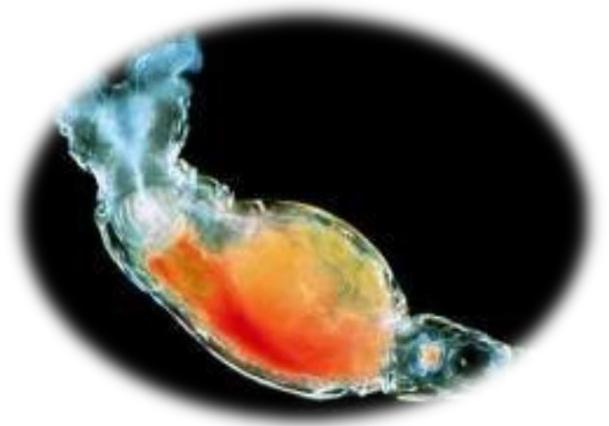


Técnicas innovadoras en el estudio del metabolismo lipídico de organismos marinos de interés para la acuicultura y la acuariología.

(Innovative techniques in the study of lipid metabolism of marine organisms of interest for aquaculture and aquariology).



Daniel Ramírez Sánchez

Trabajo Fin de Grado. 4º Grado en Biología.

Septiembre 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015 /2016	ENTRADA Fecha: Núm:
---	----------------------------------

Datos Personales

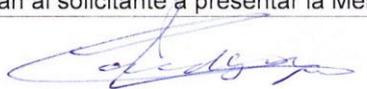
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
45774342 H	DANIEL RAMÍREZ SÁNCHEZ
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
660796685	daniramirezsanchez@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Técnicas innovadoras en el estudio del metabolismo lipídico de organismos marinos de interés para la acuicultura y la acuariología.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Covadonga Rodríguez González	
Profesor/a del Departamento de Biología, Edafología y Geología	
y D./Dña. Roberto Dorta Guerra	
Profesor/a del Departamento de Matemáticas, Estadística e Investigación Operativa	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: COVADONGA ROQUEZ - GLEZ	 Fdo.: ROBERTO DORTA GUERRA

La Laguna, a 1 de SEPTIEMBRE de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Estado actual de la acuicultura y la acuariología	1
Cría larvaria en cautividad. Los rotíferos como presa viva.....	2
Importancia de los lípidos en la nutrición de organismos acuáticos	4
MATERIAL Y MÉTODOS	8
Incubación <i>in vivo</i> con ácidos grasos marcados radiactivamente [$1-^{14}C$]	8
ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE LOS ROTÍFEROS.....	9
Extracción y cuantificación del lípido total (LT).....	9
Perfil de clases lipídicas.	9
Transmetilación del LT. Perfil de ácidos grasos.....	10
Incorporación de ácidos grasos marcados radiactivamente en los lípidos totales.....	11
Esterificación de ácidos grasos marcados radiactivamente en las clases lipídicas.	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	13
RESULTADOS	14
Perfil lipídico del rotífero control	14
Incorporación de radiactividad en el lípido total y su distribución en las clases lipídicas	16
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES	25
AGRADECIMIENTOS.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	27

RESUMEN

La nutrición larvaria de peces y otros organismos marinos a escala comercial conlleva el mantenimiento de cultivos auxiliares, o presas vivas que deben presentar una adecuada composición lipídica mediante el uso de técnicas de enriquecimiento con fitoplancton y/o productos comerciales de diversa índole, ricos en ácidos grasos esenciales, altamente insaturados de la serie n-3 (n-3 HUFA; EPA; 20:5 n-3 y DHA; 22:6 n-3), y n-6 (n-6 HUFA; ARA; 20:4n-6) y con una adecuada relación DHA/EPA/ARA, que aseguren un adecuado desarrollo. El presente trabajo pretende establecer si el uso de ácidos grasos marcados radiactivamente, añadidos directamente al medio de cultivo, permite realizar su seguimiento metabólico en el rotífero (*Brachionus plicatilis*), presa viva más utilizada en las primeras fases de vida de organismos acuáticos de interés en acuicultura y acuariología, y si el método podría ser útil en el estudio del metabolismo de ácidos grasos de larvas de peces y otros organismos acuáticos. Para ello se evaluó el perfil lipídico del rotífero control y se estudió la capacidad *in vivo* del rotífero de incorporar y metabolizar ácidos grasos insaturados como el 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 y altamente insaturados de cadena larga (HUFA o LC-PUFA) ARA, EPA y DHA. A partir de las diferencias de incorporación al lípido total (LT) o las preferencias de esterificación de los distintos ácidos grasos marcados en una determinada clase lipídica se deduce que el propio perfil de los enriquecedores puede generar relaciones inadecuadas de ácidos grasos esenciales, poniendo en riesgo un desarrollo larvario óptimo. Los resultados obtenidos presentan un elevado interés de cara a optimizar protocolos de enriquecimiento de presas vivas para la producción de larvas de origen marino.

Palabras clave: ácido graso; enriquecimiento; larvas de peces; LC-PUFA; metabolismo; rotífero.

ABSTRACT

Larval nutrition of marine organisms on a commercial scale involves maintaining auxiliary crops as live prey, which must provide adequate lipid composition by using enrichment techniques with phytoplankton and / or commercial products, rich in highly unsaturated fatty acids of the series n-3 (n-3 HUFA, EPA; 20: 5 n-3 and DHA; 22: 6n-3), and n-6 (n-6 HUFA; ARA; 20: 4n-6) and an appropriate ratio DHA / EPA / ARA, that ensure good nutrition. The aim of this study is establish whether the use of radiolabeled fatty acids, directly added to the culture medium, allows their metabolic monitoring in the rotifer (*Brachionus plicatilis*) as live prey widely used in the early life stages of aquatic organisms of interest in aquaculture and aquariology, and if the method could be useful in studying the metabolism of fatty acids of fish larvae and other aquatic organisms. To this end the control rotifer lipid profile was evaluated, as well as the *in vivo* capability of the rotifer to incorporate and esterify unsaturated fatty acids such as 18: 1n-9, 18: 2n-6 and 18: 3n-3 and highly unsaturated long chain fatty acids ARA, EPA and DHA (HUFA or LC-PUFA). Differences found in terms of incorporation into total lipids (LT) or the esterification patterns of different labelled fatty in a specific lipid class highlight that the dietary profile of the enrichment products can generate inadequate ratios of essential fatty acids, jeopardizing optimal larval development. The results show a high interest of methodology assayed in order to optimize live enrichment protocols for the production of marine larvae.

Keywords: enrichment ; fatty acid; fish larvae; LC-PUFA; metabolism; rotifer.

INTRODUCCIÓN

Estado actual de la acuicultura y la acuariología

El término acuicultura engloba todo un conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas vegetales y animales. La FAO y la Comisión Europea la definen como “el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección frente a depredadores, etc...” (FAO, 2014). Destaca por ser una importante actividad económica de producción de alimentos, materias primas de uso industrial y farmacéutico, y de organismos vivos para repoblación u ornamentación que da empleo a más de 12 millones de personas en el mundo (Rueda, 2011).

El desarrollo de la acuicultura nace como objeto de suplir las grandes demandas de pescado por parte de las poblaciones humanas, siendo una fuente importante de proteína de origen animal, es decir, el pescado proporciona al menos el 30% de la proteína dietaria, siendo la dependencia del pescado mayor en las zonas costeras que en las continentales. Al beneficio del aporte de proteína de calidad que representa el consumo de pescado, hay que sumarle el hecho de que constituye la principal fuente de ácidos grasos omega 3 ($\omega 3$) en la dieta humana (Sargent *et al.*, 2002; Galli y Marangoni, 2006; Pérez *et al.*, 2014). Numerosos estudios relacionan la ingesta de estos ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs, *Highly Unsaturated Fatty Acids*) con una disminución del riesgo de enfermedades coronarias y neurodegenerativas, la disminución de problemas de hipertensión, la prevención de ciertas arritmias cardíacas y muerte súbita, una menor incidencia de diabetes o con el alivio de los síntomas de la artritis (Young y Conquer, 2005; Wenk, 2005; Judé *et al.*, 2006; Psota *et al.*, 2006; Reiffel y McDonald, 2006; Schmidt *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a; Martín *et al.*, 2010).

La acuariología y la acuicultura son dos disciplinas cuyo prefijo sugiere una base común, su relación con el agua. En dichas disciplinas se han desarrollado herramientas comunes tales como sistemas de recirculación (que permiten una buena calidad del agua mediante el uso de sistemas de filtración, además de proporcionar una buena oportunidad para pasar de la producción en jaulas, con mayores problemas de sostenibilidad ambiental, a un tipo industrial de producción más adecuado para la acuicultura actual), y determinadas técnicas de manipulación de animales, incluyendo el cultivo de alimento vivo para larvas y juveniles. Sin embargo, la acuariología tradicionalmente tiene como objetivo el entretenimiento y la

educación pública, mientras que la cría en masa de los productos acuáticos, por lo general para el consumo humano, es el objetivo de la acuicultura. No obstante, ambas disciplinas comparten nuevas áreas de conocimiento y de actuación, como la conservación, donde cada vez son más los acuarios que están involucrados en programas de cría en cautividad que pueden garantizar la recuperación de las especies amenazadas, o la conservación mediante la crioconservación de esperma de pescado. En ciertas especies de peces marinos de interés acuícola, el éxito reproductivo en cautividad es tal, que se dispone de protocolos de congelación de esperma simples, ofreciendo una recuperación de la tasa de la motilidad media de 50 a 100% de la de semen fresco. Además, el uso de esperma congelado no afecta a la tasa de eclosión, la supervivencia de las larvas o porcentaje de larvas con formato incorrecto en varias especies de peces marinos. La reproducción y cría larvaria son aspectos relevantes en la acuicultura y acuariología de nuevas especies donde acuicultores y acuaristas trabajan a la par para conseguir el mantenimiento exitoso de las especies seleccionadas en cautiverio.

Cría larvaria en cautividad. Los rotíferos como presa viva.

En la década de 1970 la producción de peces marinos y camarones en piscifactorías se basaba en la captura de alevines silvestres para su posterior almacenamiento y engorde en tanques, jaulas o estanques; la crianza completa de muchas especies marinas se logró en las últimas dos décadas. Sin embargo, desde entonces el control de la producción de larvas y de reproductores en cautividad, o en otras palabras la producción de alevines en criaderos, se ha convertido en una operación de rutina para los peces más cultivados y especies de moluscos bivalvos (FAO, 1996; 2014).

Los cultivos larvales se llevan a cabo generalmente bajo condiciones de incubación controladas que requieren de técnicas de cultivo específicas con respecto a las técnicas de cría, estrategias de alimentación y control microbiano.

Las especies marinas más cultivadas en España actualmente, aparte del mejillón y otros moluscos bivalvos, son la dorada (*Sparus aurata*), el besugo (*Pagellus bogaraveo*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la anguila (*Anguilla anguilla*), el rodaballo (*Psetta maxima*), la corvina (*Argyrosomus regius*), el lenguado (*Solea vulgaris*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*), mientras que otras especies como el salmonete (*Mullus spp.*), el pargo (*Pagrus pagrus*), la seriola (*Seriola dumerili*) y el pulpo común (*Octopus vulgaris*) son especies que se encuentran en fase de investigación avanzada (FAO, 1980; 2009). Hoy por hoy, todas estas especies de crianza, así como otras especies de interés en acuariología, dependen en sus primeras fases de

la alimentación exógena, más concretamente del suministro de rotíferos. Una presa viva que, por sus características, resulta idónea en estos primeros días de vida larvaria.

El *phylum* rotífera está formado por un grupo de metazoos pseudocelomados, sincitiales y microscópicos con más de 1500 especies descritas, en su mayoría de agua dulce. Los individuos que pertenecen a esta clase presentan un alto dimorfismo sexual, el tamaño de las hembras es 2 a 10 veces superior al de los machos. Son formas mayoritariamente flotantes, pero las hay también reptantes, nadadoras y sésiles. La especie más conocida es *Brachionus plicatilis*, perteneciente a la clase Monogonontes; nadadores o sésiles y capaz de desarrollar tres tipos de huevos en su ciclo vital (amícticos, mícticos y durables), siendo los huevos amícticos o huevos diploides, que producen hembras por partenogénesis, los que interesan para el mantenimiento del cultivo de esta presa viva en su fase exponencial.

El uso de rotíferos como presa viva presenta una serie de ventajas:

Dichos organismos disponen de un tamaño adecuado al de la boca de las larvas en las primeras etapas del desarrollo. Además, tienen una buena estabilidad y distribución homogénea en los medios de cultivo larvarios (flotabilidad). Sus movimientos son lentos, lo que permite una captura fácil y por tanto un ahorro energético por parte de las larvas. La preparación de los cultivos es prácticamente sencilla debido a que son fáciles de obtener del medio natural, o de mantener y de un año para otro en fase latente, presentando una buena adaptabilidad a las condiciones de cultivo en cautividad y un rápido crecimiento alcanzándose densidades elevadas, pudiéndose duplicar la población en un solo día. Además, son organismos resistentes a variaciones de salinidad, temperatura o densidad, y a la presencia de ciliados, copépodos, etc. (siempre que no se alcancen condiciones extremas), siendo comúnmente mantenidos a base de levadura de panadería disuelta en agua, añadiéndose de manera regular cierta cantidad de fitoplancton para mejorar la calidad del agua e incrementar el porcentaje de hembras ovígeras.

Por otro lado, su cultivo tiene una serie de desventajas como la necesidad de fabricación de instalaciones extras, espacio y mano de obra. Además, estos organismos necesitan ser enriquecidos con proteínas, minerales, vitaminas, lípidos y antioxidantes, debido a su generalizado pobre valor nutricional. El valor nutricional de los rotíferos depende de su peso en seco, valor calórico y la composición química (*reviewed in Lubzens et al., 1989*). Pero al ser el rotífero un filtrador pasivo no selectivo, permite tener calidades nutritivas fácilmente manipulables mediante técnicas de enriquecimiento, esto es una gran ventaja a la hora de realizar cultivos con dietas ricas en ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3 (n-3

HUFA), como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) y araquidónico (ARA; 20:4n-6), que son ácidos grasos esenciales para organismos marinos, y juegan un papel crucial en el desarrollo larvario en los primeros estadios de vida.

Tras varios trabajos sobre la ecología y fisiología de *B.plicatilis*, Ito (1960) consiguió aislar dicha especie, posibilitando así su cultivo. Este científico también estudió diversos factores que influían en el crecimiento del mismo dentro del laboratorio, y comenzó a utilizarlo como presa viva en la acuicultura de agua dulce. Cabe destacar su uso en los cultivos de la anguila, donde inicialmente era considerado como una plaga porque hacían aumentar la flora bacteriana y generaban anoxia debido a su rápido crecimiento. Hasta entonces los cultivos larvarios de peces marinos (etapas iniciales de hasta 10-20 días, según las especies), dependían en su totalidad de las recolecciones de organismos planctónicos del medio natural. Desde entonces, se han hecho grandes progresos en el área tecnológica de la producción de peces y otros organismos marinos, ya que los rotíferos constituyen una excelente fuente de alimentación durante los primeros estadios del desarrollo larvario de peces, cuando la larva no puede comer aún nauplios de *Artemia* por su excesivo tamaño y movilidad, o microdietas artificiales debido, probablemente, a la rudimentariedad de su aparato digestivo. En los últimos años se han realizado numerosos avances en el conocimiento de la fisiología del rotífero, desarrollándose técnicas que han permitido una mejora progresiva de los rendimientos y volúmenes de cultivo. Actualmente los rotíferos constituyen la primera presa viva de las primeras larvas de langostino, lubina, dorada, seriola, lenguado, rodaballo, fletán y otras muchas especies de interés para la acuicultura y la acuariología. Otras presas vivas menos utilizadas en estas primeras etapas son ciliados, nauplios de copépodos (ideales por su variedad de tamaños y calidad nutritiva, pero complejos de cultivar), huevos descapsulados de *Artemia* y larvas trocófora y veliger de moluscos.

Teniendo en cuenta que el presente trabajo se centra en el estudio de una metodología novedosa para analizar el metabolismo lipídico de organismos marinos de interés para la acuicultura y la acuariología, utilizando los rotíferos como modelo de presa viva, se presenta a continuación un breve resumen sobre los lípidos, sus funciones, y su importancia en la nutrición y fisiología de organismos acuáticos.

Importancia de los lípidos en la nutrición de organismos acuáticos

Los lípidos son conocidos comúnmente como grasas, tienen una función estructural en las membranas celulares y actúan como reservorio energético. Están implicados en el transporte de nutrientes, en la transcripción génica y en la regulación de multitud de procesos, como precursores de hormonas esteroideas y de eicosanoides y otros mediadores lipídicos. Los

eicosanoides son sustancias biológicamente activas producidas en todos los tejidos a partir de ácidos grasos de 20 átomos de carbono como el 20:4n-6 y el 20:5n-3, implicados en procesos tales como la coagulación sanguínea, respuesta inmune, respuesta inflamatoria, osmorregulación y función neural y reproductora.

Los lípidos se pueden clasificar según su polaridad, en dos grandes grupos:

- Lípidos polares, también conocidos como “fosfolípidos”, compuestos por una cabeza hidrofílica polar y una cadena hidrocarbonada hidrófoba de distinta longitud. Su función es principalmente estructural. Se incluyen los fosfoglicéridos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, entre otros).
- Lípidos neutros, sin grupos polares en su estructura y cuya función es básicamente de reserva energética. Se incluyen los triacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de esteroles y ésteres de cera. El colesterol es también un lípido de carácter neutro de importante función estructural en las membranas celulares, y que no contiene ácidos grasos en su molécula.

Los ácidos grasos son los constituyentes más importantes de los lípidos, formados por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en el extremo. Se clasifican en función del número de dobles enlaces que presentan, denominándose insaturados a aquellos ácidos grasos con dobles enlaces y saturados a aquellos que no los presentan. La posición del doble enlace más cercano al metilo terminal permite clasificar los ácidos grasos insaturados en tres series principales: poliinsaturados omega 3 y 6 y monoinsaturados omega 9. El ácido oleico (18:1n-9) es uno de los monoenoos (tiene un solo doble enlace) más importantes junto al 20:1 n-9. Una sola insaturación permite la fluidez de estos ácidos grasos monoinsaturados, frente a los ácidos grasos saturados, siendo ambos muy importantes en la regulación de la fluidez de las membranas en ambientes de temperatura cambiante, como los acuáticos. Los ácidos grasos saturados son también importantes por su aporte energético a través de la betaoxidación, acumulándose junto a los monoeneos, particularmente en los triglicéridos (TAG). Los TAG a su vez son muy importantes para garantizar la flotabilidad y viabilidad de los huevos en el medio acuático. Como se señaló anteriormente, entre los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), también llamados en el ámbito más biomédico, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, *Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids*), destacan el 22:6n-3 o DHA, que es fundamental en el correcto funcionamiento de la membrana celular, y particularmente abundante en tejidos neurales como cerebro y retina. Esterifica preferentemente la fosfatidilcolina (PC) en huevos y larvas de peces, moluscos y crustáceos,

y se va acumulando en la fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), que son particularmente abundantes en la sinapsis, y en los gametos, allí donde se requieren eventos de fusión de membrana (Sargent *et al.*, 2002; Tocher *et al.*, 2008). Otros HUFA fisiológicamente esenciales son el 20:5n-3 o EPA y el ARA (20:4n-6). Estos dos últimos son los principales precursores de eicosanoides, siendo más elevada la proporción de EPA que de ARA en los tejidos de los animales marinos, a diferencia de los terrestres. EPA también es abundante en la PE y el ARA, tiene una gran afinidad por el fosfatidilinositol (PI) en los vertebrados, incluyendo los peces (Sargent *et al.*, 2002; Tocher *et al.*, 2008). Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de mantener una adecuada relación EPA/ARA y DHA/EPA en la dieta de numerosas especies de peces para su correcto desarrollo (Sargent *et al.*, 2002). A diferencia de las especies carnívoras dulceacuícolas, las marinas necesitan incorporar en su dieta ARA, EPA y DHA como ácidos grasos esenciales (AGE), siendo particularmente abundantes en los tejidos de peces los dos n-3 HUFA. Esta necesidad es debida a su limitada capacidad para producir estos ácidos grasos a partir de sus precursores de 18 carbonos, el ácido linolénico (18:3n-3) para los n-3 o el ácido linoleico (18:2n-6) para los n-6. El fitoplancton marino y, en consecuencia, el zooplancton marino, es particularmente rico en EPA y DHA, siendo ésta la razón principal por la que las especies carnívoras han ido perdiendo su capacidad para elongar y desaturar los ácidos grasos de 18 carbonos para obtener n-3 HUFA (Sargent *et al.*, 2002).

El contenido lipídico en los rotíferos varía generalmente entre el 9 y 28% de su peso seco. Aproximadamente el 34 – 43 % de los lípidos son fosfolípidos y el 20 – 55 % son triacilgliceroles, con una pequeña cantidad de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides, ésteres de esteroles y ácidos grasos libres (Teshima *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Nagata & Whyte, 1992; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997). Los fosfolípidos y triacilgliceroles en rotíferos muestran perfiles de ácidos grasos similares, pero éstos están afectados en gran medida por los lípidos facilitados en su dieta. Los ácidos grasos 20:5n-3 y 22:6n-3 que son particularmente determinantes de la supervivencia de las larvas de peces marinos (Owen *et al.*, 1975; Watanabe *et al.*, 1983; Rodríguez, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994a, 1996), se encuentran en general, esterificando la posición SN2 de los fosfolípidos de sus membranas celulares. Más específicamente, el DHA está presente en grandes concentraciones en las membranas neuronales y oculares, y la insuficiencia en la dieta de las larvas puede dar lugar a consecuencias graves en un amplio rango de procesos fisiológicos y de comportamiento. Estos incluyen pigmentación alterada y mala visión a bajas intensidades de luz, lo que lleva a unas bajas capacidades de caza de las larvas en desarrollo y trastornos en el desarrollo del

sistema neuroendocrino (Bell *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 1997, 1999; Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 2002). Del mismo modo, los peces tienen una capacidad limitada para convertir el ácido linoleico en n-6 HUFA, incluyendo el ácido araquidónico (20:4n-6), que ha cobrado mayor importancia en los últimos años (Sargent *et al.*, 1997,1999; Alves *et al.*, 2012) y también es considerado como un ácido graso esencial en organismos marinos. Se ha demostrado que mejora la tolerancia al estrés en las larvas de peces (Koven *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2012). La acumulación de evidencias apunta a la importancia de proporcionar una mezcla óptima de EPA, DHA y ARA en la dieta de las larvas de peces marinos. Así, se ha sugerido que la relación óptima para DHA: EPA: ARA es 1,8: 1: 0,12 para el rodaballo (Sargent *et al.*, 1999) y que el exceso de ARA puede tener un efecto perjudicial (Bessonart *et al.*, 1999; Estévez *et al.*, 1999). Por otra parte, los fosfolípidos en lugar de triacilgliceroles son el vehículo preferido para incorporar estos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, *Polyunsaturated Fatty Acids*). Estudios recientes demuestran que tanto las larvas de cefalópodos (Garrido *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2014, 2015, 2016) como de peces (Olsen *et al.*, 2014), mejoran sustancialmente su crecimiento y desarrollo cuando el DHA se le aporta a través de la PC, algo que de manera natural ocurre con la ingesta de copépodos. Los métodos de enriquecimiento de las presas vivas en AGE, incluyen microalgas, como, por ejemplo, el género *Nannochloropsis* es rico en EPA y el género *Isochrysis* es rico en DHA, ambos de las cuales contienen ARA, o emulsiones lipídicas, micropartículas o microcápsulas que contienen lípidos ricos en HUFA (*reviewed in* Lubzens *et al.*, 1989; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1997). El contenido lipídico cuantitativo y cualitativo de rotíferos puede ser manipulado por períodos de enriquecimiento variables en función de las recomendaciones del fabricante, no obstante, los aceites de pescado comerciales son la principal fuente de DHA y EPA, son pobres en ARA y consisten principalmente en triglicéridos y no en fosfolípidos. Existe además una tendencia creciente al uso de aceites vegetales ricos en 18:2n-6 y 18:3n-3, para reducir de forma parcial el uso de aceites de pescado en la alimentación de peces, y hacer de la acuicultura una actividad más sostenible. Sin embargo, no existen estudios que informen de cómo incorpora el rotífero estos ácidos grasos de origen vegetal y los n-3 HUFA en las distintas clases lipídicas y de qué manera su metabolismo en el rotífero podría influenciar finalmente a la nutrición larvaria.

El objetivo principal de este trabajo trata de establecer si el uso de ácidos grasos marcados, añadidos al medio de cultivo, permite realizar su seguimiento metabólico en el rotífero como presa viva más utilizada en las primeras fases de vida de organismos acuáticos de interés en

acuicultura y acuariología, y si el método podría ser útil en el estudio del metabolismo de los ácidos grasos de larvas de peces y otros organismos acuáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Incubación *in vivo* con ácidos grasos marcados radiactivamente [^{14}C]

Rotíferos obtenidos de cultivos desarrollados en el Centro Oceanográfico de Canarias (IEO, Tenerife), se incubaron en un total de 28 frascos de cultivo celular (4 por cada tratamiento más 4 control) con 50 ml de agua de mar filtrada. Las incubaciones se realizaron durante 4 horas a razón de 75.000 rotíferos por cada flask de incubación (1500 rotíferos/ml), con agitación suave a 21 °C, y 0,3 μCi (0.45 μM) de ácidos grasos marcados radiactivamente con ^{14}C , incluyendo el ácido oleico (18:1n-9), el ácido linoleico (18:2n-6), el ácido linolénico (18:3n-3), ARA, EPA o DHA (n = 4). Los ácidos grasos marcados radiactivamente con ^{14}C se añadieron individualmente a su flask correspondiente en su forma de sal de potasio unidos a albúmina de suero bovino (BSA), como se describe en Ghioni *et al.* (1997), facilitando así su disolución homogénea en el medio de cultivo. Se evaluó también el perfil lipídico del llamado tratamiento control, consistente en la incubación de los rotíferos bajo las mismas condiciones, pero sin la adición de ácidos grasos marcados con ^{14}C (n = 4). Tras el proceso de incubación, se filtró individualmente cada flask con una malla de 100 micras y se lavaron a fondo los rotíferos con una mezcla de agua dulce y salada para eliminar el exceso de radiactivo. El procedimiento consistía en coger cada muestra de cada tratamiento de manera independiente y con su malla debidamente marcada para no contaminar ninguna de las muestras a la hora de la filtración. Dicha malla se coloca en un embudo en el cual se vierte el contenido del flask que deseamos filtrar y limpiamos profusamente la muestra con una mezcla de agua dulce y salada. Seguidamente cogemos la muestra de rotífero que ha quedado en la malla con ayuda de una espátula y la depositamos en su tubo eppendorf correspondientemente marcado. Dichos tubos los iremos colocando en un recipiente con hielo para que se mantenga en frío evitando así que actúen las lipasas. Finalmente se toma una alícuota de cada sobrenadante de cada tratamiento de los tubos falcon de filtrado, en su tubo de centelleo correspondiente; 500 μl del sobrenadante + 4,5 ml de líquido de centelleo, de manera que mediante el uso de un contador de centelleo beta, nos aseguraremos de que hayamos puesto la cantidad necesaria del radiactivo.

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS DE LOS ROTÍFEROS.

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología (U.D. Fisiología Animal) de la Universidad de La Laguna.

Extracción y cuantificación del lípido total (LT).

Los lípidos totales fueron extraídos según Christie (2003), como modificación del método descrito por Folch et al. (1957). Las muestras de rotíferos filtrados y lavados, fueron homogeneizadas con cloroformo/metanol (2:1, v/v) y colocadas sobre hielo para evitar la actividad de las lipasas. A dicho homogeneizado se añadió KCL (0,88 % w/v), se agitó fuertemente en el vortex y se centrifugó durante 5 min a 1500 RPM. A continuación, se extrajo la fase orgánica (fase inferior que contiene los lípidos disueltos). El solvente orgánico fue evaporado bajo un flujo de nitrógeno y las muestras se mantuvieron en el desecador en oscuridad y bajo vacío durante 5 horas, para asegurarnos que eliminábamos cualquier resto de agua.

Los lípidos extraídos fueron redisueltos en cloroformo/metanol (2:1, v/v) conteniendo 0,01% de BHT (butilhidroxitolueno) como antioxidante, a una concentración de 10 mg/ml y guardados hasta su análisis a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en viales sellados con atmósfera de nitrógeno. La cantidad de lípido total presente en la muestra puede expresarse en porcentaje de su peso fresco, o más comúnmente, de su peso seco (% p.s.), así como referida al contenido proteico. En el presente trabajo se optó por esta última modalidad, al expresarse también los datos de incorporación de cada ácido graso radiactivo en picomoles por miligramo de proteína y hora.

Para establecer el perfil lipídico del rotífero del tratamiento control, se determinó el perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos del lípido total de estas muestras (n=4), según se detalla a continuación.

Perfil de clases lipídicas.

Las clases lipídicas (CL) se analizaron a partir del extracto de lípido total, mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) (“High Performance Thin Layer Chromatography”), y doble desarrollo (Olsen y Henderson, 1989). Se usaron placas de sílica gel 60 (sin indicador fluorescente), de 10x10 cm x 0,15 mm de grosor de sílice (Merck, Darmstadt, Alemania). Previamente a su uso, la placa se desarrolló en toda su longitud en una solución de dietil-éter para eliminar las impurezas, y luego fueron activadas en una estufa a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante media hora. Se aplicaron alícuotas de 20 μg del extracto del lípido total, del tratamiento del rotífero control en la base de la placa HPTLC, en bandas de unos 2 mm. Para el desarrollo de los lípidos polares se utilizó una mezcla de solventes compuesta por

isopropanol/cloroformo/metil-acetato/ metanol/ KCL 0,25% (5: 5: 5: 2: 1,8 v/v), que se dejó correr hasta la zona media de la placa. Como mezcla de solventes para los lípidos neutros se usó hexano/ dietil-éter/ ácido acético (22,5: 2,5: 0,25 v/v) dejándola correr hasta un centímetro por debajo del margen superior de la placa. Dicha placa se pulverizó con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8% y se quemó en una estufa a 160 °C durante 10-15 minutos, y se cuantificaron las bandas en un densitómetro Camag TLC visualizer a una longitud de onda de 370 nm. La identificación de las clases lipídicas se llevó a cabo mediante el uso de estándares conocidos (extracto de lípidos de huevas de bacalao y multiestandar de la casa Sigma) aplicados en los laterales de la misma placa. Los resultados se expresaron como porcentaje de area relativa.

Transmetilación del LT. Perfil de ácidos grasos

A partir de otra fracción de los extractos de lípido total (tratamientos de rotífero control; n=4), se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), para su identificación y cuantificación por cromatografía de gases. Este proceso se realizó sometiendo 1 mg del extracto de LT correspondiente, a una transmetilación por catálisis ácida, usando una solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v) en metanol. Para asegurar la disolución de los lípidos neutros se añadió 1ml de tolueno a cada extracto de lípido total, previamente a la adición de la solución de sulfúrico en metanol. La reacción se llevó a cabo a 50 °C en un bloque calefactor durante 16 horas, en atmósfera de nitrógeno y oscuridad. Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos fueron purificados mediante desarrollo simple por cromatografía de capa fina (TLC; Christie, 2003), con una mezcla de hexano/ dietil-éter/ ácido acético (90:10:1, v/v). Antes de la transmetilación se añadió una cantidad exacta y conocida del ácido graso nonadecanoico (19:0) como estándar interno. Los FAME ya purificados, fueron extraídos de la sílice con una mezcla de hexano/ dietil-éter (1:1, v/v). Por último, se evaporaron en un flujo de nitrógeno y se volvieron a resuspender en Hexano BHT, dejándolos preparados para ser inyectados en el cromatógrafo de gases. Finalmente se analizaron cualitativa y cuantitativamente por cromatografía de gases, utilizando helio como gas portador, con un gradiente térmico de 50-230°C y un detector de ionización de llama.

La cromatografía de gases consta de una fase móvil y una estacionaria, donde la muestra es depositada en la cabeza de la columna cromatográfica. Dicha muestra se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil gaseosa, formado por un gas inerte (no interacciona con las moléculas del analito) que lo transporta a través de la fase estacionaria. Asimismo, la fase estacionaria en cromatografía, puede ser un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido

(cromatografía gas-líquido), siendo éste último caso el más habitual, y el utilizado en nuestro trabajo.

La determinación y cuantificación de los FAME se obtuvieron con un cromatógrafo de gases TRACE GC Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), equipado con un inyector *on column*, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílice fundida, SupelcowaxTM 10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA).

La temperatura de la columna se programó para cuatro rampas diferentes de temperatura. La primera para un aumento lineal de 40 °C/min desde 50 a 150 °C; la segunda para un aumento de 2 °C/min hasta 200 °C; la tercera para un incremento de 1 °C/min hasta 214 °C; y la cuarta para un aumento de 40 °C/min hasta alcanzar los 230 °C y mantenerse a esta temperatura durante 5 minutos.

Los picos de los cromatogramas fueron integrados y analizados por comparación con los tiempos de retención de un multiestándar de tipo marino de composición conocida; mezcla hecha con tres partes de hueva de bacalao (cr; cod roe), tres partes del estándar comercial C4-C24 (Supelco 18919-1AMP) y una parte del estándar comercial PUFA n-3 (Supelco 47085-U). Cuando fue necesario, se confirmó la identidad de un pico determinado mediante espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo de gases de las mismas características, GC-MS chromatography (DSQ II, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA).

Incorporación de ácidos grasos marcados radiactivamente en los lípidos totales.

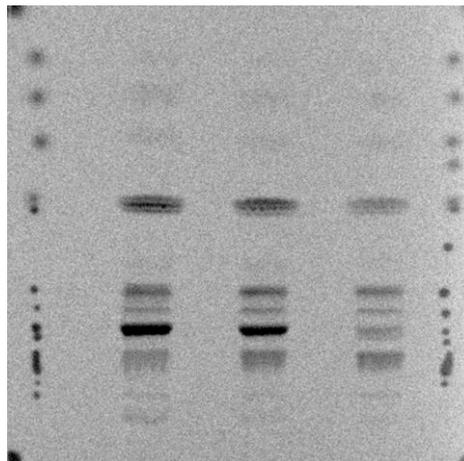
Para determinar la radiactividad total incorporada a los lípidos del rotífero, se tomó una alícuota de 0,1 mg del extracto de lípido total del rotífero de los diferentes tratamientos de ácidos grasos marcados (n=4). Dichas alícuotas fueron transferidas a tubos de centelleo y se analizaron en un contador de centelleo líquido para radiación-Beta LKB WALLAC 1214-Rackbeta (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Los resultados, dados en desintegraciones por minuto (DPM) por el aparato, fueron transformados en picomoles por mg de proteína y por hora de incubación (pmol mg pp⁻¹ h⁻¹), considerando la actividad específica de cada sustrato y el contenido de lípido total y de proteína del rotífero. El contenido proteico se estimó en todos los tratamientos incluido el rotífero control (n=4), según Lowry et al. (1951), siguiendo la metodología descrita en la bibliografía para este tipo de estudios (Reis et al., 2015). Se caracteriza por ser un método colorimétrico de valoración cuantitativa de la proteína soluble. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo

coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Esterificación de ácidos grasos marcados radiactivamente en las clases lipídicas.

Para determinar el grado de esterificación de los distintos ácidos grasos marcados con ^{14}C en las clases lipídicas, se aplicaron alicuotas de 0,1 mg de los extractos del lípido total para los distintos tratamientos (n=4), en placas HPTLC. Las clases lipídicas fueron separadas como se indicó en el apartado de ‘clases lipídicas y composición de ácidos grasos del rotífero’. Dichas placas una vez desarrolladas se colocaron durante una semana en casetes de exposición cerrados (Exposure Cassete-K, BioRad, Madrid, Spain) en contacto con una pantalla de fósforo radiactivo sensible a radiación beta (Image Screen-K, Biorad, Madrid, España). Las pantallas fueron escaneados con el sistema de adquisición de imágenes Molecular Imager FX (BioRad, Madrid, Epaña), y las bandas se cuantificaron en porcentaje con el Quantity One image analysis software (BioRad, Madrid, España).



Esterificación del ARA del EPA y del DHA a las diferentes clases lipídicas del rotífero.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos han sido expresados como media \pm desviación estándar ($n=4$). Se aplicó un ANOVA de una vía para comprobar el posible efecto del factor sustrato, con los 6 ácidos grasos marcados con ^{14}C como niveles, sobre la incorporación ($\text{pmoles mg pp}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en el contenido del lípido total del rotífero. Asimismo, se llevaron a cabo otros dos Análisis de la Varianza para comprobar si había efecto del factor sustrato, tomando como niveles los ácidos grasos de origen vegetal de 18 carbonos (18:1n-9, 18:2 n-6, 18:3n-3) y del factor sustrato con niveles LC-PUFA marcados con ^{14}C (ARA, EPA, DHA), sobre la incorporación al lípido total y la distribución en porcentaje de la radiactividad incorporada en las distintas clases lipídicas del rotífero. Para la comprobación de la homocedasticidad se ha utilizado el test de Levene y para la normalidad los test de Kolmogorov-Smirnov y el de Shapiro-Wilk. Se han llevado a cabo comparaciones a posteriori mediante los test de Tukey. Cuando no se pudo verificar la normalidad de los datos y / o la homogeneidad de las varianzas, se aplicaron pruebas robustas de igualdad de medias (Welch y Brown-Forsythe), seguido del test no paramétrico de Games-Howell para la comparación múltiple de medias. Además, se llevó a cabo un *análisis de componentes principales* (ACP) para el estudio multivariante de la incidencia de las clases lipídicas. Para todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se fijó al 0,05 ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 19.0 para Windows.

RESULTADOS

Perfil lipídico del rotífero control

Antes de analizar los resultados del seguimiento metabólico de los distintos ácidos grasos marcados con ^{14}C , se muestra a continuación el perfil de clases lipídicas y el contenido de lípido total del rotífero control (Tabla 1), además de su perfil de ácidos grasos (Tabla 2), donde se puede deducir la composición de partida del mismo. Todos los valores que se recogen en dichas tablas están presentados como medias \pm desviación estándar.

El contenido de lípido total (LT) de los rotíferos fue de $0,19 \pm 0,03$ mg lípido.mg proteína $^{-1}$ y presentó un contenido relativamente similar entre el total de lípidos polares (TPL) ($51,5 \pm 1,5$ %) y el total de los lípidos neutros (TNL) ($48,5 \pm 1,5$ %). Dentro de los lípidos polares, las clases lipídicas más abundantes fueron la fosfatidilcolina (PC) con un $13,2 \pm 0,4$ % y la fosfatidiletanolamina (PE) en un $18,1 \pm 0,6$ % del contenido del LT. Por otro lado, los ésteres de esterol (SE) dentro de los lípidos neutros, fue la clase lipídica más abundante con un $13,9 \pm 0,7$ %, seguido del colesterol ($9,9 \pm 1,1$ %) y los triglicéridos ($9,3 \pm 1,1$ %).

Tabla 1. Contenido de lípido total (mg lípido.mg proteína $^{-1}$) y composición de clases lipídicas (% de lípido total) de rotíferos control.

Contenido de lípido total (LT)	$0,19 \pm 0,03$
<i>Clases lipídicas</i>	
Esfingomielina	$0,9 \pm 0,3$
Lisofosfatidilcolina	$0,6 \pm 0,1$
Fosfatidilcolina	$13,2 \pm 0,4$
Fosfatidilserina	$3,5 \pm 0,3$
Fosfatidinositol	$6,0 \pm 0,6$
Fosfatidilglicerol	$5,4 \pm 0,5$
Fosfatidiletanolamina	$18,1 \pm 0,6$
No identificado	$4,2 \pm 0,5$
Σ Lípidos polares	$51,5 \pm 1,5$
Monoglicéridos	$6,6 \pm 0,8$
Colesterol	$9,9 \pm 1,1$
Ácidos grasos libres	$8,8 \pm 0,8$
Triglicéridos	$9,3 \pm 1,1$
Ésteres de esterol	$13,9 \pm 0,7$
Σ Lípidos neutros	$48,5 \pm 1,5$

Los valores han sido expresados como medias \pm desviación estándar (DE); n=4.

Los rotíferos fueron particularmente ricos en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA; $59,9 \pm 0,7$ % del total de ácidos grasos), siendo los más abundantes el 16: 1n-7 y 18: 1 n-9 (Tabla 2). El contenido total de ácidos grasos saturados fue del $20 \pm 0,3$ %, y el de poliinsaturados (PUFA) correspondió al $13,8 \pm 0,4$ %, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) representaron sólo el $3,6 \pm 0,2$ % del total de los ácidos grasos. Las relaciones DHA/EPA y EPA/ARA fueron $1,6 \pm 0,1$ y $1,7 \pm 0,1$, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del rotífero control.

14:0	$1,9 \pm 0,1$
15:0	$0,7 \pm 0,0$
16:0	$8,2 \pm 0,2$
17:0	$1,0 \pm 0,0$
18:0 DMA	$2,0 \pm 0,2$
18:0	$4,5 \pm 0,1$
Σ saturados ^a	$20,0 \pm 0,3$
16:1n-9	$1,3 \pm 0,2$
16:1n-7	$17,9 \pm 0,2$
18:1n-11	$3,3 \pm 0,0$
18:1n-9	$24,0 \pm 0,3$
18:1n-7	$5,0 \pm 0,2$
20:1n-9	$3,6 \pm 0,1$
20:1n-7	$1,2 \pm 0,0$
Σ monoenos ^a	$59,9 \pm 0,7$
18:2n-6	$8,2 \pm 0,2$
20:3n-9	$1,1 \pm 0,1$
20:4n-6	$0,5 \pm 0,0$
20:5n-3	$0,8 \pm 0,0$
22:6n-3	$1,3 \pm 0,1$
Σ PUFA ^{a,b}	$13,8 \pm 0,4$
LC-PUFA ^c	$3,6 \pm 0,2$
n-3/n-6	$0,2 \pm 0,0$
DHA/EPA ^d	$1,6 \pm 0,1$
EPA/ARA ^d	$1,7 \pm 0,1$

Los valores han sido expresados como media \pm desviación estándar (DS); n = 4. Los datos se representan en % del contenido total de ácidos grasos. ^a Las cifras totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran. ^b PUFA – ácido graso poliinsaturado. ^c LC-PUFA – ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. ARA – 20:4n-6; EPA – 20:5n-3; DHA – 22:6n-3.

Incorporación de radiactividad en el lípido total y su distribución en las clases lipídicas

La tabla 3 muestra la incorporación de los distintos ácidos grasos marcados con ^{14}C al lípido total de los rotíferos. Entre los ácidos grasos de origen vegetal (18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3), el 18:1n-9 fue el menos incorporado ($16,6 \pm 3,0 \text{ pmol mg pp}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $p < 0,05$). Por otro lado, dentro de los ácidos grasos de origen marino (LC-PUFA; ARA, EPA y DHA), el 20:4n-6 mostró una mayor incorporación ($25,9 \pm 3,7 \text{ pmol mg pp}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que el DHA fue el de menor incorporación ($9,6 \pm 3,4 \text{ pmol mg pp}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $p < 0,05$). En relación a su estructura se observa una mayor incorporación de ácidos grasos n-6 (18:2n-6 y ARA) que n-3 (18:3n-3, EPA y DHA) o n-9 (18:1n-9). Así mismo comparando al 18:3n-3 con 18:2n-6 o el ARA con el EPA (que tienen el mismo número de carbonos) se vuelve a observar que hay una mayor tendencia a la incorporación de ácidos grasos n-6 que n-3 sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre las medias ($p > 0,05$).

La distribución de la radiactividad incorporada en las distintas clases lipídicas del rotífero se muestra igualmente en la tabla 3. Se observa que todos los ácidos grasos marcados con ^{14}C fueron ampliamente esterificados por los rotíferos, de manera que menos de un 5% de la radiactividad incorporada se recuperó en forma de ácidos grasos libres (FFA). Después de 4 horas de incubación, la mayoría de los sustratos marcados con ^{14}C se esterificaron en los lípidos polares, principalmente en la PC (18:2n-6, 18:3n-3 y DHA, $p < 0,05$) y la PE (18:1n-9; $p < 0,05$), a excepción del ARA y el EPA que presentaron mayor esterificación en el fosfatidilinositol (PI) ($46,5 \pm 3,4\%$ y $34,8 \pm 2,5\%$ de radiactividad incorporada, respectivamente; $p < 0,05$). Los patrones de esterificación de los ácidos grasos marcados con ^{14}C 18:2n-6 y 18:3n-3 fueron similares (PC>PE>PG>PAG) (PAG-gliceroles parciales, incluyendo mono y diglicéridos; PG-fosfatidilglicerol). Sin embargo, el patrón de esterificación del 18:1n-9 fue diferente con respecto a los otros ácidos grasos de 18C, siendo predominantemente esterificado en PE > PC > PAG. El patrón de esterificación de los LC-PUFA marcados con ^{14}C también varió. El ARA fue esterificado en PI > PAG > PE, el EPA en PI > PAG > PC > PE y el DHA en PC > PE > PAG.

Mediante el análisis estadístico se pudo comprobar que hubo efecto del factor sustrato, con los 6 ácidos grasos marcados con ^{14}C como niveles, sobre la incorporación ($\text{pmoles mg pp}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al lípido total del rotífero, ($p = 0,000$), además se observó que había diferencias significativas entre las medias de los ácidos grasos de origen vegetal (18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3) con respecto a las medias de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, más relacionados con un origen marino, (20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3) ($p = 0,001$)

Asimismo, se llevaron a cabo otros dos Análisis de la Varianza para comprobar si había efecto del factor sustrato, con niveles los ácidos grasos de origen vegetal de 18 carbonos (18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3) y del factor sustrato con niveles LC-PUFA marcados con ^{14}C (ARA, EPA, DHA), sobre la distribución en porcentaje de la radiactividad incorporada en las distintas clases lipídicas del rotífero. En dichos análisis hubo efecto del factor (ácidos grasos de 18C) para cada una de las clases lipídicas exceptuando la PS ($p = 0,086$), mientras que en LC-PUFA también hubo efecto del factor menos en las clases lipídicas PS, SE, FFA y TAG y en los sumatorios de lípidos polares y neutros (TPL, TNL).

Tabla 3. Incorporación al lípido total (pmoles mg pp $^{-1}$ h $^{-1}$) y distribución (%) en las clases lipídicas de los rotíferos, de los ácidos grasos marcados con ^{14}C .

Sustrato	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3
Incorporación	16,6 ± 3,0 ^{cd•}	29,5 ± 2,7 ^{a▲}	26,8 ± 3,5 ^{ab▲}	25,9 ± 3,7 ^{abΔ}	21,3 ± 4,4 ^{bcΔ}	9,6 ± 3,4 ^{d○}
Clases Lipídicas						
Lisofosfatidilcolina	0,5 ± 0,2 ^{b•}	0,7 ± 0,2 ^{b▲•}	1,0 ± 0,4 ^{b▲}	0,7 ± 0,2 ^{b○}	0,8 ± 0,5 ^{b○}	2,3 ± 0,3 ^{aΔ}
Fosfatidilcolina	23,8 ± 1,1 ^{d■}	38,4 ± 0,8 ^{a▲}	34,8 ± 1,0 ^{b•}	8,4 ± 0,4 ^{f□}	14,0 ± 0,8 ^{e○}	30,8 ± 1,5 ^{cΔ}
Fosfatidilserina	2,5 ± 0,4 ^{b▲}	2,3 ± 0,3 ^{b▲}	2,8 ± 0,0 ^{b▲}	7,7 ± 1,4 ^{aΔ}	7,0 ± 3,7 ^{abΔ}	5,6 ± 0,7 ^{aΔ}
Fosfatidilinositol	5,7 ± 0,3 ^{d▲}	3,0 ± 0,2 ^{e•}	2,5 ± 0,2 ^{e■}	46,5 ± 3,4 ^{aΔ}	34,8 ± 2,5 ^{b○}	10,8 ± 1,5 ^{c□}
Fosfatidilglicerol	6,7 ± 0,6 ^{c■}	11,3 ± 0,8 ^{b•}	18,2 ± 1,4 ^{a▲}	4,1 ± 0,3 ^{d○}	4,7 ± 0,6 ^{d○}	7,5 ± 0,5 ^{cΔ}
Fosfatidiletanolamina	35,5 ± 1,5 ^{a▲}	29,4 ± 0,7 ^{b•}	27,7 ± 0,3 ^{b■}	10,1 ± 0,7 ^{e□}	12,8 ± 0,5 ^{d○}	19,7 ± 0,2 ^{cΔ}
No identificado	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,0	-	-	-
∑ Lípidos polares	76,6 ± 2,2 ^{bd•}	86,4 ± 0,8 ^{a▲}	88,4 ± 0,7 ^{a▲}	77,5 ± 1,1 ^{bΔ}	74,1 ± 1,0 ^{cdΔ}	76,7 ± 2,5 ^{bcΔ}
Gliceroles parciales	10,2 ± 1,4 ^{b▲}	6,7 ± 1,6 ^{c•}	7,9 ± 0,7 ^{bc▲•}	18,3 ± 1,5 ^{a○}	21,4 ± 0,9 ^{aΔ}	19,5 ± 1,8 ^{aΔ○}
Ácidos grasos libres	4,2 ± 0,9 ^{a▲}	2,6 ± 0,4 ^{ab▲•}	2,0 ± 0,2 ^{ab•}	1,5 ± 0,3 ^{bΔ}	1,8 ± 0,6 ^{bΔ}	1,6 ± 0,8 ^{bΔ}
Triglicéridos	6,5 ± 1,0 ^{a▲}	3,6 ± 0,5 ^{b•}	1,5 ± 0,3 ^{c■}	1,8 ± 0,1 ^{cΔ}	1,7 ± 0,4 ^{cΔ}	1,8 ± 0,5 ^{cΔ}
Ésteres de esteroles	2,5 ± 0,7 ^{a▲}	0,7 ± 0,4 ^{ab•}	0,3 ± 0,2 ^{b•}	0,8 ± 0,2 ^{acΔ}	1,0 ± 0,8 ^{abΔ}	0,4 ± 0,3 ^{bcΔ}
∑ Lípidos neutros	23,4 ± 2,2 ^{ab▲}	13,6 ± 0,8 ^{d•}	11,6 ± 0,7 ^{d•}	22,5 ± 1,1 ^{bcΔ}	25,9 ± 1,0 ^{aΔ}	23,3 ± 2,5 ^{acΔ}

Los valores han sido expresados como medias ± desviación estándar (DS); n = 4. Los datos de incorporación se representan en pmoles de ácidos grasos marcados con ^{14}C incorporados por mg de proteína por hora. Los datos de distribución son dados en porcentaje. Letras diferentes en superíndice dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre todos los ácidos grasos ($p < 0,05$). Los diferentes símbolos rellenos en superíndice (▲●■) dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre los ácidos grasos de 18 carbonos ($p < 0,05$). Los diferentes símbolos huecos en superíndice (Δ○□) dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre los LC-PUFA ($p < 0,05$).

Por último, se llevó a cabo un *análisis de componentes principales* (ACP) para el estudio multivariante del grado de esterificación de los distintos ácidos grasos marcados con ^{14}C en las clases lipídicas.

Las dos componentes explican un 82,98% de información de los datos originales, donde la componente 1 (CP 1) recoge el 53,41% de la información, y está altamente correlacionada con las clases lipídicas PAG, PE, PG, PI, PS y PC. Por otro lado, la componente 2 (CP 2) explica el 29,57% de la varianza, y se encuentra correlacionada principalmente con los SE, TAG, FFA y lisofosfatilcolina (LPC). (Tabla 4).

En los resultados obtenidos, tanto para el estudio de comparación de medias como para el gráfico de dispersión (Fig 1), se observó que, en términos generales, es la componente 1 la que mejor discrimina entre el grado de esterificación de los distintos ácidos grasos en las clases lipídicas, no obstante, en el caso del 18:1n-9, se observó que la discriminación era debida a la componente 2, es decir, que el enriquecimiento con 18:1n-9 afecta sobre todo a las clases lipídicas SE, TAG, FFA y LPC. No obstante, los ácidos grasos ARA y EPA no presentaron diferencias significativas ($p= 0.586$). Ambos ácidos grasos explican por igual las variaciones de esterificación con la componente 1 que con la 2.

Tabla 4: Matriz de cargas factoriales de las clases lipídicas estudiados en rotífero

CL	Componente	
	1	2
SE	-,120	,939
TAG	,287	,915
FFA	,368	,866
PAG	-,845	-,304
PE	,849	,479
PG	,838	-,321
PI	-,945	-,085
PS	-,838	-,301
PC	,941	-,195
LPC	,082	-,644

Los valores en negrita muestran las cargas factoriales más altas con componente 1. Los valores subrayados muestran las cargas factoriales más altas con componente 2. Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

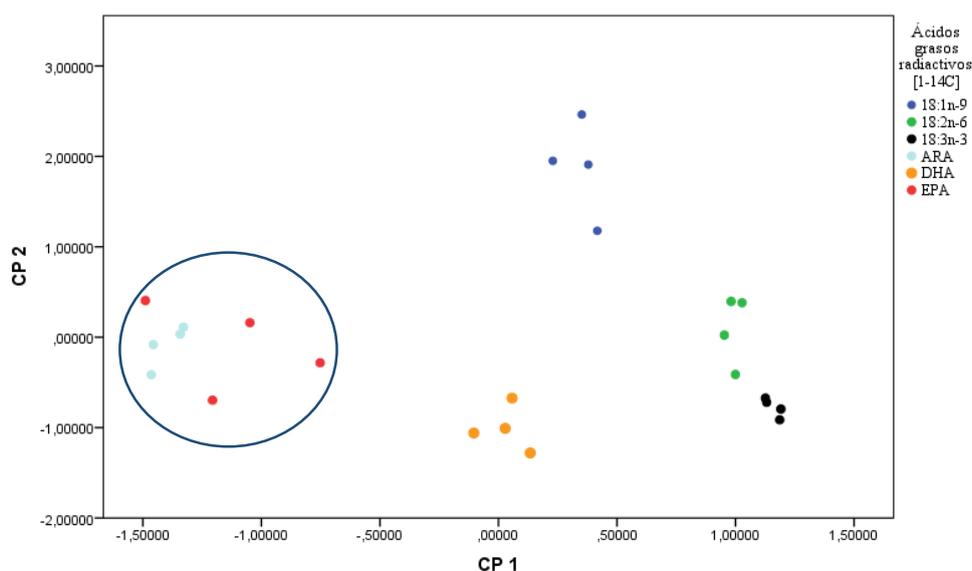


Figura 1. Puntuaciones factoriales (componente 1 y 2) del grado de esterificación de los distintos ácidos grasos marcados con ^{14}C en las distintas clases lipídicas de los extractos del lípido total en el rotífero.

DISCUSIÓN

Tanto en acuicultura como en acuariología, el cultivo larvario de peces marinos es la etapa más compleja y delicada debido, no sólo al pequeño tamaño de las larvas, sino a que éstas sufren constantes procesos de metamorfosis y poseen un sistema digestivo tan rudimentario, que aún hoy es difícil utilizar con éxito microdietas formuladas, siendo los resultados de crecimiento y supervivencia bastante pobres con el uso exclusivo de microdietas (Rueda-Jasso *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006). La alimentación de las larvas de peces marinos a escala comercial conlleva el mantenimiento de cultivos auxiliares (fitoplancton, rotífero y nauplius de *Artemia*), que deben presentar una adecuada composición lipídica para asegurar la buena nutrición larvaria. Ello implica que, hasta que el uso de microdietas u otro tipo de presas vivas como los copépodos, esté consolidado, hoy por hoy, las hatcheries comerciales y los acuarios dependen del enriquecimiento de los rotíferos y nauplius de *Artemia* con fitoplancton y/o productos comerciales de diversa índole, ricos en n-3 HUFA, y con una adecuada relación DHA/EPA/ARA, capaces de asegurar una supervivencia y crecimiento aceptables desde un punto de vista económico.

A raíz de esto, hoy en día son frecuentes los estudios de metabolismo «in vivo» e «in vitro», que aportan información relevante sobre aspectos concretos de la nutrición larvaria. Este es el caso de estudios sobre capacidad de digestión, absorción y deposición de una determinada fuente lipídica y, más concretamente, los estudios de seguimiento metabólico de ácidos grasos

radiactivos que permiten analizar la capacidad de la especie en cuestión para beta-oxidar o esterificar un determinado ácido graso, o bien, producir $\omega 3$ y $\omega 6$ HUFA a partir de sus precursores. Por lo tanto, se hace evidente el esfuerzo investigador en el área de la nutrición larvaria de peces marinos, que continúa no sólo para la consecución de microdietas adaptadas a las necesidades nutricionales de cada especie, sino en la búsqueda de nuevas fuentes de aceites y fosfolípidos ricos en n-3 HUFA para el enriquecimiento de las presas vivas (Li *et al.*, 2014, 2015; Olsen *et al.*, 2014; Sargent *et al.*, 1997,2002; Van der Meeren *et al.*, 2008).

En el caso de los rotíferos, al igual que en todas las presas zooplanctónicas, el perfil lipídico es de máxima importancia para la nutrición de las larvas. Además, el contenido del lípido total de la dieta es un factor determinante en el nivel de requerimiento (Salhi *et al.*, 1994). Igualmente, los requerimientos varían entre especies y para una misma especie, dependiendo de las condiciones de cultivo y del parámetro concreto medido por el investigador (Furuita *et al.*, 1996a, b). Así, hay estudios que señalan que en términos de supervivencia el EPA se presenta como particularmente esencial (Rodríguez, 1994), mientras que, para el crecimiento y viabilidad, el conjunto de n-3 HUFA o sólo el DHA, resultan más efectivos (Watanabe, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Izquierdo *et al.*, 1989 a, b; Rodríguez *et al.*, 1997, 1998b; Li *et al.*, 2014, 2015; Olsen *et al.*, 2014).

El contenido lipídico en los rotíferos varía generalmente entre el 9 y 28% de su peso seco, donde aproximadamente el 34 – 43 % de los lípidos son fosfolípidos y el 20 – 55 % son triacilgliceroles, con una pequeña cantidad de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides, ésteres de esteroles y ácidos grasos libres (Teshima *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Nagata y Whyte, 1992; Fernandez- Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997). En general, los fosfolípidos y triacilgliceroles en rotíferos muestran perfiles de ácidos grasos similares, pero éstos están afectados en gran medida por los lípidos facilitados en su dieta.

En el presente trabajo, los rotíferos control presentaron un contenido de lípido total (LT) unas cinco veces inferior al contenido proteico, con valores relativamente similares entre los lípidos polares y los lípidos neutros. Las clases lipídicas (dentro de los lípidos polares) más abundantes fueron la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Por otro lado, los ésteres de esteroles (SE) dentro de los lípidos neutros, fue la clase lipídica más abundante, seguido del colesterol y los triglicéridos. Al tratarse de rotíferos alimentados con levadura de panadería y un ligero enriquecimiento en fitoplancton, no presentaban un contenido graso elevado, siendo su perfil de clases lipídicas, eminentemente estructural, y pobre en lípidos de reserva tales como los triglicéridos, altamente presentes en rotíferos enriquecidos con emulsiones lipídicas comerciales (Rodríguez *et al.*, 1998a, 1998b). Además, el perfil de ácidos grasos mostró que

son organismos particularmente ricos en ácidos grasos monoinsaturados, siendo los más abundantes el 16:1n-7 y 18:1n-9, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) representaron sólo el $3,6 \pm 0,2\%$ del total de los ácidos grasos, con relaciones DHA/EPA y EPA/ARA similares de $1,6 \pm 0,1$ y $1,7 \pm 0,1$, respectivamente. Este perfil se corresponde igualmente con el de rotíferos mantenidos con levadura de panadería, que no aporta LC-PUFA y un cierto enriquecimiento con microalgas (Rodríguez *et al.*, 1998a, 1998b; Olsen *et al.*, 2014; Rainuzzo *et al.*, 1994).

Es de destacar que el rotífero al ser un organismo filtrador, pasivo, no selectivo, permite tener calidades nutritivas fácilmente manipulables mediante técnicas de enriquecimiento, lo que supone una gran ventaja a la hora de realizar cultivos con dietas ricas en ácidos grasos altamente insaturados de la serie n-3, como EPA y DHA (n-3 HUFA) y el ARA, que son ácidos grasos esenciales para organismos marinos, y juegan un papel crucial en el desarrollo larvario en los primeros estadios de desarrollo (Li *et al.*, 2014, 2105; Olsen *et al.*, 2014; Sargent *et al.*, 2002). La importancia de dichos ácidos grasos radica en la gran cantidad de procesos en los que intervienen, como se resume en la introducción del presente trabajo.

En este trabajo se observó que los diferentes ácidos grasos marcados radiactivamente tuvieron mayor grado de esterificación en los lípidos polares, si bien mostraron diferencias significativas de esterificación entre sí. Concretamente, en la clase lipídica PC se esterifican preferentemente 18:2n-6, 18:3n-3 y DHA, el 18:1n-9 en la PE, ARA y el EPA en PI.

Dentro de los ácidos grasos de origen vegetal se observó que la proporción de radiactividad recuperada como TAG fue significativamente mayor para el 18:1n-9, que para el linoleico o el linolénico. Esta esterificación preferencial podría estar relacionada con los sistemas de oxidación de ácidos grasos para la obtención de energía (Sargent *et al.*, 1989). En larvas de peces y otros organismos marinos, los lípidos neutros y más específicamente los triglicéridos (TAG) son presumiblemente utilizados para satisfacer las demandas de energía (Rainuzzo *et al.*, 1997, Sargent *et al.*, 1989), siendo los ácidos grasos saturados y monoinsaturados los principales sustratos.

Por otro lado, dentro de los LC-PUFA el DHA, que en nuestro trabajo fue el menos incorporado al lípido total ($9,6 \pm 3,4$ pmol mg pp⁻¹ h⁻¹; $p < 0,05$), es fundamental en el correcto funcionamiento de la membrana celular, y particularmente abundante en tejidos neurales como cerebro y retina. Dicho ácido graso esterifica preferentemente la posición SN2 de la fosfatidilcolina (PC) en huevos y larvas con vitelo de peces, moluscos y crustáceos, y se va acumulando en la fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) durante el desarrollo. Se trata de un ácido graso particularmente abundante en la sinapsis, en los conos y bastones de la

retina y en los gametos, es decir, allí donde se requieren eventos de fusión de membrana (Sargent *et al.*, 2002; Tocher *et al.*, 2008). A pesar de la peor incorporación del DHA en el rotífero, su esterificación preferente en PC y PE, concuerda con las necesidades descritas recientemente para larvas de peces y cefalópodos (Reis *et al.*, 2014, 2015, 2016; Li *et al.*, 2014, 2015; Olsen *et al.*, 2014). El EPA y el ARA son los principales precursores de eicosanoides, siendo más elevada la proporción de EPA que de ARA en los tejidos de los animales marinos, a diferencia de los terrestres. EPA también es abundante en la PE, no obstante, en nuestro trabajo presentó mayor grado de esterificación en el PI. El ARA, tiene una gran afinidad por el fosfatidilinositol (PI) en los vertebrados, incluyendo los peces (Sargent *et al.*, 2002; Tocher *et al.*, 2008). La esterificación preferente del ARA en el PI, también concuerda con la idoneidad del rotífero de cara a la vehiculización dietaria de este ácido graso esencial para las primeras etapas del desarrollo larvas de peces.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de mantener una adecuada relación EPA/ARA y DHA/EPA en la dieta de numerosas especies de peces para su correcto desarrollo, y que los requerimientos de AGE pueden ser alcanzados con un nivel inferior de n-3 HUFA total si estas relaciones dietarias son adecuadas (Watanabe, 1993; Izquierdo *et al.*, 1989 a,b; Rodríguez *et al.*; 1994a, 1997, 1998b). En este sentido, en larvas de dorada el nivel óptimo de AGE se consigue con una relación 22:6n-3/20:5n-3 de aproximadamente 1.5-2 (Rodríguez *et al.*, 1994a, 1997, 1998a), mientras que este valor es inferior a 1 en el caso de los alevines (Ibeas *et al.*, 1997). En nuestro estudio el rotífero control presenta una relación DHA/EPA y EPA/ARA de $1,6 \pm 0,1$ y $1,7 \pm 0,1$, respectivamente. Ambos valores serían adecuados desde el punto de vista de la nutrición larvaria. No obstante, la menor incorporación observada del DHA frente a EPA y ARA, o la competitividad entre DHA, 18:2n-6 y 18:3n-3 por su esterificación en la PC o del EPA y ARA en el PI, podrían generar un rotífero con relaciones inadecuadas de ácidos grasos esenciales, si no se tiene en cuenta estos factores en el proceso de enriquecimiento lipídico del rotífero.

También resulta evidente de la investigación disponible, que en general, las larvas tienen un requerimiento superior de 22:6n-3 que de 20:5n-3 (Izquierdo *et al.*, 1989 a,b; Watanabe, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1997, 1998b), ya que, por ejemplo, el desarrollo de las larvas del trompetero australiano (*Latris lineata*) se ve beneficiado por la inclusión de determinados niveles dietarios de 22:6n-3, por debajo de los cuales, se ven afectados de forma negativa el comportamiento larvario, la resistencia a infecciones y la absorción y transporte de los lípidos (Brandsen *et al.*, 2003, 2005a,b). Más aún, en las larvas de mahimahi (pez delfín; *Coryphaena hippurus*), la resistencia al estrés ha sido correlacionada positivamente con el

22:6n-3 y no con el 20:5n-3 o con el nivel total de n-3 HUFA, (Kraul *et al.*, 1993). La principal razón aducida para un mayor requerimiento de DHA en las larvas de la mayoría de las especies estudiadas, es la necesidad de este ácido graso en una fase en la que los tejidos neurales y más concretamente el desarrollo cerebral y visual están en pleno desarrollo, tejidos cuyos fosfolípidos son ricos en este ácido graso y que, durante la fase larvaria, adquieren una proporción elevada respecto al resto de masa corporal. La importancia del 22:6n-3 para el desarrollo adecuado de estos tejidos es un hecho constatado en multitud de especies, incluyendo el arenque (Navarro *et al.*, 1993b; Bell *et al.*, 1995), la lubina (Bell *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997) o la dorada (Benítez-Santana *et al.*, 2007). Así, deficiencias dietarias de DHA dan lugar a larvas de arenque con dificultades en la visión y capacidad depredadora, presumiblemente debidas a disfunciones de los bastones de la retina (Bell *et al.*, 1995). También ocasiona problemas de mal pigmentación en la producción de peces planos, incluyendo el rodaballo, el fletán y el lenguado japonés. La avidez por el 22:6n-3 de los tejidos neurales, quedó claramente evidenciada también con el aumento de la presencia de este ácido graso en el cerebro de larvas de rodaballo y dorada que habían sido destetadas, pasando de una dieta deficiente a una dieta rica en 22:6n-3 (Mourente *et al.*, 1993). Por lo tanto, el aporte de un nivel dietario adecuado de 22:6n-3 es de vital importancia durante el desarrollo larvario de peces marinos.

Por otro lado, en experimentos realizados con la especie limanda (*Limanda ferruginea*), otro tipo de lenguado, mostró que tras la ingesta de rotíferos ricos en 20:4n-6 se producía un efecto negativo en la pigmentación (Copeman *et al.*, 2002). De hecho, Sargent *et al.*, (1999) sugieren que el efecto negativo del ARA sobre la pigmentación podría deberse a una sobreproducción de eicosanoides derivados de este ácido graso, no obstante, son muy escasos los trabajos que señalan esta relación entre ARA, producción de eicosanoides y pigmentación de larvas de peces (Brandsen *et al.*, 2005b). Anteriormente, se había postulado la influencia negativa del exceso del 20:4n-6, en el desarrollo de las larvas de la dorada europea (Rodríguez *et al.*, 1994a) y en larvas de seriola donde un 4 % de ARA en peso seco de nauplios de *Artemia*, inhibía el crecimiento e incrementaba la mortalidad (Ishizaki *et al.*, 1998). Sin embargo, Zheng *et al.* (1996) encontraron que con los niveles dietarios ensayados de 20:4n-6 no se veían afectados el crecimiento o viabilidad de las larvas del bacalao. En el caso de las larvas de la lubina estriada (*Morone saxatilis*), Harel *et al.*, (2001), señalan lo delicado del balance dietario DHA/ARA en relación con el estrés y la respuesta inmune. De hecho, encontraron mayor crecimiento en larvas enriquecidas con ARA que con DHA, pero en condiciones de hipersalinidad, la supervivencia larvaria era mejor en larvas enriquecidas en DHA. Por lo tanto, dichos resultados evidencian la existencia de un requerimiento estricto de 20:4n-6, tal vez más bajo que el de DHA y EPA, pero

necesario para el desarrollo óptimo de las larvas de peces marinos (Rodríguez *et al.*, 1994a; Ishizaki *et al.*, 1998; Estévez *et al.*, 1999; Bessonart *et al.*, 1999; Harel *et al.*, 2001). En el caso de la dorada (*Sparus aurata*), el efecto negativo producido por el incremento dietario del ARA sobre la incorporación del EPA en los lípidos polares de la larva, se relacionó con la posible interacción competitiva en la esterificación de ambos ácidos grasos (Bessonart *et al.*, 1999). Esto puede ser debido a la relación inversa descrita en los peces marinos entre el ARA y EPA. De hecho, en el presente estudio el patrón de esterificación del ARA y el EPA en las distintas clases lipídicas fue similar, siendo ambos preferentemente esterificados en el PI ($46,5 \pm 3,4\%$ y $34,8 \pm 2,5\%$). La mencionada relación inversa, podría estar asociada con una competencia entre estos dos LC-PUFA para el uso de las enzimas acilasas y transacilasas, responsables de la esterificación de los ácidos grasos en los fosfolípidos, las cuales no parecen tener especificidad para un ácido grasos particular de la dieta (Sargent *et al.*, 1999).

A la vista de los resultados del presente estudio, se deduce que la sustitución parcial de aceites marinos por aceites vegetales ricos en 18:2n-6 y 18:3n-3, podría generar también cierta competitividad entre estos ácidos grasos y el DHA en su esterificación en la PC, poniendo en riesgo un desarrollo larvario óptimo.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo nos demuestran la viabilidad del método desarrollado para realizar un seguimiento metabólico en el rotífero, de ácidos grasos marcados radiactivamente con ^{14}C , añadidos al medio en su forma de sal de potasio unidos a la albúmina de suero bovino (BSA), pudiendo establecer no sólo su incorporación al lípido total sino su grado de esterificación en las distintas clases lipídicas. La aplicación de esta metodología para estudiar el metabolismo lipídico y de otros nutrientes en organismos acuáticos, incluyendo fases larvarias de crustáceos, cefalópodos y peces de interés en acuicultura y acuariología, resulta particularmente interesante.

CONCLUSIONES

Las principales aportaciones de este estudio son las siguientes:

The main contributions of this study are as follows:

1) Gracias al estudio del seguimiento metabólico de ácidos grasos radiactivos, pudimos analizar la capacidad del rotífero para incorporar en el lípido total (LT) los distintos ácidos grasos utilizados, además del grado de esterificación de los mismos en las distintas clases lipídicas. Así, presenta una mayor incorporación de ácidos grasos n-6 que n-3 o n-9 y una esterificación preferente en los lípidos polares, principalmente en la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI).

Metabolic monitoring of radioactive fatty acids, tests the ability of the rotifer to incorporate in the total lipid (TL) different fatty acids, and the degree of esterification thereof in the different lipid classes. Thus, a higher fatty acid incorporation occurs for n -6 than for n-3 and n-9, in a preferred esterification rate in polar lipids, mainly phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI).

2) El método empleado es eficiente de cara a asegurar una correcta nutrición larvaria en organismos marinos de interés para la acuicultura y la acuariología, destacando cómo la dinámica de incorporación y esterificación de los distintos ácidos grasos y sus posibles interacciones, hacen compleja la tarea de cubrir las necesidades nutricionales de cada especie, a través del enriquecimiento de presas vivas en AGE de la serie n-3 (n-3 HUFA), como el EPA (20:5n-3) el DHA (22:6n-3) o de la serie n-6 (n-6 HUFA) como el ARA (20:4n-6), que juegan un papel crucial en el correcto desarrollo de los cultivos larvarios.

The methodology is efficient to ensure proper larval nutrition in marine organisms of interest for aquaculture and aquariology, emphasizing how the dynamics of incorporation and esterification of the various fatty acids assayed and their possible interactions, make difficult the task of meeting nutritional needs of each species through the enrichment of live prey in AGE of the n-3 (n-3 HUFA) series, such as EPA (20 : 5 n -3) DHA (22: 6n -3) or n-6 (n-6 HUFA) such as ARA (20 : 4 n -6), which play a crucial role in the proper development of marine larviculture.

3) El aporte dietario de 18:2n-6 y 18:3n-3, propio de la sustitución parcial de aceites de pescado por aceites vegetales, ponen en riesgo un desarrollo larvario óptimo debido a la baja incorporación del DHA y competitividad mostrada entre estos dos ácidos grasos de 18C y el DHA por su esterificación en la fosfatidilcolina (PC).

The partial replacement of fish oils of vegetable oils rich in 18: 2n - 6 and 18: 3n -3 jeopardize optimal larval development due to the low incorporation of DHA and competitiveness shown between these two fatty acids and DHA by esterification in phosphatidylcholine (PC)

4) Dependiendo de la especie de cultivo, el propio metabolismo del rotífero o de otra presa viva, podría favorecer o no a su correcta nutrición. Es necesario un mayor entendimiento en la valoración y caracterización de los requerimientos específicos en clases lipídicas y ácidos grasos esenciales de cada especie de cultivo, con el fin de obtener información relevante para el desarrollo de una dieta capaz de cubrir las necesidades nutricionales de larvas especies criadas en cautividad.

Depending on the crop species, rotifer or any live prey own metabolism may favor or not proper nutrition. It is necessary a greater understanding of the measurement and characterization of specific requirements in lipid classes and essential fatty acids from each crop species, in order to obtain information relevant to the development of a diet that copes with the nutritional needs of marine larvae under captivity.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, D., Rocha F., Martínez-Rodríguez, G., Bell G., Morais, S., Castanheira, F., Bandarra, N., Coutinho, J., Yúfera, M. and Conceição L.E. 2012. Teleost fish larvae adapt to dietary arachidonic acid supply through modulation of the expression of lipid metabolism and stress response genes. *British Journal of Nutrition*. 108: 864–874.
- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C. & Sargent, J.R. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*. 30: 440–443.
- Bell, M.V., Dick, J.R., Thrush, M. Y Navarro, J.C. 1996. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared with wild fish. *Aquaculture*. 144: 189-199.
- Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carrillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernández-Cruz, C.M., Izquierdo, M.S. 2007. Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*. 264: 408-417.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M. & Fernández- Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*. 179: 265–275.
- Brandsen, M.P., Battaglione, S.C., Cobcroft, J.M., Morehead, D.T., Brown, M.R., Nichols, P.N., Dunstan, G.A., Kolkovski, S. 2003. Determining the essential fatty acid requirements of striped trumpeter larvae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 12 Supplement: S34.
- Brandsen, M.P., Battaglione, S.C., Morread, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D. 2005a. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched Artemia. *Aquaculture*. 243: 331-344.
- Brandsen, M.P., Buttetfield, G.M., Walden, J., Mcevoy, L.A., Bell, J.G. 2005b. Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 250: 328-340.
- Chang, Q., Liang, M., Wang, J., Chen, S., Zhang, X., Liu, X. 2006. Growth and survival of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873) larvae fed a compound diet with different protein sources. *Aquaculture Research*. 37(6): 643-646.
- Christie, W.W. 2003. Lipid Analysis, third ed. The Oily Press, Bridgewater, UK, pp. 205-224.
- Copeman, L.A. Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*. 210: 285-304.
- Estevez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G. & Sargent, J.R. 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*. 180: 321–343.
- FAO, 1980. Pereiro J.A. y Bravo de Laguna, J. Dinámica de la Población y Evaluación de los Recursos del Pulpo del Atlántico Centro-Oriental.
- FAO, 1996. Lavens P., Sorgeloos P. Manual on the production and use of live food for aquaculture.
- FAO, 2009. Grainger, R. El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome, 223 pp
- Fernandez-Reiriz, U., Labarta, U. & Ferreiro, M.J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*. 112: 195–206.

- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1): 497-509.
- Frolov, A.V., Pankov, S.L., Geradz, K.N., Pankova, S.A. & Spektrova, L.V. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 97: 181–202.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Toyota, M., Watanabe, T. 1996a. EPA and DHA requirements in early juvenile red seabream using HUFA enriched *Artemia nauplii*. *Fisheries science*. 62: 246-251.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Watanabe, T., Fujimoto, H., Sekiya, S. and Imaizumi, K. 1996b. Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 highly unsaturated fatty acid. *Fisheries science*. 62 (3): 372-379.
- Galli, C., Marangoni, F. 2006. N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 75: 129–133.
- Garrido, D., Martín, M. V., Rodríguez, C., Iglesias, J., Navarro, J. C., Estévez, A., Hontoria, F., Becerro, M., Otero, J. J., Pérez, J., Varó, I., Reis, D. B., Riera, R., Sykes, A. V. y Almansa, E. 2016. Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture*. 0: 1-12.
- Ghioni, C., Tocher, D.R., Sargent, J.R. 1997. The effect of culture on morphology, lipid and fatty acid composition, and polyunsaturated fatty acid metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin cells. *Fish Physiology and Biochemistry*. 16: 499-513.
- Harel, M., Gavasso, S., Leshin, J., Gubernatis, A., Place, A.R. 2001 The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 24: 113-123
- Ibeas, C., Cejas, J.R., Fores, R., Badía, P., Gómez, T., Lorenzo, A. 1997. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*. 150: 91-102.
- Ishizaki, Y., Takeuchi, T., Watanabe, T., Arimoto, M. Shimizu, K. 1998. A preliminary experiment of the effect of Artemia enriched with arachidonic acid on survival and growth of yellowtail. *Fisheries Science*. 64: 295-299.
- Ito, T. 1960. On the culture of the mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Muller, in sea water. *Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie*. 3: 708–740.
- Izquierdo, M. S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C., 1989a. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55: 859-867.
- Izquierdo, M. S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C., 1989b. Optimal EFA levels in *Artemia* to meet the EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). En: Proc. 3rd Int. Symp. Feeding and Nutr. in Fish. Toba (Japón). pp. 221-232.
- Judé, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Champeroux, P., Le Guennec, J-Y. 2006. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 90: 299–325.
- Kraul, S. Brittain, K. Cantrell, R. Nagao, T. Ako, H. Ogasawara, A., Kitagawa, H. 1993. Nutritional factors affecting stress resistance in larval mahimahi *Coryphaena hippurus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24: 186-193.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*. 193: 107–122.
- Li, K., Kjörsvik, E., Bergvik, M., Olsen, Y. 2014. Manipulation of the fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rotifers *Brachionus* Nevada and *Brachionus* Cayman. *Aquaculture Nutrition*. 21: 85–97.

- Li, K., Olsen, Y. 2015. Effect of enrichment time and dietary DHA and non-highly unsaturated fatty acid composition on the efficiency of DHA enrichment in phospholipid of rotifer (*Brachionus Calycinus*). *Aquaculture* 446, 310–317
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lubzens, E., Tandler, A. & Minkoff, G. 1989 Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*. 186/187: 387–400.
- Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I., Díaz, M. 2010. Lipid Alterations in Lipid Rafts from Alzheimer's Disease Human Brain Cortex. *Journal of Alzheimer's Disease*. 19(2): 489-502.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) larvae during first feeding. *Aquaculture*: 112: 79-98.
- Nagata, W.D. & Whyte, J.N.C. 1992. Effect of yeast and algal diets on the growth and biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) in culture. *Aquacult. Fish. Manage.* 23: 13–21.
- Navarro, J. C., Batty, R. S., Bell, M. V., Sargent, J. R. 1993b. Effects of two *Artemia* diets with different contents of polyunsaturated fatty acids on the lipid composition of larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Journal of Fish Biology*. 43(4): 503-515.
- Navarro, J.C., Mcevoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., Hontoria, F., Sargent, J.R. 1997. Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) on the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. *Aquaculture International*. 5(6): 509-516.
- Olsen, R. E., & Henderson, R. J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 129(2): 189-197.
- Olsen, Y., Evjemo, J.O., Kjørsvik, E., Larseen, H., Li, K., Overrein, I., Rainuzzo, J. 2014. DHA content in dietary phospholipids affects DHA content in phospholipids of cod larvae and larval performance. *Aquaculture*. 428-428, 203-214.
- Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C. y Cowey, C.B. 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Lipids*. 10: 528-531.
- Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J.R., 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: 571–583.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., Kris-Etherton, P. 2006. Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology*. 98 (4A): 1-18.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jørgensen, L., Olsen, Y. 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsion of different lipid classes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 107: 699-710.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. & Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*. 155: 103–115.
- Reiffel, J. A., McDonald, A. 2006. Antiarrhythmic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology*. 98 (4A): 50-60.
- Reis, D.B., Acosta, N.G., Almansa, E., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Monroig, O., Andrade, J.P., Sykes, A.V., Rodríguez, C. 2014. *In vivo* metabolism of unsaturated fatty acids in *Octopus vulgaris* hatchlings determined by incubation with ¹⁴C labelled fatty acids added directly to seawater as protein complexes. *Aquaculture*. 431: 28-33.

- Reis, D.B., García-Herrero, I., Riera, R., Felipe, B.C., Rodríguez, C., Sykes, A.V., Martín, M.V., Andrade, J.P. and Almansa, E. 2015. An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquaculture Nutrition*. 21: 797–806.
- Reis, D.B., Rodríguez, C., Acosta, N.G., Almansa, E., Tocher, D.R., Andrade, J.P., Sykes, A.V. 2016. *In vivo* metabolism of unsaturated fatty acids in *Sepia officinalis* hatchlings. *Aquaculture*. 450: 67-73.
- Rodríguez, C., 1994. Estudios de los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la dorada (*Sparus aurata*, L.) durante las dos primeras semanas de alimentación. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de la Laguna, España. pp 284.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Lorenzo, A., Izquierdo, M.S. and Cejas, J.R. 1994a. n-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream *Sparus aurata* when using high levels of eicosapentaenoic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 107: 693-698.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Izquierdo, M.S., Cejas, J.R., Bolaños, A., Lorenzo, A. 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture*. 147: 93-105.
- Rodríguez, C., Henderson, R.J., Porter, A.E.A., Dick, J.R. 1997. Modification of oddchain length unsaturated fatty acids by hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Lipids*. 32 (6): 611-619.
- Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Badía, P., Samper, M., Lorenzo, A. 1998a. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*. 18: 177–187.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A. 1998b. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture*. 169: 9-23.
- Rueda-González, F.M. 2011. Breve historia de una gran desconocida: la acuicultura. *Eubacteria*. 26: 1-2.
- Rueda-Jasso, R.A., Conceicao, L.E.C., De Coen, W., Rees, J.F., Sorgeloos, P. 2005. Diet and weaning age affect the growth and condition of Dover sole (*Solea solea* L.). *Ciencias Marinas*. 31: 477-489.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M., Fernandez-Palacios, H. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 124 (1-4): 275-282.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1989. The lipid in: Halver, J. (Ed), *Fish Nutrition*, second ed. Academic Press, London pp. 153-217.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. & Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of unsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155: 117–127.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., et al. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179: 217–229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, Third Edition. Academic Press, New York, pp. 181-257.
- Schmidt, E. B., Rasmussen, L. H., Rasmussen, J. G., Joensen, A. M., Madsen, M. B., Christensen, J. H., 2006. Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: A minireview with focus on clinical trial data. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 75: 191–195.
- Teshima, S.-I., Kanazawa, A., Horinouchi, K., Yamasaki S. & Hirata, H. 1987. Phospholipids of the rotifer, prawn, and larval fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 53: 609–615.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J., Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*. 280: 21-34.

Van Der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K., Fyhn, H.J. 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*. 274: 375–397.

Wang, C., Harris, W. S., Chung, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B., Jordan, H. S., Lau, J. 2006a. n₃ Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84: 5–17.

Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*. 34: 115–143.

Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24: 152-161.

Wenk, M. R. 2005. The emerging field of Lipidomics. *Nature reviews, Drug Discovery*. 4: 594-610.

Young, G.G., Conquer, J. 2005. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reproduction Nutrition Development*. 45: 1–28.

Zheng, F., Takeuchi, T., Yoseda, K., Kobayashi, M., Hirokawa, J., Watanabe, T. 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia nauplii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 62: 669-676.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría iniciar este trabajo de fin de grado con unas palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado a que sea posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores académicos la Dra. Covadonga Rodríguez y el Dr. Roberto Dorta por todas las horas de ayuda empleadas y por estar disponibles en todo momento.

Agradecer a los compañeros de la U.D. Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Facultad de Ciencias de la ULL, por integrarme y tratarme como uno más durante la realización de la parte experimental y práctica de mi trabajo, en especial quiero mencionar a Guadalupe Acosta y Diana Reis por ser uno de los pilares básicos de dicha tarea.

Por último, agradecer a mi familia y amigos por su gran apoyo incondicional, y por confiar en que sería capaz de superar todo aquello que me propusiera.