



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización y análisis de expresión tisular de los
receptores de potencial transitorio sensibles a vaniloides
(TRPVs) en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*).

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Fernández Simó, Alejandro

Tutor/a: Asturiano Nemesio, Juan Francisco

Cotutor/a: Morini, Marina Ange Marie

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

--- Trabajo Fin de Grado de Biotecnología ---

Caracterización y análisis de expresión tisular de los receptores de potencial transitorio sensibles a vaniloides (TRPVs) en lubina europea (Dicentrarchus labrax).

Alumno: Alejandro Fernández Simó

Tutor: Dr. Juan F. Asturiano

Co-tutor: Dra. Marina Morini

Curso académico: 2022/2023

Valencia, 03 de julio de 2023



Caracterización y análisis de expresión tisular de los receptores de potencial transitorio sensibles a vaniloides (TRPVs) en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*).

RESUMEN

En el contexto actual del cambio climático, es necesario generar conocimientos básicos sobre los mecanismos fisiológicos implicados en la integración, regulación y respuesta de los seres vivos al ecosistema. La superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRPs) constituye un grupo de proteínas de superficie multifuncional involucradas en diversas funciones fisiológicas, incluyendo la sensibilidad y detección de estímulos mecánicos y térmicos entre otros. Dentro de esta familia, los TRP de la subfamilia vaniloide (TRPV) han demostrado su importancia en la termodetección, la percepción del dolor y la regulación osmótica.

Por ello, este trabajo se centra en la caracterización y análisis de expresión tisular de las secuencias de TRPVs en machos y hembras de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), seleccionada debido a su importancia en la acuicultura mediterránea.

Se han descrito 4 parálogos, así como analizado su expresión, ubicada en los tejidos estudiados, y que ha sido muy elevada en el corazón y cerebro, muy relevantes en el periodo de adaptación al medioambiente, y, además, se han establecido diferencias de expresión entre sexos, principalmente en sus gónadas y órganos sensoriales.

Este trabajo se relaciona con el Objetivo de Desarrollo Sostenible 14, Vida Submarina.

PALABRAS CLAVE: acuicultura mediterránea; BLAST; qPCR; respuestas fisiológicas; *screening*; termosensación; TRPV.

Autor TFG: D. Alejandro Fernández Simó.

Localidad y fecha: Valencia, 03 de julio de 2023

Tutor Académico: Dr. Juan F. Asturiano y Dra. Marina Morini

Characterization and tissue expression analysis of transient receptor potential vanilloid (TRPV) ion channel family in European seabass (*Dicentrarchus labrax*).

ABSTRACT

In the current context of climate change, it is necessary to generate basic knowledge about the physiological mechanisms involved in the integration, regulation, and response of living beings to the ecosystem. The superfamily of transient receptor potential (TRP) receptors constitutes a group of multifunctional surface proteins involved in various physiological functions, including sensitivity and detection of mechanical and thermal stimuli, among others. Within this family, the vanilloid subfamily TRP receptors (TRPVs) have demonstrated their importance in thermosensation, pain perception, and osmotic regulation.

Therefore, this work focuses on the characterization and analysis of tissue expression of TRPV sequences in males and females of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), selected due to their importance in Mediterranean aquaculture.

Four paralogs have been described, and their expression has been analyzed, which is ubiquitous in the tissues studied and has been found to be very high in the heart and brain, both of which are highly relevant in environmental adaptation. Additionally, differences in expression between sexes have been established, mainly in their gonads and sensory organs.

This work is related to Sustainable Development Goal 14, Life Below Water.

KEYWORDS: BLAST; Mediterranean aquaculture; physiological responses; qPCR; screening; thermosensation; TRPV.

AGRADECIMIENTOS

A mi mami por acompañarme todo el camino, cuidarme y abrazarme en la cercanía y en la distancia. Te tengo siempre presente <3.

A mi papi y mis hermanos, por todo el cariño que os guardo. Por nuestra unión y perseverancia en los momentos más felices y en los más difíciles.

A mis tías de Madrid, mis protectoras, que suerte tuvimos de conoceros de peques.

A todos mis amigos, por todas las experiencias vividas y las que nos quedan. ¡Nos queda una vida por delante!

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ACUICULTURA.....	1
1.1.1. Mercado global y nicho mediterráneo.....	1
1.1.2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	2
1.2. CONTEXTO AMBIENTAL.....	3
1.2.1. Proyección global.....	3
1.2.2. Contribución de la acuicultura al cambio climático	4
1.2.3. Impacto biológico.....	4
1.3. FAMILIA DE TRPs	5
1.3.1. TRPVs	7
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. MANTENIMIENTO DE LOS PECES Y MUESTREO:.....	11
3.2. CARACTERIZACIÓN DE TRPVs EN <i>Dicentrarchus labrax</i> Y DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS:.....	12
3.3. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN:	12
3.4. VALIDACIÓN DE <i>PRIMERS</i>	13
3.5. MEDIDA DE EXPRESIÓN GÉNICA VÍA qPCR:.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	14
4.1. Identificación de TRPVs en lubina europea y selección de <i>primers</i> específicos	14
4.2. Extracción de ácidos nucleicos	17
4.3. Validación y selección de <i>primers</i>	19
4.4. Análisis de expresión tisular	20
5. CONCLUSIONES.....	25
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
7. ANEXOS.....	33
7.1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030	33

Índice de figuras

Figura 1: Producción de <i>Dicentrarchus labrax</i> vía acuicultura, en España.....	2
Figura 2: Concentraciones de CO ₂ -equivalentes para distintos escenarios de emisión (en partes por millón)	3
Figura 3: Temperatura de activación de termoTRPs en diferentes especies animales	7
Figura 4: Estructura y organización tridimensional de los canales TRPV.....	8
Figura 5: Evolución de la familia de TRPVs en metazoos.....	10
Figura 6: Alineamiento de secuencias parálogas TRPV en lubina europea	16
Figura 7: Curvas de calibración obtenidas para el par de <i>primers</i> seleccionado.....	20

Índice de tablas

Tabla 1: <i>Primers</i> diseñados para el análisis de expresión tisular	17
Tabla 2: Concentración de RNA (ng/μl) y ratios de absorbancia en diferentes tejidos de machos y hembras de lubina europea.....	18
Tabla 3: Par de <i>primers</i> seleccionados para cada parólogo de TRPV en lubina europea	19
Tabla 4: Expresión tisular de TRPV1a, TRPV4 y TRPV5 en machos y hembras de lubina europea.....	21

Tabla de abreviaturas

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Ct: Umbral de ciclo (qPCR)

TermoTRP: receptor de potencial transitorio asociado a la termosensibilidad

TRP: receptor de potencial transitorio

TRPA: receptor de potencial transitorio de anquirina

TRPC: receptor de potencial transitorio canónico

TRPM: receptor de potencial transitorio de melastatina

TRPV: receptor de potencial transitorio de vaniloides

TWL: peso vivo equivalente

WGD: duplicación genómica completa

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ACUICULTURA.

1.1.1. Mercado global y nicho mediterráneo.

El consumo global de alimentos provenientes de especies acuáticas está en continuo crecimiento, siendo el incremento anual medio del consumo mundial del 3%. Esto justifica que este mercado en desarrollo está experimentando un creciente interés social, fundamentado en los avances tecnológicos, aumento de ingresos *per capita*, y una clara transición en las preferencias de consumo hacia alimentos más saludables y nutritivos (FAO, 2022a).

Este aumento en la demanda no se puede suplir únicamente con la pesca, que suponía el 96% de la producción en la década de los 50. No obstante, el progreso de la acuicultura ha determinado la expansión de este sector, alcanzando el 49% de la producción total global en 2020 (FAO, 2022a).

Esta tendencia global se extrapola del mismo modo al mercado europeo, donde, si bien existe una marcada preferencia, por parte del consumidor, de pescado salvaje, el crecimiento porcentual de producción por parte de granjas acuícolas es del 3.1 % (Hough, 2022; SCIENTIFIC TECHNICAL AND ECONOMIC COMMITTEE FOR FISHERIES, 2021).

El mercado acuícola europeo alcanzó una producción de 3.4 millones de toneladas en 2018, de las cuales el 60% representa especies diádromas, como el salmón atlántico (*Salmo salar*), el 20% representan moluscos, como el mejillón mediterráneo (familia *Mytilidae*), y el 11% corresponde a especies marinas como la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*). Informes recientes destacan la creciente diversificación de especies, debido a la inestabilidad que se plantean algunos países (Hough, 2022).

Atendiendo a la región mediterránea, que cubre el 20% de la producción acuícola europea, la producción ha aumentado un 1.5% en la última década, conducido principalmente por el desarrollo de la acuicultura, cuya participación es del 43% sobre el total (Bjørndal & Guillen, 2018; FAO, 2022b). Destacan fuertemente la crianza de lubina europea y dorada, la cual ha aumentado un 115 y 95% respectivamente desde 2009. Estas especies conforman el 79% del valor de mercado y más de la mitad de la producción (62%) en el sector mediterráneo. El 97% de la comercialización de lubina europea y dorada proviene del Mar Mediterráneo, cuyo origen y desarrollo se basa en técnicas de acuicultura en el 95% de los casos (Bjørndal & Guillen, 2018).

1.1.2. *Dicentrarchus labrax*.

La lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) es, por tanto, un pilar fundamental en la acuicultura europea, alcanzando cifras de producción que rondan las 225.000 toneladas (equivalente en peso vivo (TLW)) en el sector mediterráneo en 2019. Estas cantidades cubren el 28% de la acuicultura total mediterránea, así como el 2,3% de la acuicultura global marina (EUROSTAT, 2023; FAO, 2022a). El sector español está constituido por 122 instalaciones que cultivan esta especie, encontrándose mayoritariamente en Andalucía y la Comunidad Valenciana. La producción nacional listó 25.259 toneladas en 2019 (EUROSTAT, 2023; MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2022).

La figura 1 muestra el crecimiento constante en la producción de lubina europea en España. Además, a efectos económicos, esta actividad genera un ingreso de 150 mil millones de euros, que se espera que aumente debido al incremento de producción, pese a que la competencia disminuya el precio por tonelada anualmente (EUROSTAT, 2023).

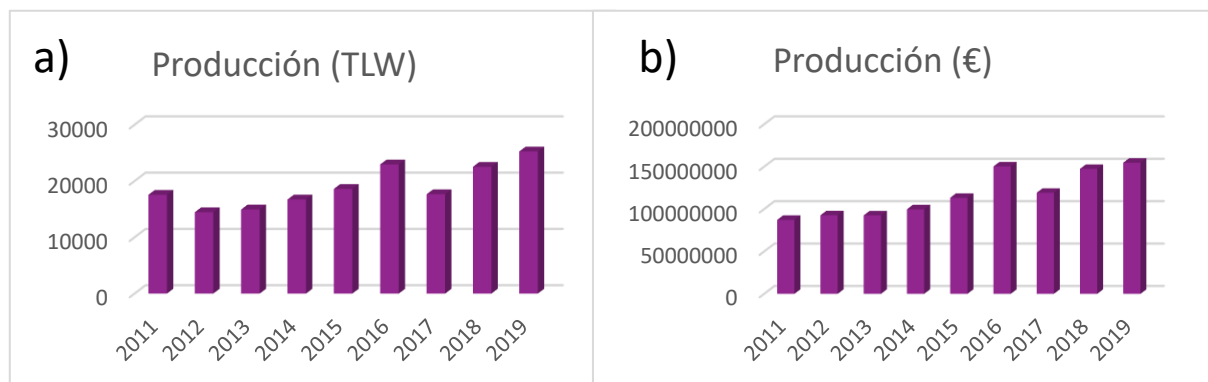


Figura 1: Producción de *Dicentrarchus labrax* vía acuicultura, en España, expresado en a) toneladas de peso vivo (TLW), b) €. Fuente: (EUROSTAT, 2023).

Atendiendo a su biología, la lubina europea es un teleósteo perciforme de la familia de los morónidos, distribuida por todo el Mediterráneo, Mar Negro y Atlántico nororiental (MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2022), entre los que existen pequeñas diferencias genéticas a nivel de microsatélites que ajustan sus condiciones de crecimiento óptimas a su entorno (Fuentes et al., 2010).

Es una especie carnívora, muy voraz y con alta capacidad de adaptación, pues posee elevada tolerancia extrínseca y puede cambiar su comportamiento de acuerdo con las circunstancias (Pickett & Pawson, 1994). Es gonocórica y no presenta dimorfismo sexual. Puede vivir en zonas superficiales o hasta 100 metros de profundidad, dependiendo principalmente de la estación. En verano suele acercarse a la costa para alimentarse, mientras que, las bajas temperaturas de invierno disminuyen su tasa de alimentación, volviendo a mar abierto donde se dará su única estación reproductiva y desove (febrero-marzo). Además, puede vivir en

bancos o de manera solitaria, una tendencia más presente en estados adultos (MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2022; Ortega, 2013). Es eurihalina (pudiendo vivir en aguas casi dulces a 0,5‰, hasta salinidades de 60‰, tolerando cambios bruscos de 8-10‰) y euriterma (soportando temperaturas de 3-30 °C) (Pickett & Pawson, 1994), si bien presenta una temperatura óptima de crecimiento (22-25 °C en lubina mediterránea) y de reproducción (12-17 °C en lubina mediterránea), que en ambos casos será 1-2 °C más fría para la lubina atlántica. (Ortega, 2013).

1.2. CONTEXTO AMBIENTAL.

1.2.1. *Proyección global.*

La actividad humana y el progresivo incremento de emisiones de dióxido de carbono (CO₂) ha supuesto un aumento en la concentración de CO₂ atmosférico, de 278 a 400ppms en los últimos 40 años, a lo que se debe añadir el constante aumento de otros gases de efecto invernadero (GHGs) y aerosoles (Bopp et al., 2013). Como respuesta, con el paso de las décadas, el océano ha experimentado modificaciones a nivel físico y geoquímico, ya que funciona como un importante integrador de la información climática que le rodea vía un intercambio continuo. De este modo, el océano ha absorbido el 93% del exceso de calor de la Tierra desde la década de 1970, incrementando su temperatura y el nivel del mar, y ha capturado el 28% de las emisiones de CO₂ desde 1750, lo que conlleva una bajada de pH en la superficie marina (Gattuso et al., 2015). Otras consecuencias a nivel oceánico incluyen, modificaciones en la estratificación, cambios en la salinidad (Bopp et al., 2013), así como la reducción del oxígeno disuelto disponible (Servili et al., 2020).

En 2013, el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), describió una serie de modelos predictivos para finales del siglo XXI que incluían diversos estresantes. De este modo, se establecieron los resultados en cuatro posibles situaciones de acuerdo con las trayectorias de concentración representativas (RCP) de CO₂ atmosférico (IPCC et al., 2014), indicadas en la figura 2.

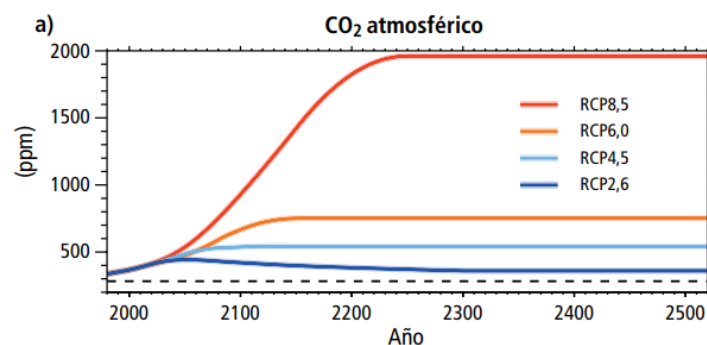


Figura 2: Concentraciones de CO₂ equivalentes para distintos escenarios de emisión (en partes por millón). Fuente: (IPCC, 2014).

Atendiendo a los extremos, la situación RCP8.5, designada como “*business-as-usual scenario*”, asume que no habrá un cambio significativo en la percepción de la población, manteniéndose las prácticas industriales, tecnológicas y económicas como hasta ahora, mientras que la situación RCP2.6, designada como “*high-mitigation scenario*” asume e incluye acciones que reducirán la ratio de emisión de gases de efecto invernadero actual.

Para el escenario RCP8.5, se prevé un aumento de 2.73 ± 0.72 °C, una disminución de 0.33 ± 0.003 unidades de pH, una reducción (porcentual) de $3.45 \pm 0.44\%$ del contenido de O₂ disuelto y un decrecimiento (porcentual) $8.6 \pm 7.9\%$ de la producción primaria neta (NPP), que referencia a la materia orgánica producida por la base de la cadena alimenticia de los ecosistemas marinos, el fitoplancton. Para el modelo RCP2.6 los datos fueron más positivos, variando $+0.71 \pm 0.45$ °C, -0.07 ± 0.001 unidades de pH, $-1.81 \pm 0.31\%$ oxígeno disuelto y $-2.0 \pm 4.1\%$ NPP (Bopp et al., 2013).

La situación del Mediterráneo no es la más favorecedora, observándose diferentes procesos climáticos de alto impacto, como el aumento de la temperatura o del nivel del mar, lo que puede provocar intrusiones salinas. Estas variables afectan directamente a la acuicultura mediterránea por medio de la alteración del metabolismo de los organismos, la eutrofización, la alteración en los estratos marinos y la prevalencia y potencia de nuevas enfermedades producidas por patógenos o biotoxinas, cuyo crecimiento y expansión se ve favorecido por dicho aumento de temperaturas (Rosa et al., 2012).

1.2.2. Contribución de la acuicultura al cambio climático.

La acuicultura presenta ciertos peligros que elevan el impacto medioambiental. Dichos riesgos provienen del uso de recursos naturales, emisión de contaminantes, transmisión de enfermedades, dispersión no natural de especies, liberación de antibióticos y fármacos al agua, aumento en concentración de amonio y fosforo proveniente de los alimentos, modificación de estratos en regiones bentónicas, además de los relacionados con la construcción de infraestructuras y la energía necesaria (Abdou et al., 2017), teniendo un alto impacto negativo sobre las especies marinas y su ecosistema.

1.2.3. Impacto biológico.

Las implicaciones del cambio climático sobre la biodiversidad marina se establecen en 4 niveles de acuerdo con la organización biológica. Estos niveles son: 1. Modificaciones fisiológicas en respuesta a cambios ambientales, 2. Cambios de comportamiento (migración), 3. Desequilibrio en el número de individuos de la población y 4. Alteraciones del ecosistema, alterando la producción primaria neta (NPP) y relaciones tróficas (Pörtner & Peck, 2010).

La respuesta más sencilla es la migración, pero si esta no es posible, los organismos tratarán de adaptarse y aclimatarse al medio. Se dan tres casos, la plasticidad fenotípica, dentro de una generación y relacionada con la tolerancia, la plasticidad transgeneracional y la adaptación genética, en la que, de acuerdo con la presión de selección, se establecerán fenotipos más adecuados a lo largo de las generaciones (Servili et al., 2020).

Diversos autores han establecido como limitación principal, debida al cambio climático, el correcto desarrollo y actividad funcional de los organismos frente la temperatura (Anestis et al., 2010). La bibliografía científica nos presenta innumerables ejemplos de alteraciones metabólicas presentes en distintos tipos celulares de acuerdo con esta condición.

En lubina europea se han descrito algunos, como incrementos en el metabolismo de lípidos, glucosa, el ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de la urea (Zhou et al., 2021), en respuesta a temperaturas de crecimiento (hasta cierto límite), que aumentan su masa, el consumo alimenticio y energético, así como la excreción de amonio al medio (Person-Le Ruyet et al., 2004), y que terminan favoreciendo alteraciones en la celularidad muscular, aumentando la prevalencia de hipertrofias e hiperplasias (Ayala et al., 2001). Además, se ha observado que el aumento de temperatura puede alterar funciones de relativa importancia que comprometen su bienestar, como una disminución del rango de tolerancia a salinidad, disminuyendo la cantidad de células rojas, hematocrito y hemoglobina (Jakiul Islam et al., 2021), respuesta también descrita frente a una menor cantidad de O₂ biodisponible (Samaras et al., 2023). Al tratarse de una especie gonocórica, cuya diferenciación sexual se puede perturbar de manera fisiológica variando el fotoperiodo o temperatura, se han descrito alteraciones en la esteroidogénesis o gametogénesis (Servili et al., 2020), así como en la ratio poblacional de sexos (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008).

Por ello, el presente trabajo busca focalizar esfuerzos en entender las respuestas frente dichos estresantes a nivel molecular de la lubina europea. Pudiéndose así describir mejor las condiciones óptimas y proyectar cambios en el comportamiento de la producción acuícola.

1.3. FAMILIA DE TRPs.

En 1997 se estableció que todo ser vivo ha adquirido, por medio de la evolución, la capacidad de transducir todos los estímulos externos (como dolor, pH, osmolaridad, temperatura, presión, químicos volátiles) vía canales iónicos (Caterina et al., 1997). El descubrimiento de receptores sensoriales en las terminaciones nerviosas de la piel que responden al calor llevó a David Julius, junto a Ardem Patapoutian a recibir el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2021 (NobelPrize.org, 2023). Estos receptores forman parte de la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP), que actúan como canales iónicos y cuya expresión se da en la gran mayoría de tejidos (Clapham, 2003). Su nombre proviene de la capacidad de respuesta

transitoria a la luz observada en moscas ciegas mutantes, descritas por Cosens y Maning en 1969 (Montell et al., 2002).

El inicio de la transmisión de estímulos requiere la participación del sistema somatosensorial, cuyas fibras nerviosas aferentes, con sus correspondientes terminaciones libres poseen canales TRP (Schepers & Ringkamp, 2010). Estos modificarán, de manera transitoria, la permeabilidad de los propios canales de acuerdo con el estímulo y su intensidad (Lezama-García et al., 2022). Estímulos como la temperatura son traducidos en actividad neuronal por el sistema nervioso central, que desencadenará las respuestas necesarias para mantener la termoneutralidad. (Kashio & Tominaga, 2022). La mayoría de los TRPs actúan como canales de difusión catiónica no selectiva, participan en la transducción de señal y regulan los niveles de calcio y magnesio en neuronas y células cancerígenas, encontrándose principalmente en la membrana plasmática (Lezama-García et al., 2022; Zitt et al., 2002).

En mamíferos, la superfamilia de TRPs consiste en 28 canales catiónicos permeables separados en 6 subfamilias: TRP canónico (TRPC); TRP vaniloide (TRPV, ampliamente estudiados por su relación con la termodetección del calor); TRP de melastatina (TRPM); TRP de anquirina (TRPA); TRP de mucolipina (TRPML) y TRP policístico (TRPP) (Samanta et al., 2018). Además, se han observado las familias: TRP sin potencial mecanorreceptor C (TRPN o TRPnopC); TRP similar a vaniloides (TRPVL) y TRP de soromestatina (TRPS) en algunos clados de animales bilaterales (*Bilateria*) como moluscos, anélidos o tardígrados (Himmel et al., 2020; Peng et al., 2015), así como TRP vacuolar de la levadura (TRPY) (Amini et al., 2021). Todos ellos comparten una estructura similar con 6 subunidades transmembrana y una región poro, cuya especificidad depende de los dominios presentes en la región C-terminal y N-terminal (Lezama-García et al., 2022).

La capacidad de termosensación se ha descrito en algunos receptores de estas subfamilias, denominándose termoTRPs. Las neuronas en mamíferos pueden distinguir 4 estados o sensaciones térmicas, que modificarán la permeabilidad de los diferentes canales. Estas sensaciones son: frío (-10 – 15 °C), fresco (16 – 30 °C), cálido (31 – 42 °C) y caluroso (43 – 60 °C), siendo los extremos altamente dañinos. Los receptores por excelencia del calor son los TRPVs, activándose TRPV1 y TRPV2 frente calores extremos (43 y 52 °C respectivamente), mientras que TRPV3 y 4 se activan en el rango de 23 – 39 °C. Por otro lado, TRPA1, TRPM8 y TRPC5 responden a temperaturas más frías (Lezama-García et al., 2022). No obstante, los mecanismos que explican la termosensibilidad y el papel que desempeñan es objeto de debate, pues la investigación se centra en mamíferos, observándose resultados contradictorios entre especies, como muestra la figura 3.

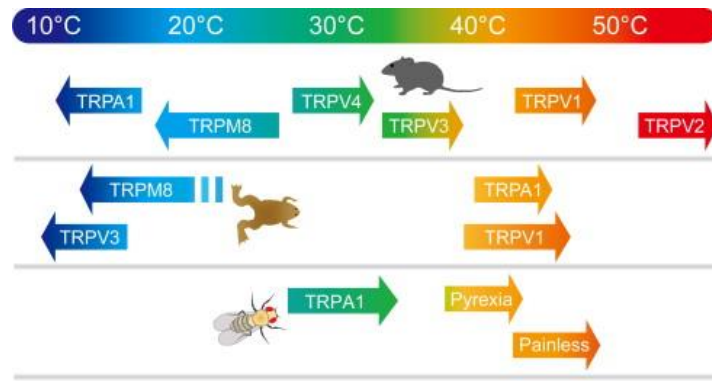


Figura 3: Temperatura de activación de termoTRPs en diferentes especies de metazoos (Saito & Tominaga, 2015).

Los termoTRPs han cambiado su repertorio génico y propiedades funcionales a lo largo de la evolución, observándose duplicaciones, deleciones o incluso multiplicaciones, las cuales han aportado características únicas a las especies (Saito & Tominaga, 2015). Por ejemplo, el pez cebra ha experimentado una cuadruplicación en TRPM4 y la pérdida de TRPM8, (Kastenhuber et al., 2013), relacionada con una mejora reproductiva en regiones frías del Himalaya (Majhi et al., 2015). Cabe destacar que los genes TRPV en humanos siguen bajo procesos de mutación y selección en determinados clústeres, teniendo TRPV1 y TRPV3 ratios más altos de mutación (Ghosh et al., 2016).

A parte de la función sensorial, diversos estudios han establecido los TRPs como importantes participantes de la actividad fisiológica y patológica de mamíferos (Samanta et al., 2018; Sasase et al., 2022). Algunos ejemplos recogen un aumento de secreción de insulina en el páncreas (Saito & Tominaga, 2015), diferencias en el desarrollo embrionario (Verlinden et al., 2022), crecimiento (Zhang et al., 2023), y en la capacitación espermática (Bernabò et al., 2010; Kumar et al., 2016). Se han descrito variaciones en la diferenciación, activación y señalización de células T (Bertin et al., 2014; Umar et al., 2020), así como una mayor facilidad de infección y desarrollo de enfermedades virales (Kumar et al., 2023) o la regulación de la proliferación celular, resultando en la resistencia o sensibilidad presente en células tumorales (L. He et al., 2019; Kärki & Tojkander, 2021). Por ello, estos receptores se han destacado como dianas terapéuticas prometedoras (Abbas, 2020; Santoni et al., 2019; Sasase et al., 2022), debiendo prestar especial atención a posibles efectos secundarios, como es el caso de agonistas y antagonistas de TRPV1, que alteran la temperatura corporal central (Yue et al., 2022).

1.3.1. TRPVs.

En 1997 fue identificado por primera vez el canal TRPV1 en neuronas de rata gracias a la sensibilidad presentada frente capsaicina y calor (Caterina et al., 1997). Actualmente se han descrito en mamíferos 6 integrantes de la familia como mediadores sensoriales activados por ligandos endógenos, calor, estímulos mecánicos y cambios osmóticos (Benham et al., 2002).

En los inicios se consideró a toda la subfamilia como termosensible, no obstante, estudios posteriores han demostrado que no todos responden ante la temperatura. Los integrantes TRPV1 - 4 son los denominados termoTRPVs cuyo poro introduce cationes de manera no selectiva, mientras que TRPV5 – 6 son altamente selectivos al calcio, manteniendo así la homeostasis celular (Samanta et al., 2018). Esta variabilidad se puede entender atendiendo a la homología, donde los termoTRPVs están bien conservados con una identidad próxima al 50% entre ellos, mientras que TRPV5 y TRPV6 presentan un 75% de homología entre ellos, si bien solo comparten ~30% de identidad con los primeros (Morini et al., 2022).

Los canales TRPV son homotetrámeros cuyas unidades poseen 6 segmentos transmembrana. Tal y como muestra la figura 4, los segmentos 5 y 6 forman una vía de permeación de iones, mientras que los segmentos 1 – 4 se mantienen inmóviles, en contraste con otros canales dependientes de voltaje, que experimentan movimiento durante la apertura (Cao et al., 2013). Para su funcionamiento, se requiere de cofactores positivos como fosfatidilinositidos que pueden regular las regiones alostéricas próximas al filtro de selectividad (Gao et al., 2016; Zhang et al., 2021). TRPV1 y TRPV4 son los miembros más analizados, si bien la actividad del último es objeto de debate, relacionándose con la mecano, termo y quimiosensibilidad (Lezama-García et al., 2022), y regulando posiblemente la temperatura corporal (Güler et al., 2002).

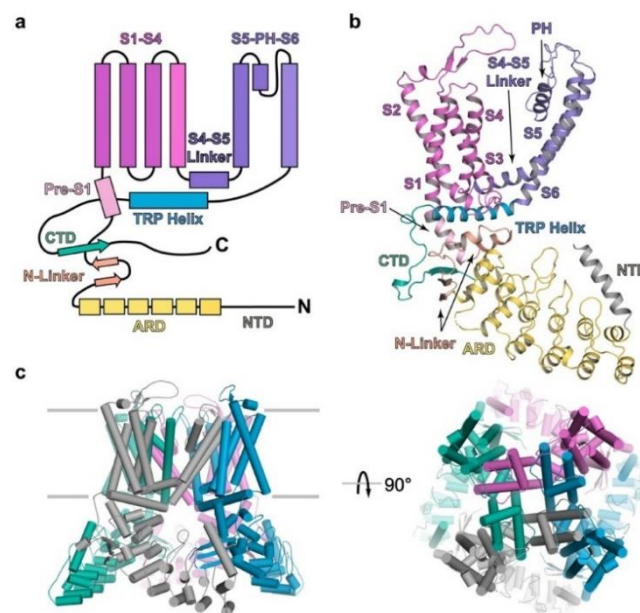


Figura 4: Estructura y organización tridimensional de los canales TRPV. (a) Representación esquemática de un monómero TRPV. El dominio N-terminal (NTD) se representa en gris, el dominio de repetición de anquirina (ARD) en amarillo, el enlazador N en naranja, la hélice pre-S1 en rosa, las hélices S1-S4 en magenta, el enlazador S4-S5 y la unión S5-PH-S6 en morado, la hélice TRP en azul y el dominio C-terminal (CTD) en verde. (b) Estructura tridimensional de monómero de TRPV5 (c) Ensamblaje tetramérico de TRPV5 desde el lateral (izquierda) y desde la cara extracelular (derecha). Fuente: (Pumroy et al., 2020).

El origen de los TRPVs surge en el último ancestro común que separó el filo Cnidaria de Bilateria, encontrándose tanto en especies vertebradas como invertebradas, si bien los filos externos a mamíferos han sido muy poco estudiados en cuanto a funcionalidad (Morini et al., 2022; Saito & Tominaga, 2015).

Desde la separación Bilateria-Cnidaria, se han producido eventos genómicos que dan lugar a la especiación y a la diferenciación de clados. La figura 5 muestra la evolución observada en la familia TRPV en los metazoos, incluyendo los eventos locales descritos. Se destaca la existencia de 3 nuevos integrantes de la familia no descritos anteriormente, que son TRPV7, 8 y 9, si bien pocos linajes como los prototerios los han mantenido (Morini et al., 2022). En el ancestro del clado Gnathostomata se produjeron 2 etapas de duplicación genómica completa (WGD) conocidas como “1R” y “2R”, aumentando así el número de genes. Además, la infraclase de los teleósteos adquirió una tercera duplicación genómica completa referida como “3R”, y la familia de los salmónidos reveló una cuarta WGD denominada “4R”. La mayoría de los genes duplicados se pierden, pero algunos evolucionan y pueden adquirir nuevas funcionalidades (neofuncionalización) o partir la funcionalización del gen ancestral (subfuncionalización), dando un amplio rango de posibilidades que diferencien en gran medida con sus homólogos de mamíferos, y que pueden explicar el éxito reproductivo y evolutivo de los teleósteos. (Meyer & Van De Peer, 2005; Morini et al., 2022). Los teleósteos heredaron los genes TRPV 1, 4 y 5, y tras su duplicación 3R, se mantuvieron generalmente las copias 1a, 1b, 4 y 5, perdiéndose una de las copias correspondientes a TRPV 4 y 5 y en algunos teleósteos la copia 1b (Flores-Aldama et al., 2020; Morini et al., 2022).

Los estudios en teleósteos son mínimos. En pez cebra (*Danio rerio*), se ha observado que TRPV1 es capaz de actuar como termorreceptor del calor, si bien su activación se da a los 25 °C, frente a los 42 °C de mamíferos, además, dicho receptor es fundamental en la locomoción normal inducida por calor (Gau et al., 2013), la movilidad espermática (Chen et al., 2020) y la regulación del ciclo circadiano (Jerônimo et al., 2017), fenómeno también observado en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Vera et al., 2023), mientras que TRPV4 ha demostrado respuesta frente la hipertermia (Hunt et al., 2012). Por otro lado, en salmónidos se observó activación de TRPV1 frente calor y capsaicina, dando lugar a funciones locomotoras de respuesta (Yoshimura et al., 2022), así como expresando citoquinas proinflamatorias, que junto a una reducción en la expresión de TRPV4 lideran el movimiento por fiebre comportamental hacia aguas más calientes (Boltana et al., 2018), donde una de las copias se activa con el aumento de salinidad y temperatura, mientras que la segunda copia se activa frente la disminución de temperatura en el medio (Lee et al., 2021). Estudios en lungfish (*Dipnoi*), señalan activación de TRPV1 frente condiciones ácidas, si bien no se observa aumento frente capsaicina o temperaturas de hasta 44 °C, reduciendo así la sensibilidad

térmica (Hori & Saitoh, 2023), mientras que por otro lado en el rohu (*Labeo rohita*) TRPV1 cumple una importante función en la calidad y duración del movimiento espermático (Majhi et al., 2013). En medaka (*Oryzias latipes*), TRPV4 es activado frente temperaturas frías (13 °C) y cálidas (40 °C), pH ácido (5), agonistas específicos y cambios osmóticos (Hori et al., 2022), lo que coincide con el único estudio realizado sobre lubina europea en este ámbito, el cual explica la expresión diferencial de TRPV4 bajo la transición de condiciones salinas a agua dulce, modificando su patrón de expresión en diversos tejidos como cerebro o branquias (Bossus et al., 2011).

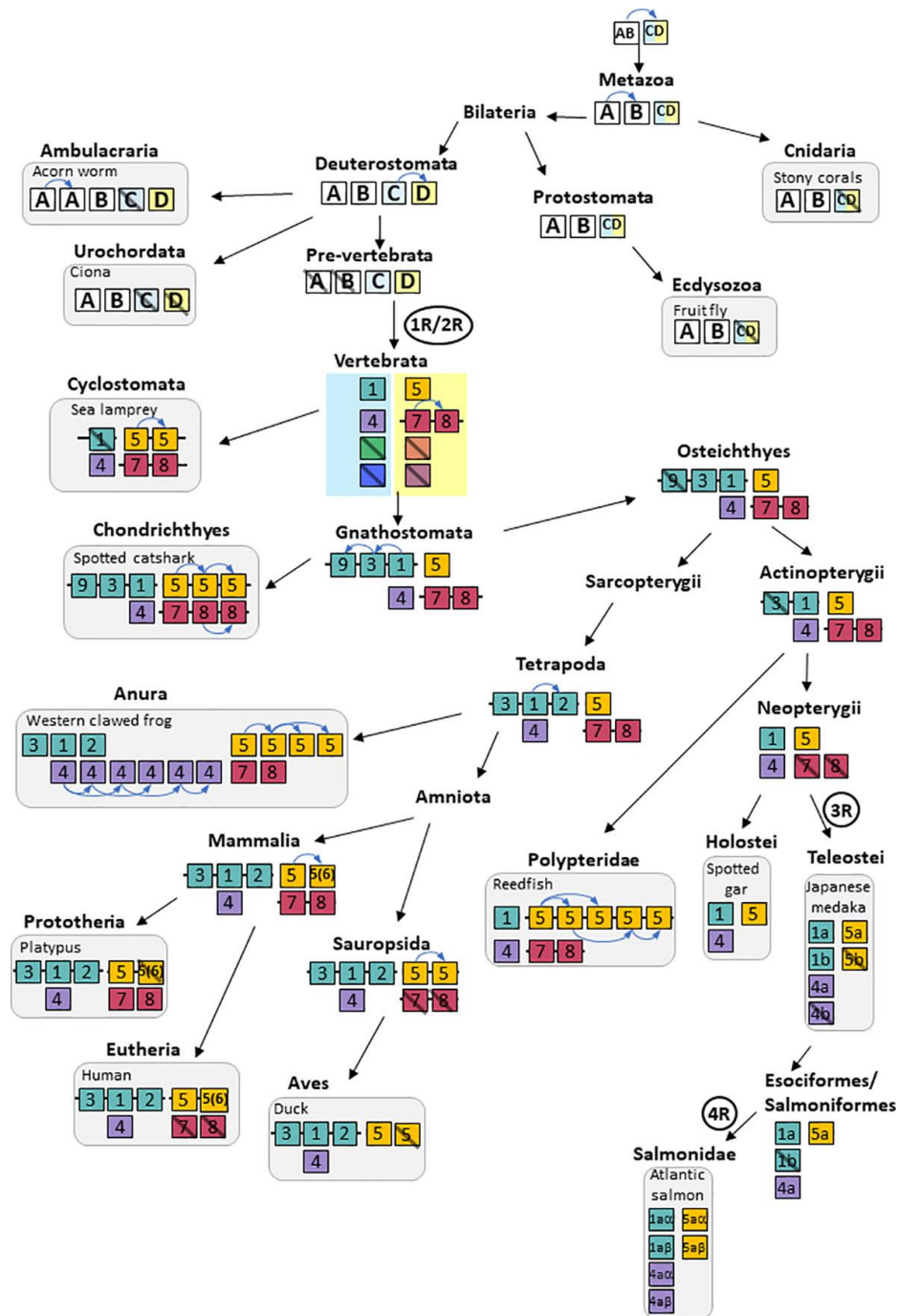


Figura 5: Evolución de la familia de TRPVs en metazoos. Fuente: (Morini et al., 2022).

Como se ha visto a lo largo de la introducción, la lubina europea es uno de los mayores exponentes de la acuicultura mediterránea. Al igual que muchas especies, se encuentra altamente supeditada al avance no controlado del cambio climático, cuyos efectos, como el aumento de temperatura, pueden suponer desequilibrios metabólicos y comportamentales importantes. Los seres vivos han ido adquiriendo mecanismos evolutivos de adaptabilidad, que son profundamente importantes frente a cambios repentinos, y que se encuentran regulados por canales iónicos, como los termoTRPVs, en el sistema somatosensorial. Este proyecto pretende acercar dichos mecanismos mediante la puesta punto de análisis que permitirán el estudio fisiológico de lubina europea frente a estímulos externos. Esta información podría implementarse en los sistemas de producción acuícola, mejorando la eficiencia y productividad.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo es obtener información sobre la respuesta de la lubina europea frente al cambio climático y la posible implicación de los TRPVs en la adaptabilidad a estímulos térmicos. Para ello se han establecido los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar las secuencias TRPVs presentes en la especie *Dicentrarchus labrax*.
2. Validar *primers* específicos para cada secuencia TRPV.
3. Medir y analizar la expresión diferencial tisular de los parálogos de TRPVs en tejidos de la especie.
4. Comparar la expresión tisular de los parálogos de TRPVs entre sexos.

Además, el proyecto se relaciona con la ODS número 14: Vida submarina, cuya meta 14a incluye los avances y el desarrollo de investigaciones científicas, que permitan establecer un conocimiento libre y transferible cuyo fin sea la mejora de la salud de océanos y potenciación de la biodiversidad marina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MANTENIMIENTO DE LOS PECES Y MUESTREO.

Las muestras necesarias para el estudio fueron obtenidas en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC, Castellón) (40º NL). En estas instalaciones se cultivaron machos y hembras de lubina europea de 2 a 3 años, comprados en Aquanord (Gravelines, Francia), en tanques de recirculación de agua abierta bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo. El protocolo de sacrificio cumple lo acordado en la legislatura europea (2010/63EU) y fue aprobado por el Comité de Bienestar del Instituto de Acuicultura de Torre

la Sal (Registro 09-0201), supervisado bajo el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Se recolectaron en 2012 muestras de 4 individuos, 2 machos y 2 hembras.

Los tejidos recibidos fueron: ojos, bazo, hígado, riñón, riñón cefálico, branquias, músculo, grasa, intestino, gónadas, piel, techo óptico, corazón, telencéfalo, cerebro, hipotálamo e hipófisis.

Se recibieron aproximadamente 4 muestras de cada tejido, correspondiendo la mitad a hembras y la mitad a machos. Queda exento de esta proporción aquellos órganos específicos de sexo, como las gónadas, así como la hipófisis (sólo presente una única muestra de macho) y el riñón cefálico.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE TRPVs EN *Dicentrarchus labrax* Y DISEÑO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS

Se realizaron los estudios con la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que permitió definir el número de parálogos de TRPVs en la especie de interés, así como identificar sus secuencias. Los alineamientos se hicieron frente al genoma de *Dicentrarchus labrax*, taxid:13489.

A partir de dicho conocimiento, se diseñaron *primers* específicos para cada parálogo con el fin de medir por qPCR cada TRPV. Para ello se empleó la herramienta primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y se diseñaron de acuerdo con los siguientes criterios: Longitud del producto = 75-200pb, %GC entre 50 – 60%, con repetición de nucleótido máxima (PoliX) = 2 y autocomplementariedad máxima = 3. Tras obtener el conjunto de *primers* generados, se compararon las secuencias génicas de los miembros de la familia TRPV de la especie seleccionada con la herramienta ‘clustalo’ (Omega) de Seaview (Gouy et al., 2021) con el fin de conocer la región de hibridación con la sonda. Este procedimiento tiene la finalidad de seleccionar sondas en regiones no conservadas, que den especificidad al *primer* para su gen correspondiente. Tras el análisis se escogieron 3 *primers*/gen, con un total de 12 parejas de *primers* que se muestran en la tabla 1.

Los *primers* fueron producidos, por la empresa Integrate DNA Technology, Inc. (IDT, Coralville, IA) bajo las condiciones: escala 25nm en “*desalting*”, es decir, deshidratado, que permite su almacenamiento a temperatura ambiente.

3.3. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN

El RNA total fue extraído empleando el agente TRIzol (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo de extracción del método fenol-cloroformo (Peñaranda et al., 2010). La concentración de RNA fue evaluada y cuantificada utilizando NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Fisher Scientific SL, Spain), obteniéndose valores de concentración

(ng/μl), y las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, que evalúan la pureza de la muestra del extracto. La retrotranscripción de RNA a cDNA fue llevada a cabo con 500 ng de RNA total vía “QuantiTect Reverse Transcription Kit” (QIAGEN, Inc.), de acuerdo con el protocolo del fabricante, conservándose, posteriormente, el cDNA a -20 °C.

3.4. VALIDACIÓN DE *PRIMERS*

Inicialmente se realizó una prueba de expresión en tejidos aleatorios, en este caso de cerebro y gónadas, donde se probaron los 12 pares de *primers*, a concentración 250nM, por duplicado. Se seleccionó aquellos de mayor interés, de acuerdo con los siguientes parámetros medidos, umbral del ciclo (Ct), la curva de disociación, y la curva de amplificación. Se analizó la eficiencia del par de *primers* a través de la curva estándar en diluciones seriadas 1:5 en cerebro. El volumen total de reacción de PCR fue de 20 μl, añadiéndose en cada pocillo 5 μl de cDNA (a su dilución correspondiente), además de 1μl de agua, 1μl del *forward primer*, 1 μl del *reverse primer* y 12 μl del *reporter*, SYBR® Select Master Mix (ThermoFisher Scientific).

La validación fue medida por “Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific StepOnePlus™ RealTime PCR system”. Después de una activación inicial de la Taq polimerasa a 95 °C durante 10 minutos, se llevaron a cabo 40 ciclos de acuerdo con las siguientes condiciones: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, obteniéndose finalmente una curva de calibrado para cada *primer* seleccionado. Para todos los *primers* se realizó un control duplicado, donde se sustituyó la proporción de cDNA por agua.

3.5. MEDIDA DE EXPRESIÓN GÉNICA VÍA qPCR

Los datos de expresión de TRPVs fueron obtenidos por qPCR, donde se emplearon los *primers* específicos diseñados y seleccionados. La medición se realizó por “Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific StepOnePlus™ RealTime PCR system”. Se emplearon placas de 96 pocillos, en cada pocillo se introdujo una dilución 1:5 de cDNA siguiendo la misma proporción de reactivos mencionada en el apartado 3.4, así como las condiciones de ciclado. Los tejidos se separaron por sexo e individuo, y se hizo una medición por duplicado.

Los tejidos seleccionados, debido a su eficiencia en la extracción de RNA fueron: ojos, bazo, branquia, músculo, hígado, cerebro, intestino, gónadas, piel, hipotálamo, corazón y riñón.

Tras la lectura, se aplicaron las fórmulas matemáticas necesarias para obtener valores absolutos de expresión y poder hacer una comparación entre tejidos y sexos para los distintos parálogos de TRPVs.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

4.1. Identificación de TRPVs en lubina europea y selección de *primers*.

Se realizó un primer alineamiento BLASTP de la secuencia proteica TRPV1 de pez cebra (XP_005165384.1), un teleosteo cuyos TRPVs han sido descritos, frente una base de datos proteica que incluye al organismo de interés ("*Dicentrarchus labrax*" taxid:13489). Se encontraron diversos hits significativos, destacando dos parálogos de TRPV1 (XP_051256471.1 y XP_051254558.1), uno de TRPV4 (XP_051279250.1) y un último descrito como TRPV6 (XP_051256471.1).

Conociendo las secuencias proteicas de cada parálogo de TRPV, se escogió una de ellas, en este caso la asociada a una de las copias de TRPV1 (XP_051256471.1) y mediante la herramienta TBLASTN se comparó contra el genoma de lubina europea, almacenado en la base de datos del NCBI, con el fin de asegurar que no existan más parálogos de la familia TRPV. Se obtuvieron los mismos resultados, encontrando las secuencias nucleotídicas predichas de todos los integrantes. En cuanto al porcentaje de identidad, con respecto a la primera copia obtenida de TRPV1, se observó una similitud del 48,73% con la segunda copia de TRPV1, 44,40% con la copia de TRPV4 y de tan solo un 24,58% con la copia TRPV6.

Comparando con la bibliografía, surge alguna discrepancia. Los receptores TRPVs descritos y predichos en lubina europea en la base de datos del NCBI son TRPV1a (XM_051400511.1), TRPV1b (XM_051398597.1), TRPV4 (XM_051423290.1) y TRPV6 (XM_051406044.1), si bien de acuerdo con la duplicación del genoma completo "3R" observada en teleosteos (Meyer & Van De Peer, 2005), los parálogos mantenidos son TRPV1a, TRPV1b, TRPV4 y TRPV5 (Morini et al., 2022). Esto es debido a un error de nomenclatura. Por otro lado, el porcentaje de identidad entre miembros se adecúa al establecido en humanos, donde TRPV1 – 4 comparten una similitud próxima al 50%, mientras que TRPV5 – 6 tienen alrededor de un 30% de identidad con los primeros (Morini et al., 2022).

Una vez establecidas todas las secuencias nucleotídicas de los parálogos de TRPV en lubina europea, se diseñaron 3 *primers*/gen que podrían servir para un posterior análisis de expresión tisular. Cada secuencia *primer* es una región específica del gen a amplificar y su localización no coincide con regiones conservadas, que pueden dar pie a una amplificación no específica. Para ello, se alinearon las secuencias nucleotídicas de los TRPVs, obteniendo la figura 6, y pudiendo definir así regiones conservadas o similares entre cada gen. Esta información sirve de apoyo para un diseño de *primers* adecuado y específico, seleccionándose aquellos que no tengan una autocomplementariedad elevada, sin repeticiones consecutivas de un mismo nucleótido y que no posean >3 nucleótidos en posiciones idénticas en otro de los miembros TRPV.

```
1
XM_051400511.1 -----
XM_051398597.1 -----
XM_051423290.1 TGTGTC CACCCC AAAATC TGTGTG TGAAGG CATTCC TTGTTC TGTGTG ACCTCA CCGGGG GTGGGA CACATG AATCAG AGGGAT ACTGTC ATTTAG TTGAAG CATTTT GTGTCA
XM_051406044.1 -----

115
XM_051400511.1 -----
XM_051398597.1 -----
XM_051423290.1 TCTGGC AGGAGT CAGACC CCCTCA GAGAGA AAAAAT AAGTGT GGAGCT TTCACG AAAAAA GAAAAA GCTGGC GAATAG TTTAT TTTTGA AGAAAC TAAAAA TAAGAT CAACA-
XM_051406044.1 -----

229
XM_051400511.1 GAAACA CAGTGG CAGCGA CTATAA AAAGGA AGGCTG CCTTCA TTTTTT TTATTC ACCACA ---AGT CACAGA AACACC CGAAAA GTAGCA TTTTAC AGGG-- -GAGG A-CCAC
XM_051398597.1 -----
XM_051423290.1 -----
XM_051406044.1 -----

343
XM_051400511.1 AACAAG GACTCT GCAGGA CACTCC ATT--G TGTGTT TTGTGT TTTTTT AAACAA GAAGAC AATCTG GAACAG GAAGAC GT---- -CCTCT GACTG-
XM_051398597.1 TCTTAA GTTTAC TTAAGA AATACA GT--- -GCTG CTGTGG TTTTCT AACCGG GATGTG ACATGA TCATGA TCATGA CCG--- -C---T CATCAT AGCTG-
XM_051423290.1 GCTCTG CTCTCC TCAGAA GGTGGC ATCTTG CCTTGT CCAAGA CCGACA CCTTCA GCTCTG CAGATG GCGATG GCGGGG CTTGTC AGCTGT AGAGCG ACGCGC
XM_051406044.1 -----

457
XM_051400511.1 -----
XM_051398597.1 -----
XM_051423290.1 CTTGAC CAGTGG GCTCTG TTG-AG AGCGAG ---GGT TTCACT TCTCTT AAGGGA CATTTC ATAGGT GTTTGT TTCACA TTTTGT GCGGTG TGTATT GACTGA
XM_051406044.1 -----

571
XM_051400511.1 GGAGGA GAAATC ACAGCA GAAAGC TGCAAA GAAGGA T----- -GG ATTAGT ----- TTC TGCCCT GGGTTT GGGCAA GAGGCG GCGCAG TGCTCC
XM_051398597.1 CTTGGA AAGG-- -ACAG CCC--- ------ -AGAG GAAATA AAGGAG GGCACA TCTCCA ATCAGA TTCAT CTCAAC TTGTAC AAACA-- -GAT TCGAGG
XM_051423290.1 CAACTG CCGGAT GAGGTT CCAAGG TGCTTT CAGAGA GGGGAT TTCCAA CCTCAT GGAAGT ATTGGA ATCAAC TATATA TGAGTC AAAGT GCTTCA AGCGCC CAGAA AGCAC
XM_051406044.1 GAACTT GA----- -GCTC C----- -GA CACTTT T----- -A----- T----- -TGTTTA AGCTCC AACATC AGCTCT

685
XM_051400511.1 CACGGA CACT-- ------ -AATT ACC--- ------ -AGAG GAAATA AAGGAG GGCACA TCTCCA ATCAGA TTCAT CTCAAC TTGTAC AAACA-- -GAT TCGAGG
XM_051398597.1 TC--A TCCCG TGTGTA AATACA CACTAT AACAGG GAG-AG TCTTTG AAGCGG CACTCC AGGGAG ACAGCA CTCAAC TTAAGC TTGACT AGCTCC
XM_051423290.1 CAACTG CCGGAT GAGGTT CCAAGG TGCTTT CAGAGA GGGGAT TTCCAA CCTCAT GGAAGT ATTGGA ATCAAC TATATA TGAGTC AAAGT GCTTCA AGCGCC CAGAA AGCAC
XM_051406044.1 CAACTT GA----- -GCTC C----- -GA CACTTT T----- -A----- T----- -TGTTTA AGCTCC AACATC AGCTCT

799
XM_051400511.1 TGACCG GGGGGA CAGCAG CAAGAG AGACAG CAAGAG ATTTAA CACGGA TAG-GT TATTTT AAGCGG TGCCCA GCGGGG ACTTTG GAAAGC TCGACT GCTCTC ATCTGT ACCTCC
XM_051398597.1 GCTTTA ATAAAT ACCGAC TTACGA CACTAT AACAGG TAAAGC GAG-AG TCTTTG AAGCGG CACTCC AGGGAG ACAGCA CTCAAC TTAAGC TTGACT AGCTCC
XM_051423290.1 GCAATC AGGCTC AGACCC CCGCAA AGTAAT AATCAA CCGCTC TCT-CC TCTTGG ACTTGG TGTCA CCGCAG ACAGCG AGCGCC GCTCTC TGA--- -TCA TCGAGT
XM_051406044.1 AGATGT TGGATG AGAGCT TTCTAC TCTACA CCAAAC ATATAA ATGATA TTCTCT TCTTCT ATCGCG CTAAAA AGAACA GTGTTC GTTCCA TCAAGA AACTCC TAAGTT GTCCCT

913
XM_051400511.1 ACAGCA ACATGA TGAAC ----- TCTGG ACAGTT TGTATC ATCTCC ATGTTA AATATC CCTTGA TGAGG CTTCTG TGCACC TGAAG ATGGCA AGACA AGAGC TGAAG
XM_051398597.1 GACTTA ATAAAT ACCGAC TTACGA CCGGAC AGTTCA CAGATG AAACAA AAGCCG CCTTCA TGAAG CTTTCC TGAATC TTAAGC ACACA AATATC CACTGT TGAAG
XM_051423290.1 AAGCTC ATGATA AGAGCT TAAACC ATGAGC ACTTCA GAGAGT GATCCA GAGGTA AGACTC GTCTCG CTAAAG CCGCTG TGAACC TTTAGC CTGGCG TGAATC TGACCA TCCCTC
XM_051406044.1 CCACTA ATA--- ------ TCTTTC AGAGAG GAGTCC TGGGGA AGACAG GAGTCC ATGTTG CTCTCA TGAATC A----- -TAAAC CTCTCA TGAATC TCCGCG TGAGCT

1027
XM_051400511.1 TATTAA TTGACA TTTCGG AGAAGA TGGGTG ACATCA AAAAAT TTTTGA ATTCAG CTTACA CCAACA GCTACT ACAAG GCGAGA CAGCTC TCATTA TGGCCA TTGAGA GAGAGA
XM_051398597.1 TCTTCA TTGACA TGGCTC AAAAAA CCGGAG ATTTAG AAAAAT TCATTA ACAGCT CTTATC AAGATC CTTGTT ACAAG GTCAGA CCGGCT TCCACA TGGCCA TTGAGA GAGAGA
XM_051423290.1 TCTTCA TTGACA TAGCAG CCGGAA CCGGAA ACCTCA GAGAGT GATCCA GAGGTA AGACTC GTCTCG CTAAAG CCGCTG TGAACC TTTAGC CTGGCG TGAATC TGACCA TCCCTC
XM_051406044.1 TGTATG ACCG----- -AGCTC CT--- -GACT TCATCA ACAGCG CCAATGA CCTCCG AGCTCT TCCAAG GTTATA CTCTCC TCCACA TGGCTC TCCACA TGGCTC TGAATA ATCAGA

1141
XM_051400511.1 CTTCTC TCTATG TGAAGC TCTTGG TCAGTA AAGGAG CA---A TCTTTC ATGCCA AAGCTC GTGGAA CATTCT TCCAGC C---AC ATGACG GCGCCA ACTTCT ACTTTG GTGAGC
XM_051398597.1 GCTTTG CTTTGG TGAAGC CC---G ATGTGG AAGCCA AGGCCA ATGGGA AGTTCT TCCAGC G---TA ATGACG GAGCTG GCTTTT ACTTTG GAGAGC
XM_051423290.1 CCAAGC AGTATG TGGAGC TCTCTG TGGAGA TGGGAG CT---G ATGTGG ACCTCC AGGCCA GGGGAC CTTCTT TCCAGC CCGAGC ATGAGG GGGGCT ACTTCT ACTTTG GTGAGC
XM_051406044.1 ACATCA ATCTGG TACGAC TTATCG TTAGTC GTGGGG GTGATG TGCTCA GAGTCA GAGTCA CCGGTC GTTACT TCAGGA A---GA GATATG GAGGAC TACTCT ACTTTG GTGAGC

1255
XM_051400511.1 TGCTCC TGTCTG TGGCAG CTTGCA CCAACC AGCGCC AGCTGG TGGACT TTCTCA TGGAGA ATGAGT ATGACG GAGCAG AOCCTA AGCTTC AGGACT CTGAGC GCAACA CCGTCC
XM_051398597.1 TTCTCC TGTCTG TGGCAG CTTGCA CCAACC AGCGCC ACATTT TGTCTT TCTTCA TGGAGA AOCCTT ACAGAA GAGCTC AOCCTA CTGACA AAGACT CACAGC GGAACA CTGTCC
XM_051423290.1 TTCTCC TGTCTG TGGCAG CTTGCA CCAACC AGCGCC ATGATG AGATAG TGTACT ACTTAA TGGAGA ATCCAC ACAGAA AGGCTG ATCTCG CTGACA GAGACT GAAACA CCGTCC
XM_051406044.1 ACATCC TGTCTT TTGCTG CTTGTC CTTGGA ATGAGG ACATTA TCTCCA TGTATA TCGA--- -CGCAG GGGCCA CCGACA GGGGCC AGGATT AOCCTG GCAACA CAGTCC

1369
XM_051400511.1 TCGACG CTTTGG TGGTGG TGGCTG ATGATA AGAATA ATACAG ATAGGA ATAAAT CAGAGT TCATCA CAAACA TGTACG AOCGCA TCTTCA AGA--- -CCA CTGCA GACTCC
XM_051398597.1 TCGACT CTTTGG TGGTGG TGGCTG ATGATA AGAATA ATACAG ATAGGA ATAAAT CAGAGT TCATCA CAAACA TGTATG ATGACA TGTATG TCGACT TCTTAA TCGA--- -AGA GTGCA AGCTCT
XM_051423290.1 TCGACG CTTTGG TGGTGG TGGCTG ATGATA AGAATA ATACAG ATAGGA ATAAAT CAGAGT TCATCA CAAACA TGTATG ATGACA TGTATG TCGACT TCTTAA TCGA--- -AGA GTGCA AGCTCT
XM_051406044.1 TPCACA CTTTGG TGGTGG TGGCTG ATGATA AGAATA ATACAG ATAGGA ATAAAT CAGAGT TCATCA CAAACA TGTATG ATGACA TGTATG TCGACT TCTTAA TCGA--- -AGA GTGCA AGCTCT

1483
XM_051400511.1 ACCCCA AGCTGA AGCTGG AGGACA TAGAGA ACAATA AAGGCG TGACAC CTCTCA AAATGG CTGCCA AGACTG GCGAGA TGGGTA TTTTFT CACACA TCTTCA AACTCC AATTCC
XM_051398597.1 AAAGGA AAGTGG AGTTGG AAGAAA TCGAAA ACAATC AAGGCG TGACTC CTCTCA AGTTAG CAGCCA AACTAG CAGAAA TTTGGC TGTTCA TGTATC AOCGGG AATTCC
XM_051423290.1 ACCGAC ACTTGA CTTTGG AGACAG TGCTCA ACAATC ATGGCA TGTACC CTTTCA TGTATG CCGCCA AGCTGG GCGAGA TGGGTT TTTTTC AAGACA TGTATC GACTCC AGCTCC
XM_051406044.1 ACCGAT CATTAC CACTGG ACATGG TGGCCA ACTTAC GAGGCG TTACAG CTTTFA TCGTGG CCGCCA AAGAGG GAGAGA ATGTGG CCGCCA AAGACC TTTTTC AATAAA G-----

1597
XM_051400511.1 AGGAGA CTCATA CCAAAC ATTTGT CCGGTA AATTTA CTGAGT GGGTTT ACGGCG CCGTTA ACAGCT CCGTGT ACCAGC TGGCGG CTTGCG ACTCAT ACGA-- -GGAAA ACTCAG
XM_051398597.1 TGGAGC AGGAGA TGAAGC CCGTGT CCGAGA AGTTCA CAGATG GGGTCT ATGGAC CTGTTT ACTGCT CACTPT ATGACA TGAAGT CCAATG ACAGCC ACGA-- -AGAAA ACTTCT
XM_051423290.1 -----
XM_051406044.1 -----

1711
XM_051400511.1 TCTTGG AGATAC TGTATC ACGCCA GTGAGA TCTCTA ACCCTG ATGAGA TGGCTG AGACCG AGCCTC TGAAGC GPTTGG TGGAGT CAAGT GCGAGA CCGTTG CAAGT GAGTGT
XM_051398597.1 TCTTGG AGATAC TGTATC ACGCCA GTGAGA TCTCTA ACCCTG ATGAGA TGGCTG AGACCG AGCCTC TGAAGC GPTTGG TGGAGT CAAGT GCGAGA CCGTTG CAAGT GAGTGT
XM_051423290.1 TCTTGG AGATAC TGTATC ACGCCA GTGAGA TCTCTA ACCCTG ATGAGA TGGCTG AGACCG AGCCTC TGAAGC GPTTGG TGGAGT CAAGT GCGAGA CCGTTG CAAGT GAGTGT
XM_051406044.1 TCTTGG AGATAC TGTATC ACGCCA GTGAGA TCTCTA ACCCTG ATGAGA TGGCTG AGACCG AGCCTC TGAAGC GPTTGG TGGAGT CAAGT GCGAGA CCGTTG CAAGT GAGTGT

1825
XM_051400511.1 TTTTTT TCAACT TCTTAC TATACC TCTTGT ACCTGA TCATCT TCACTT TTGTAG CTTACA ATAAGC AGGA-- ------ ------ ------ ------
XM_051398597.1 TTTTAA TCAACT TCTTAC TATACC TCTTGT ACCTGA TCATCT TCACTT TTGTAG CTTACA ATAAGC AGGA-- ------ ------ ------ ------
XM_051423290.1 TTTTAA TCAACT TCTTAC TATACC TCTTGT ACCTGA TCATCT TCACTT TTGTAG CTTACA ATAAGC AGGA-- ------ ------ ------ ------
XM_051406044.1 TCAAGC TCGCGG TGTATC TGTATC TCTTGT ACCTGA TCATCT TCACTT TTGTAG CTTACA ATAAGC AGGA-- ------ ------ ------ ------

1939
XM_051400511.1 -----
XM_051398597.1 -----
XM_051423290.1 -----
XM_051406044.1 -----

2053
XM_051400511.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051398597.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051423290.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051406044.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC

2167
XM_051400511.1 GCGTGT ATCTGA CCGGCG AGCAGG AGTACC TGGGCT TCTTGG TCTTGT GCTTGT CTTTCA CTTGGG TGAACC TGTCTT ACTTCT CCGAGG GCGACA TACACA TGGGCA TCTTCA
XM_051398597.1 TTTTGT ACCGCT CCGGCG GTCAAG AGTACC TGGGCT TCTTGG TCTTGT GCTTGT CTTTCA CTTGGG TGAACC TGTCTT ACTTCT CCGAGG GCGACA TACACA TGGGCA TCTTCA
XM_051423290.1 TCTTGT ACTTGT CTTGCA GTTATG TGTCCG TGTATG TGTTGT GCTTGT CTTTCA CTTGGG TGAACC TGTCTT ACTTCT CCGAGG GCGACA TACACA TGGGCA TCTTCA
XM_051406044.1 TTTTCA GAGCTC CCGAGG TCGAGG GAGAGG CTTGAG TGTATG TGTTGT GCTTGT CTTTCA CTTGGG TGAACC TGTCTT ACTTCT CCGAGG GCGACA TACACA TGGGCA TCTTCA

2281
XM_051400511.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051398597.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051423290.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
XM_051406044.1 GCAATC TAGACA TGAAGA GAAACC GCGCCA AGCT-- ---- -CA AGCTCC TGTACA TGTATG CATATT ATGAGA TCTTCT TTTTTT TCGAGC CCGTCC TCTTCC TGGTCT CAGCTC
```


Tabla 1: Primers diseñados para el análisis de expresión tisular.

<u>TRPV</u>	<u>Parejas de primers (5' a 3')</u>	<u>Tamaño del producto</u>
TRPV1a XM_051400511.1	F: TTGTCTACGCCGTCTTCCTT R: ACACAGTTCTCCTCAGGCTC	133pb
	F: CAACAGCCTGCCTCATAAC R: TTAGGTCAGTCAGGCTCAGC	178pb
	F: AACAAAGGACTCTGCAGGACA R: AACTCTCGTTCCAGCAGTCA	103pb
TRPV1b XM_051398597.1	F: TCCTTCTGATCTGCACCGTT R: CACGTTGATCCAGGCAAGAG	92pb
	F: AACACTGTCCTCCACTCGTT R: TGTCTCCAGCTTGTTGCCT	111pb
	F: CAGACCATGTGATGCCAGTG R: GCAGGCCGTTAAGTTGAGTT	107pb
TRPV4 XM_051423290.1	F: TTCCTCTCTCATTGGCTGCA R: CGTGTTGTCTTGGTGTGT	158pb
	F: AGGTGGATCAAGGCTCAGAC R: CCTGTGGATGGCTCTCTGAA	169pb
	F: CATCCTCTGACTACCTGCGT R: GCAGCGGTGACTACAATCAG	184pb
TRPV5/6 XM_051406044.1	F: CGAGTCACCGGTCTGTACTT R: TGCCTCGATTACCATGGAGA	120pb
	F: CTGGAGGACTCAGGTGGTAG R: CGCTCTCTCAGACCGTAGTT	108pb
	F: ACCTGTATGACCTGACGGAG R: TCAGACTAACCAGCTGCCTC	132pb

4.2. Extracción de ácidos nucleicos

La tabla 2 muestra la eficiencia de extracción de RNA bajo el protocolo fenol-cloroformo. Atendiendo a la concentración obtenida y las ratios de absorbancia, es observable que el protocolo en general es adecuado, pues en su mayoría se obtiene una concentración suficiente, necesaria para el paso a cDNA (500ng). Además, las ratios se adecúan a los requisitos de pureza que deben estar entre 1,8 – 2,1 para la ratio 260/280, que representa la contaminación por presencia de otras proteínas, y entre 1,8 – 2,2 para la ratio 260/230, si bien se ve más variabilidad en este último, que implica presencia de contaminantes de tipo fenol, como el agente TRIzol empleado en la extracción.

Observando los datos se decidió hacer una selección de tejidos más fina para el estudio de expresión. Al ser necesaria una concentración mínima de 42,5 ng/μl, se descartaron las muestras de grasa, de muy baja pureza y concentración, así como el telencéfalo, pero se decidió mantener el riñón por su implicación en la detoxificación y adaptación al medio. También se descartaron aquellos tejidos de los que solo se había recibido muestra de un único ejemplar, como la hipófisis y el riñón cefálico.

Tabla 2: Concentración de RNA (ng/μl) y ratios de absorbancia en diferentes tejidos de machos y hembras de lubina europea.

<u>Sexo</u>	<u>Tejidos</u>	Individuo					
		1			2		
		<u>RNA</u> <u>(ng/μL)</u>	<u>ABS260/280</u>	<u>ABS260/230</u>	<u>RNA</u> <u>(ng/μL)</u>	<u>ABS260/280</u>	<u>ABS260/230</u>
Macho	Ojos	734	1,92	1,06	729,6	1,87	2,02
	Bazo	1012,2	2,02	1,85	1071,2	2,01	2,1
	Riñón cefálico	1135,9	1,96	2,42			
	Riñón	875,5	1,95	1,71	809,8	1,84	2,03
	Branquia	787,8	1,89	2,39	1096,2	1,95	1,79
	Músculo	289,4	1,92	1,81	239,2	1,95	0,98
	Grasa	38	1,7	1,54	72,8	1,78	0,2
	Hígado	981	1,95	1,23	972,9	1,95	0,98
	Intestino	1057,1	2	2,13	1007,8	2,01	2,18
	Testículos	1174,5	2,03	1,79	1085,4	1,99	2,21
	Piel	893,7	1,98	0,65	305,4	1,93	1,13
	Techo óptico	956,5	2,02	2,11	1164,8	1,95	2,23
	Corazón	1010,2	1,97	2,21	709,4	1,92	2,2
	Telencéfalo	913,7	2,02	2,41	1058,3	2	2,37
	Cerebro	834,1	1,97	1,95	1130,1	2,02	2,26
	Hipotálamo	1128,5	2,02	2,34	398,01	1,97	1,81
Hipófisis	1157,4	2,02	2,06				
Hembra	Ojos	79,2	1,78	0,92	1098	1,93	1,64
	Bazo	1074,9	1,98	2,24	875,4	1,7	2,04
	Riñón cefálico	463,6	1,81	1,3	872,9	1,73	2,02
	Riñón	38,3	1,65	1,71	870	1,64	2
	Branquia	1129	1,97	0,54	983,1	1,98	2,44
	Músculo	1067,8	1,93	2	422,6	2,02	1,75
	Grasa	32,2	1,52	1,58	434,7	1,88	1,89
	Hígado	1196,6	2	1,34	1125,9	1,99	1,36
	Intestino	876,7	1,98	2,39	1102,5	2	2,36
	Ovario	1169,7	2,04	2,15	1123,4	2,05	2,15
	Piel	108,1	1,8	1,41	431,3	1,9	1,76
	Techo óptico	862,3	1,97	2,3	754,8	1,92	1,32
	Corazón	220,6	1,84	2,23	1033,4	2,01	2,24
	Telencéfalo	32,4	1,54	1,5	450,7	1,95	1,38
	Cerebro	813,7	1,99	2,17	767,7	1,88	2,14
	Hipotálamo	50,7	1,62	1,45	393,3	1,96	1,9

4.3. Validación y selección de *primers*

Se llevó a cabo una prueba de expresión inicial de los 12 pares de *primers* en cerebro y gónadas con la intención de obtener una primera aproximación de los valores de expresión. Los resultados de expresión fueron muy bajos, obteniendo Ct muy altas con cualquiera de los *primers* seleccionados, lo que indica que han sido necesarios un alto número de ciclos de PCR para alcanzar el umbral de concentración mínima. Se decidió escoger uno de los pares de *primers* para cada parólogo de TRPV de acuerdo con aquellos con Ct más bajos y una curva de disociación (*melting curve*) más ajustada a lo esperado, es decir, con un único pico a una temperatura específica. Por ello, se seleccionaron los *primers* que se muestran en la tabla 3, y se estudió su curva de calibración en diluciones seriadas 1:5 de muestras de cDNA en cerebro, ya que dio una mayor expresión que la de las gónadas.

Tabla 3: Par de primers seleccionados para cada parólogo de TRPV en lubina europea.

TRPV	Parejas de <i>primers</i> (5' a 3')	Tamaño del producto
TRPV1a XM_051400511.1	F: TTGTCTACGCCGTCTTCCTT R: ACACAGTTCTCCTCAGGCTC	133pb
TRPV1b XM_051398597.1	F: CAGACCATGTGATGCCAGTG R: GCAGGCCGTTAAGTTGAGTT	107pb
TRPV4 XM_051423290.1	F: TTCCTCTCTCATTGGCTGCA R: CGTGTTGTCCTTGGTGTGT	158pb
TRPV5 XM_051406044.1	F: CGAGTCACCGGTCTGTACTT R: TGCCTCGATTACCATGGAGA	120pb

La curva de calibración mide la relación lineal entre cantidad de cDNA presente y el número de ciclos necesario para alcanzar el umbral, buscándose una eficiencia en fase exponencial óptima. Esta eficiencia se mide de acuerdo con la siguiente fórmula, siendo un *primer* óptimo aquel cuya eficiencia es del 90-110%.

$$Eficiencia = 10^{\left(-\frac{1}{pendiente}\right)} - 1$$

Las curvas de calibración de *primers* se muestran en la figura 7, obteniéndose una eficiencia del 107,61% para el par de TRPV1a, 178,23% para TRPV1b, 114,12% para TRPV4 y 94,57% para TRPV5.

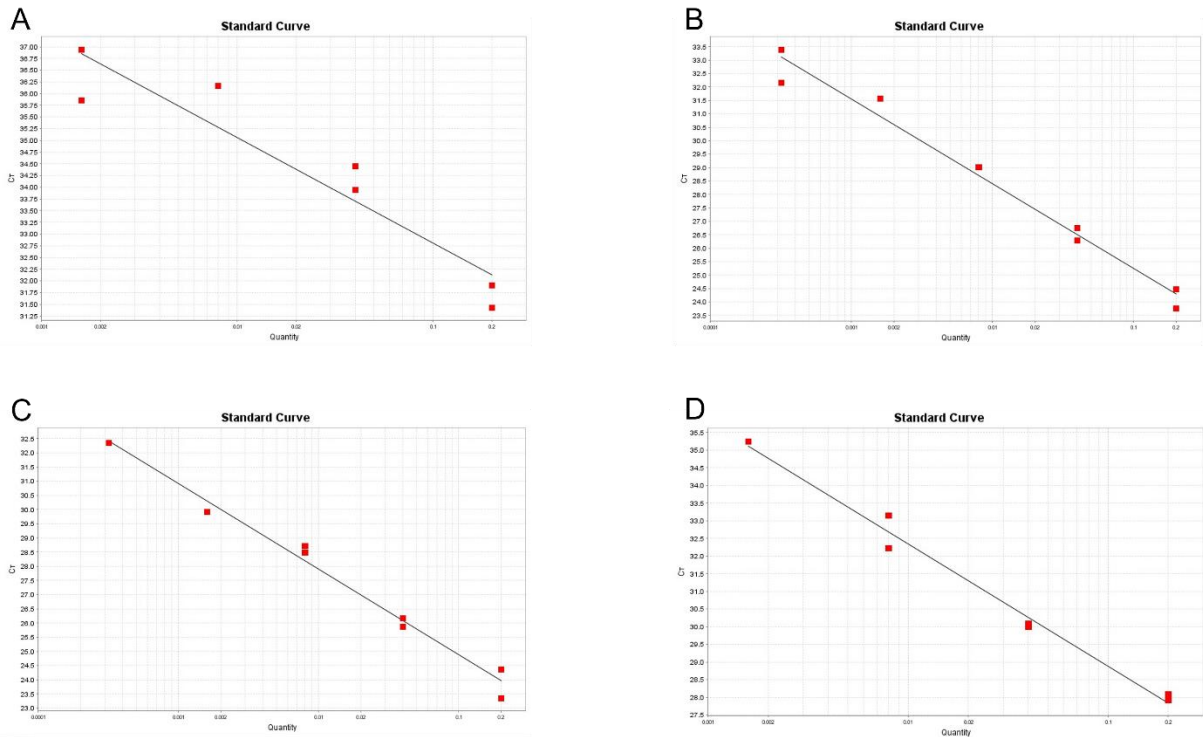


Figura 7: Curvas de calibración obtenidas para el par de primers seleccionado en A) TRPV1a, B) TRPV1b, C) TRPV4 y D) TRPV5.

Los *primers* se podrían optimizar, estudiando el resto de los pares de *primers* para buscar mejores eficiencias o diseñando otros, pero no ha sido posible en el tiempo de realización del trabajo. A todo esto, debe sumarse la baja expresión observada en la prueba previa de expresión, debida principalmente al tratamiento de unas muestras muy antiguas y cuya conservación no ha sido óptima.

A continuación, se procedió con el análisis de expresión tisular con los *primers* seleccionados, si bien el par de TRPV1b no se ha empleado, excluyéndose este parálogo del estudio de expresión.

4.4. Análisis de expresión tisular

Tras la lectura y *screening* tisular de las distintas placas asociadas a un miembro de la familia TRPV en lubina europea, se obtuvieron los valores Ct, los cuales permitieron establecer un valor relativo que relaciona la expresión de cada TRPV con el tejido.

Generalmente, se establecen los siguientes rangos de Ct para determinar si una expresión relativa es alta, media o baja: Ct = 22 – 25 indica una expresión alta, Ct = 26 – 28 indica una expresión media, mientras que un valor > 28 indica baja expresión. Cuando dichos valores se analizan frente su calibrador, en este caso la eficiencia del *primer*, se obtiene su cantidad absoluta

Los resultados obtenidos no alcanzaron las cantidades esperadas. Las Ct observadas fueron muy altas yendo desde 27 hasta 39 los ciclos necesarios, encontrándose la mayoría en torno a los 30 ciclos. La expresión fue muy baja, probablemente debido a la antigüedad de las muestras y conservación no adecuada, por lo que se espera que, con muestras más recientes, los resultados aporten información más fiable sobre los mecanismos de adaptación y su relación con la expresión en diferentes tejidos. No obstante, dentro de la baja expresión general, se pueden establecer diferencias, mostradas en la tabla 4, y que permiten apreciar la distribución tisular y observar qué tejidos tienen mayor expresión para futuros análisis de determinación.

Tabla 4: Expresión tisular de TRPV1a, TRPV4 y TRPV5 en machos y hembras de lubina europea

Tejido	Sexo					
	Macho			Hembra		
	TRPV1a	TRPV4	TRPV5	TRPV1a	TRPV4	TRPV5
Ojos	++	+	+++	+++	++	+++
Bazo	++	+	-	+	+	++
Branquia	+	++	+++	+	++	+++
Músculo	++	+	-	++	+	++
Hígado	++	+	-	++	+	-
Cerebro	++	+	+++	++	++	+++
Intestino	++	+	-	+	+	-
Gónadas	+++	+	+++	++	+	+++
Piel	+	++	++	++	++	+++
Hipotálamo	+++	+	+++	+++	+	+++
Corazón	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Riñón	+++	++	+++	++	+++	+++

Los símbolos “+” y “-” indican diferencias absolutas de expresión entre tejidos. “-” indica indeterminación de Ct, mientras que “+” implica expresión más baja y “+++” expresión más alta.

Los datos aportan información clara sobre una expresión diferencial, si bien ubicua, de los receptores TRPV en los distintos tejidos analizados. Es destacable la mayor expresión del TRPV5 en casi todos los tejidos analizados, si bien se observa ausencia en diversos tejidos. Por su parte, la expresión de TRPV1a y TRPV4 es más variable, pero se encuentran presente en la totalidad de tejidos. La mayor expresión se dio en testículos, corazón e hipotálamo para TRPV1a, en corazón y riñón para TRPV4, y en ojos, hipotálamo y riñón para TRPV5.

Atendiendo a los diferentes tejidos, bazo e intestino son los tejidos donde el valor absoluto es menor, expresándose de manera similar. Por un lado, el bazo, cuya función principal es la filtración de la sangre y mantenimiento de células sanguíneas no parece tener una relación directa con la termosensación o termoestabilidad, si bien en el teleosteo *Cynoglossus semilaevis*, el bazo constituye el segundo tejido con mayor expresión de TRPV4 (Shang et al., 2020), mientras que en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) TRPV1 tiene una expresión

similar respecto al resto de tejidos (Nisembaum et al., 2015). Por otro lado, el intestino, relacionado con procesos de absorción de nutrientes puede alcanzar temperaturas muy elevadas durante la digestión, por lo que parece raro la ausencia de termoTRPVs (TRPV1a y TRPV4), así como de TRPV5, de alta afinidad por iones Ca^{2+} , el cual no supera el umbral de detección en los 40 ciclos establecidos. Si bien en otras especies los resultados en el intestino son contradictorios, ya que el salmón chum (*Oncorhynchus keta*) muestra una expresión muy baja de TRPV4 en dicho tejido (Lee et al., 2021), mientras que, en la trucha arcoíris, del mismo género, la expresión de TRPV1a en el intestino es la más elevada (Nisembaum et al., 2015). En especies más alejadas como en seres humanos (*Homo sapiens*) se observa un comportamiento similar al de la lubina europea, con una expresión muy baja (Kudsi et al., 2022).

Las branquias, que constituyen un punto importante en la respuesta fisiológica a cambios en medio ambiente en los peces, son el tejido con menor expresión de TRPV1a observada, presentando una mayor expresión, no muy destacada, de TRPV4 y TRPV5. Esta proporción se adecúa a lo observado en otros teleósteos y bivalvos, donde la expresión de TRPV1a no es destacable, pudiendo relacionarse con una baja estimulación de expresión, dado que las condiciones de activación requieren temperaturas más elevadas (Verlinden et al., 2022). Por otro lado, TRPV4, con capacidad osmo, mecano y termorreguladora, se expresa de manera elevada en las branquias de la ostra japonesa (*Magallana gigas*) (Fu et al., 2021; He et al., 2022), de medaka (Hori et al., 2022) y en salmón chum (Lee et al., 2021), si bien cabe destacar que en lubina europea se ha descrito un gran aumento en la expresión de TRPV4 bajo condiciones de agua dulce (Bossus et al., 2011). Además, TRPV5 se encuentra muy elevado en las branquias del catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) (Flores-Aldama et al., 2020), siendo importantes en peces de agua dulce, que deben mantener una alta concentración de iones, como el Ca^{2+} , en sangre (Marshall, 2002).

Otros tejidos como la piel, músculo o hígado presentan una expresión media/baja. El hígado es uno de los tejidos con menor expresión de termoTRPVs en los diversos teleósteos, siendo TRPV4 el menos expresado en *Cynoglossus semilaevis* (Shang et al., 2020) y salmón chum (Lee et al., 2021), así como TRPV1a el menos expresado en trucha arcoíris (Nisembaum et al., 2015). Además, no se ha podido definir la cantidad de TRPV5, siendo por tanto muy baja en lubina europea, si bien ésta se ha observado en la perca americana (*Micropterus salmoides*) ((Zhao et al., 2023).

El músculo no ha sido un tejido ampliamente analizado, destacándose únicamente una fuerte expresión de TRPV4 en la ostra japonesa, cuyo músculo abductor está muy desarrollado (He et al., 2022). Por otro lado, la piel, mejor estudiada y considerada un importante integrador de la información del medioambiente, presenta grandes diferencias entre especies. Por ejemplo,

dentro de los teleósteos, TRPV4 se expresó muy poco en *Cynoglossus semilaevis*, mientras que en pez cebra y salmón chum, este mismo receptor se expresó de manera elevada (Amato et al., 2012; Lee et al., 2021; Shang et al., 2020). Esta elevada expresión también se observa en humanos (Saito & Tominaga, 2015), cuya alteración está relacionada con neuropatías motoras y sensoriales (Sasase et al., 2022).

Los ojos presentan una expresión de TRPV4 baja, superada por TRPV1a. Esta correlación se observa también en el salmón chum (Lee et al., 2021) y en la trucha arcoíris (Nisembaum et al., 2015), pero en *Cynoglossus semilaevis*, la expresión de TRPV4 en el ojo es muy elevada (Shang et al., 2020). En mamíferos se han descrito enfermedades oftalmológicas por alteraciones de TRPV4 en el ojo, siendo muy importante en el mantenimiento de la presión ocular y la barrera hemato-retiniana (Lapajne et al., 2022; Wang et al., 2023). Cabe destacar que la expresión de todos los receptores en los ojos es más alta que en la piel, mecanismo no observado en mamíferos, pudiendo tratarse los ojos de un importante integrador de las variaciones ambientales en lubina europea.

Las gónadas presentan una clara mayor expresión de TRPV1a y TRPV5, con diferencias observables entre los diferentes sexos. Los testículos presentan mayor expresión de TRPV1 que los ovarios, coincidiendo con lo observado en seres humanos (Kudsi et al., 2022), pues poseen una importante función en la regulación de la temperatura que modulará la maduración y desarrollo espermático (Stein et al., 2004). Además, la elevada expresión de TRPV5 también es común a ambas especies (Sasase et al., 2022). Los ovarios mantienen una expresión elevada de todos los receptores.

En cerebro la expresión de TRPV1a ha sido superior a TRPV4. Los estudios de especies cercanas también sitúan la baja expresión de TRPV4 en salmón chum, medaka, trucha arcoíris y salmón atlántico, si bien la expresión aumenta considerablemente en teleósteos en periodos de adaptación, ya sea aumentando la temperatura, alterando la salinidad o tras una infección (Boltana et al., 2018; Bossus et al., 2011; Z. He et al., 2022; Hori et al., 2022; Lee et al., 2021; Nisembaum et al., 2015).

El hipotálamo, conocido por regular la temperatura corporal, la sed y el hambre en humanos, presentó niveles muy elevados de TRPV1a y TRPV5, si bien muy bajos de TRPV4. Esto se puede relacionar con la tónica vista hasta ahora, donde aquellos tejidos en los que destaca la expresión de TRPV4 son aquellos en contacto con el medio ambiente, y que, parecen tener más relación con la transducción de información exterior en lubina europea.

El riñón ha presentado importantes niveles de expresión en todos los receptores TRPV. Dada su función e importancia en la reabsorción de Ca^{2+} , no es de extrañar la alta expresión de TRPV5, que ha sido la más elevada captada por la medición qPCR en nuestro estudio, al igual

que en el catán pinto (Flores-Aldama et al., 2020) y que se extrapola a mamíferos, cuyos mutantes sin receptor han señalado enormes pérdidas de Ca^{2+} (Nijenhuis et al., 2005), así como la presencia de cálculos renales (Sasase et al., 2022)

Por último, el corazón es el tejido con mayor presencia de TRPVs en lubina europea de acuerdo con los resultados. Posee una expresión uniforme y elevada en machos y hembras, siendo un importante regulador de todas las funciones fisiológicas. En especies cercanas se ha observado un comportamiento similar, siendo la expresión 4 veces más elevada de TRPV4 en el corazón respecto al resto de tejidos en *Cynoglossus semilaevis*, y significativamente más elevada en la trucha arcoíris (Nisembaum et al., 2015; Shang et al., 2020).

Atendiendo a los sexos se aprecia una distribución relativamente uniforme en la mayoría de los tejidos, si bien algunas diferencias salen a la luz. Por un lado, los testículos presentan una expresión de TRPV1a muy elevada, regulando la óptima temperatura de desarrollo espermático, mientras que los ovarios presentan mayor expresión de TRPV5. Por otro lado, se observa una evidente mayor expresión de TRPVs en los ojos y piel de hembras que de machos, si bien no se ha relacionado con una mejor adaptabilidad o respuesta entre estos grupos. Algunos tejidos como el músculo o corazón, cuyo tamaño varía de acuerdo con el sexo, presentan resultados muy similares. La ausencia de TRPV5 en tejidos de machos que sí se da en hembras no parece corresponder con la realidad, tratándose de posibles incoherencias debidas al estado de las muestras.

De acuerdo con un proceso de adaptabilidad, como el cambio de temperatura o salinidad, se han determinado alteraciones en la expresión de los TRPVs en tejidos específicos, relacionándose con el desarrollo de una respuesta. El órgano más importante y que muestra mayor relación con la adaptación a numerosos estímulos es el cerebro, el cual dirigirá el comportamiento y actuación del teleósteo en cuestión, seguido de las branquias y ojos, importantes integradores de la información. Cabe destacar que la expresión en la piel no responde a un aumento de estos estímulos, dejando dicho órgano sensorial en un segundo plano en este contexto de la generación de respuestas. También se han observado importantes variaciones en riñón e intestino, pudiendo alterar el consumo, hecho observado en lubina europea durante las estaciones frías, así como la reabsorción de iones como Ca^{2+} en respuesta a los cambios (Boltana et al., 2018; Bossus et al., 2011; Z. He et al., 2022; Hori et al., 2022; Lee et al., 2021; Nisembaum et al., 2015; Pickett & Pawson, 1994).

Como se ha observado, la variabilidad que presenta el perfil de expresión de estos receptores es enorme, incluso dentro del mismo género o de la infraclase de los teleósteos. En este proyecto se determina la presencia o ausencia de cada TRPV, y se predice alguna función relacionada con su localización tisular en lubina europea, si bien no se puede determinar la

importancia, posición o funcionalidad que tiene cada TRPV dentro de una cascada de señalización frente a los estímulos que recibe. Además, teniendo en cuenta las complicaciones presentadas por la antigüedad de las muestras, no se ha podido optimizar el protocolo utilizado ni obtener resultados más fiables.

Por ello, futuras investigaciones son necesarias, que ajusten de manera precisa los niveles de expresión tisular y permitan desarrollar análisis funcionales con el fin de establecer una clara relación estímulo – respuesta. De este modo, se podrá determinar la capacidad adaptativa y los potenciales riesgos que suponen las variaciones derivadas del cambio climático a la reproducción y desarrollo de especies de interés acuícola como la lubina europea. Planteando así soluciones, que, asegurando un adecuado bienestar en las especies, permitan aumentar la producción y adecuar la industria a un creciente y exigente sector económico.

5. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha puesto a punto el protocolo de análisis de la expresión tisular de los receptores TRPV en la lubina europea, que permitirán determinar mecanismos de respuesta frente temperatura, cambios de osmolaridad y contaminantes entre otros.
2. Se han caracterizado 4 parálogos TRPVs presentes en lubina europea, que son TRPV1a, TRPV1b, TRPV4 y TRPV5.
3. Se han diseñado y probado *primers* para cada TRPV, obteniendo *primers* adecuados y óptimos para TRPV1a, TRPV4 y TRPV5, que permiten su análisis por qPCR.
4. Se han encontrado TRPVs en todos los tejidos analizados en lubina europea, estando relacionados con la integración de estímulos y la respuesta de adaptación al medio.
5. El screening de expresión de cada parálogo ha permitido observar diferencias entre tejidos de lubina europea, destacando una mayor expresión en el corazón y riñón, así como expresiones bajas en branquias e intestino, donde se pensaba que tendría una mayor relevancia. Además, se ha determinado el cerebro como órgano importante en la adaptación y aclimatación al medio ambiente, y propuesto los ojos y branquias como importantes integradores de los estímulos externos.
6. Se han observado pequeñas diferencias entre sexos, principalmente en las gónadas, así como en algunos órganos sensoriales. No obstante, la baja calidad de las muestras puede esconder información importante que deberá ser estudiada en proyectos futuros.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABBAS, M. A. (2020). Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chemico-Biological Interactions*, 330, 109178. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2020.109178>
- ABDOU, K., AUBIN, J., ROMDHANE, M. S., LE LOC'H, F., & LASRAM, F. B. R. (2017). Environmental assessment of seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*) farming from a life cycle perspective: A case study of a Tunisian aquaculture farm. *Aquaculture*, 471, 204–212. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.01.019>
- AMATO, V., VIÑA, E., CALAVIA, M. G., GUERRERA, M. C., LAURÀ, R., NAVARRO, M., DE CARLOS, F., COBO, J., GERMANÀ, A., & VEGA, J. A. (2012). TRPV4 in the sensory organs of adult zebrafish. *Microscopy Research and Technique*, 75(1), 89–96. <https://doi.org/10.1002/JEMT.21029>
- AMINI, M., CHANG, Y., WISSENBACH, U., FLOCKERZI, V., SCHLENSTEDT, G., & BECK, A. (2021). Activity of the yeast vacuolar TRP channel TRPY1 is inhibited by Ca²⁺-calmodulin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4), 101126. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101126>
- ANESTIS, A., PÖRTNER, H. O., KARAGIANNIS, D., ANGELIDIS, P., STAIKOU, A., & MICHAELIDIS, B. (2010). Response of *Mytilus galloprovincialis* (L.) to increasing seawater temperature and to marteliosis: Metabolic and physiological parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2009.12.018>
- AYALA, M. D., LÓPEZ-ALBORS, O., GIL, F., GARCÍA-ALCÁZAR, A., ABELLÁN, E., ALARCÓN, J. A., ÁLVAREZ, M. C., RAMÍREZ-ZARZOSA, G., & MORENO, F. (2001). Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 202(3–4), 359–370. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00785-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00785-2)
- BENHAM, C. D., DAVIS, J. B., & RANDALL, A. D. (2002). Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology*, 42(7), 873–888. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00047-3)
- BERNABÒ, N., PISTILLI, M. G., FALASCA, G., CURINI, V., GAROFALO, M. L. A., TURRIANI, M., MATTIOLI, M., & BARBONI, B. (2010). Role of TRPV1 channels during the acquisition of fertilizing ability in boar spermatozoa. *Veterinary Research Communications*, 34(SUPPL.1), 5–8. <https://doi.org/10.1007/S11259-010-9367-4>
- BERTIN, S., AOKI-NONAKA, Y., DE JONG, P. R., NOHARA, L. L., XU, H., STANWOOD, S. R., SRIKANTH, S., LEE, J., TO, K., ABRAMSON, L., YU, T., HAN, T., TOUMA, R., LI, X., GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M., HERDMAN, S., CORR, M., FU, G., DONG, H., ... RAZ, E. (2014). The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, 15(11), 1055–1063. <https://doi.org/10.1038/ni.3009>
- BJØRNDAL, T., & GUILLEN, J. (2018). Market integration between wild and farmed fish in Mediterranean countries: Vol. FIAM/C1131 (FAO, Ed.). FAO.
- BOLTANA, S., SANHUEZA, N., DONOSO, A., AGUILAR, A., CRESPO, D., VERGARA, D., ARRIAGADA, G., MORALES-LANGE, B., MERCADO, L., REY, S., TORT, L., & MACKENZIE, S. (2018). The expression of TRPV channels, prostaglandin E2 and pro-inflammatory cytokines during behavioural fever in fish. *Brain, Behavior, and Immunity*, 71, 169–181. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.03.023>
- BOPP, L., RESPLANDY, L., ORR, J. C., DONEY, S. C., DUNNE, J. P., GEHLEN, M., HALLORAN, P., HEINZE, C., ILYINA, T., SÉFÉRIAN, R., TJIPUTRA, J., & VICHI, M. (2013). Multiple stressors of ocean ecosystems in the 21st century: Projections with

- CMIP5 models. *Biogeosciences*, 10(10), 6225–6245. <https://doi.org/10.5194/BG-10-6225-2013>
- BOSSUS, M., CHARMANTIER, G., & LORIN-NEBEL, C. (2011). Transient receptor potential vanilloid 4 in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*: A candidate protein for osmosensing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2011.04.014>
- CAO, E., LIAO, M., CHENG, Y., & JULIUS, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504(7478), 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature12823>
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- CHEN, Y., WANG, H., WANG, F., CHEN, C., ZHANG, P., SONG, D., LUO, T., XU, H., & ZENG, X. (2020). Sperm motility modulated by Trpv1 regulates zebrafish fertilization. *Theriogenology*, 151, 41–51. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.03.032>
- CLAPHAM, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- EUROSTAT. (2023). Production from aquaculture excluding hatcheries and nurseries (from 2008 onwards). https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/FISH_AQ2A_custom_6478250/default/table?lang=en
- FAO. (2022a). *The State of Mediterranean and Black Sea Fisheries 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc3370en>
- FAO. (2022b). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- FLORES-ALDAMA, L., VANDEWEGE, M. W., ZAVALA, K., COLENZO, C. K., GONZALEZ, W., BRAUCHI, S. E., & OPAZO, J. C. (2020). Evolutionary analyses reveal independent origins of gene repertoires and structural motifs associated to fast inactivation in calcium-selective TRPV channels. *Scientific Reports 2020*, 10(1), 8684. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65679-6>
- FU, H., JIAO, Z., LI, Y., TIAN, J., REN, L., ZHANG, F., LI, Q., & LIU, S. (2021). Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Genome-Wide Identification and Expression Profiling after Heat Stress between *C. gigas* and *C. angulata*. *International Journal of Molecular Sciences 2021*, Vol. 22, Page 3222, 22(6), 3222. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063222>
- FUENTES, A., FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., SERRA, J. A., & BARAT, J. M. (2010). Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*, 119(4), 1514–1518. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.036>
- GAO, Y., CAO, E., JULIUS, D., & CHENG, Y. (2016). TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature 2016* 534:7607, 534(7607), 347–351. <https://doi.org/10.1038/nature17964>
- GATTUSO, J. P., MAGNAN, A., BILLÉ, R., CHEUNG, W. W. L., HOWES, E. L., JOOS, F., ALLEMAND, D., BOPP, L., COOLEY, S. R., EAKIN, C. M., HOEGH-GULDBERG, O., KELLY, R. P., PÖRTNER, H. O., ROGERS, A. D., BAXTER, J. M., LAFFOLEY, D., OSBORN, D., RANKOVIC, A., ROCHETTE, J., ... TURLEY, C. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO2 emissions scenarios. *Science*, 349(6243). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC4722/SUPPL_FILE/GATTUSO.SM.PDF

- GAU, P., POON, J., UFRET-VINCENY, C., SNELSON, C. D., GORDON, S. E., RAIBLE, D. W., & DHAKA, A. (2013). The Zebrafish Ortholog of TRPV1 Is Required for Heat-Induced Locomotion. *Journal of Neuroscience*, 33(12), 5249–5260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5403-12.2013>
- GHOSH, A., KAUR, N., KUMAR, A., & GOSWAMI, C. (2016). Why individual thermo sensation and pain perception varies? Clue of disruptive mutations in TRPVs from 2504 human genome data. *Channels*, 10(5), 339–345. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1162365>
- GOUY, M., TANNIER, E., COMTE, N., & PARSONS, D. P. (2021). Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2231, 241–260. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15
- GÜLER, A. D., LEE, H., IIDA, T., SHIMIZU, I., TOMINAGA, M., & CATERINA, M. (2002). Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6408–6414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06408.2002>
- HE, L., AHMAD, M., & PERRIMON, N. (2019). Mechanosensitive channels and their functions in stem cell differentiation. *Experimental Cell Research*, 374(2), 259–265. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.11.016>
- HE, Z., YANG, C., JIANG, D., WANG, X., XING, Z., YU, S., YANG, Q., & WANG, L. (2022). The expression profile of a multi-stress inducible transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 3, 100064. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2022.100064>
- HIMMEL, N. J., GRAY, T. R., COX, D. N., & RUVINSKY, I. (2020). Phylogenetics Identifies Two Eumetazoan TRPM Clades and an Eighth TRP Family, TRP Soromelastatin (TRPS). *Molecular Biology and Evolution*, 37(7), 2034–2044. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA065>
- HORI, S., & SAITOH, O. (2023). Decreased heat sensitivity of lungfish TRPV1 revealed by the heterologous expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 647, 16–22. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2023.01.060>
- HORI, S., SAKAMOTO, N., & SAITOH, O. (2022). Cloning and functional characterization of medaka TRPV4. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 267, 111182. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111182>
- HOUGH, C. (2022). *Regional review on status and trends in aquaculture development in Europe – 2020*. <https://doi.org/10.4060/cb7809en>
- HUNT, R. F., HORTOPAN, G. A., GILLESPIE, A., & BARABAN, S. C. (2012). A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Experimental Neurology*, 237(1), 199–206. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2012.06.013>
- IPCC, Pachauri, R. K., & Meyer, L. A. (2014). *Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*.
- JAKIUL ISLAM, M., JAMES SLATER, M., THIELE, R., & KUNZMANN, A. (2021). Influence of extreme ambient cold stress on growth, hematological, antioxidants, and immune responses in European seabass, *Dicentrarchus labrax* acclimatized at different salinities. *Ecological Indicators*, 122, 107280. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2020.107280>
- JERÔNIMO, R., MORAES, M. N., DE ASSIS, L. V. M., RAMOS, B. C., ROCHA, T., & CASTRUCCI, A. M. DE L. (2017). Thermal stress in *Danio rerio*: a link between temperature, light, thermo-TRP channels, and clock genes. *Journal of Thermal Biology*, 68, 128–138. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2017.02.009>

- KÄRKI, T., & TOJKANDER, S. (2021). TRPV Protein Family—From Mechanosensing to Cancer Invasion. *Biomolecules*, *11*(7), 1019. <https://doi.org/10.3390/BIOM11071019>
- KASHIO, M., & TOMINAGA, M. (2022). TRP channels in thermosensation. *Current Opinion in Neurobiology*, *75*, 102591. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102591>
- KASTENHUBER, E., GESEMANN, M., MICKOLEIT, M., & NEUHAUSS, S. C. F. (2013). Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes. *Developmental Dynamics*, *242*(11), 1236–1249. <https://doi.org/10.1002/DVDY.24020>
- KUDSI, S. Q., PICCOLI, B. C., ARDISSON-ARAÚJO, D., & TREVISAN, G. (2022). Transcriptional landscape of TRPV1, TRPA1, TRPV4, and TRPM8 channels throughout human tissues. *Life Sciences*, *308*, 120977. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120977>
- KUMAR, A., MAJHI, R. K., SWAIN, N., GIRI, S. C., KAR, S., SAMANTA, L., & GOSWAMI, C. (2016). TRPV4 is endogenously expressed in vertebrate spermatozoa and regulates intracellular calcium in human sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *473*(4), 781–788. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.03.071>
- KUMAR, P. S., RADHAKRISHNAN, A., MUKHERJEE, T., KHAMARU, S., CHATTOPADHYAY, S., & CHATTOPADHYAY, S. (2023). Understanding the role of Ca²⁺ via transient receptor potential (TRP) channel in viral infection: Implications in developing future antiviral strategies. *Virus Research*, *323*, 198992. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2022.198992>
- LAPAJNE, L., RUDZITIS, C. N., CULLIMORE, B., RYSKAMP, D., LAKK, M., REDMON, S. N., YARISHKIN, O., & KRIZAJ, D. (2022). TRPV4: Cell type-specific activation, regulation and function in the vertebrate eye. *Current Topics in Membranes*, *89*, 189–219. <https://doi.org/10.1016/BS.CTM.2022.07.005>
- LEE, H. J., LEE, S. Y., & KIM, Y. K. (2021). Molecular characterization of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) gene transcript variant mRNA of chum salmon *Oncorhynchus keta* in response to salinity or temperature changes. *Gene*, *795*, 145779. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2021.145779>
- LEZAMA-GARCÍA, K., MOTA-ROJAS, D., PEREIRA, A. M. F., MARTÍNEZ-BURNES, J., GHEZZI, M., DOMÍNGUEZ, A., GÓMEZ, J., GERALDO, A. DE M., LENDEZ, P., HERNÁNDEZ-ÁVALOS, I., FALCÓN, I., OLMOS-HERNÁNDEZ, A., & WANG, D. (2022). Transient receptor potential (Trp) and thermoregulation in animals: Structural biology and neurophysiological aspects. *Animals*, *12*(1), 106–127. <https://doi.org/10.3390/ani12010106>
- MAJHI, R. K., KUMAR, A., YADAV, M., SWAIN, N., KUMARI, S., SAHA, A., PRADHAN, A., GOSWAMI, L., SAHA, S., SAMANTA, L., MAITY, A., NAYAK, T. K., CHATTOPADHYAY, S., RAJAKUBERAN, C., KUMAR, A., & GOSWAMI, C. (2013). Thermosensitive ion channel TRPV1 is endogenously expressed in the sperm of a fresh water teleost fish (*Labeo rohita*) and regulates sperm motility. *Channels*, *7*(6), 483–492. https://doi.org/10.4161/CHAN.25793/SUPPL_FILE/KCHL_A_10925793_SM0001.ZIP
- MAJHI, R. K., SAHA, S., KUMAR, A., GHOSH, A., SWAIN, N., GOSWAMI, L., MOHAPATRA, P., MAITY, A., KUMAR SAHOO, V., KUMAR, A., & GOSWAMI, C. (2015). Expression of temperature-sensitive ion channel TRPM8 in sperm cells correlates with vertebrate evolution. *PeerJ*, *3*, e1310. <https://doi.org/10.7717/peerj.1310>
- MARSHALL, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, *293*(3), 264–283. <https://doi.org/10.1002/JEZ.10127>
- MEYER, A., & VAN DE PEER, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays*, *27*(9), 937–945. <https://doi.org/10.1002/BIES.20293>

- MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2022). *Dicentrarchus labrax*. https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/lubina_tcm30-628440.pdf
- MONTELL, C., BIRNBAUMER, L., & FLOCKERZI, V. (2002). The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. *Cell*, *108*(5), 595–598. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00670-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00670-0)
- MORINI, M., BERGQVIST, C. A., ASTURIANO, J. F., LARHAMMAR, D., & DUFOUR, S. (2022). Dynamic evolution of transient receptor potential vanilloid (TRPV) ion channel family with numerous gene duplications and losses. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 2724. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1013868>
- NIJENHUIS, T., HOENDEROP, J. G. J., & BINDELS, R. J. M. (2005). TRPV5 and TRPV6 in Ca²⁺ (re)absorption: Regulating Ca²⁺ entry at the gate. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *451*(1), 181–192. <https://doi.org/10.1007/S00424-005-1430-6/FIGURES/4>
- NISEMBAUM, L. G., BESSEAU, L., PAULIN, C. H., CHARPANTIER, A., MARTIN, P., MAGNANOU, E., FUENTÈS, M., DELGADO, M. J., & FALCÓN, J. (2015). In the Heat of the Night: Thermo-TRPV Channels in the Salmonid Pineal Photoreceptors and Modulation of Melatonin Secretion. *Endocrinology*, *156*(12), 4629–4638. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1684>
- NobelPrize.org. (2023, June 12). *Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021*. Nobel Prize Outreach AB 2023.
- ORTEGA, A. (2013). Cultivo de lubina (*Dicentrarchus labrax*). *Cuadernos de Acuicultura* (Vol. 5). <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- OSPINA-ÁLVAREZ, N., & PIFERRER, F. (2008). Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE*, *3*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002837>
- PEÑARANDA, D. S., PÉREZ, L., GALLEGO, V., JOVER, M., TVEITEN, H., BALOCHE, S., DUFOUR, S., & ASTURIANO, J. F. (2010). Molecular and physiological study of the artificial maturation process in European eel males: From brain to testis. *General and Comparative Endocrinology*, *166*(1), 160–171. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.08.006>
- PENG, G., SHI, X., & KADOWAKI, T. (2015). Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *84*, 145–157. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2014.06.016>
- PERSON-LE RUYET, J., MAHÉ, K., LE BAYON, N., & LE DELLIOU, H. (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, *237*(1–4), 269–280. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.04.021>
- PICKETT, G. D. ., & PAWSON, M. G. (1994). *Sea Bass: Biology, exploitation and conservation* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.
- PÖRTNER, H. O., & PECK, M. A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, *77*(8), 1745–1779. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2010.02783.X>
- PUMROY, R. A., FLUCK, E. C., AHMED, T., & MOISEENKOVA-BELL, V. Y. (2020). Structural insights into the gating mechanisms of TRPV channels. *Cell Calcium*, *87*, 102168. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2020.102168>
- ROSA, R., MARQUES, A., & NUNES, M. L. (2012). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *4*(3), 163–177. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2012.01071.X>

- SAITO, S., & TOMINAGA, M. (2015). Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. *Cell Calcium*, 57(3), 214–221. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.12.001>
- SAMANTA, A., HUGHES, T. E. T., & MOISEENKOVA-BELL, V. Y. (2018). Transient receptor potential (TRP) channels. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 87, pp. 141–165). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6
- SAMARAS, A., TSOUKALI, P., KATSIKA, L., PAVLIDIS, M., & PAPADAKIS, I. E. (2023). Chronic impact of exposure to low dissolved oxygen on the physiology of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* and its effects on the acute stress response. *Aquaculture*, 562, 738830. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738830>
- SANTONI, G., MAGGI, F., MORELLI, M. B., SANTONI, M., & MARINELLI, O. (2019). Transient Receptor Potential Cation Channels in Cancer Therapy. *Medical Sciences*, 7(12), 108–131. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI7120108>
- SASASE, T., FATCHIYAH, F., & OHTA, T. (2022). Transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels: Basal properties and physiological potential. *General Physiology and Biophysics*, 41(3), 165–190. https://doi.org/10.4149/GPB_2022016
- SCHEPERS, R. J., & RINGKAMP, M. (2010). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2009.10.003>
- SCIENTIFIC TECHNICAL AND ECONOMIC COMMITTEE FOR FISHERIES. (2021). *The EU Aquaculture Sector - Economic report 2020 (STECF-20-12)*.
- SERVILI, A., CANARIO, A. V. M., MOUCHEL, O., & MUÑOZ-CUETO, J. A. (2020). Climate change impacts on fish reproduction are mediated at multiple levels of the brain-pituitary-gonad axis. *General and Comparative Endocrinology*, 291, 113439. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2020.113439>
- SHANG, X., MA, A., WANG, X., XIA, D., & ZHUANG, J. (2020). Isolation, characterization and expression analysis of TRPV4 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 38(1), 294–305. <https://doi.org/10.1007/S00343-019-8316-5/METRICS>
- STEIN, R. J., SANTOS, S., NAGATOMI, J., HAYASHI, Y., MINNERY, B. S., XAVIER, M., PATEL, A. S., NELSON, J. B., FUTRELL, W. J., YOSHIMURA, N., CHANCELLOR, M. B., & DE MIGUEL, F. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *Journal of Urology*, 172(3), 1175–1178. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf>
- UMAR, D., DAS, A., GUPTA, S., CHATTOPADHYAY, S., SARKAR, D., MIRJI, G., KALIA, J., ARIMBASSERI, G. A., DURDIK, J. M., RATH, S., GEORGE, A., & BAL, V. (2020). Febrile temperature change modulates CD4 T cell differentiation via a TRPV channel-regulated Notch-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36), 22357–22366. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1922683117/-/DCSUPPLEMENTAL>
- VERA, L. M., DE ALBA, G., SANTOS, S., SZEWCZYK, T. M., MACKENZIE, S. A., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J., & REY PLANELLAS, S. (2023). Circadian rhythm of preferred temperature in fish: Behavioural thermoregulation linked to daily photocycles in zebrafish and Nile tilapia. *Journal of Thermal Biology*, 113, 103544. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2023.103544>
- VERLINDEN, S. M. D., NORTON, T., LARSEN, M. L. V., SCHROYEN, M., YOUSSEF, A., & EVERAERT, N. (2022). Influence of temperature during incubation on the mRNA levels of temperature sensitive ion channels in the brain of broiler chicken embryos.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 268, 111199. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2022.111199>

- WANG, Y., ZHANG, W., XU, G., SHI, C., WANG, X., QU, J., WANG, H., & LIU, C. (2023). The role of TRPV4 in the regulation of retinal ganglion cells apoptosis in rat and mouse. *Heliyon*, 9(7), e17583. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E17583>
- YOSHIMURA, A., SAITO, S., SAITO, C. T., TAKAHASHI, K., TOMINAGA, M., & OHTA, T. (2022). Functional analysis of thermo-sensitive TRPV1 in an aquatic vertebrate, masu salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*). *Biochemistry and Biophysics Reports*, 31, 101315. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2022.101315>
- YUE, W. W. S., YUAN, L., BRAZ, J. M., BASBAUM, A. I., & JULIUS, D. (2022). TRPV1 drugs alter core body temperature via central projections of primary afferent sensory neurons. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.80139>
- ZHANG, Y., NIE, H., & YAN, X. (2023). Transient receptor potential (TRP) channels in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Characterization and expression patterns of the TRP gene family under heat stress in Manila clams based on genome-wide identification. *Gene*, 854, 147112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147112>
- ZHAO, L. L., LIAO, L., YAN, H. X., TANG, X. H., HE, K., LIU, Q., LUO, J., DU, Z. J., CHEN, S. Y., ZHANG, X., CHENG, Z., & YANG, S. (2023). Physiological responses to acute hypoxia in the liver of largemouth bass by alteration of mitochondrial function and Ca²⁺ exchange. *Aquatic Toxicology*, 256, 106436. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2023.106436>
- ZHOU, C., ZHANG, Z. QIANG, ZHANG, L., LIU, Y., & LIU, P. FEI. (2021). Effects of temperature on growth performance and metabolism of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 537, 736458. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736458>
- ZITT, C., HALASZOVICH, C. R., & LÜCKHOFF, A. (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Progress in Neurobiology*, 66(4), 243–264. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00002-3)

7. ANEXOS.

7.1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.				X
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.	X			
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

El Proyecto se relaciona con la meta 14.a “Aumentar los conocimientos científicos, desarrollar la capacidad de investigación y transferir tecnología marina, teniendo en cuenta los Criterios y Directrices para la Transferencia de Tecnología Marina de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental, a fin de mejorar la salud de los océanos y potenciar la contribución de la biodiversidad marina al desarrollo de los países en desarrollo, en particular los pequeños Estados insulares en desarrollo y los países menos adelantados”.

Permite abordar y desarrollar los mecanismos de adaptabilidad y su relación frente los estreses que suponen el cambio climático. De este modo, se podrán controlar de manera más eficiente cualquier respuesta que altere los ecosistemas y transferir dicha información aplicable para mejorar las condiciones y seguridad de granjas en la acuicultura.