

Cronobiología de peces y sus aplicaciones en acuicultura

Jose Fernando López-Olmeda¹, Luisa María Vera² y Francisco Javier Sánchez-Vázquez¹

(1) Departamento de Fisiología Animal, Universidad de Murcia, 30100 Murcia. Email: jflopez@um.es

(2) Institute of Aquaculture, University of Stirling, FK9-4LA Stirling, Reino Unido.

RESUMEN

Al igual que ocurre en mamíferos, los peces presentan ritmos en un gran número de procesos biológicos. El estudio de estos ritmos en peces tiene una gran importancia en investigación básica, ya que nos ayuda a comprender como funcionan sus procesos fisiológicos y como han desarrollado adaptaciones a las condiciones cambiantes en su medio natural. Además, tienen un gran interés en investigación aplicada, sobre todo relacionada con la acuicultura.

1) RITMOS DE ACTIVIDAD Y ALIMENTACIÓN

Los peces no presentan una actividad sostenida durante las 24 horas del día, sino que concentran su actividad locomotora y alimentaria en una fase concreta, presentando patrones de actividad diurnos o nocturnos, en función de que esta mayor actividad se produzca durante el día o la noche, respectivamente. En el caso de la actividad alimentaria, el conocimiento de la fase del día en la que los animales prefieren alimentarse tiene una implicación importante en las piscifactorías, ya que va a permitir a los acuicultores alimentar a los peces en el momento del día óptimo, reduciendo el estrés producido por la alimentación fuera de la fase de actividad y aumentando la eficiencia del alimento. Para conocer los ritmos de alimentación en peces han tenido gran importancia los alimentadores a demanda desarrollados por nuestro grupo de investigación. Estos alimentadores son operados de forma activa por el pez y el aprendizaje de su utilización está basado en un condicionamiento operativo positivo, ya que cada vez que el pez activa el sensor del alimentador se proporciona una recompensa consistente en la liberación de una pequeña cantidad de comida.

El estudio de los ritmos de alimentación también nos permitió describir la existencia de dualismo en varias especies de peces como la lubina (figura 1). El dualismo se define como la capacidad de un animal de presentar actividad diurna o nocturna, pudiendo cambiar de una fase a otra a lo largo de

su ciclo vital. En el caso de la lubina, en condiciones naturales, estas inversiones en su fase de actividad están relacionadas con la época del año, de modo que las lubinas tienen un comportamiento diurno durante la primavera, el verano y parte del otoño, y cambian a un comportamiento nocturno durante el invierno. Estas inversiones estacionales parecen estar ligadas a la reproducción, como veremos más adelante.

2) RITMOS DE REPRODUCCIÓN

La mayoría de las especies de peces presentan ritmos estacionales de reproducción, de modo que se reproducen en una época del año determinada que va a ser específica para cada especie. Por ejemplo, la dorada y la lubina se reproducen en invierno, mientras que el lenguado se reproduce durante la época de primavera y principios de verano. Desde un punto de vista evolutivo, los ritmos estacionales de reproducción proporcionan una gran ventaja adaptativa a estas especies ya que se van a reproducir en el medio natural en una época del año donde las condiciones sean más óptimas para la supervivencia de las crías. El caso de la lubina es además muy interesante porque estos ritmos estacionales de reproducción coinciden con otros ritmos estacionales como son las inversiones de su comportamiento, como comentábamos anteriormente (Figura 1). En las lubinas en el medio natural, además, también coinciden con las migraciones estacionales de esta especie. La lubina, en primavera y verano, suele encontrarse en lagunas costeras, donde hay una gran abundancia de alimento. Durante el otoño, estas lubinas migran a mar abierto, donde se van a reproducir durante los meses de invierno. En esta época se produce la inversión en sus patrones de comportamiento, pasando de diurnas a nocturnas. Después de la reproducción, a finales de invierno, las lubinas migrarán de nuevo a la costa, volviendo a invertir su comportamiento de nocturno a diurno. En acuicultura, el conocimiento de los ritmos estacionales y la época de reproducción de las especies tiene una gran importancia ya que nos va a permitir diseñar protocolos de manipulación del fotoperiodo y la temperatura del agua para optimizar su reproducción en cautividad, un proceso que

normalmente constituye uno de los “cuellos de botella” más importantes.

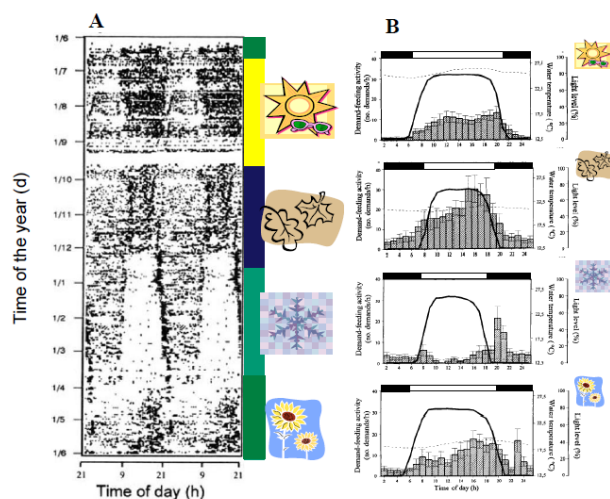


Figura 1. Ritmos estacionales e inversiones en el comportamiento alimentario de la lubina. El comportamiento alimentario se registró mediante comederos a demanda operados por los animales. El actograma de la izquierda de la gráfica (A) representa las demandas de alimento de las lubinas durante un año completo. El actograma se representa de forma doble (escala de 48 horas), de modo que el eje de ordenadas progresa en días sencillos pero cada día se representa dos veces en la gráfica (el día 1 a la derecha de la gráfica se repite en el día 2 a la izquierda). La actividad alimentaria se registró cada 10 minutos, de modo que la altura de cada punto indica el número total de demandas de alimento durante cada intervalo de 10 minutos. A la derecha (B) se han representado unas ondas medias con la media diaria de actividad alimentaria (media $\pm$ D.E.) para cada estación del año (de arriba hacia abajo: verano, otoño, invierno y primavera). Las barras representan la actividad media cada hora, la línea continua indica las variaciones diarias medias de temperatura del agua. Las barras blancas y negras encima de cada onda media representan la duración media para cada estación del día (barras blancas) y la noche (barras negras). Figura modificada de Sánchez-Vázquez et al., *Chronobiology International* (1998).

Junto con los ritmos estacionales, los peces también presentan ritmos diarios de reproducción. El ejemplo más claro son los ritmos de puesta. En general, la puesta de los huevos y la fecundación en peces se produce en la primera mitad de la fase de actividad. Como se puede observar en la figura 2, en el caso del pez cebra la puesta se produce en las primeras horas de la fase de luz, mientras que en el lenguado, la lubina y la dorada se produce durante la fase de oscuridad. Estos ritmos diarios de reproducción y puesta de huevos están controlados por la presencia de ritmos diarios en las hormonas del eje reproductor como la GnRH (hipotálamo), la FSH y LH (hipófisis), y los esteroides sexuales (producidos en las gónadas). Los ritmos diarios de todas estas hormonas son modulados por las condiciones ambientales de luz y temperatura. En las especies con reproducción nocturna como el lenguado y la lubina, la hora a la que se produce la puesta tiene una especial relevancia ya que son especies de gran interés comercial, que se reproducen en cautividad en las empresas de acuicultura. El hecho de conocer el momento

de la puesta de huevos va a permitir una recogida inmediata de las puestas, evitando que los huevos permanezcan durante mucho tiempo en los sistemas de recolección, lo que podría afectar a la calidad.

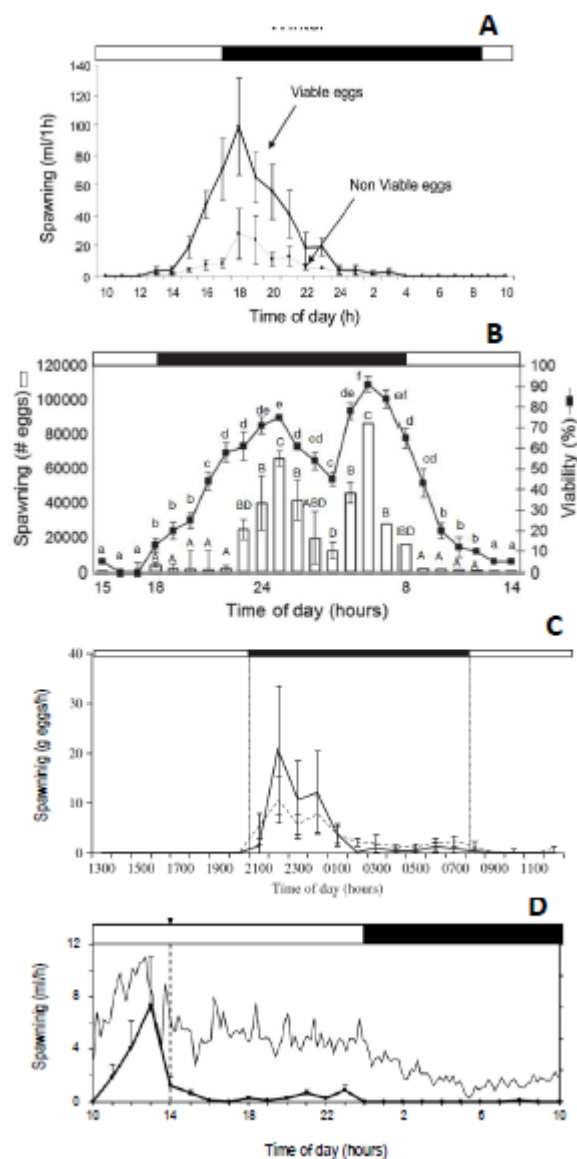


Figura 2. Ritmos de puesta en varias especies de peces teleósteos: dorada (A), lubina (B), lenguado (C) y pez cebra (D). Las barras blancas y negras encima de cada gráfica representan la fase de luz y de oscuridad, respectivamente. El eje de abscisas indica la hora del día. El eje de ordenadas indica la cantidad de la puesta en ml/h (A, D), número de huevos (B), o gramos de huevos/h (C). Figura modificada de Meseguer et al., *Chronobiology International* (2008) (dorada); Villamizar et al., *Aquaculture* (2012) (lubina); Oliveira et al., *Journal of Fish Biology* (2009) (lenguado); y Blanco-Vives & Sánchez-Vázquez, *Physiology & Behavior* (2009) (pez cebra).

3) DESARROLLO TEMPRANO (EMBRIONARIO Y LARVARIO)

Los embriones de peces presentan capacidad fotorreceptora, es decir, capacidad de sentir y transducir la

iluminación exterior, desde los primeros estadios del desarrollo. Además, debido a que son animales ectotermos, su desarrollo está muy influenciado por la temperatura del agua. En condiciones naturales, esa temperatura externa va a presentar variaciones diarias, conocidas como termociclos, de modo que por el día el agua presenta una temperatura más alta que por la noche.

Los embriones y las larvas de pez cebra presentan ritmos diarios de desarrollo y eclosión, de modo que su desarrollo es más rápido en una fase del día determinada, y la eclosión se produce en una fase concreta del día. Estos ritmos van a estar modulados por las variaciones diarias de luz y temperatura. En el caso de los ritmos de eclosión, por ejemplo, en el pez cebra la eclosión se produce a lo largo de la primera mitad de la fase de luz, mientras que en el lenguado se produce al final de la fase de oscuridad (Figura 3 A-B). Si analizamos el desarrollo de los estadios embrionarios, veremos que también aparecen diferencias en función de la hora del día. En el pez cebra, el desarrollo se produce fundamentalmente durante el día, produciéndose una reducción en la tasa de desarrollo durante la fase de oscuridad. En el caso del lenguado ocurre al contrario, apareciendo un desarrollo más rápido durante la fase de oscuridad. Hay que tener en cuenta que el pez cebra es una especie diurna mientras que el lenguado es nocturna, por lo que estos resultados sugieren que los ritmos de desarrollo y eclosión estarían muy relacionados con la fase de actividad de la especie.

En otra serie de experimentos, nuestro laboratorio también ha puesto de manifiesto la importancia de las condiciones de iluminación y la composición de la luz sobre el desarrollo. Como hemos comentado anteriormente, los embriones presentan capacidad fotorreceptora desde los primeros estadios de desarrollo, por lo que se van a ver muy influidos por las características de la luz que reciben. Si analizamos la tasa de crecimiento de larvas de lubina bajo diferentes condiciones de iluminación vemos que las longitudes de onda cortas (azul) son más eficaces e inducen una tasa mayor de crecimiento que las longitudes de onda largas (rojo) (Figura 3C). Esto tiene una explicación evolutiva evidente, ya que sobre todo en los océanos las longitudes de onda corta del visible son las que penetran a mayor profundidad y los peces presentan sobre todo fotopigmentos que captan estas longitudes de onda corta como la melanopsina.

La existencia de un ciclo de luz-oscuridad es también muy importante para un correcto desarrollo. Si sometemos a las larvas de lubina a condiciones de iluminación constantes van a aparecer problemas en el desarrollo. Por ejemplo, las larvas de lubina, lenguado y pez cebra presentan tasas de mortalidad muy elevadas cuando crecen en condiciones de oscuridad constante. En el caso de la luz constante, la tasa de

mortalidad va a ser baja, similar a la que aparece con un ciclo de luz-oscuridad, pero las larvas van a presentar una tasa de aparición de malformaciones mucho más elevada en luz continua que en condiciones normales de luz-oscuridad (Figura 3D).

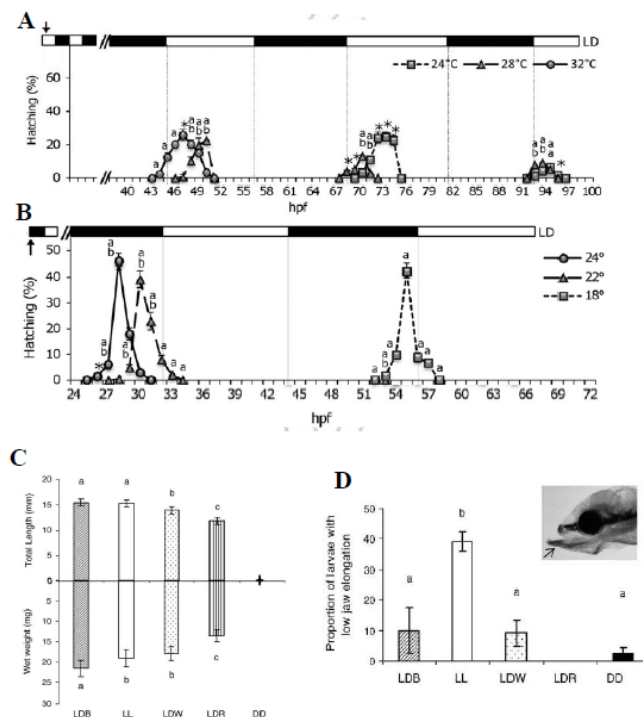


Figura 3. Ritmos de eclosión en larvas de pez cebra (A) y lenguado (B); y efecto de diferentes condiciones de iluminación sobre el crecimiento (C) y la aparición de malformaciones (D) en larvas de lubina. La eclosión (A-B) se representa como porcentaje de nuevas larvas eclosionadas cada 2 horas, a lo largo de los primeros días de desarrollo (expresado en el eje de abscisas como hpf, horas post-fertilización). Los ritmos de eclosión se analizaron en embriones mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad y una temperatura del agua constante. Para cada especie el experimento se realizó utilizando tres temperaturas diferentes: 24, 28 y 32°C para pez cebra; 18, 22 y 24°C para lenguado. Para el estudio de lubina, las larvas se dividieron en cinco grupos bajo condiciones diferentes de iluminación: tres grupos se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad, con una luz de diferente composición para cada grupo, luz azul (LDB), luz roja (LDR) y luz blanca (LDW); otro grupo se mantuvo en condiciones de luz continua (LL) y el último grupo en condiciones de oscuridad continua (DD). A los 40 días de edad se midió la longitud y el peso (C) y la aparición de malformaciones (elongación de la mandíbula) (D). Figura modificada de Villamizar et al., *Aquaculture* (2009), y Villamizar et al., *Chronobiology International* (2013).

Actualmente, en las empresas de acuicultura, es común la utilización de protocolos de mantenimiento de larvas que implican unas condiciones constantes de iluminación. Por ejemplo, las larvas de lubina se mantienen en oscuridad constante los primeros 8-10 días de vida. Para otras especies de peces como por ejemplo el bacalao, se utiliza una iluminación continua. En todos los casos de especies en cultivo, la temperatura del agua se mantiene constante. Por lo tanto, las larvas de peces en acuicultura se

van a desarrollar en unas condiciones ambientales constantes que no tienen nada que ver con lo que ocurre en el medio natural, lo que podría tener un impacto negativo importante sobre las funciones fisiológicas de estos animales cuando son adultos. El caso más claro probablemente sea el del lenguado. Los lenguados adultos capturados del medio natural cuando son juveniles se reproducen en cautividad con relativa facilidad. Sin embargo, los lenguados que nacen en cautividad y se desarrollan en la empresa de acuicultura presentan muchos problemas en su reproducción, lo que parece estar relacionado con las condiciones ambientales constantes presentes durante su desarrollo. Por lo tanto, es muy importante concienciar a las empresas de la importancia de simular las variaciones naturales de luz temperatura.

4) RITMOS DE ESTRÉS

Un problema importante en el cultivo de peces es el del estrés y el bienestar animal. Este estrés puede estar producido por diversos procesos rutinarios en las empresas como la clasificación por tamaño de los peces, el traslado de jaula o la vacunación. Al igual que ocurre con otros procesos, los marcadores fisiológicos de estrés y su respuesta en peces está condicionada por la hora del día a la que se produce dicho estrés. Por ejemplo, centrémonos en lo que ocurre con el cortisol. Ésta es una hormona producida en peces por las células interrenales (en mamíferos es producida en las glándulas suprarrenales), que en condiciones normales juega un papel muy importante en procesos de metabolismo, crecimiento, regulación energética y del equilibrio hidromineral. En condiciones de estrés, el cortisol forma parte de la respuesta primaria del organismo, de modo que se utiliza como uno de los marcadores fisiológicos más importantes de estrés en peces. En condiciones normales, los vertebrados presentan ritmos diarios de secreción de cortisol, con máximos de producción al comienzo de la fase de actividad. Estos picos de cortisol en condiciones normales están muy relacionados con una de las funciones de la hormona, que es la de inducir el despertar y preparar el organismo para afrontar la fase de actividad diaria. Por lo tanto, animales diurnos como los humanos presentan un ritmo de cortisol en sangre con un pico al final de la noche y principio del día, mientras que animales nocturnos como la rata presentan el máximo de cortisol al final del día y comienzo de la noche.

Estos ritmos de cortisol también aparecen en peces y, al igual que en los mamíferos antes descritos, en condiciones normales (sin estrés) están muy relacionados con la fase de actividad de la especie. Por ejemplo, como se puede ver en la figura 4, una especie nocturna como el lenguado presenta los valores más altos de cortisol durante la primera mitad de la noche. Además del cortisol, la glucosa y el lactato se utilizan frecuentemente como marcadores de estrés en peces. Estos

dos metabolitos forman parte de la respuesta secundaria al estrés y, al igual que el cortisol, muestran ritmos diarios en sangre en condiciones normales (figura 4). Por lo tanto, cuando tomamos muestras de sangre para evaluar si los animales están en un estado de estrés o no, hay que tener muy en cuenta los ritmos de los marcadores que vamos a analizar (cortisol, glucosa o lactato) y la hora del día a la que se recogen las muestras. Además, en peces, la respuesta en la secreción de estos marcadores a un estrés agudo por manipulación presenta diferencias en función de la hora del día a la que se aplica dicho estrés. Por ejemplo, en el lenguado, la respuesta es mucho mayor durante el día (fase de reposo) que durante la noche (fase activa) (figura 4D-F). Por lo tanto, otro punto importante a tener en cuenta, sobre todo cuando vamos a aplicar algún procedimiento a los peces que puede ser potencialmente estresante, es intentar realizar ese procedimiento a una hora del día a la que los animales son menos sensibles y el estrés va a ser menor.

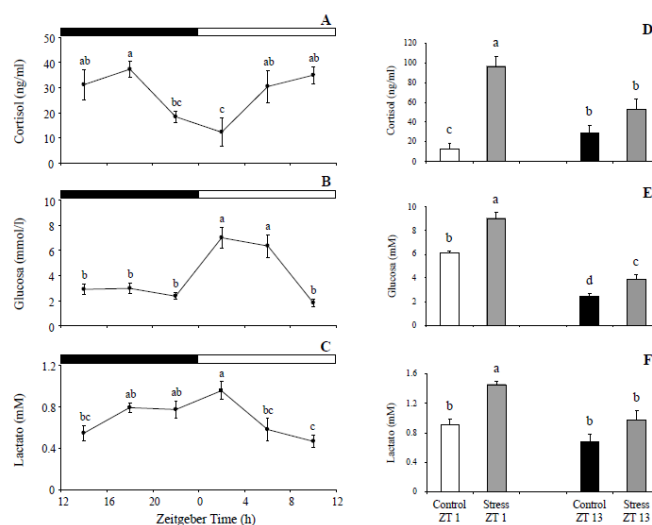


Figura 4. Ritmos de marcadores de estrés e influencia de la hora del día en la respuesta al estrés en lenguado. En un primer experimento, en lenguados mantenidos en condiciones normales (no estresados), se analizó la existencia de ritmos diarios de marcadores de estrés en sangre: cortisol (A), glucosa (B) y lactato (C). Después de constatar la existencia de ritmos en estos marcadores, en un segundo experimento se estudió el efecto de la hora del día a la que se aplica un estrés sobre la respuesta de cortisol (D), glucosa (E) y lactato (F). En la segunda parte del experimento se utilizó un estrés consistente en la exposición al aire de los animales durante 30 segundos. Una hora después del estrés se midieron los marcadores tanto en animales estresados como no estresados (control). El estrés se aplicó a diferentes grupos de lenguados a dos horas distintas del día: 1 hora después del encendido de las luces (ZT 1) y 1 hora después del apagado de las luces (ZT 13). En las gráficas de los ritmos diarios (A-C), las barras blancas y negras sobre las gráficas indican la fase de luz y de oscuridad, respectivamente. Todos los valores están expresados como la media $\pm$ D.E. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, dentro de la misma gráfica. Figura modificada de López-Olmeda et al., Chronobiology International (2013).

5) CRONOTOXICIDAD DE ANESTÉSICOS Y PRODUCTOS TERAPÉUTICOS USADOS EN ACUICULTURA

En acuicultura los peces se exponen con frecuencia a un gran número de compuestos empleados tanto en procedimientos rutinarios como en la prevención y tratamiento de enfermedades, para preservar la salud y el bienestar de los peces en las instalaciones acuícolas. Entre estas sustancias están los antibióticos, antifúngicos, antiparásitos, desinfectantes, vacunas y anestésicos. Normalmente estos compuestos se administran a los peces mediante baños puntuales o también añadidos a la dieta. En ambos casos, los peces se exponen al compuesto activo en un momento preciso del día. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, existe muy poca información acerca de las variaciones temporales en los efectos de estas sustancias, tanto a nivel de su efectividad como en su toxicidad para el pez. No obstante, conocer la hora del día en la que el compuesto terapéutico tenga una efectividad óptima pero los efectos secundarios sean mínimos permitiría mejorar el bienestar de los peces y reducir los costes económicos que se derivan de la toxicidad de estas sustancias para los animales expuestos a ellas. Estos ritmos diarios de toxicidad se deben a su vez a la existencia de ritmicidad en varios sistemas de la fisiología del pez. Por un lado la captación de las sustancias disueltas en el medio acuático puede diferir dependiendo de la hora del día, lo que determina la dosis final absorbida a través de las branquias y por lo tanto una mayor absorción causará unos efectos secundarios más severos. Por otro lado los sistemas encargados del metabolismo y detoxificación de estos compuestos tóxicos también presentan ritmos diarios y circadianos, lo que afecta al intervalo temporal transcurrido entre la absorción y la neutralización y/o eliminación. Y finalmente, los mecanismos de excreción también pueden estar sujetos a ritmos diarios.

Los primeros trabajos sobre cronotoxicidad en peces llevados a cabo en nuestro grupo de investigación se realizaron con anestésicos. Estas sustancias se emplean con mucha frecuencia en acuicultura, con el objetivo de minimizar el estrés de los peces durante numerosos procesos rutinarios, tales como el transporte, la clasificación y la vacunación, entre otros. Por lo tanto, la determinación de la dosis apropiada necesaria en casa situación es una cuestión importante y los efectos de la hora del día no deberían ser menospreciados. En nuestro estudio se investigaron las diferencias en la efectividad y la toxicidad de dos anestésicos, el MS-222 (metanosulfonato de triclaína) y el aceite de clavo (eugenol). La efectividad del MS-222, o tiempo necesario para inducir la anestesia, fue significativamente menor durante el día que durante la noche, tanto en dorada como en pez cebra. En cuanto a la toxicidad de este anestésico, comprobamos que las diferencias día-noche eran paralelas a

las observadas en la efectividad, es decir, para una misma concentración la tasa de mortalidad registrada durante el día era significativamente superior a la observada por la noche. Así, en pez cebra, la exposición durante 15 minutos a 0.73 mM (190 mg/L) de MS-222 causó la mortalidad del 82% de los peces durante el día, mientras que cuando esta exposición se llevó a cabo por la noche la tasa de mortalidad descendió al 14% (Figura 5). En el caso del aceite de clavo se obtuvo resultados similares en pez cebra. Además, en dorada, estas variaciones día-noche se alteraron cuando se manipuló el horario de alimentación de los peces, lo que sugiere que la imposición de un ciclo de comidas periódicas podría ser utilizado para modular los ritmos de efectividad y toxicidad de estos anestésicos.

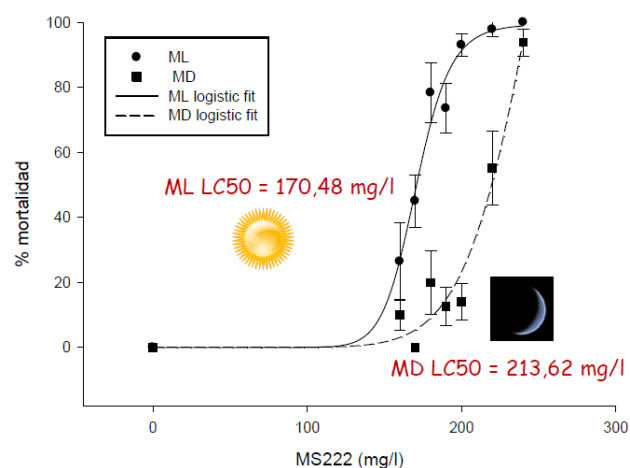


Figura 5. Tasa de mortalidad del pez cebra tras una exposición de 15 min a MS-222 en mitad del día (círculos blancos) o en mitad de la noche (círculos negros). Cada punto representa la media de seis réplicas independientes (8 peces/réplica). Figura modificada de Sánchez-Vázquez et al., *Chronobiology International* (2011).

Actualmente se están llevando a cabo trabajos similares con otros productos terapéuticos empleados en acuicultura, siendo el objetivo final de estas investigaciones la optimización de los procedimientos en acuicultura. La aplicación de estos estudios permitirá diseñar y modificar los protocolos de manejo diario de los peces, en función de la hora del día a la que la efectividad del compuesto de interés es óptima pero teniendo en cuenta la hora del día en que la toxicidad para el pez es mínima y por tanto la tolerancia al tratamiento es mayor.

REFERENCIAS

Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology and Behavior* 98:268-275.

Kulczykowska E, Sánchez Vázquez FJ (2010) Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: Aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research* 41:654-667.

López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ (2010) Feeding rhythms in fish: from behavioural to molecular approach. In: Kulczykowska E, Popek W, Kapoor BG (eds) *Biological clock in fish*. Science Publishers, Enfield, pp 155–184.

López-Olmeda JF, Noble C, Sánchez-Vázquez FJ (2012) Does feeding time affect fish welfare? *Fish Physiology and Biochemistry* 38:143-152.

López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Pujante IM, Wunderink YS, Mancera JM, Sánchez-Vázquez FJ (2013) Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiology International* 30:530-539.

Meseguer C, Ramos J, Bayarri MJ, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ (2008) Light synchronization of the daily spawning rhythms of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) kept under different photoperiod and after shifting the LD cycle. *Chronobiology International* 25:666-679.

Oliveira C, Dinis MT, Soares F, Cabrita E, Pousão-Ferreira P, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole *Solea senegalensis*. *Journal of Fish Biology* 75:61-74.

Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ (2010) Reproduction rhythms in fishes. In: Kulczykowska E, Popek W, Kapoor BG (eds) *Biological clock in fish*. Science Publishers, Enfield, pp 185-216.

Sánchez-Vázquez FJ, Terry MI, Felizardo VO, Vera LM (2011) Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiology International* 28:109-117.

Villamizar N, García-Alcázar A, Sánchez-Vázquez FJ (2009) Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 292:80-86.

Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sánchez-Vázquez FJ (2011) Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. *Aquaculture* 315:86-94.

Villamizar N, Herlin M, López MD, Sánchez-Vázquez FJ (2012) Daily spawning and locomotor activity rhythms of European sea bass broodstock (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 354-355:117-120.

Villamizar N, Blanco-Vives B, Oliveira C, Dinis MT, Di Rosa V, Negrini P, Bertolucci C, Sánchez-Vázquez FJ (2013) Circadian rhythms of embryonic development and hatching in fish: A comparative study of Zebrafish (Diurnal), Senegalese Sole (Nocturnal), and Somalian Cavefish (Blind). *Chronobiology International* 30:889-900.