

Universidad de La Laguna
Facultad de Ciencias: Sección de Biología
Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología

Influencia de la dieta y la salinidad ambiental sobre el perfil de ácidos grasos y la potencial capacidad de biosíntesis de ω 3-LC PUFA en el pez omnívoro eurihalino *Chelon labrosus*.



Influence of the diet and environmental salinity on the fatty acid profile and potential capacity of biosynthesis of ω 3-LC PUFA on the omnivorous euryhaline fish *Chelon labrosus*.



Trabajo de Fin de Grado
Ana Perdomo Soto

Tutorizado por Covadonga Rodríguez González y Manuel Alejandro Marrero Arteaga

Grado en Biología, septiembre de 2020

El presente trabajo forma parte del proyecto “Caracterización y modulación de la biosíntesis de ω 3 LC-PUFA en peces: una cuestión de sostenibilidad para la futura diversificación de la acuicultura” (PROPUFAW3).

Financiación: Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España (AGL2015-70994-R).



Resumen

Para las próximas décadas, se prevé que la población mundial aumente en 2000 millones de habitantes. Esto, sumado al continuo agotamiento de recursos, hace plantear nuevas formas de alimentación sostenibles, apostando en este caso por el cultivo de especies de peces marinos, que gracias a sus ventajas productivas y valor nutricional (alto contenido en proteína digerible y en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; LC-PUFA), se plantean como una buena alternativa. La variabilidad recientemente demostrada en teleósteos para la biosíntesis de estos compuestos, indica que el estudio del metabolismo lipídico es esencial para el futuro de la acuicultura, seleccionando especies capaces de aportar omega-3 LC-PUFA. En este trabajo se estudió el efecto de la dieta y salinidad en el teleósteo marino *Chelon labrosus*, por su potencial capacidad de generar omega-3 LC-PUFA, a partir de sus precursores de 18 átomos de carbono. Los individuos se sometieron a cuatro tratamientos, dos de ellos se alimentaron con una dieta comercial herbívora para tilapia, con un 4% adicional de aceite de pescado, rico en EPA y DHA (FO), en los otros dos se suministró la misma dieta de tilapia, en este caso con la adición de un 4% de aceite de oliva carente de estos ácidos grasos (VO). Para cada dieta se preparó un tanque con una salinidad control (35ppt) y otro a una salinidad más baja (20ppt). Los resultados sugieren que a pesar de que el mejor tratamiento en valores nutricionales es FO y 20ppt, las diferencias en valores absolutos generadas por la sustitución de una dieta vegetal a la misma salinidad, no supone una disminución en el contenido de EPA o DHA.

Palabras clave: *Chelon labrosus*, acuicultura, salinidad, dieta, omega-3 LC-PUFA, biosíntesis.

Abstract

For the next few decades, the world's population is expected to increase by 2 billion people. This, added to the continuous depletion of resources, raises new forms of sustainable food, betting in this case on the cultivation of marine fish species, which with its productive advantages and nutritional value (high content of digestible protein and polyunsaturated fatty acids long-chain; LC-PUFA), are considered as an excellent alternative. The recently demonstrated variability in teleosts for the biosynthesis of these compounds indicates that the study of lipid metabolism is essential for the future of aquaculture, selecting species capable of providing omega-3 LC-PUFA. In this work, the effect of diet and salinity on the marine teleost *Chelon labrosus* was studied, due to its potential capacity to generate omega-3 LC-PUFA, from its precursors of 18 carbon atoms. The individuals underwent four treatments, two of them were fed with a commercial herbivorous diet for tilapia, with an additional 4% of fish oil, rich in EPA and DHA (FO), in the other two the same diet of tilapia, in this case with the addition of 4% olive oil devoid of these fatty acids (VO). For each diet, a tank with a control salinity (35ppt) and another with a lower salinity (20ppt) was prepared. The results suggest that even though the best treatment in nutritional values is FO and 20ppt, the differences in absolute values generated by substituting a vegetable diet at the same salinity do not imply a decrease in the content of EPA or DHA.

Key words: *Chelon labrosus*, aquaculture, salinity, diet, omega-3 LC-PUFA, biosynthesis.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Situación actual de la acuicultura.....	1
1.2 Fuentes alternativas sostenibles en las dietas acuícolas.....	1
1.3 Importancia de los omega-3 LC-PUFA.....	2
1.4 Biosíntesis de LC-PUFA.....	3
1.5 Salinidad, osmorregulación y lípidos.....	4
1.6 <i>Chelon labrosus</i> , especie objeto de estudio.....	7
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	10
3.1 Diseño experimental.....	10
3.2 Extracción de tejido muscular.....	10
3.3 Extracción lipídica del tejido muscular.....	11
3.4 Determinación de perfil de ácidos grasos.....	12
3.5 Extracción lipídica de los piensos y determinación de su perfil de ácidos grasos.....	13
3.6 Análisis estadístico.....	14
4. Resultados y discusión	15
4.1 Incremento del peso.....	15
4.2 Perfil de ácidos grasos del tejido muscular de <i>C. labrosus</i>	15
5. Conclusiones	20
6. Bibliografía	22

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la acuicultura

Se estima que para el año 2050, uno de los mayores problemas con los que se encontrará la población mundial será con el de su propio crecimiento, teniendo que alimentar aproximadamente 9.600 millones de personas que habitarán el planeta, con la limitación de los recursos naturales de los que se disponen (Apromar, 2018). Como consecuencia, ha aumentado la demanda mundial de alimentos, de manera que actividades como la agricultura y la ganadería, y especialmente la acuicultura, han apostado por una búsqueda de nuevas formas de alimentación. Nuestro país, se encuentra entre los 20 primeros países con una mayor producción acuícola del mundo, siendo el primero de toda Europa, seguido de Reino Unido y Francia (FAO, 2018).

La acuicultura, juega un papel fundamental en la erradicación del hambre y la malnutrición, ofreciendo alimentos de alto contenido proteico, ricos en ácidos grasos omega-3 poliinsaturados de cadena larga (omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids, omega-3 LC-PUFA), tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) o el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), así como vitaminas y minerales para un amplio sector de la población (Apromar, 2018). Sin embargo, debido a que la acuicultura de especies carnívoras depende del uso de aceites y harinas de pescado procedentes de algunos pequeños peces pelágicos, el índice FIFO (*fish in fish out*), que se define como la cantidad de pescado necesario para alimentar y producir 1 kg de estos peces carnívoros, sigue siendo elevado, empobreciendo la diversidad marina (Naylor et al, 2009). Por ello, es necesario disminuir dicho índice, para garantizar una mejor sostenibilidad ambiental y económica especialmente en cuanto a la alimentación de peces y otras especies carnívoras marinas.

1.2 Fuentes alternativas sostenibles en las dietas acuícolas

En la acuicultura, la alimentación es el factor que más costes ocasiona, afectando de forma directa a la calidad nutricional del producto, su crecimiento y reproducción. Por esto se pretende estudiar las necesidades nutricionales de cada una de las especies, llevando un control más específico de su bienestar y desarrollo, abaratar los costes de producción y rebajar al mínimo el impacto ambiental ocasionado. Desde hace años, se están comenzando a hacer algunos avances, como son el uso de desechos de otros productos de pesca para elaborar piensos para la acuicultura (Iñarra et al., 2018), así como el uso de algunos aceites procedentes de semillas (Apromar, 2018). Sin embargo, la utilización de materias primas de origen principalmente vegetal

terrestre tiene algunas respuestas negativas con respecto a la composición de los órganos y tejidos de los animales, volviéndose más grasos y con menos cantidad de omega-3 (Izquierdo et al., 2003).

Los aceites procedentes de semillas vegetales aportan gran cantidad ácidos grasos omega-6 de 18C, lo que provoca que la relación omega-6/omega-3 en el pescado sea más elevada (Naylor et al., 2000). Esta relación de ácidos grasos omega-6/omega-3 en la dieta se ha vinculado con la mayor incidencia de enfermedades patentes en el mundo occidental, como son los trastornos cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, trastornos neurodegenerativos, entre muchas otras enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios (Zárate et al., 2017).

Para evitar todo esto, una alternativa es emplear las dietas “a término”, en las que se intenta devolver al animal su dieta marina original, tras haberle administrado una dieta vegetal durante un periodo de tiempo determinado, de forma que se compensan las deficiencias producidas justo antes de su comercialización (Díaz López, 2009). Otras alternativas, son además de un mejor uso de los descartes y los subproductos de la pesca y la acuicultura, el uso de las algas, la producción de aceites a partir de plantas transgénicas ricas en omega-3 LC-PUFA, o la selección de nuevas especies acuícolas alimentadas con dietas más sostenibles, y capaces de sintetizar omega-3 LC-PUFA a partir de sus precursores dietarios.

1.3 Importancia omega-3 LC-PUFA.

Los lípidos, son macromoléculas esenciales, que participan en funciones como la reserva energética, funciones estructurales esenciales en las membranas celulares, la generación de derivados eicosanoides y docosanoides, y la regulación de la expresión génica, participando como intermediarios metabólicos en multitud de procesos fisiológicos. Entre estas moléculas lipídicas, encontramos los ácidos grasos, que se clasifican en base a la longitud del esqueleto hidrocarbonado, el grado de insaturación de esta cadena y la posición en la que se encuentren los dobles enlaces con respecto al grupo metilo terminal. En función de esto los podemos clasificar en tres grupos o series principales; omega-3, omega-6 y omega-9 (Rodríguez et al., 2012).

La mayoría de los animales son incapaces de sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), especialmente el ácido linoleico (LA; 18:2n-6) y el linolénico (LNA; 18:3n-3), que se consideran, por lo tanto, ácidos grasos esenciales, y que están incluidos en la cadena trófica gracias a los productores primarios, plantas terrestres y algas. Los PUFA, que presentan 20 o más

átomos de carbono, y 2 o más dobles enlaces, se denominan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Los LC-PUFA, presentan funciones fisiológicas esenciales y a nivel estructural, forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares garantizando su integridad y regulando su funcionalidad (Rodríguez et al., 2012). Los LC-PUFA biológicamente más activos son EPA, DHA y ARA (20:4-n6). Los dos primeros se encuentran entre los ácidos grasos omega-3 mientras que el último se trata de un omega-6, el más importante conocido y principal precursor de eicosanoides de alta actividad biológica y eminentemente proinflamatoria (Sanz et al., 2009).

En peces marinos, y en el medio marino en general, el EPA y el DHA se presentan a elevadas concentraciones en los tejidos, siendo las algas marinas los únicos organismos capaces de sintetizarlos *de novo*. Estos ácidos grasos junto con el colesterol ayudan al animal frente a los cambios ambientales. Al variar el número de insaturaciones de los PUFA, así como su longitud, es posible modificar la fluidez de las membranas, ayudando a la adaptación frente a los cambios de salinidad, temperatura y presión del ambiente en el que se encuentran los organismos. Sin embargo, esta capacidad para modificar la longitud y grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas, en función de los cambios ambientales o de la dieta, no es universal y está bastante limitada, especialmente en los teleósteos marinos (Rodríguez et al., 2012). Es por ello que conocer la capacidad de sintetizar omega-3 LC-PUFA de las especies marinas de interés acuícola, y el efecto de la dieta y el ambiente en su modulación, se ha convertido en una prioridad en la diversificación acuícola.

1.4 Biosíntesis de LC-PUFA

Las enzimas responsables de la síntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores de 18 carbonos (C18PUFA; 18:2n-6; LA o 18:3n-3; LNA) son las mismas desaturasas y elongasas, actuando sobre uno u otro ácido graso ya existente en el tejido o recientemente incorporado en la dieta. Las desaturasas, añaden dobles enlaces mientras que las elongasas añaden 2 átomos de carbono al esqueleto hidrocarbonado mediante una reacción de condensación (Tocher, 2003). La capacidad de biosíntesis de ARA, EPA y DHA de cada especie, dependerá principalmente de su dotación genética, que codifica para las elongasas (Elovl) y desaturasas (Fads), pudiendo verse afectada también por factores ambientales y los hábitos alimenticios (Castro et al., 2016).

Todos los vertebrados tienen la capacidad de sintetizar ácido oleico (OA; 18:1n-9), aunque solo las plantas y microorganismos son capaces de

desaturar este ácido graso hasta LA y LNA, mientras que los vertebrados tienen esta ruta bloqueada, al carecer de las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ (Tocher, 2003).

A partir del ácido linoleico, es posible formar el ácido 20:3n-6 mediante dos rutas alternativas: una desaturación por la enzima $\Delta 6$, y una elongación; o bien una elongación seguida de una desaturación por la enzima $\Delta 8$. Este precursor (20:3-n6) experimenta una desaturación por $\Delta 5$, dando lugar al ARA. Por otro lado, partiendo del ácido linolénico es posible sintetizar EPA por medio de las mismas enzimas que en la síntesis de ARA, lo que refleja la importancia del equilibrio en la dieta de los ácidos grasos precursores, asegurando el balance entre los omega-3 LC-PUFA y los omega-6 LC-PUFA.

Por otro lado, la síntesis de DHA, se produce comúnmente a través de la “vía de Sprecher”, siendo el resultado de dos elongaciones más, una desaturación por parte de la enzima $\Delta 6$, así como un acortamiento de la cadena hidrocarbonada de 24C por una β -oxidación en los peroxisomas (Castro et al., 2016) (Figura 1).

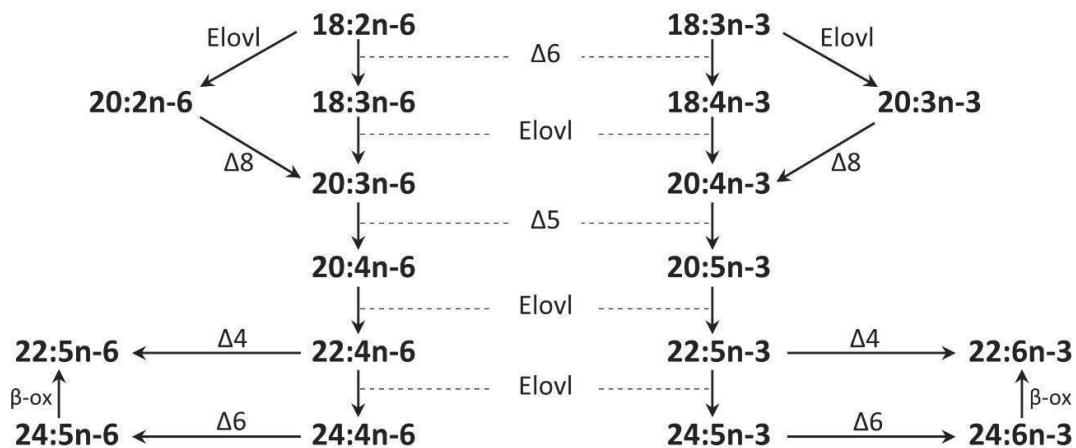


Figura 1. Ruta de biosíntesis de los LC-PUFA a partir del LA y el LNA (Lee et al., 2016).

1.5 Salinidad, osmorregulación y lípidos.

La capacidad de sintetizar LC-PUFA puede verse alterada por factores ambientales como son la dieta o la salinidad. Recientes estudios han mostrado que ciertas disminuciones en la salinidad ambiental provocan un aumento en la síntesis de LC-PUFA en algunas especies marinas. De manera similar, el aumento de la salinidad favorece también el grado de producción de EPA y DHA a partir de LNA, en determinadas especies dulceacuícolas. Por ello se

propone que una salinidad ambiental más próxima a la osmolaridad del medio interno podría aumentar la expresión de los genes que codifican para las desaturasas, incrementando consecuentemente la biosíntesis de LC-PUFA (Xie et al., 2014).

Los animales acuáticos se enfrentan a problemas de regulación del equilibrio osmótico, respondiendo con dos estrategias diferentes, el osmoconformismo, propio de organismos que se encuentran en equilibrio osmótico con el medio en el que viven; y la osmorregulación, presente en especies que mantienen un equilibrio osmótico con el entorno, en este caso suponiendo un coste energético extra que varía en función de múltiples factores, entre los cuales destaca la permeabilidad de su piel (Garrido, 2007).

De los peces marinos osmorreguladores, podemos destacar a los eurihalinos que son capaces de sobrevivir frente a grandes variaciones en la salinidad ambiental, sorteando las tensiones osmóticas con adaptaciones morfológicas y bioquímicas que tienen lugar principalmente en sus branquias y en otros epitelios osmorreguladores como el intestinal (Evans et al., 2005). Los peces teleósteos a su vez pueden ser parcialmente eurihalinos, solo capaces de tolerar ciertos rangos de salinidad (Martos-Sitcha et al., 2015). Entre los peces eurihalinos podemos incluir a nuestra especie de estudio, *Chelon labrosus*.

Los peces marinos, experimentan una continua entrada de iones del medio, en especial de Cl^- , a la vez que van sufriendo procesos de deshidratación por pérdida pasiva de agua. Por todo esto, cuentan con mecanismos específicos para la secreción de iones desde el medio interno (por medio de estructuras como branquias e, intestino, entre otras), así como para evitar la deshidratación, produciendo orina muy concentrada en sales e ingiriendo agua salada. Esto supone un gasto energético que irá en aumento cuanto mayor sea el desbalance iónico entre los medios interno y externo (Martos-Sitcha et al., 2015) (Figura 2).

Las branquias y el tracto intestinal son los principales órganos encargados de la osmorregulación en peces. El tracto intestinal, se encarga de la absorción de agua, y por consiguiente de iones Na^+ y Cl^- (Dópido, 2006). Las branquias por otra parte invierten gran cantidad de energía durante la osmorregulación por diferentes mecanismos de transporte de iones, como los cotransportadores, canales conductores de iones o proteínas de transporte de iones que necesitan de ATP para funcionar (Sangiao-Alvarellos et al., 2003). La entrada y salida de iones en las células de las branquias se encuentra regulada por el complejo Na^+K^+ -ATPasa, que encontramos en los extremos de

estas células. Esta actividad se encuentra directamente relacionada con el flujo de Na^+ y Cl^- al exterior del animal en medios hipertónicos (Marshall, 2002).

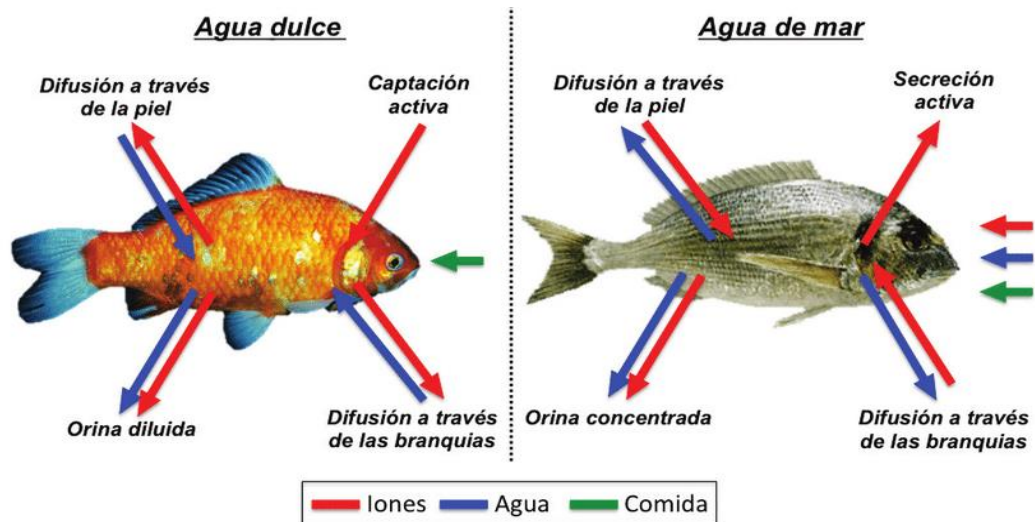


Figura 2. Esquema general de los principales problemas y estrategias llevadas a cabo por teleósteos osmorreguladores para mantener el equilibrio hídrico e iónico frente a diferentes salinidades ambientales (Martos-Sitcha et al., 2015).

En teleósteos marinos, la acción coordinada de branquias y epitelio intestinal es responsable del movimiento de agua de mar hacia los lechos vasculares submucosos y la expulsión del NaCl en exceso proveniente del agua de mar ingerida, provocando un balance neto en la toma de agua. La cantidad de sal ingerida por la ingesta de agua debe ser expulsada mediante las branquias, a través de un grupo de células especializadas que conocemos como células de cloruro, dispuestas en el epitelio branquial. Se ha descrito que el epitelio branquial presenta altos niveles de ácidos grasos libres (FFA), monoacilglicéridos (MAG) y triacilglicéridos (TAG), estrechamente relacionados con la gran densidad de mitocondrias presentes y sus altas tasas metabólicas en las células de cloruro (Evans et al., 2005). Estas células, son energéticamente muy activas al secretar Cl^- en contra de gradiente electroquímico, requiriendo de una mayor disposición de ácidos grasos de los que obtener energía con rapidez a través de la beta oxidación. Además de estas clases lipídicas, las células branquiales también presentan un alto contenido de fosfolípidos ricos en LC-PUFA, incluyendo DHA, EPA y ARA, y de colesterol para regular su funcionalidad, fluidez y permeabilidad, así como monoenoos de los que obtiene energía en primera instancia (Tocher, 2003).

El contenido lipídico de las membranas celulares de peces eurihalinos se encuentra sujeto a variaciones en su composición durante los procesos de aclimatación a factores ambientales, como son la temperatura, el pH o la

salinidad. Estos cambios buscan el mantenimiento del estado homeoviscoso de las membranas celulares. Para ello, se producen variaciones en la longitud de las cadenas, en la composición del grupo polar presente en los fosfolípidos y en la presencia o ausencia de colesterol, (Hazel y Prosser, 1985).

Así, se sugiere que los componentes de la dieta, y más específicamente los lípidos, juegan un importante papel como reserva energética, como fuente de moléculas lipídicas que acaban formando parte de las membranas celulares y como moléculas de señalización celular, que se encuentran asociadas a procesos fisiológicos relacionados con la osmorregulación e ionorregulación (Díaz et al., 2016).

Por todos estos motivos, es fundamental indagar en los procesos que afectan a la biosíntesis de los LC-PUFA, conocer sus funciones y su capacidad de síntesis en las diferentes especies, así como su regulación a través de la dieta y otros factores como la salinidad o la temperatura ambientales. De esta forma se podrán optimizar las condiciones de cultivo y seleccionar las especies más aptas para mejorar las dietas haciéndolas más sostenibles sin que afecten al bienestar, desarrollo y calidad nutricional del pescado, reduciendo a su vez, el índice FIFO.

1.6 *Chelon labrosus*, especie objeto de estudio.

Chelon labrosus, comúnmente conocida como lisa, es un teleósteo marino de la familia Mugilidae, frecuente en zonas costeras y estuarios. Se trata de una especie anfidroma, es decir, que migra a aguas salobres para buscar alimento (McDowall, 1988). Se reproduce en zonas alejadas de la costa, presentándose como especie dominante dentro de las comunidades ícticas, y constituyendo un elemento clave en el funcionamiento del ecosistema y como recurso pesquero (Pujante, 2013).

Se trata de una especie euriterma y eurihalina, capaz de soportar amplios rangos de temperatura y salinidad. Su alimentación temprana se basa en el consumo de zooplancton, al ser filtradores y detritívoros. Al igual que el resto de mugílidos, sufre modificaciones en su régimen alimenticio al aumentar de talla, pasando de ser zooplantófagos en sus estadios tempranos para ser fitobentónicos en sus estadios adultos (Koutrakis, 2005). Todos estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar una dieta para el desarrollo acuícola de *C. labrosus*.

Los mugílidos representan un grupo importante dentro de la pesca comercial, pudiéndose encontrar en cualquier ambiente costero. Su cultivo se ha

practicado durante siglos de forma tradicional (Pujante, 2013). De entre las 70 especies conocidas de mugílidos, cabe destacar la especie *Chelon labrosus* (Risso, 1827) (comúnmente conocida como muble), por ser considerada una de las más fácilmente cultivables (Boglione *et al.*, 1992; Kemish *et al.*, 2006, 2013). Ejemplo de ello son los cultivos extensivos y tradicionales basados en la captura de alevines salvajes en el sureste de la Península Ibérica, aunque su producción es local y con poca representatividad a nivel nacional (De las Heras *et al.*, 2012). Esta especie está ampliamente distribuida por el Mar Mediterráneo, el Sudeste del Mar Negro, el Atlántico Este y en las costas de Senegal y Cabo Verde (Turan, 2015; FishBase, 2020), pudiendo encontrarse tanto en ecosistemas interiores de aguas salobres y dulces como en ecosistemas costeros predominantemente marinos (Pujante, 2012), uno de los aspectos que la hace idónea para su cultivo. Se trata de una especie gonocórica y ovípara, con una época de reproducción establecida en el invierno, entre los meses de noviembre y abril, dependiendo de la latitud en la que se encuentren, ya que un aumento de temperatura en el agua adelanta los procesos de maduración y reproducción (De las Heras *et al.*, 2012). Los ejemplares adultos de *C. labrosus* se alimentan de algas, desechos orgánicos y sedimentos. Además, disponen de una protuberancia en el labio superior que les permite raspar sustratos duros, ricos en organismos incrustados (Boglione *et al.*, 2006). El hecho de que la lisa modifique sus hábitos alimenticios es otro punto a favor para su cultivo, puesto que así asimilan mejor las dietas vegetales, sustituyendo de forma parcial o total el uso de harinas de pescado por harinas de origen vegetal, reduciéndose así su índice FIFO. Dadas sus cualidades, la estrategia alimenticia de *C. labrosus* puede variar en función de la proporción y disponibilidad de alimento (Freyhof y Kottelat, 2008; Sarasquete *et al.*, 2014). Estas características y su capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes hacen que el cultivo de esta especie sea, *a priori*, factible económicamente en lo que se refiere a su alimentación e infraestructura y tecnología acuícola.

2. OBJETIVOS

Dentro del contexto general del proyecto **PROPUFA omega-3** (AGL2018-70994-R) “Caracterización y modulación de la biosíntesis de omega-3 LC-PUFA en peces: una cuestión de sostenibilidad para la futura diversificación de la acuicultura”, se analiza la modificación del perfil de ácidos grasos y la capacidad potencial de biosíntesis de omega-3 LC-PUFA y su regulación dietaria y ambiental en nuevas especies de peces.

En este contexto, se abordará el estudio del efecto modulador de los lípidos de la dieta y de la salinidad ambiental sobre la composición lipídica del músculo y la síntesis potencial de omega-3 LC-PUFA, a través de las muestras obtenidas en un experimento de modulación salina y dietaria en la especie *Chelon labrosus*.

Para la consecución del trabajo se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- Comparar la composición de ácidos grasos del músculo de 20 ejemplares de *Chelon labrosus* en función del perfil de ácidos grasos de la dieta: dieta más (FO) o menos (VO) rica en omega-3 LC-PUFA.
- Comparar la composición de ácidos grasos en el músculo de estos 20 ejemplares de *Chelon labrosus* en función de la salinidad ambiental (35‰ o 20‰).
- Evaluar cuál de los cuatro tratamientos podría ser más favorable para la biosíntesis de omega-3 LC-PUFA y el cultivo de la especie *Chelon labrosus*.

En el contexto general del proyecto anteriormente mencionado, estos objetivos específicos persiguen disminuir el índice FIFO y, por lo tanto, potenciar la sostenibilidad ambiental del cultivo de la lisa (*C. labrosus*), sin afectar negativamente su metabolismo lipídico y valor nutricional, ni la salud y bienestar de los ejemplares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Se capturaron 20 ejemplares de *Chelon labrosus* en la Punta del Hidalgo, habiéndose obtenido para ello, los permisos pertinentes por parte de la Consejería de Pesca del Gobierno de Canarias, y se mantuvieron en las instalaciones de la Fundación Neotrópico durante 3 semanas para su aclimatación. Para el desarrollo del experimento de modulación dietaria y salina, se dividieron los especímenes en 4 tanques de 1000 l. Dos de los tanques se alimentaron con una dieta comercial de tilapia, con la adición de un 4% de aceite Incromega™, rico en EPA y DHA (Fish Oil, FO). Mientras, que los otros dos tanques se alimentaron con la misma dieta comercial de tilapia, con la adición de un 4% de aceite de oliva carente de EPA y DHA (Vegetable Oil, VO).

Para cada una de las dietas se ensayó un tanque con salinidad control (35 ppt), y otro a una salinidad más baja (20 ppt). Para todos los tratamientos el fotoperiodo fue natural, la temperatura del agua fue de $23,5 \pm 0,5$ °C, y el oxígeno disuelto por encima de 5ppm.

FO + 20ppt

FO + 35ppt

VO + 20ppt

VO + 35ppt

3.2 Extracción de tejido muscular

Tras finalizar el experimento, los ejemplares se sacrificaron siguiendo métodos humanitarios según la normativa vigente (BOE nº 34, 08/02/2013) y la reglamentación y autorización del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna. Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología (U.D. Fisiología Animal) de la Universidad de La Laguna. Tras ser sacrificados, fueron medidos y pesados, extrayéndose muestras de músculo y otros tejidos para su análisis. El proceso se desarrolló en presencia de hielo para evitar la degradación de los tejidos (lo que implicaría la modificación del perfil de ácidos grasos).

Con ayuda de un bisturí, se recogieron las muestras de tejido muscular que fueron almacenados hasta su análisis en un ultra congelador a - 80°C para así

minimizar el riesgo de oxidación de los ácidos grasos. La actividad realizada por la autora del presente TFG comienza con el aprendizaje de las técnicas y la realización del análisis del perfil lipídico de las muestras de músculo de cada uno de los cuatro tratamientos, recogidos en la fase experimental.

3.3 Extracción lipídica del tejido muscular.

De cara a expresar el contenido de lípido en peso seco se procedió a determinar el contenido en humedad de las muestras. Para determinar el % de humedad del músculo, se usaron 500 mg de muestra por cada pez, que se introdujeron en la estufa a 110°C hasta alcanzar un peso estable (durante aproximadamente 24h). El porcentaje de humedad de cada muestra se puede calcular haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{Peso fresco} - \text{Peso seco} / \text{Peso fresco}) * 100$$

La extracción lipídica se realizó según el método de Folch - Lee (1957) y modificaciones descritas por Christie en 2003. Las muestras, (de 100mg cada una), una vez descongeladas, fueron homogeneizadas con ayuda de un homogeneizador Virtishear en 10 ml de cloroformo/metanol (2:1) con 0,01% de BHT (hidroxitolueno butilado), que ayuda a la correcta preservación de las muestras frente a la peroxidación lipídica. El resultado de esta homogeneización fue filtrado y recuperado en un nuevo tubo. Tras esto, se añadieron 2,5 ml de KCl y se centrifugaron los tubos para separar los lípidos en la fase inferior. Una vez recuperada dicha fase, se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno, tras lo que fue trasvasado el contenido a pequeños viales de cristal previamente pesados. Una vez que se evaporó el nuevo solvente de estos tubos pequeños, fueron dispuestos en un desecador durante toda la noche, ayudando a que se termine de evaporar los últimos restos de humedad. Se pesaron los viales para así calcular la cantidad de lípido total gravimétricamente. Tras esto se suspendieron los extractos lipídicos de las muestras a una concentración de 10mg/ml, de nuevo en CL:MET con 0,01% de BHT, sellando con atmósfera de nitrógeno evitando así, en lo posible la oxidación de los lípidos, almacenados a -20°C hasta sus posteriores análisis.

El porcentaje de lípido en peso fresco y en peso seco fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lípido peso fresco} = (\text{lípido total} / \text{peso fresco}) * 100$$
$$\% \text{ Lípido peso seco} = (\% \text{ lípido en peso fresco} / (100 - \% \text{ Humedad})) * 100$$

3.4 Determinación del perfil de ácidos grasos

Se realizó la transesterificación de 1 mg del extracto de lípido de cada muestra de manera que se rompan los enlaces éster entre los ácidos grasos y los esqueletos hidrocarbonados, permitiendo la unión de un grupo metilo (- CH₃) a los ácidos grasos libres, formando así ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES; *Fatty acid methyl ester*) pudiendo ser analizados mediante cromatografía de gases (Christie, 2003).

Para cuantificar la cantidad de ácidos grasos en valor absoluto, se añadió a las muestras un 5% de un ácido graso conocido y que no está contenido en la muestra, el estándar interno (19:0). Se dejaron reaccionar las muestras con tolueno y ácido sulfúrico al 1% en metanol en una manta calefactora a 50°C y oscuridad durante toda la noche (unas 16h).

Transcurrido dicho tiempo, se realizaron lavados con hexano/éter (1:1) y KHCO₃, para finalmente, evaporar el solvente en atmósfera de nitrógeno y proceder a su purificación.

La purificación de la mezcla de FAMES y esqueletos hidrocarbonados, se llevó a cabo por cromatografía en capa fina, haciendo uso de un estándar conocido, de manera que se pueda identificar la banda en la que se ubican los FAMES de las muestras analizadas. Tanto el estándar como las muestras se pincharon en placas de TLC (20 cm x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como fase móvil, una mezcla de hexano, éter y acético (90:10:1 ml). Una vez corrida la cromatografía y seca la placa se tiñó con yodina al 1% por la banda lateral (en la zona correspondiente solo al estándar) y por la banda superior (correspondiente al BHT), para así poder identificar los FAMES, inmediatamente por debajo del BHT. Se raspó la sílice de las placas de TLC y se transfirieron los FAMES a un nuevo tubo de ensayo, donde se añadió hexano/éter (1:1), y se evaporó totalmente el solvente bajo atmósfera de nitrógeno. Por último, se determina el perfil de ácidos grasos de cada una de las muestras diluidas en hexano por cromatografía de gases. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases (*Thermo Scientific TRACE-GC Ultra*, Milán, Italia), con inyección en columna y detector de ionización de llama FID (*Flame ionitiation Detector*), en una columna de sílice fundida, y empleando helio como gas portador.

La identificación de cada uno de los ácidos grasos se realizó con ayuda de un patrón compuesto por una mezcla de aceite de pescado y varios multiestándares comerciales, con composiciones y tiempos de retención conocidos.

3.5 Extracción lipídica de los piensos y determinación del perfil de ácidos grasos.

La extracción lipídica se realizó siguiendo el método anteriormente explicado de Folch - Lee (1957) con modificaciones, descrito por Christie en 2003, tras haber hidratado los piensos con una pequeña cantidad de agua destilada, durante toda la noche previa a la extracción. Igualmente, la obtención y determinación del perfil de ácidos grasos del pienso, se realizó siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Tabla 1. Composición proximal y de ácidos grasos de los piensos FO y VO: Contenido en cenizas, proteínas y lípido total (% en peso seco) y perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos).

	Pensos			Pensos		
	FO			VO		
	X	±	DE	X	±	DE
Cenizas	5,8	±	0,4	5,9	±	0,3
Proteína	40,4	±	0,7	40,4	±	0,7
TL (p.s.)¹	12,08	±	0,44	12,34	±	0,06
14:0	1,97	±	0,04	1,73	±	0,02
16:0	13,23	±	0,26	15,01	±	0,12
18:0	4,21	±	0,08	3,92	±	0,02
SFA¹	20,85	±	0,41	21,80	±	0,21
16:1	3,63	±	0,23	3,57	±	0,07
18:1	27,29	±	0,30	45,16	±	0,17
20:1	1,38	±	0,16	0,58	±	0,50
MUFAs¹	33,90	±	0,57	49,87	±	0,47
18:2n-6	15,73	±	0,08	16,27	±	0,07
18:3n-6	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00
20:4n-6	1,18	±	0,03	0,57	±	0,01
Total n-6 PUFA¹	18,24	±	0,16	16,95	±	0,17
18:3-n3	2,68	±	0,07	2,67	±	0,06
20:5n-3	4,92	±	0,05	2,55	±	0,11
22:5n-3	0,94	±	0,02	0,34	±	0,01
22:6n-3	14,81	±	0,39	2,38	±	0,06
Total n-3 PUFA¹	24,57	±	0,63	8,67	±	0,17
n-3/n-6	1,35	±	0,02	0,51	±	0,01
Total n-3 LC-PUFA¹	21,30	±	0,48	5,49	±	0,18

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=3).

¹Puede contener componentes minoritarios no mostrados en la tabla.

TL: Lípido total.

FA: Ácidos grasos totales.

SFA: Ácidos grasos saturados.

MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados.

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados.

LC-PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

VO: Dieta Vegetal.

FO: Dieta animal.

3.6 Análisis estadístico

Se realizó una ANOVA de dos vías para la determinación del efecto de la dieta, la salinidad y la interacción de estos factores, sobre la composición de ácidos grasos del músculo. Para ello, se verificaron las hipótesis de normalidad y homocedasticidad de los datos. Para las variables que no cumplían alguna de estas hipótesis se aplicaron las transformaciones del arcoseno y la inversa. Las diferencias fueron consideradas significativas para un p-valor inferior a 0,05. El estudio estadístico se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 25.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Incremento del peso

Al terminar el experimento, se registraron incrementos promedios en peso más bien limitados para todos los tratamientos, pero que no mostraron claras diferencias entre ellos (tabla 2). Los datos de crecimiento nos muestran que, los cambios inducidos en la dieta o en las condiciones ambientales no afectaron de manera significativa a los ejemplares de lisa y que, por lo tanto, la osmorregulación en esta especie eurihalina, con elevada capacidad de adaptación a los cambios ambientales, no parece generar un coste extra tan acusado como para afectar visiblemente al crecimiento de la especie. En el contexto de este mismo proyecto, los ejemplares de lenguado (*Solea senegalensis*) sometidos a los mismos tratamientos experimentales, presentaron un crecimiento significativamente mayor con el tratamiento FO a 20ppt frente a los otros tres tratamientos, indicando un mayor coste energético asociado a la osmorregulación, que afecta al crecimiento, y una mayor eficiencia de una dieta más carnívora y rica en omega-3 LC-PUFA que la dieta de componente más herbívoro (VO) (Marrero et al., 2019; Pérez, 2020). La tasa de crecimiento obtenida, podría mejorarse probablemente en sistemas de cultivo diferentes al ensayado en el presente estudio. El mantenimiento de las condiciones del agua de mar en los circuitos acuapónicos cerrados de la fundación Neotrópico, fueron complejos, no habiéndose registrado estas dificultades ni diferencias en la calidad de agua de los circuitos, en los estudios previos en las que las especies cultivadas eran de agua dulce.

Tabla 2. Incremento de peso (g) de *C. labrosus* en los cuatro diferentes tratamientos.

Δ Peso (g)

FO 20ppt	FO 35ppt	VO 20ppt	VO 35ppt
X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD
10,48 \pm 6,43	9,21 \pm 5,03	9,33 \pm 6,87	11,77 \pm 5,82

Los datos se representan como media \pm desviación estándar n = 5.

4.2 Perfil de ácidos grasos del tejido muscular de *C. labrosus*.

En cuanto al contenido de ácidos grasos del músculo en los peces de los 4 tratamientos (tabla 3), se observa que los ácidos grasos saturados se encuentran en gran proporción, siendo el mayoritario el 16:0, que es además

el que se encuentra en mayor cantidad en el pienso. Algo similar ocurre en el medio natural, donde el 16:0 es particularmente abundante en la dieta, y es altamente utilizado con fines energéticos como resultado de la β -oxidación (Rodríguez et al., 1997). Se trata además de un ácido graso que los peces pueden sintetizar *de novo*, e importante componente estructural que permite la regulación de la fluidez y permeabilidad de las membranas (Pérez et al., 2014). Es por ello por lo que es un ácido graso mayoritario también en las grasas utilizadas en la fabricación de los piensos para acuicultura, garantizando así su aporte nutricional adecuado. El 14:0, es el ácido graso saturado que se encuentra en menor cantidad, lo que se podría explicar debido a que, junto con los MUFAs (ácidos grasos monoinsaturados), son los que primero se degradan para la obtención de energía (Rodríguez et al., 1997), además de ser el SFA que en menor cantidad se encuentra en la dieta.

Se observa que son los MUFAs los que se encuentran en mayor cantidad, siendo el más abundante el 18:1, entre los cuales encontramos al isómero 18:1n-9 o ácido oleico, precursor de LA y LNA en plantas y microorganismos, y componente energético y estructural esencial para los peces en su medio natural. Un solo doble enlace en su molécula otorga un alto grado de fluidez a las membranas, hecho especialmente importante en ambientes fríos como los acuáticos, ejerciendo un papel muy importante en los cambios adaptativos homeoviscosos ante condiciones ambientales cambiantes de salinidad y temperatura. Según el análisis ANOVA, el contenido de este ácido graso se ve afectado por la dieta, encontrándola en mayor cantidad en la VO que en la FO, como cabría esperar, al ser un componente mayoritario del aceite de oliva que se utilizó en la formulación de esta dieta.

En cuanto a los ácidos grasos de la serie n-6, el que se encuentra en mayor cantidad es LA, ácido graso dietario, precursor del ARA, que se sintetiza por la acción de elongasas y desaturasas que actúan inespecíficamente para sustratos homólogos omega-6 u omega-3, siendo más optimizada la reacción hacia los omega-3 en el medio marino (Castro et al., 2016). De nuevo dentro de los n-6, se observa cómo en ambos piensos el ácido graso 18:3n-6 o el 20:3n-6 se encuentran ausentes dentro de la dieta (tabla 1). Sin embargo, la presencia de estos ácidos grasos solo en el músculo de los tratamientos donde se indujo una menor salinidad o un menor aporte de LC-PUFA (FO20ppt; VO35ppt y VO20ppt) sugieren que en *Chelon labrosus* el ambiente menos salino, y el perfil de ácidos grasos de la dieta, está siendo capaz de modular su capacidad de síntesis, confirmando que esta especie posee actividad $\Delta 6$ (figura 1), como indican los estudios recientes de Garrido et al. (2019), al ser capaz de sintetizar 18:3n-6 a partir de 18:2n-6 (LA). La desaturación del 18:3n-6 a 20:3n-6 es un paso más hacia la obtención del ARA, que también ha sido

Tabla 3. Contenido de lípido total (% p.f.), cantidad de ácidos grasos totales (mg/100 g peso fresco), y principales ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) en el tejido muscular de los cuatro tratamientos.

	Músculo			Músculo			Músculo			Músculo			ANOVA		
	FO 20ppt			FO 35ppt			VO 20ppt			VO 35ppt			DOS VÍAS		
	X	±	SD	X	±	SD	X	±	SD	X	±	SD	D	S	I
TL¹	1,53	±	0,26	1,46	±	0,53	1,73	±	0,48	1,41	±	0,68			
FA	1012,61	±	157,5	1129,95	±	460,27	1411,87	±	265,37	1043,22	±	605,64			
14:0	2,49	±	0,61	2,84	±	0,42	2,37	±	0,23	2,15	±	0,35			
16:0	20,49	±	1,09	24,27	±	1,78	21,94	±	0,79	22,01	±	0,77		*	
18:0	4,06	±	0,41	3,89	±	0,96	3,54	±	0,52	3,85	±	0,54			
SFA¹	28,45	±	1,60	33,61	±	2,57	29,31	±	0,84	29,61	±	0,34			
16:1	5,47	±	0,19	6,95	±	0,05	7,19	±	0,80	5,66	±	0,58	*	*	*
18:1	24,21	±	1,86	23,46	±	0,51	32,43	±	1,96	31,55	±	3,83	*		
20:1	0,65	±	0,38	0,96	±	0,32	0,95	±	0,20	1,09	±	0,12			
MUFAs¹	30,64	±	2,19	31,90	±	0,57	40,57	±	2,32	38,30	±	4,33	*		
18:2n-6	10,50	±	1,01	7,49	±	1,39	11,37	±	0,77	10,88	±	0,37	*	*	*
18:3n-6	0,31	±	0,06	0,00	±	0,00	0,32	±	0,03	0,33	±	0,09	*	*	*
20:3n-6	0,23	±	0,13	0,00	±	0,00	0,28	±	0,06	0,33	±	0,11	*	*	*
20:4n-6	2,67	±	0,58	3,12	±	0,59	2,10	±	0,85	2,24	±	1,02			
Total n-6 PUFA¹	15,14	±	0,93	11,66	±	1,29	15,09	±	1,03	14,94	±	1,09	*	*	*
18:3-n3	3,28	±	0,66	2,43	±	0,28	2,41	±	0,36	3,13	±	1,05		*	*
20:5n-3	4,66	±	0,59	4,40	±	0,50	3,63	±	0,74	3,44	±	0,75	*		
22:5n-3	1,51	±	0,19	0,86	±	0,74	1,19	±	0,23	1,28	±	0,20			*
22:6n-3	11,25	±	1,57	6,40	±	0,40	3,53	±	0,83	4,31	±	0,68	*	*	*
Total n-3 PUFA¹	21,83	±	1,78	16,07	±	1,25	11,73	±	1,67	13,39	±	2,50	*	*	*
n-3/n-6	1,44	±	0,13	1,39	±	0,13	0,78	±	0,10	0,89	±	0,11	*		
Total n-3 LC-PUFA¹	17,74	±	2,05	11,97	±	0,33	8,49	±	1,81	9,35	±	1,59	*	*	*

Los datos se representan como media ± desviación estándar n = 5.

*Indica diferencias significativas (p>0.05). TL: Lípido total. FA: Ácidos grasos totales. SFA: Ácidos grasos saturados. MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados. PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados. LC-PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. D: Dieta. S: Salinidad. I: Interacción.

confirmada en estos estudios. De manera similar, el ARA, a pesar de que en el pienso de dieta animal ($1,18 \pm 0,03$) se encuentre en cantidades que duplican la de la vegetal ($0,57 \pm 0,01$), en el músculo no se aprecian diferencias entre tratamientos, lo que da a entender la capacidad de bioacumulación y retención del pez para este ácido graso tan importante fisiológicamente, o una vez más, la capacidad de síntesis de este ácido graso, a partir de $20:3n-6$ por la actividad $\Delta 5$, especialmente cuando se induce cierta deficiencia dietaria o disminución de la salinidad hacia un rango más acorde con la salinidad en el medio, como se demostró para *Siganus canaliculatus* y *Chirostoma estor* (Fonseca-Madrigal et al., 2012; Xie et al., 2014).

Esta actividad enzimática global, concuerda también con la descrita para esta misma especie por Galindo et al., (2020), siendo también posible la obtención de $20:3n-6$ a partir de $20:2n-6$ por la actividad $\Delta 8$ también reportada por Garrido et al., (2019).

Por último, en cuanto a los ácidos grasos de la serie n-3, se ven diferencias importantes en el músculo de los ejemplares de los distintos tratamientos, siendo el tratamiento que sigue una dieta con un mayor grado de incorporación de componentes de origen animal (FO) y que se encuentra a una salinidad menor (20ppm), el que más n-3 PUFAs contiene, así como LC-PUFAs en general, a nivel muscular. El hecho de que el tratamiento FO35ppt recibiera la misma dieta y presente sin embargo, menos DHA, induce de nuevo a pensar que la disminución en la salinidad está favoreciendo una mayor síntesis de DHA a partir de sus precursores dietarios principales $18:3n-3$ y $20:5n-3$. De manera similar, a pesar de que en la dieta VO las proporciones de EPA presentes en los piensos son muy diferentes, llegando a encontrar en la FO ($4,92 \pm 0,05$) cerca del doble que VO ($2,55 \pm 0,11$), las cantidades encontradas posteriormente en el músculo de los ejemplares VO35ppt y VO20ppr no son tan diferentes a los tratamientos FO, pudiendo explicarse este hecho no solo por la posible bioacumulación y retención selectiva de este esencial precursor de eicosanoides antiinflamatorios, sino también a cierta síntesis del compuesto, inducida por su disminución dietaria y que en este caso, conlleva la acción secuencial nuevamente de la $\Delta 6$, $\Delta 5$, a partir del LNA, (Galindo et al., 2020). De la misma manera ocurre con el $22:5n-3$, que en el pienso animal se encuentra en proporciones 3 veces superiores a las del vegetal, aunque en el músculo las diferencias no sean destacables. Este ácido graso se trata de uno de los precursores de DHA en la "vía de Sprecher" (Castro et al., 2016), si bien, la acción de la $\Delta 4$, cuya presencia o ausencia aún se desconoce en esta especie podría conducir a la producción de DHA (Galindo et al., 2020). En cuanto al DHA en el músculo de los ejemplares, se observa que cuando este

es suministrado en la dieta en altas cantidades (como es en el caso de FO, $14,81 \pm 0,39$), el pez mantiene unas proporciones similares a las que posee cuando se le suministra una proporción muy inferior (como es en la VO, $2,38 \pm 0,06$). Una vez más, parece tener lugar un importante efecto modulador de la dieta a la hora de inducir un incremento compensatorio en la capacidad de síntesis de omega-3 LC-PUFA en *C. labrosus*.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización para la Agricultura y la alimentación (FAO) y las Autoridades Europeas de Seguridad Alimentaria (AESA), recomiendan una ingesta diaria de al menos 250mg de EPA y DHA en conjunto (Zárate et al., 2017). En nuestro caso, por cada 100g de pescado del tratamiento de FO a una salinidad de 20ppt obtenemos $1012,61 \pm 157,5$ mg de ácidos grasos totales, de los cuales el 11,25% será DHA (Tabla 3), es decir, unos 114mg, y otros 50mg de EPA. De manera similar, en el otro tratamiento con la misma dieta FO pero a una salinidad mayor, se obtuvo un total de $1129,95 \pm 460,27$ mg de ácidos grasos totales por cada 100g de pescado, de los que unos 70mg son de DHA y 50mg de EPA. En los tratamientos con una dieta vegetal, los peces que se encontraban a salinidad baja obtuvieron un total de $1411,87 \pm 265,37$ mg de ácidos grasos, de los que unos 50mg eran de DHA, y otros 50mg de EPA. Por último, en el tratamiento de dieta vegetal a una salinidad de 35ppt, se obtuvo un total de $1043,22 \pm 605,64$ mg de ácidos grasos, de los que habría unos 45mg de DHA y 35mg de EPA.

En definitiva, el tratamiento con la menor salinidad y una dieta más marina es en el que los niveles de ácidos grasos de interés aumentan de forma considerable, si bien en términos absolutos, la sustitución por la dieta VO más sostenible y a 20ppt no supone una disminución tan drástica en el contenido de éstos omega-3 LC-PUFA con respecto al tratamiento FO 20ppt.

5. CONCLUSIONES

- El cultivo de la especie *C. labrosus* a una salinidad de 20pp o con una dieta parcialmente sustituida por aceites vegetales con un menor aporte de EPA y DHA, no afecta negativamente a su crecimiento, lo que confirma la capacidad adaptativa de la especie a la salinidad cambiante y su menor requerimiento nutricional de omega-3 LC-PUFA frente a otras especies de hábitos más omnívoros y carnívoros.
- El cultivo de la especie *C. labrosus* a una salinidad de 20ppt, inferior a la marina, alimentando los ejemplares con una dieta rica en EPA y DHA, favorece su contenido de omega-3 LC-PUFA frente al obtenido en los ejemplares alimentados con la misma dieta pero a 35ppt. Ello indica la existencia en esta especie, de un efecto modulador de la salinidad en la capacidad de biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores dietarios, que podría resultar ventajosa de cara a su cultivo.
- Si bien los tratamientos con una dieta formulada con aceite de pescado (FO) proporcionan mayor cantidad de LC-PUFA, la sustitución parcial de estos componentes marinos, por otros de origen vegetal (VO) no merman el aporte de EPA ni sustancialmente el de DHA del músculo de los ejemplares en términos absolutos. Ello indica la existencia en esta especie, de un efecto modulador de la dieta en la capacidad de biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores dietarios, pudiéndose mejorar la sostenibilidad ambiental y económica de la dieta sin afectar significativamente la calidad nutricional del producto final.
- El efecto modulador de la salinidad ambiental y del perfil lipídico de la dieta, sobre la capacidad de síntesis de omega-3 LC-PUFA de *C. labrosus* son aspectos atractivos que deberían tenerse en cuenta el cultivo de esta nueva especie de interés para la diversificación acuícola.

CONCLUSIONS

- The culture of *C. labrosus* at 20ppt salinity or with a diet partially substituted by vegetable oils with lower levels of EPA and DHA, does not affect its growth performance, which confirms the ability to adapt to different salinities and its lower nutritional requirement of omega-3 LC-PUFA compared to other species with more omnivorous and carnivorous habits.

- The culture of *C. labrosus* at 20ppt salinity, lower than the marine one, feeding the specimens with a diet with high levels of EPA and DHA, improves the amount of omega-3 LC-PUFA compared to that obtained in specimens fed with the same diet at 35ppt. This result indicates the presence of a modulating effect of salinity in the biosynthesis capacity of LC-PUFA from its dietary precursors, which could be advantageous for its cultivation.
- Although fish oil treatments (FO) provide a higher amount of LC-PUFA, the partial substitution of these marine components with vegetable oils (VO) does not reduce the contribution of EPA or significantly DHA from the muscle of the specimens in absolute terms. This result indicates a dietary effect on the biosynthesis capacity of LC-PUFA, being able to improve the environmental and economic sustainability of the diet with not significantly effects in the nutritional quality of the final product.
- The modulating effect of the environmental salinity and the lipid profile of the diet, on the biosynthesis capacity of omega-3 LC-PUFA of *C. labrosus* are attractive features that should be considered for the culture of this new species of interest for aquaculture diversification.

6. BIBLIOGRAFÍA

Apromar. (2018). La Acuicultura en España. España

Boglione, C., Bertolini, B., Russiello, M., and Cataudella, S. 1992. Embryonic and larval development of the thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*) under controlled reproduction conditions. *Aquaculture* 101, 349–359.

Castro, L. F. C., Tocher, D. R., & Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*, 62, 25–40.

Christie, W.W., (2003). *Lipid Analysis*. Third ed. The Oily Press, Bridgewater, UK, pp. 205-224.

Díaz López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Tocher, D.R., Jerez, S.C., *et al.*, (2009). Effect of dietary substitution of fish oil by Echium oil on growth, plasma parameters and body lipid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15: 500-515.

Díaz, M., Dópido, R., Gómez, T., y Rodríguez, C. (2016). Membrane lipid microenvironment modulates thermodynamic properties of the Na⁺-K⁺-ATPase in branchial and intestinal epithelia in euryhaline fish in vivo. *Frontiers in physiology*, 7, 589.

Dópido, R. (2006). Caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de enterocitos aislados o a lo largo del tracto intestinal de la dorada (*Sparus aurata*). Efectos de la deficiencia de n-3 y n-6 PUFA (Tesis doctoral). Universidad de La Laguna. San Cristóbal de La Laguna.

Duncan, D. 2019. Differential growth and aspects of the health of *Chelon labrosus* (Risso, 1827) fed on commercial trout and tilapia feeds in Open Flow and a Recirculatory Aquaculture System (Master's thesis, Ghent University, Ghent, Belgium).

Evans, D. H., Piermarini, P. M., and Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Review*. 85, 97-177.

FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (2018). Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.

Farkas, T., Fodor, E., Kitajka, K., Halver, J. E., (2001). Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Res.* 32, 645-655.

Folch J., Lees, M. y Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry*. 226: 497-509.

Fonseca-Madrugal, J., Pineda-Delgado, D., Martínez-Palacios, C., Rodríguez, C., & Tocher, D. R. (2012). Effect of salinity on the biosynthesis of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in silverside *Chirostoma estor*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 38(4): 1047-1057.

Freyhof, J., Kottelat, M. 2008. *Chelon labrosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008 (2015 International Union for Conservation of Nature and Natural Resources No. e. T135689A4182365; pp. 1–8).

Galindo A., Garrido D., Monroig Ó., Pérez J. A., Betancor N. B., Acosta N.G., *et al.*, (2020). Polyunsaturated fatty acid metabolism in three fish species with different trophic level. Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna.

Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M. B., Pérez, J. A., Acosta, N. G., (2019). Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl desaturases occurs independently of the trophic level. *Scientific reports*, 9(1), 11199.

Hazel, J. R., y Prosser, C. L., (1985). Rapid changes in the phospholipid composition of gill membranes during thermal acclimation of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 155:597-602.

Iñarra, B., Bald, C., San Martín, D., Orive, M., Cebrián, M. & Zufía, J. (2018) Guía para la valorización de subproductos de la acuicultura. AZTI, Derio, España.

Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, *et al.*, (2003). Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 9(6), 397-407.

Khemis, I.B., Zouiten, D., Besbes, R., Kamoun, F. 2006. Larval rearing and weaning of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) in mesocosm with semiextensive technology. *Aquaculture* 259, 190–201.

Koutrakis E T, Athanassios C T y Apostolos IS (2005). Temporal variability of the ictiofauna in a Northern Aegean coastal lagoon (Greece). Influence of environmental factors. *Hydrobiologia*, 543.

Lee, J., Lee, H., Kang, S., & Park, W. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.

Marrero, M., Betancor, M.B., Galindo, A., Monroig, Ó., Herrera, M., Garrido, D., Pérez, J.A., Giráldez, I., Rodríguez, C., (2019). Influence of dietary lipids and environmental salinity on the ω -3 LC-PUFA biosynthesis capacity of senegalese sole (*Solea senegalensis*). Poster Presentation. *Aquaculture Europe 2019 Congress Center in Berlin, Germany*.

Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*. 293: 264-283.

Martos-Sitcha, J. A., Cadiz, L., Skrzyńska, A. K., Martínez-Rodríguez, G., y Mancera, J. M. (2015). Procesos osmorreguladores en peces teleósteos: control mediado por diferentes sistemas endocrinos. *Encuentros en la Biología, Universidad de Málaga*. 152. 211-214.

McDowall R. M. (1988). *Diadromy in fishes*. Croom Helm, London.

Naylor, R., Hardy, R., Bureau, D., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, et al (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), p. 18040.

Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., *et al.*, (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024.

Pérez, A. (2020). Modulating effect of environmental salinity on the metabolism of fatty acids and their possible implications in osmoregulation, in the marine carnivorous fish *Solea senegalensis* (TFG). *Universidad de La Laguna. San Cristóbal de La Laguna*.

Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J. R., y Lorenzo, A. (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 571-583.

Pujante I., Mancera J. M. (2013). Diversificación en acuicultura: la liseta (*Chelon labrosus*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz. 141-142.

Pujante I., Martos-Sitcha JA, Ruiz-Jarabo I, Mancera JM. (2012). Osmoregulation and energy metabolism in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) submitted to different environmental salinities. IV Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui.: 399-407, 2012.

Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J. R., Santamaría, F., y Lorenzo, A. (2004) Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 139(4), 619-629

Rodríguez, C., Lorenzo, A. y Martín, V. (2012). Nutrición lipídica. En Sanz F. (coord.), La nutrición y alimentación en piscicultura (pp. 151-231). Madrid: Editorial Paraninfo.

Rodríguez, C., Pérez, J. A., Díaz M., Izquierdo M. S., Fernández-Palacios, H., (1997). Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. Aquaculture, 150(1-2), 77-89.

Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., Guzmán, J. M., Martín del Río, M. P., Miguez, J. M., Mancera, J. M., y Soengas, J. L. (2003). Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 285(4), R897-R907.

Sanz, F., Zamora Nazarro, S., Cruz-Rubio, V., Jover, M., Rodriguez, C. et al. (2009). La nutrición y alimentación en piscicultura. Madrid, España: CSIC, Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura 1: 188-200.

Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Martos-Sitcha, J. A., de Las Heras, V., Yúfera, M., Martínez, G. 2014. Ontogeny and functional histochemistry of the digestive and visual systems and other organs during the larval development of the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus*. Scientia Marina, 74(4), 1–28.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in fisheries science, 11(2), 107-184.

Turan, C. 2015. Biogeography and Distribution of Mugilidae in the Mediterranean and the Black Sea, and North-East Atlantic. In Crosetti, D. & Blabe, S. (Eds.), Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae) (pp. 116-127). Rome, Italy: CRC Press.

Xie, D., Wang, S., You, C., Chen, F., Tocher, D. R., y Li, Y. (2014). Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. Aquaculture Nutrition, 21(5), 541-551.

Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N.E., Tejera, N.A., Pérez, J.A., y Rodríguez, C.R. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. Clinical and translational medicine, 6(1), 25.

Fuentes web

Garrido, C. (2007). Osmorregulación. De peces. Recuperado el 18-07-2019 de <https://www.depeces.com/la-osmorregulacion-peces-agua-dulce-agua-salada.html>.

FishBase. 2020. <https://www.fishbase.se/summary/Chelon-labrosus.html>