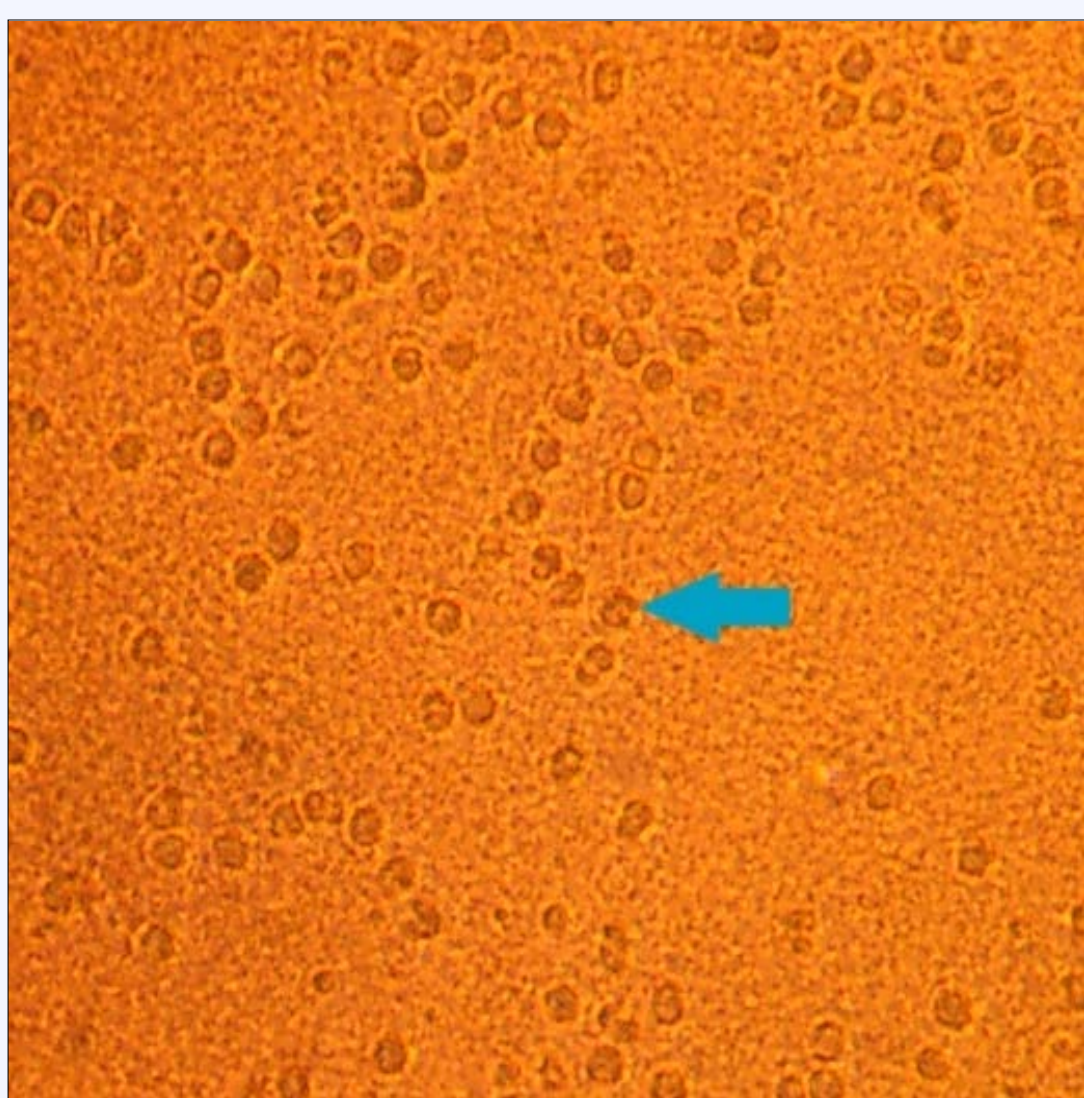
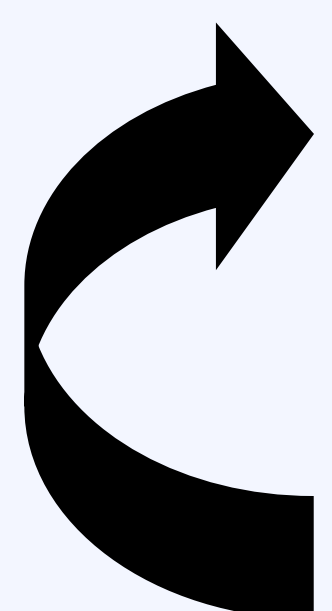
CEREBRO

Células crecen aisladas.
Dos formas celulares.



GÓNADA

Células crecen agregadas.
Tres formas celulares.



Resultados obtenidos en los distintos cultivos a los 7 días. Imágenes del Microscopio óptico invertido para cada tipo de tejido. Objetivo 40x.

REFERENCIAS

- Bols, N.C., V.R Dayeh, L.E.J Lee y K. Schirmer. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Pisciculture cell lines in environmental toxicology. En: Biochemistry and molecular biology of fishes. Environmental toxicology. Elsevier, Amsterdam. T.P. Mommsen y T.W. Moon (Eds.) 6: 43-84.
- Ciba P., S. Schickantz, E. Anders, E. Siegl, A. Stielow, E. Klink y C. Kruse. 2008. Long-term culture of a cell population from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. Fish Physiol Biochem 34: 367-372.
- Grunow, B., S. Noglick, C. Kruse y M. Gebert. 2011. Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* and optimization of culture conditions. Aquat Biol. 14: 67-75.
- Hedrick, R.P., T.S McDowell, R. Rosemark, D. Aronstein y C.N Lannan. 1991. Two cell lines from White Sturgeon. American Fisheries Society. 120: 528-534.
- Huynh, K.T., D.W Baker, R. Harris, J. Church y C.J Brauner. 2011. Capacity for intracellular pH compensation during hyperapnia in White sturgeon primary liver cells. J Comp Physiol B. 181: 893-904.
- Kim, M.S., Y.K Nam, C. Park, H.W K, J. Ahn, J.M Lim y S.P Gong. 2014. Establishment condition and characterization of heart-derived cell culture in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). In vitro Cell. Dev. Biol. 50: 909-917.
- Lakra W.S, T.R Swaminathan y K.P Joy. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. Fish Physiol Biochem 37: 1-20.
- Li, M., V. Marrayatt, C. Annand y P. Odense. 1985. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). Canadian Journal of Zoology 63: 2867-2874.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Domezain, de la Piscifactoría Sierra Nevada, por suministrarnos el material.

A la Dra. Nieves Rodríguez, del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada por sus recomendaciones.

A las doctoras María José Rosales Lombardo y Clotilde Marín Sánchez del Departamento de Parasitología de la UGR, por brindarnos los medios necesarios para realizar este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Investigación de Excelencia P07-CVI-03296. Junta de Andalucía, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa.