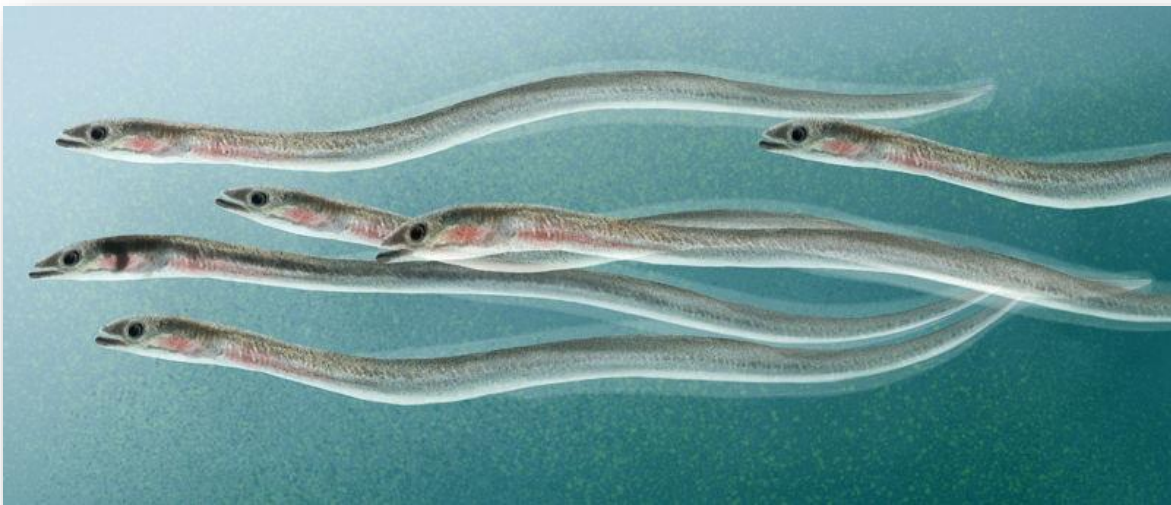


**Composición lipídica y metabolismo de ácidos grasos de  
larvas de anguila europea (*Anguilla anguilla*).**

**Un paso más en su recuperación.**

Lipid composition and fatty acid metabolism of European eel  
(*Anguilla anguilla*) larvae.

A further step in its recuperation.



**Trabajo Fin de Grado**

Lía Gómez Caballero

Tutorizado por Dra. Covadonga Rodríguez González y Dra. Diana B.  
Reis

Grado en Biología. Julio 2018

# Índice

<b>Introducción</b> .....	5
Importancia de la acuicultura .....	5
Interés económico y ecológico de la anguila.....	6
Biología y reproducción .....	7
Ontogenia de las primeras etapas de desarrollo.....	9
Importancia de los lípidos en el desarrollo larvario .....	10
<b>Objetivo</b> .....	13
<b>Material y métodos</b> .....	14
Incubación <i>in vivo</i> con ácidos grasos marcados radiactivamente [1- <sup>14</sup> C].....	14
Análisis Bioquímicos.....	14
Extracción del lípido total y cuantificación.....	14
Determinación del perfil de clases lipídicas de las muestras control .....	15
Determinación del perfil de ácidos grasos de las muestras control.....	16
Incorporación de ácidos grasos marcados radiactivamente al lípido total .....	17
Esterificación de ácidos grasos marcados radiactivamente en las distintas clases lipídicas.....	18
Transformación de los ácidos grasos marcados radiactivamente en función de su actividad elongasa y desaturasa.....	18
Análisis estadístico .....	19
<b>Resultados</b> .....	20
<b>Discusión</b> .....	24
<b>Conclusiones</b> .....	28
<b>Agradecimientos</b> .....	30
<b>Bibliografía</b> .....	31

**SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**Curso Académico: 2017/2018**

**Datos Personales**

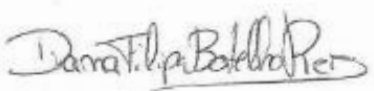
Nº DNI o pasaporte: 45866680B | Nombre y Apellidos: Lía Gómez Caballero

**SOLICITA** la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

Composición lipídica y metabolismo de ácidos grasos de larvas de anguila europea (Anguilla anguilla). Un paso más en su recuperación.

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

<b>D./Dña. Covadonga Rodríguez González</b>	
<b>Profesor/a del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología</b>	
<b>y D./Dña. Diana Reis</b>	
<b>Co-tutora del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología</b>	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
	
Fdo.: Covadonga Rodríguez González	Fdo.: Diana Reis

La Laguna, a 2 de Julio de 2018

**Firma del interesado/a**



## Resumen

La anguila europea (*Anguilla anguilla*), se encuentra fuera de sus límites biológicos de seguridad. Es una especie que realiza una migración catádroma y de la que se tiene muy poca información biológica. Se están llevando a cabo importantes proyectos en el ámbito de la acuicultura, para cerrar su ciclo en cautividad con fines de repoblación y para minimizar la actividad extractiva en su medio natural. Con el fin de aportar información útil sobre la fisiología nutricional de esta especie, se realizó un estudio del metabolismo lipídico de larvas de anguila de 12 días de edad, cuando comienza su alimentación exógena. Aun tratándose de una especie predominantemente dulceacuícola, en su fase larvaria presenta un perfil y metabolismo de clases lipídicas y ácidos grasos, propia de organismos estrictamente marinos y carnívoros, con valores elevados de fosfolípidos (FC y FE) y de  $\omega$ -3 (EPA y DHA) y capacidades nulas para elongar y desaturar los precursores de 18C para producir LC-PUFA. Los elevados niveles de ARA, y su esterificación selectiva en la FC y no en el FI, son muy novedosos para un vertebrado, y parecen señalar al ARA como un ácido graso relevante en las adaptaciones ambientales de la especie durante las migraciones propias de su ciclo vital.

*Palabras clave:* anguila europea, larvas, clases lipídicas, LC-PUFA, metabolismo.

## Abstract

The European eel (*Anguilla anguilla*) is outside of the biological safety limits. It is a species that performs a catadromous migration and from which very little biological information it is available. Important aquaculture projects are being carried out to close its cycle in captivity for restocking purposes and to minimize the extractive activity impact in its natural environment. In order to provide useful information on the nutritional physiology of this species, an analysis of the lipid metabolism of eel larvae of 12 days, when their exogenous feeding began was performed. Even in the case of a predominantly freshwater species, in its larval phase it presents a profile and metabolism of lipid classes and fatty acids typical of strictly marine and carnivorous organisms, with high values of phospholipids (PC and PE) and of  $\omega$ -3 (EPA and DHA) and null capacities to elongate and desaturate 18C precursors to produce LC-PUFA. The high levels of ARA, and its selective esterification in the PC and not in the PI, are very novel for a vertebrate, and seem to indicate that ARA is a relevant fatty acid in the environmental adaptations of the species during the migrations of its vital cycle.

*Keys words:* European eel, larvae, lipid classes, LC-PUFA, metabolism.

## **Introducción**

### **Importancia de la acuicultura**

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 2015 la población mundial era de 7.300 millones y se prevé un aumento hasta alcanzar los 9.700 millones en 2050. Debido a este crecimiento exponencial de la población existe hoy en día la necesidad de suplir la demanda mundial de proteína de origen animal, lo que obliga a optimizar las técnicas para la producción de alimento. De la misma manera que en el pasado la ganadería sustituyó a la caza, la acuicultura surge como la evolución natural de la pesca extensiva. La acuicultura la define la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como un conjunto de actividades enfocadas en el cultivo de organismos acuáticos (animales y vegetales) tanto en zonas costeras como del interior, que implica la intervención humana en el proceso de cría para aumentar su producción (FAO, 2016). A favor de la producción acuícola encontramos que el 70 % de la superficie del planeta es agua, que las tasas de reproducción de los animales acuáticos son varios órdenes de magnitud superiores a las de los vertebrados terrestres, y que los animales acuáticos son más eficientes convertidores de su alimento, al no consumir energía para mantener su temperatura corporal (APROMAR, 2017).

La acuicultura es considerada como unas de las actividades económicas de mayor desarrollo y que más ha crecido. En 2014 la producción de acuicultura para consumo humano superó por primera vez a las capturas de la pesca salvaje con cerca de 100 millones de toneladas producidas (FAO, 2016). La Unión Europea es la mayor potencia en el mercado mundial para los productos acuáticos. En 2015 la producción acuícola fue de 1,3 millones de toneladas alcanzando un valor de 3.584 millones de euros de ganancia. Encabezando la lista de especies más producidas encontramos el mejillón (492.572 t), el salmón atlántico (185.995 t) y la trucha arco iris (185.889 t) (APROMAR, 2017). En este mismo año, España fue el estado miembro con una mayor cosecha de acuicultura (289.821 t), seguido por el Reino Unido (206.834 t) y Francia (206.800 t). Esta producción alcanzó un valor en su primera venta de 407,2 millones de euros siendo el mejillón la principal especie producida (225.307 t), seguida por la lubina (21.324 t), la dorada (16.231 t) y la trucha arco iris (16.179 t) (APROMAR, 2017).

Entre las principales ventajas que presenta la explotación acuícola de la mayoría de las especies, destacan:

- La protección de la biodiversidad marina al ofrecer otra alternativa a la actividad extractiva.
- El control exhaustivo de la especie cultivada, ofreciendo materia prima de gran calidad, al poder garantizar las propiedades del producto que se comercializa y la selección de ejemplares por tallas.
- El aprovechamiento que nos ofrecen las costas y zonas interiores.
- La producción de alimentos ricos en proteína de origen acuático, y de ácidos grasos omega-3 en los productos de origen marino.

### **Interés económico y ecológico de la anguila**

Las poblaciones de anguila europea (*Anguilla anguilla*) se han reducido de manera alarmante en los últimos años. Según los últimos dictámenes científicos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM), la población se encuentra fuera de los límites biológicos de seguridad, sufriendo un intenso declive desde finales de los años 70. Este declive es atribuido principalmente a la contaminación del agua continental y de la plataforma mediterránea, el exceso de capturas de angulas (alevines de las anguilas) y anguilas con artes de pesca cada vez más perfeccionadas y al cierre de compuertas de los cursos de agua en épocas vitales de migración, rompiendo eslabones fundamentales del ciclo biológico de este pez (Franquet y Pàmies, 2007). El CIEM recomendó la elaboración de un plan de recuperación para toda la población de *A. anguilla* con carácter urgente y que la explotación y demás actividades humanas que inciden en la pesca o en las poblaciones se redujeran lo máximo posible.

Hasta los años 70s, en Italia, el oeste de Alemania y Dinamarca el cultivo extensivo de anguila europea se hacía en estanques. Sin embargo, debido al corto período de verano (ej. Dinamarca) fue imposible lograr una producción económicamente rentable. Así, a finales de esa década, se desarrollaron sistemas de cultivo de anguila a su temperatura óptima de desarrollo (24-26 °C). Con el desarrollo de estos sistemas, el cultivo extensivo de anguila europea bajo condiciones naturales ha disminuido a un nivel sin importancia comercial. Los sistemas de producción intensivos usan tecnologías de recirculación, manteniendo las temperaturas del agua estables (alrededor de 24 °C), hasta que se alcanza el peso comercial de la anguila (125-150 g) (FAO, 2016). Sin embargo, esta producción se basa en la captura de angulas salvajes en las costas de Francia, Portugal, España y Reino Unido, lo que resulta insostenible.

Los principales países productores de anguila europea son los Países Bajos, Italia y Dinamarca. Sin embargo, España, Grecia, Suecia y Alemania son también centros de actividad de cultivo de anguilas (FAO, 2016). En España la producción está bastante estabilizada en torno a las 300 t anuales, destinándose mayoritariamente a su comercialización a nivel local. En 2006 había en España 19 instalaciones destinadas al engorde de anguila europea: 4 instalaciones de acuicultura continental (2 en Valencia, 1 en Córdoba y 1 en Guipúzcoa) y 15 instalaciones en la Comunidad Andaluza, principalmente en Cádiz, donde utilizan aguas salobres (JACUMAR, 2017), actualmente el número de instalaciones es reducido y se han ido implantando allí donde hay más tradición culinaria: Cataluña y la Comunidad Valenciana, pero también Asturias y el País Vasco.

Además de su interés económico, alcanzando precios de mercado de 35 a 45 €/Kg, el cultivo de esta especie es a su vez de gran interés ecológico. Su repoblación produciría una mejora en el incremento de la diversidad de una población de peces en la cual originariamente la anguila ocupaba un espacio concreto y participaba de una forma activa en su equilibrio; generando una presión depredadora sobre especies invasoras. Una de las soluciones a este problema sería la obtención de angulas en piscifactorías, al igual que se obtienen alevines de otras especies de interés en acuicultura. No obstante, su crianza supone un reto, ya que no se ha cerrado el ciclo de vida de la anguila en cautividad.

### **Biología y reproducción**

Las anguilas son peces teleósteos pertenecientes al orden de los Anguilliformes. Las más estudiadas son la *Anguilla japonica* (anguila japonesa), la *Anguilla rostrata* (anguila americana) y la *A. anguilla* (anguila europea). No obstante, existen 19 especies distintas de anguila. Se les conoce por su cuerpo alargado, serpentiforme, de sección redonda en la parte anterior, con una larga aleta impar resultante de la fusión de las aletas dorsales, caudal y anal, y sin aletas pelvianas pares. Presentan escamas muy pequeñas sobre una piel rica en glándulas mucosas, que segregan una mucosidad blanquecina la cual les confiere una piel viscosa. Los ojos pequeños y redondos se hipertrofian al madurar sexualmente. Poseen una mandíbula inferior ligeramente más alargada que la superior, y una línea lateral muy visible. (Fig. 1). Están dotadas de un gran olfato, la anguila es un pez carnívoro que busca sus alimentos en el fondo del mar o de los ríos.



Fig. 1. Morfología de la *A. anguilla* (Guía del pescado, WWF. 2016)

Su dieta es muy amplia, constituida por todo aquel animal invertebrado que pueda capturar, sean estos insectos, gusanos, crustáceos, moluscos y en ocasiones, hasta peces pequeños.

Su coloración es variable (amarillenta, pardusca, verdosa, negruzca o plateada), según la edad y el medio de vida. Los machos miden entre 20 y 40 cm mientras que las hembras superan los 50 cm hasta un máximo de 1,50 metros. Se trata de una especie en la que todos los individuos nacen hembras (protoginia) (Franquet y Pàmies, 2007)

La anguila es una especie catadrómica, cuya reproducción tiene lugar en el mar de los Sargazos a grandes profundidades. Tras la eclosión emergen unas larvas leptocéfalas de hábitos pelágicos, que con la ayuda de las corrientes llegarán hasta las costas europeas y norteafricanas (Figura 2.). La corriente del Golfo juega un papel decisivo en estas migraciones pasivas. Recorren entre 5.000 y 10.000 km, dependiendo de su procedencia, durante 1 a 3 años, con una velocidad de entre 3 a 47 km/día (Righton et al., 2016).

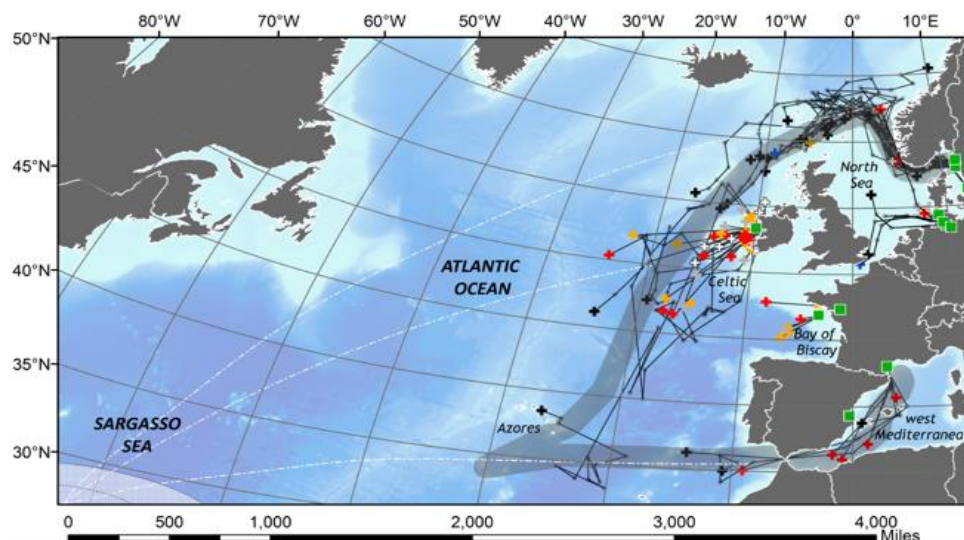


Fig. 2. Trayecto de las anguilas europeas hacia el Mar de Sargazos. (Righton et al., 2016)



La larva leptocéfala sufre una transformación a angula (juvenil) en las proximidades de las costas, con una fase intermedia de metamorfosis de anguila de cristal (alevín), adquiriendo gradualmente pigmentación en los estuarios. Completan su fase de crecimiento a anguila amarilla (adulto) durante su ascenso en los ríos (Tesh, 2003). Su permanencia en el río finaliza con la fase de planteamiento que corresponde al inicio de la maduración sexual. Esta maduración continúa a grandes profundidades marinas durante su viaje de regreso al mar de los Sargazos y las islas Bermudas, entre los 20 y 30° de latitud, donde se reproducen. No se han encontrado anguilas desovadoras, por lo que los sitios de desove se han identificado por la distribución de las larvas recién eclosionadas entre marzo y abril (Mapama, 2015).

### **Ontogenia de las primeras etapas de desarrollo**

El huevo de la anguila europea comparte características con los animales marinos pelágicos, por su corto periodo embrionario y por su gota lipídica y largo espacio vitelino a diferencia de otros teleósteos (Sørensen et al., 2016). Pasadas 3 horas desde su fertilización, el diámetro de los huevos es de entre 0,12-1,45 mm. El desarrollo embrionario a 20°C dura aproximadamente entre 45-48 horas hasta la eclosión. Desde la eclosión hasta sus dos primeros días, la anguila europea pasa por varios estadios de desarrollo. Durante las primeras 12 horas, la longitud de la larva aumenta y la cabeza empieza a sobresalir del saco vitelino. Adicionalmente las vesículas óticas que sostienen los otolitos se definen más claramente. A los dos días las larvas desarrollan una amplia aleta primordial con una cola bien definida, redondeada y pigmentada. La cabeza presenta capsulas ópticas en desarrollo y un pericarpio visible, mientras que la mandíbula sigue sin desarrollarse (Figura 3; Sørensen et al., 2016).



Fig.3. Desarrollo de larvas de anguila europea hasta la etapa pre-leptocefálica (Sørensen et al., 2016)

A los 3 días de vida el corazón y cerebro son claramente visibles. Pasados los 5 días la boca comienza a desarrollarse y los ojos se pigmentan. Con 7 días, la mandíbula superior e inferior son distinguibles y a los 9 días el ángulo de la cabeza cambia, con la boca apuntando hacia adelante. Hasta los 12 días de desarrollo la larva se alimenta pasivamente de su saco vitelino. Sin embargo, a los 12 días la apertura bucal ya se ha desarrollado y la larva ya es capaz de alimentarse. Así que, a partir de esta edad, se encuentra la fase crucial para su correcto desarrollo, ya que desde este momento la larva necesita alimentarse para sobrevivir. No obstante, su dieta natural durante esta fase de desarrollo aún no ha sido identificada. Con 17 días se desarrollan los dientes en forma de aguja y se alcanza la pigmentación total de los ojos (Sørensen et al., 2016).

### **Importancia de los lípidos en el desarrollo larvario**

Los lípidos juegan un papel muy importante como componentes estructurales de las membranas celulares, como constituyentes de las reservas energéticas, reguladores de la expresión génica y precursores de hormonas esteroideas, de eicosanoides y otros mediadores lipídicos (Tocher 2003, 2015). Dentro de los lípidos encontramos los ácidos grasos. Un ácido graso es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Aquellos ácidos grasos con dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y a aquellos PUFA que presentan 20 o más átomos de carbono se los denomina ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), considerados más biológicamente activos (Bell y Tocher, 2009) y fisiológicamente esenciales. Dentro de los LC-PUFA encontramos dos grupos principales: los ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3) y omega-6 ( $\omega$ -6). Los de la serie  $\omega$ -3 presentan el primer doble enlace en el tercer átomo de carbono contando desde el metilo terminal y de la serie  $\omega$ -6 cuando se encuentre en el sexto átomo de carbono. Los LC-PUFA de la serie  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 destacan por ser componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos (tipo de lípido anfipático presente en todas las membranas plasmáticas que presenten bicapa lipídica y particularmente abundante en los huevos de peces) y son sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos. Además, son importantes en las últimas etapas de desarrollo embrionario antes de la eclosión. Los fosfolípidos de huevos de peces marinos son particularmente ricos en fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE), y estos a su vez son ricos en DHA y EPA, presentando también los huevos cantidades

significativas de ARA. Se ha demostrado que los fosfolípidos de la dieta mejoran globalmente el desarrollo de larvas de peces de un gran número de especies, tanto marinas como de agua dulce, confirmando un requisito dietético esencial para estos lípidos que dependerá de la especie, la fuente y las clases de fosfolípidos, y los criterios utilizados para evaluar este efecto: crecimiento, supervivencia, resistencia al estrés, malformaciones en las larvas (Cahu et al., 2009).

El primer exponente de los ácidos grasos  $\omega$ -3, en la ruta de síntesis de los  $\omega$ -3 LC-PUFA es el ácido linolénico (18:3n-3; LNA) el cual vía desaturasas y elongasas se puede transformar en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y posteriormente en ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA) (Fig. 4).

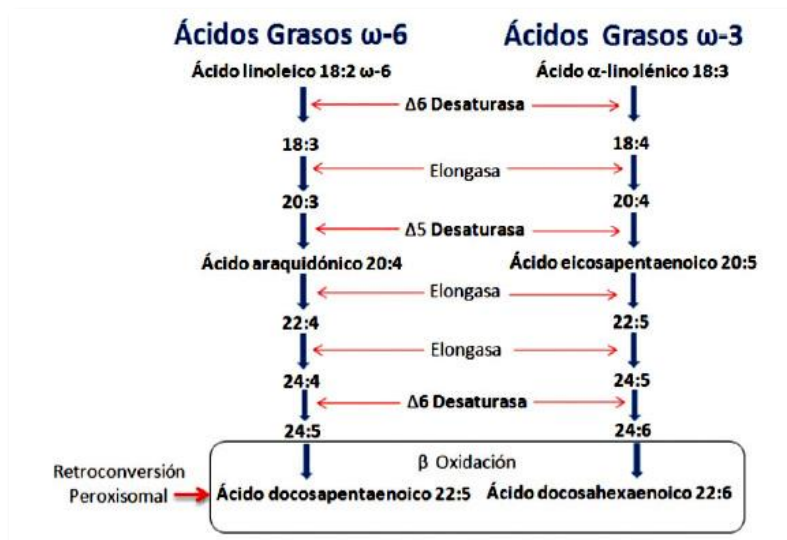


Fig. 4. Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3. Vías de desaturación y elongación de LA y LNA

El primero de los ácidos grasos  $\omega$ -6 es el ácido linoleico (18:2n-6; LA) y uno de sus derivados más importantes es el ácido araquidónico (20:4n-6; ARA) (Bell y Tocher, 2009).

El EPA y el DHA son esenciales para mantener la integridad de la membrana celular en los peces (Sargent et al., 1999), jugando un papel muy importante ante los cambios de temperatura. La capacidad de modificación de las longitudes de cadena y del número de insaturaciones de los mismos les permite modificar la fluidez y otras propiedades fisiológicas de la membrana, hecho esencial para adaptarse a los cambios de salinidad, temperatura y presión en el ambiente en el que habitan (Rodríguez et al., 2012). El DHA, además, tiene un

papel fundamental en el sistema nervioso central, participando activamente en la formación del cerebro y los ojos que constituyen una parte importante en el volumen del embrión y el cuerpo de la larva y su capacidad visual y de depredación. El ARA a su vez, es el principal ácido graso de la serie  $\omega$ -6 presente en el cerebro, eminentemente esterificado en el fosfatidilinositol (FI) de diversos tejidos de los vertebrados, estimulador de la esteroidogénesis ovárica y testicular, involucrado en la osmorregulación, el desarrollo embrionario del sistema inmunitario, las eclosión y rendimiento larval temprano (Mustafa y Srivastava, 1989; Wade y Van Der Kraak, 1993; Sorbera et al., 1998). Por otro lado, actúan como precursores de eicosanoides como las prostaglandinas, tromboxanos y otros mediadores lipídicos de más reciente descubrimiento (resolvinas, protectinas y maresinas) mediante las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Riediger et al., 2009). Los eicosanoides son compuestos de 20 átomos de carbono formados a partir de los PUFA y que presentan una gran variedad de funciones fisiológicas. Tanto ARA como EPA son importantes precursores de estos compuestos, aunque los derivados del ARA son biológicamente más activos, produciendo principalmente compuestos proinflamatorios y proagregantes, mientras que los del EPA producen más compuestos antiinflamatorios (Sargent et al., 1999; Lee et al., 2016). Ambos ácidos grasos compiten por las mismas enzimas en la síntesis de eicosanoides (Riediger et al., 2009), por lo que el EPA va a ser un importante modulador en la formación de estos compuestos (Sargent et al., 1999; Tocher 2015).

Los ácidos grasos en los peces pueden surgir de dos fuentes: la síntesis *de novo* de las fuentes de carbono no lipídicas dentro del animal, o directamente de los lípidos ingeridos de la dieta. La actividad de la primera vía depende del complejo enzimático activo en la especie. La mayoría de los peces carnívoros de origen marino analizados hasta la fecha no son capaces de sintetizar ARA, EPA y DHA a partir de sus precursores como son LNA y LN, por lo que es necesario su incorporación por medio de la dieta. Este suceso solía achacarse a su propia dieta, el fitoplacton, y a su vez, el zooplancton, ingerido directa o indirectamente, que contienen altos niveles de estos ácidos grasos esenciales (AGEs) para los peces marinos. Es por esto que su actividad enzimática (desaturasas  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6) se habría visto inactivada ante la inutilización a lo largo de la evolución (Sargent et al., 2002), jugando también la salinidad un cierto efecto inactivador de esta ruta de síntesis de LC-PUFA. Por otro lado, los peces dulceacuícolas carecen de las enzimas necesarias para completar la síntesis *de novo* de los ácidos grasos poliinsaturados precursores que, por tanto, deben obtenerse preformados a partir de la dieta. La mayoría de las especies de peces de agua dulce podrían, por lo tanto, desaturar y elongar

LN y LNA a sus homólogos C20 y C22. Recientemente se ha descubierto que esta teoría no se cumple de manera tan generalista y que, de hecho, en un momento de su evolución los teleósteos perdieron el pool de desaturasas FADs-1, donde se encontraba la  $\Delta 5$ , lo que dificulta la obtención de LC-PUFA a partir de sus precursores de 18C en la mayoría de las especies. Si bien ciertos estudios muy recientes indican que algunas especies han encontrado a lo largo de su evolución ciertas alternativas (neofuncionalización, duplicación de genes...) que les permite cierto grado de conversión de estos ácidos grasos precursores, parece tratarse de un número limitado de especies (Tocher 2015). No obstante, los estudios filogenéticos postulan que la anguila, al ser una especie evolutivamente más antigua, podría no haber sufrido esta pérdida de genes quedándose atrás en la diferenciación de teleósteos en función de las FADs-1 ( $\Delta 5$ ) y FADs-2 ( $\Delta 6$ ), y que por su condición catadrómica, con una importante fase de vida en un medio dulceacuícola, podría haber favorecido la no inactivación total de las desaturasas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  (Castro et al., 2012).

Con el fin último de contribuir a la recuperación de la *A. anguilla* en su medio natural, el presente estudio pretende dilucidar algunos aspectos importantes de la fisiología de la nutrición lipídica de las larvas, incluyendo su capacidad de biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores y su requerimiento de AGE.

## Objetivo

El principal objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil lipídico de las larvas de *A. anguilla* a los 12 días de vida (momento en que empieza su alimentación exógena) y determinar su capacidad *in vivo* para asimilar, esterificar y transformar por elongación y desaturación diversos ácidos grasos insaturados, marcados radiactivamente con carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ), determinando así aspectos básicos de sus requerimientos lipídicos.

## Material y métodos

### **Incubación *in vivo* con ácidos grasos marcados radiactivamente [1- $^{14}\text{C}$ ]**

El experimento se llevó a cabo con trescientas larvas de 12 días de edad de *A. anguilla*, procedentes de dos hembras adultas mantenidas en las instalaciones de The North Sea Research Center de la Technical University of Denmark, que fueron incubadas en placas de cultivo con 10 ml de agua de mar. Las incubaciones se realizaron durante 4 horas a una densidad de 5 larvas por ml (50 larvas por pocillo) por triplicado ( $n=3$ ), con agitación suave y con 0.2  $\mu\text{Ci}$  (0.3  $\mu\text{M}$ ) de LNA, LA, EPA o ARA marcados radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ . Los sustratos radiactivos se añadieron individualmente a cada pocillo, siendo añadidos directamente al medio de incubación. Para determinar las clases lipídicas y el perfil de ácidos grasos de las larvas de anguila, se realizó un tratamiento control en el cual la misma cantidad de larvas fue incubada bajo las mismas condiciones de los demás tratamientos, pero sin la adición de ningún ácido graso marcado ( $n=3$ ). Después del periodo de incubación se filtraron las larvas de cada pocillo con una malla de 100 micras y se lavaron a fondo con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato radioactivo. La muestra de larvas se transfirió posteriormente a un Eppendorf marcado y se guardó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta los análisis correspondientes.

### **Análisis Bioquímicos**

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

### **Extracción del lípido total y cuantificación**

Los lípidos totales (LT) fueron extraídos según Christie (2003), como modificación del método descrito por Folch et al. (1957). Todos los procesos en los que se tenía la muestra en el laboratorio iban acompañados de una bandeja de hielo picado para evitar la actividad de las lipasas. Las muestras de larva de anguila de 12 días fueron homogeneizadas con KCl al 0.88% (w/v) por medio de un rotter (Virtishear homogenizer mixer, Virtis Company, Nueva York, USA). Se guardó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de este homogeneizado en Eppendorfs debidamente identificados para posterior determinación del contenido proteico de las muestras. La extracción de los lípidos fue hecha usando cloroformo/metanol (CL:MET; 2:1, v/v) como

solvente orgánico. Para conseguir una separación entre la fase acuosa, donde se encuentran restos de proteínas y demás sustancias hidrosolubles y la fase orgánica (de CL:MET) donde se encuentran los lípidos, se llevó a cabo una centrifugación de 5 min a 1500 r.p.m. Posteriormente, se extrajo la fase inferior (de CL:MET), que se filtró y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. El extracto lipídico fue transferido a viales de 1,5 ml previamente pesados, que se mantuvieron en el desecador en oscuridad y bajo vacío durante toda la noche. Al día siguiente se redisolieron los lípidos con CL:MET (2:1, v/v) con 0.01 % de butilhidroxitolueno (BHT) y atmosfera de nitrógeno como factores antioxidantes, a una concentración de 10 mg/ml, y se guardaron en el congelador a -20 °C.

En nuestro experimento debido a la pequeña cantidad de muestra no fue posible determinar el peso seco de la misma, por lo que no se pudo determinar el valor de lípido total en peso seco (% p.s.). Así los datos de lípido total se expresaron en relación al contenido proteico de las muestras (mg de lípido por mg de proteína – mg lípido/mg proteína).

### **Determinación del perfil de clases lipídicas de las muestras control**

Las clases lipídicas (CL) se analizaron a partir del extracto de LT, mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (*High-performance thin-layer chromatography*; HPTLC) y en doble desarrollo (Olsen y Henderson, 1989). Se usaron placas de HPTLC de sílica gel 60, de 10 x 10 cm x 0,15 mm de grosor de sílice (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Antes de su utilización, dichas placas fueron lavadas con dietil-éter y activadas en la estufa durante 30 min a 110°C para eliminación de las impurezas. Se aplicaron alícuotas de 2 µl (20 µg) del extracto de lípido total de las muestras control, en bandas de 2 mm. Además, se añadió a un lado de la placa 2 µl de LT de un estándar externo de composición conocida (huevo de bacalao). Para separar los lípidos polares se desarrolló la placa hasta la zona media de la placa usando una disolución de isopropanol/cloroforno/metilacetato/metanol/KCL 0,25% (5:5:5:2:1,8 v/v). Los lípidos neutros se separaron desarrollando la placa hasta un centímetro por debajo del margen superior en una solución de hexano/éter/ácido acético (20:5:0,5 v/v). Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico y ortofosfórico en metanol y se quemaron en una estufa a 160°C durante 10-15 minutos. Las placas se escanearon en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttentz, Suiza) mediante el software winCATS versión 1.4.4 para determinar las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría. Su procesamiento y cuantificación se realizó mediante el software

VideoScan versión 1.02, de forma que se obtuvo la proporción de cada clase lipídica de la muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de área relativa.

### **Determinación del perfil de ácidos grasos de las muestras control**

Se realizó la transmetilación de 1 mg del extracto lipídico de las muestras control, es decir, rotura de los esqueletos hidrocarbonados para obtener ácidos grasos libres y permitir la unión de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al ácido graso, lo que los convierte en ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés Fatty acid methyl esters; FAME) y les confiere la propiedad de ser volátiles y por tanto detectables y separables por cromatografía de gases (Christie, 2003). Antes de la transmetilación se añadió una cantidad exacta y conocida del ácido graso nonadecanoico (19:0) como estándar interno. Para realizar el proceso de transmetilación por catálisis ácida se añadió al extracto de LT y estándar interno previamente secos bajo atmósfera de nitrógeno, 1 ml de tolueno y 2 ml de sulfúrico al 1% en metanol, dejándolo reaccionar en una manta calefactora a 50°C y en oscuridad durante 16 horas. La purificación de los FAME obtenidos se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (*Thin-layer Chromatography*, TLC) mediante desarrollo simple, usando placas de TLC de 20 x 20 cm x 0,25 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Las placas se desarrollaron usando una mezcla de hexano/éter/ácido acético (90:10:1, v/v/v). Los FAME purificados fueron extraídos de la sílice con hexano/éter (1:1, v/v). Se evapora totalmente el solvente bajo flujo de nitrógeno y finalmente, se redisuelve la muestra con hexano de altísima pureza (pureza HPLC) y se almacenan en viales de cristal en atmósfera de nitrógeno hasta el análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases. La cromatografía de gases analiza cualitativa y cuantitativamente los FAME, utilizando helio como gas portador, con un gradiente térmico de 50 - 230°C y un detector de ionización de llama. El cromatógrafo utilizado se trata del modelo 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, Supelcowax<sup>TM</sup> 10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). 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. Así pues, en el experimento se llevó a cabo una cromatografía gas-líquido, en la cual la fase estacionaria fue un líquido.



Los resultados obtenidos en función de los tiempos de retención fueron comparados 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 por 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 al lípido total**

Para determinar la radioactividad total incorporada al LT de las larvas de anguila (n=3), una alícuota de 100 µg del extracto de LT de los diferentes tratamientos radioactivos se introdujeron en viales de centelleo. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido para radiación-β (TRI-CARB 4810TR, Perkin Elmer, Singapur) (Fig. 5). Los resultados obtenidos en DPM (desintegraciones por minuto) se transformaron a pmol/mg proteína/hora (pmol/mg pp/h) teniendo en cuenta la actividad específica de cada ácido graso y relacionándolo con el contenido de LT y con la cantidad de proteína de cada muestra.



Fig. 5. Contador de centelleo beta TRICARB 4810 TR

El contenido proteico se cuantificó usando el método descrito por Lowry et al., (1951). Se incubaron las alícuotas de las muestras en una solución digestora 1M NaOH + 0,25% SDS, digerida a 60°C durante 1 hora. Se añadió un reactivo que contiene cobre, y posteriormente se hace reaccionar la muestra con el reactivo de Folin, que es reducido por la tirosina y triptófano. Se produce un complejo entre el cobre y los nitrógenos de los enlaces peptídicos que va a producir un compuesto coloreado medible por espectrofotometría (Thermo Scientific

Appliskan, Vantaa, Finlandia) mediante el software Appliskan 2.3. Según la ley de Lambert-Beer, la intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas.

### **Esterificación de ácidos grasos marcados radiactivamente en las distintas clases**

#### **lipídicas.**

Para determinar la esterificación de los diferentes sustratos radioactivos a las distintas CL las muestras radiactivas, se desarrollaron utilizando el mismo procedimiento que con las muestras control. No obstante, una vez desarrolladas, las placas fueron teñidas con una solución de yodo (1% yodo/cloroformo). De esta manera se visualizan, identifican y marcan las bandas del estándar de huevo de bacalao no radiactivas con puntos de tinta radiactiva (ácido oleico marcado mezclado con tinta china), para facilitar la posterior localización, marcado y procesamiento de las bandas radiactivas, que quedan entre ambos estándares y que no son visibles a simple vista en la HPTLC.



Fig. 6. Exposure Cassette-K

Seguidamente, dichas placas se introdujeron durante una semana en un cassette (Exposure Cassette-K, BioRad, Madrid, España). (Fig. 6.) en contacto con una pantalla de fósforo (Image Screen-K, Biorad, Madrid, España) la cual es sensible a la radioactividad y ofrecerá una correcta impresión de los datos. Transcurrido este periodo las placas fueron escaneadas con el sistema de adquisición de imágenes MOLECULAR IMAGER FX (BioRad, Madrid, España) y las bandas se cuantificaron en porcentaje con el Quantity One image analysis software (BioRad, Madrid, España).

### **Transformación de los ácidos grasos marcados radiactivamente en función de su actividad elongasa y desaturasa**

Para determinar la capacidad de las larvas de anguila para elongar/desaturar ácidos grasos, se transmetilaron 1,2 mg de extracto de LT de los tratamientos radiactivos (n=3) según el procedimiento descrito previamente. Sin embargo, para separar los AG según su longitud de cadena y grado de insaturación, las placas de TLC fueron previamente impregnadas con una solución de nitrato de plata disuelto en acetonitrilo (2:20, w/v) y activadas durante 30 minutos

a 110°C en la estufa (Wilson y Sargent, 1992). Se añadió en el lateral derecho de cada placa un estándar externo de referencia que corresponde a una mezcla de diversos ácidos grasos radiactivamente marcados y se cargaron las placas con el extracto lipídico de las muestras transmetiladas. Las placas se desarrollaron en tolueno/acetonitrilo (95:5, v/v).

### **Análisis estadístico**

Los datos han sido expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los datos expresados en porcentaje fueron previamente transformados utilizando la fórmula del arcoseno de la raíz del valor entre cien. En todos los test el nivel de significación fue de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Se aplicó un Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA de 1 vía) para comprobar el efecto del sustrato ( $[1-^{14}\text{C}]$ LNA,  $[1-^{14}\text{C}]$ LA,  $[1-^{14}\text{C}]$ EPA o  $[1-^{14}\text{C}]$ ARA) sobre la incorporación de la radiactividad al lípido total, la distribución de los ácidos grasos radiactivos en las distintas clases lipídicas y la transformación de los ácidos grasos radiactivos incubados en las larvas de 12 días de anguila. Se estudió la normalidad de los datos, a través del test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por medio del test de Levene. En los supuestos en donde no se cumplía con la normalidad y/o homogeneidad de las varianzas se aplicaron pruebas robustas de igualdad de medias (Welch y Brown-Forsythe) seguido del test no paramétrico Games-Howell para la comparación múltiple de las medias. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico IBM© SPSS Statistics versión 25.0 (IBM Co., USA).

## Resultados

El contenido de lípido total (LT) de larvas de 12 días de *A. anguilla* fue 0,6 mg lípido/mg proteína (**Tabla 1**). Se verificó una clara diferencia entre el contenido en lípidos polares (LP) ( $30,5 \pm 3,1$  %) y lípidos neutros (LN) ( $69,5 \pm 3,1$  %). Dentro de los lípidos polares, las clases lipídicas más abundantes fueron la FC y la FE. Por otro lado, entre los lípidos neutros, el colesterol (COL) fue la clase lipídica más abundante, seguido de los esteres de esteroles y los triglicéridos (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Contenido de lípido total y composición de clases lipídicas de las larvas de anguilas de 12 días.

<b>Contenido de lípido total</b>	
	0,6 ± 0,1
<i>Clases lipídicas</i>	
Esfingomielinea	0,5 ± 0,1
Fosfatidilcolina	11,7 ± 0,2
Fosfatidilserina	1,9 ± 1,1
Fosfatidilinositol	2,4 ± 0,2
Fosfatidilglicerol	1,2 ± 1,7
Fosfatidiletanolamina	7,4 ± 0,5
No identificado	5,3 ± 0,3
<b>Σ Lípidos polares</b>	<b>30,5 ± 3,1</b>
Colesterol	31,4 ± 0,4
Ácidos grasos libres	3,7 ± 0,9
Triglicéridos	14,9 ± 0,1
Esteres de esteroles	19,4 ± 1,9
<b>Σ Lípidos neutros</b>	<b>69,5 ± 3,1</b>

Los valores se expresan como medias ± desviación estándar (DE); n=3; Datos de lípido total presentados en mg lípido.mg proteína<sup>-1</sup>; Datos de clases lipídicas presentados en porcentaje.

Las larvas de anguila europea presentan un alto contenido en ácidos grasos saturados y en especial de 16:0 (ácido palmítico). La diferencia proporcional entre monoenoos y poliinsaturados es baja, ya que los ácidos grasos monoinsaturados representan el  $16,9 \pm 7,1$  %, y los poliinsaturados el  $16,9 \pm 3,3$  % del total de los ácidos grasos de las larvas de anguila. Entre los monoinsaturados destaca principalmente el 18:1n-7 y entre los LC-PUFA el 22:6n-3 (DHA) y el 20:4n-6 (ARA). El contenido en 18:2n-6 y 18:3n-3 fue de  $2,3 \pm 0,1$  % y  $0,4 \pm 0,0$  %, respectivamente. El EPA (20:5n-3) representa el  $1,5 \pm 0,9$  % del total de ácidos grasos de

las larvas de anguila. Las relaciones de ARA/EPA y DHA/EPA fueron respectivamente  $3,6 \pm 0,1$  y  $4,7 \pm 0,2$  (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos de las larvas de anguila de 12 días.

16:0 DMA	1,2 $\pm$ 0,0
18:0	5,6 $\pm$ 0,4
18:0 DMA	0,4 $\pm$ 0,0
$\Sigma$ saturados	33,2 $\pm$ 1,9
16:1n-7	5,8 $\pm$ 0,3
18:1n-7	5,0 $\pm$ 0,0
18:1n-9	22,8 $\pm$ 1,2
18:1n-7	5,0 $\pm$ 0,0
20:1n-9	0,8 $\pm$ 0,0
$\Sigma$ monoenos	59,7 $\pm$ 2,5
18:2n-6	2,3 $\pm$ 0,1
18:3n-3	0,4 $\pm$ 0,0
20:2n-6	0,4 $\pm$ 0,0
20:3n-6	0,3 $\pm$ 0,0
20:4n-6	7,6 $\pm$ 0,7
20:5n-3	1,5 $\pm$ 0,9
22:4n-6	0,5 $\pm$ 0,6
22:5n-3	1,9 $\pm$ 0,1
22:6n-3	9,9 $\pm$ 1,5
$\Sigma$ PUFA	26,7 $\pm$ 3,1
<i>n-3/n-6</i>	1,1 $\pm$ 0,1
<i>ARA/EPA</i>	3,6 $\pm$ 0,1
<i>DHA/EPA</i>	4,7 $\pm$ 0,2

Los valores se presentan como media  $\pm$  DE (n=3). Los datos se presentan en porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Los sumatorios incluyen componentes minoritarios que no se muestran. PUFA - ácidos grasos poliinsaturados. ARA - 20:4n-6; EPA - 20:5n-3; DHA - 22:6n-3.

De los ácidos grasos ensayados, el EPA es el que más se ha incorporado al lípido total de las larvas con  $39,0 \pm 7,9$  pmol/mg pp/h, y el ARA el menos incorporado con  $11,2 \pm 3,3$  pmol/mg pp/h. Así, apreciamos que se han incorporado en menor medida los  $\omega$ -6 (ARA y 18:2 n-6) que los  $\omega$ -3 (EPA y 18:3 n-3). En cuanto a la longitud de la cadena, independientemente de la posición del doble enlace, no hay diferencias significativas, no obstante, dentro de los ácidos grasos de 18C y 20C, siguen destacando los  $\omega$ -3 frente a los  $\omega$ -6.

Todos los sustratos fueron ampliamente esterificados en las distintas clases lipídicas con valores de AGL para ARA, EPA, LN y LNA de  $6,4 \pm 0,6 \%$ ,  $8,5 \pm 0,6 \%$ ,  $9,6 \pm 0,3 \%$ ,  $16,8 \pm 2,6 \%$ , respectivamente. En relación a la distribución de los sustratos en las distintas clases lipídicas observamos que en general, se observa una mayor esterificación de los ácidos grasos en las clases lipídicas polares frente a las neutras. Todos se esterificaron preferentemente a la fosfatidilcolina (FC). En los lípidos neutros hay una mayor incorporación general a los gliceroles parciales (GP) y seguidamente a los triglicéridos (TG). La fosfatidiletanolamina (FE) es la segunda clase a la que más se han incorporado los ácidos grasos, destacando el ARA  $11,7 \pm 1,0 \%$  y el EPA  $10,7 \pm 1,6 \%$ . El ARA presenta similitudes de incorporación con el EPA excepto en el FI, en donde el ARA presenta mayor incorporación  $5,7 \pm 0,8 \%$ . En la FE hay mayor incorporación del ARA  $11,7 \pm 0,1 \%$ . Finalmente, las mayores diferencias las observamos entre el ARA y el LNA en las clases de AGL, FE, FI, FS, siendo mayores las proporciones de ARA en FE, FI, y FS y mayor la presencia de sustrato no esterificado (AGL) para el caso del LNA.

**Tabla 3.** Incorporación al lípido total y distribución en las clases lipídicas de las larvas de anguila de 12 días, de los sustratos radiactivos incubados

Sustrato	ARA		EPA		LN		LNA	
<b>Incorporación</b>	11,2	± 3,3 <sup>ac</sup>	39,0	± 7,9 <sup>b</sup>	15,0	± 5,0 <sup>c</sup>	31,0	± 0,5 <sup>abc</sup>
<b>Clases lipídicas</b>								
Esteres de esteroles	4,2	± 1,9	1,9	± 1,2	1,7	± 1,0	2,6	± 0,2
Triglicéridos	3,4	± 2,1	1,6	± 0,9	1,4	± 0,9	4,2	± 2,5
Ácidos grasos libres	6,4	± 0,6 <sup>a</sup>	8,5	± 0,6 <sup>ab</sup>	9,6	± 1,3 <sup>ab</sup>	16,8	± 2,6 <sup>b</sup>
Gliceroles parciales	7,0	± 1,2 <sup>ab</sup>	6,1	± 0,8 <sup>a</sup>	11,2	± 1,3 <sup>b</sup>	11,5	± 2,8 <sup>ab</sup>
Fosfatidiletanolamina	11,7	± 1,0 <sup>b</sup>	10,7	± 1,6 <sup>ab</sup>	7,8	± 0,7 <sup>a</sup>	6,6	± 0,6 <sup>a</sup>
Fosfatidilglicerol	-	± -	1,3	± 0,9	-	± -	1,5	± 0,7
Fosfatidilinositol	5,7	± 0,8 <sup>b</sup>	2,8	± 0,3 <sup>a</sup>	2,8	± 1,4 <sup>ab</sup>	3,0	± 0,3 <sup>a</sup>
Fosfatidilserina	5,2	± 0,2 <sup>b</sup>	3,2	± 0,8 <sup>ab</sup>	2,5	± 0,6 <sup>ab</sup>	1,4	± 0,7 <sup>a</sup>
Fosfatidilcolina	46,4	± 6,2	53,8	± 6,6	58,8	± 0,8	44,8	± 6,5
Esfingomiolina	5,8	± 0,8	4,1	± 1,6	1,7	± 1,6	4,7	± 2,2
Lisofosfatidilcolina	4,1	± 0,1	6	± 1,6	2,5	± 1,3	2,9	± 0,8
<i>Total lípidos neutros</i>	21,0	± 5,0 <sup>ab</sup>	18,1	± 3,4 <sup>a</sup>	23,9	± 3,1 <sup>ab</sup>	35,0	± 2,4 <sup>b</sup>
<i>Total lípidos polares</i>	79,0	± 5,0 <sup>ab</sup>	81,9	± 3,4 <sup>b</sup>	76,1	± 3,1 <sup>ab</sup>	65,0	± 2,4 <sup>a</sup>

Los valores se presentan como medias ± desviación estándar (DE); n = 3. Letras diferentes en superíndice dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre los sustratos incubados ( $p < 0,05$ ). Los datos de incorporación se presentan en pmoles de ácidos grasos marcados con  $^{14}\text{C}$  incorporados por mg de proteína por hora (pmol/(mg prot/h)). Los datos de distribución son dados en porcentaje.

Un 100% del sustrato incubado fue recuperado como el propio ácido graso sin transformar, en el caso de ARA, LNA y LA. Sin embargo, cuando las larvas de anguila fueron incubadas con [1-<sup>14</sup>C] EPA, se obtuvo un producto de transformación que corresponde al  $4,5 \pm 0,6$  % de la radiactividad incorporada. Considerando la posición de la banda en la placa y comparándola con las bandas correspondientes del estándar, se trata de un ácido graso de menor número de carbonos y enlaces que el EPA. Un posible resultado de la  $\beta$ -oxidación cuya identidad no fue posible determinar inequívocamente. (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Transformación de los ácidos grasos radiactivos incubados [1-<sup>14</sup>C] ARA, [1-<sup>14</sup>C] EPA, [1-<sup>14</sup>C] 18:3n-3 y [1-<sup>14</sup>C] 18:2n-6

Sustrato	Producto			
[1- <sup>14</sup> C]ARA	20:4n-6	100,0	±	0,0 <sup>c</sup>
[1- <sup>14</sup> C]EPA	20:5n-3	95,5	±	0,6 <sup>b</sup>
	Desconocido	4,5	±	0,6 <sup>a</sup>
[1- <sup>14</sup> C]LNA	18:3n-3	100,0	±	0,0 <sup>c</sup>
[1- <sup>14</sup> C]LA	18:2n-6	100,0	±	0,0 <sup>c</sup>

Los valores se presentan como medias  $\pm$  desviación estándar (DE); n = 3. Los datos de transformación están expresados en porcentaje. Las letras en superíndice dentro de la misma fila representan diferencias significativas entre los sustratos incubados (p < 0,05).

## Discusión

El metabolismo lipídico de la especie de *A. anguilla* en sus primeras etapas de desarrollo destaca notablemente por su comportamiento estrictamente marino. Como ya se ha comentado previamente en la bibliografía, se trata de una especie catádróma, la cual durante su ciclo de vida experimenta cambios de salinidad, temperatura y alimentación drásticos con una sorprendente adaptabilidad. (Righton et al., 2016). En cuanto a las larvas analizadas de 12 días, justo al comienzo de su alimentación exógena, observamos un alto contenido en FC y FE, valores que también destacan en larvas de numerosas especies marinas tanto de peces (Cahu et al., 2009) como de cefalópodos tales como *O. vulgaris* y el *S. officinalis* (Reis et al., 2016; Reis et al., 2014). Estos datos son importantes porque confirman la trascendencia de dos moléculas ricas en DHA y ARA, particularmente esenciales en la formación de los tejidos neurales y en los fuertes procesos de metamorfosis que sufre esta especie en su adaptación osmótica a ambientes progresivamente menos salinos (Cappocioni et al., 2018; De Silva et al., 2004; Olsen et al., 2014; Sargent et al., 1999). Por otro lado, tanto la etanolamina, que se obtiene de la FE y la colina que aporta la FC, son moléculas precursoras de la acetilcolina, el principal neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico (Valenzuela et al., 2014).

Dentro de los lípidos neutros destacan los valores de colesterol (COL), requeridos para los cambios de fluidez en la bicapa lipídica que va a sufrir el individuo en función de la temperatura y la salinidad. También se observan altos valores de TG y ES cuyo carácter apolar les permite depositarse en el interior de las células formando grandes gotas de grasa y contribuyendo a la reserva energética de los tejidos. (Valenzuela et al., 2014). Los valores de lípidos neutros ascienden al 69,7%, valores que explican la importante función de reserva energética de un individuo que está en proceso de crecimiento y metamorfosis y su papel como reservorio de ácidos grasos para los procesos de síntesis lipídica de los tejidos neural, digestivo y osmorregulador, que están en pleno desarrollo (Sargent et al., 1999).

En cuanto a la composición de los ácidos grasos, son destacables los altos porcentajes de ARA, EPA y DHA, en un momento en el que el individuo acaba de desarrollar la apertura bucal (Sørensen et al., 2016). Las concentraciones de DHA frente a EPA son 5 veces mayores y las de ARA frente a EPA del orden de 3. Las altas relaciones DHA/EPA, en un rango de 2-4 son muy habituales en huevos y larvas de peces marinos que aún no han iniciado su alimentación exógena y denotan esta relevancia del DHA en las primeras etapas de vida (Olsen et al., 2014; Sargent et al. 1999), y por lo tanto, un requerimiento que parece ser



particularmente alto en esta especie. No obstante, es de especial interés el valor de ARA, ácido graso que no se suele encontrar con tales rangos de abundancia en las especies marinas. Al tratarse de una anguila que aún no ha comenzado su alimentación exógena, es evidente que esta dotación lipídica viene de la madre y denota, no solo la presencia de componentes dietarios ricos en estos ácidos grasos, sino la importancia que ellos tienen en la supervivencia de esta especie. El ARA ha sido descrito como un componente muy importante en la regulación de multitud de procesos fisiológicos reguladores del sistema inmunitario y también como componente esencial de las branquias y otros epitelios osmorreguladores (Sargent et al., 1999; Lee et al., 2016). En los vertebrados está descrito que el ARA se esterifica eminentemente en el FI de donde es escindido por la fosfolipasa A2 para intervenir directamente, o transformado en diferentes mediadores lipídicos o eicosanoides, en diversos procesos fisiológicos. Las larvas de anguila enfrentan, con su tegumento desnudo, un ambiente altamente desecante como el marino, teniendo que adaptarse en poco tiempo a ambientes cada vez menos salinos. La elevada presencia de ARA en la larva, procedente de la madre que ha vivido largamente en un medio dulceacuícola, podría indicar que, como ocurre en un limitado número de especies de teleósteos de reciente descubrimiento, podría darse una bifuncionalidad asociada a los genes FADs-1 con actividad  $\Delta 5/\Delta 6$  y FADs-2 con actividad  $\Delta 5/\Delta 4$  (Castro et al., 2016), una batería enzimática a partir de la cual el ARA podría proceder de la elongación/desaturación del  $18:2n-6$ , de la misma manera que EPA y DHA procederían de la actividad de las mismas enzimas sobre el  $18:3n-3$ . De hecho, ambos ácidos grasos de 18C son abundantes en la cadena trófica de los ambientes dulceacuícolas. Esta discordancia para la especie incluida en el grupo de teleósteos quedaría explicada por el hecho de que el orden de Anguilliformes es un orden muy antiguo, que se quedó un paso por detrás de la delección de las desaturasas FADs-1 descrita para la generalidad de los teleósteos, por Castro et al., (2016). Aunque la bibliografía es muy escasa al respecto, para el caso de la *Anguilla japonica*, las pruebas moleculares señalan a que las hembras adultas y maduras, aún en su etapa de río, solo presentarían dotación de FADs-2 con actividad  $\Delta 6/\Delta 8$  y una elongasa capaz de convertir C20 en C22 (Wang et al., 2014). Según estos datos, no podrían metabolizar los C18 precursores hasta completar la ruta de producción de ARA, EPA y DHA. En nuestro caso, la situación parece aún más restrictiva, en el sentido de que no hubo actividad elongasa ni desaturasa alguna sobre ninguno de los dos ácidos grasos radiactivos C18, ni sobre el EPA y el ARA. Esto podría obedecer a que se trata de un estadio temprano de desarrollo biológico de la larva o a la ausencia/inactivación de estas enzimas. Si la larva nace altamente dotada de

EPA, DHA y ARA no tiene necesidad de activar su ruta de síntesis, por otro lado, la larva, además de ser carnívora, nace en un ambiente marino de alta salinidad, factores ambos que han sido ligados en la bibliografía a la inactivación de las desaturasas (Tocher, 2015). En cualquier caso, los datos apuntan a que, tanto el ARA, como el EPA y DHA han debido de ser incorporados por medio de la madre. De hecho, las hembras, momentos previos a la migración al medio marino para el desove, parecen llevar a cabo una alimentación particularmente selectiva en LC-PUFA en las lagunas costeras, en donde se genera una gran biomasa (Capoccioni et al., 2018), con presas tales como el cangrejo azul o *Callinectes sapiduspara*, el cual le confiere altos niveles de n-3 y n-6 LC-PUFA como ARA, EPA y DHA. (Çelik et al., 2014).

Dichas proporciones de LC-PUFA irán variando después en función de la etapa del ciclo de vida y el ambiente en el que se encuentren. Datos de otra especie del orden anguiliformes, concretamente de la anguila australiana (*Anguilla australis australis*), nos indican que, en la fase de anguilas de cristal, posterior a la larval, donde se experimenta la migración de vuelta a los rios, existe un alto nivel de PUFA de carácter marino y un bajo nivel de monoenos. No obstante, a medida que cambia su ambiente, en la etapa de angula, ya más próxima a zonas de menor salinidad, el contenido en LC-PUFA disminuye y aumenta el de monoenos y el de PUFA C18: 18:2n-6 y 18:3n-3 (De Silva et al., 2004).

El modo de alimentación y las presas naturales propias de las larvas tempranas de anguila europea es aún un misterio. Sin embargo, recientes análisis genéticos señalan a que los aparentes tractos intestinales vacíos de las anguilas de cristal de la especie europea, denotan una alimentación basada en zooplacton gelatinoso (Hydrozoa, Thaliacea y Ctenophora) (Rietmann et al., 2010). Estos grupos zoológicos se alimentan de fitoplancton, especialmente fotosintético, capaz de sintetizar ARA, DHA y EPA con mucha eficiencia, lo que justificaría los niveles de LC-PUFA tisulares de esta fase (Valenzuela A, Sanhueza J, Garrido A., 1999).

Finalmente, en cuanto a la dinámica de incorporación de los ácidos grasos radiactivos, se deduce que la efectiva incorporación de los sustratos podría ser el resultado de la ingesta continua del agua de incubación circundante, como proceso osmorregulador propio de los peces marinos, así como la alta permeabilidad del tegumento desnudo de la *A. anguilla* en la fase larval. Destaca la notable incorporación del EPA y el LNA ( $\omega$ -3) frente a ARA y el LN ( $\omega$ -6), los cual concuerda con lo descrito para especies de ambientes marinos (Sargent et al., 1999). También concuerda con resultados previos del grupo (Reis et al., 2014, 2016), que tres

de los ácidos grasos incubados: LN, LNA y EPA van a parar mayoritariamente a la FC, sin embargo, hasta donde hemos podido indagar, esta es la primera evidencia de que el ARA se esterifique de una manera tan específica a la FC y no al FI, como ha sido ampliamente descrito para distintas especies de vertebrados y de peces en particular (Sargent et al., 1999). La razón de esta inesperada especificidad está aún por dilucidar.

## Conclusiones

1. Los altos valores de FC, FE, ARA, EPA y DHA de las larvas de la anguila europea, justo antes de su alimentación exógena, evidencian su relevancia fisiológica descrita para las larvas de otras especies de organismos marinos y que estos componentes son proporcionados por la madre durante la fase de formación del huevo.
2. La nula actividad desaturasa y elongasa encontrada en las larvas de anguila europea incubadas con los ácidos grasos linoleico, linolénico y EPA confirman que los ácidos grasos EPA, DHA y ARA son AGE para esta especie, al menos en sus fases tempranas de desarrollo.
3. Los elevados valores de ARA presentes en las larvas de anguila, apuntan a la importancia fisiológica de este ácido graso y podrían guardar relación con su implicación en procesos relacionados con la respuesta del sistema inmune y la osmorregulación en un animal de tegumento desnudo, que debe adaptarse un ambiente cambiante de salinidad y temperatura.
4. La inesperada esterificación selectiva del ARA a la FC y no al FI, es totalmente novedosa para un vertebrado y requiere de estudios más complejos, entre los que se incluye la confirmación de que este ácido graso se encuentra de manera natural esterificado en la fosfatilcolina de los tejidos de la anguila europea.

## Conclusions

1. The high levels of PC, PE, ARA, EPA and DHA present the in European eel larvae, just before the exogenous feeding, demonstrate their physiological relevance described for the larvae of other marine organisms species and that these components are provided by the mother during the egg formation.
2. The inactivity of desaturase and elongase enzymes in the European eel larvae incubated with linoleic acid, linolenic acid and EPA confirms that the fatty acids EPA, DHA and AA are EFAs for this species at least at the early life stages.

3. The high levels of ARA present in the European eel larvae denotes its physiological relevance and could be related to its involvement in processes related to the response of the immune system and osmoregulation in an animal with a bare integument, which must adapt to the changing environmental salinity and temperatura conditions occurring in its life cycle.
4. The unexpected selective esterification of ARA into PC and not into PI is totally novel for a vertebrate and requires more complex studies, including the confirmation that this fatty acid is naturally esterified in the European eel tissue PC.

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecer a todo el grupo de Fisiología Animal, por el trato recibido y el buen ambiente existente. En primer lugar, a Nieves Guadalupe Acosta González por enseñarme las técnicas y por amenizar las horas de laboratorio. Al Dr. José Antonio Pérez Pérez, por siempre estar receptivo y disponible ante cualquier duda, y en especial mención, a dos brillantes mujeres, mi co-tutora Diana Reis, por su paciencia, cercanía y conocimientos, de la que he aprendido mucho, y a mi tutora la Dra. Covadonga Rodríguez González, por confiar en mí para este trabajo, por estar siempre ante cualquier duda o problema y por orientarme y motivarme hacia una rama de la biología que no había tenido en cuenta antes.

También dar las gracias a mis padres, que sin ellos no hubiese llegado hasta aquí, por apoyarme siempre y cuidarme y finalmente a mis amigos, que han sido un pilar fundamental en estos años de carrera.

## Bibliografía

APROMAR. 2017. La acuicultura en España. 2-3.

Bell, M. V., y Tocher, D. R. 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In *Lipids in aquatic ecosystems*, 211-236. Springer New York.

Capoccioni, F., Contò, M., Failla, S., Cataudella, S., Ciccotti, E. 2018. Fatty acid profiles of migrating female silver eel from Mediterranean coastal lagoons as integrative descriptors of spawners biological quality. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 210, 87-97

Castro, L. F., Monroig, O., Leaver, M. J., Wilson, J., Cunha, I., et al. 2012 Functional Desaturase Fads1 (D5) and Fads2 (D6) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates. *PLoS ONE* 7(2): e31950.

Çelik, M., Türeli, C., Çelik, M., Yanara, Y., Erdem, Ü. 2004. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 88 (2), 271-273.

Chantal, L., Gisbert, E., Villeneuve L., Morais S., Hamza N., Wold, P., et al. 2009. Influence of dietary phospholipids on early ontogenesis of fish. *Aquaculture Research*. 40 (9), 989-999.

D. Deibel, C. C. Parrish, P. Grønkjær, P. Munk and T. Gissel Nielsen, 2012. Lipid Class and Fatty Acid Content of the *Leptocephalus* Larva of Tropical Eels, *Lipids*, (47) 6, 623-634.

De Silva, S., Gunasekera R.M., Collins R.O. 2005. Some morphometric and biochemical features of ready-to-migrate silver and pre-migratory yellow stages of the shortfin eel of south-eastern Australian waters, *Journal of Fish Biology*, (61) 4, 915-928.

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Departamento de Pesca. Roma.

Franquet, J. M., y Pàmies, C. B. 2007. Cultivo intensivo de la anguila europea. 308.

JACUMAR. 2017. Secretaría General de Pesca (MAPAMA). Estadísticas de producción de acuicultura 2013-2016.

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

MAPAMA. 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente Informe de consumo alimentario en España.

Mustafa, T., Srivastava, K.C. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 5, 157-207.

Olsen, R. E., y Henderson, R. J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using doubledevelopment HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.

Reis, D.B., García-Herrero, I., Riera, R., Felipe, B.C., Rodríguez, C., Sykes, A.V., Martín, M.V., Andrade, J.P., Almansa, E., 2015. An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquac. Nutr.* 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.

Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., y Moghadasian, M. H. 2009. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 668-679.

Riemann, L., Alfredsson, H., Hansen, M. M., Als, T. D., Nielsen, T. G., et al. (2010). Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, 6(6), 819-822.

- Righton D., Westerberg H., Feunteun E., Økland f., Gargan F., et al. 2016. Empirical observations of the spawning migration of European eels: The long and dangerous road to the Sargasso Sea. *Sci. Adv.* 2, e1501694.
- Rodríguez, C., Lorenzo, A. y Martín, V. 2012. Nutrición lipídica. En Sanz F. (coord.), *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Editorial Paraninfo, Madrid. 151-231.
- Sargent, J. R., y Tacon, A. G. J. 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(02), 377-383.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., y Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1), 191-199.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2002. The lipids, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edition. Academic Press, San Diego, 181–257.
- Sorbera, L.A., Zanuy, S., Carrielo, M. 1998. A role for polyunsaturated fatty acids and prostaglandins in oocyte maturation in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Vandry, H., Tonon, M.C., Roubos, E.W., Loof, A. (eds.), *Trends in Comparative Endocrinology and Neurology: From Molecular to Integrative Biology*. New York Academy of Sciences, New York, 535–537.
- Sørensen, S.R., Tomkiewicz, J., Munk, P.; Butts, I., Nielsen, A., Lauesen, P., Craver, C. 2016. Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel, 50–61.
- Tesch, F.W., Rohlf, N. 2003 Migration from Continental Waters to the Spawning Grounds. In: Aida K., Tsukamoto K., Yamauchi K. (eds.), *Eel Biology*. Springer, Tokyo.
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2), 107-184.
- Tocher, D. R. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., Garrido, A. 1999. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3: cuándo y por qué es necesaria la suplementación con estos ácidos grasos. *Aceites y Grasas*, 9, 294-9.
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., De la Barra, F., Morales, G. 2014. Phospholipids from marine origin: a new alternative for supplementing omega-3 fatty acids. *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 433-438.
- Wade, M.G., Van Der Kraak, G. 1993. Regulation of prostaglandins E and F production in the goldfish testes. *Journal of Experimental Zoology* 266, 108–115.
- Ward, O. P., y Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652.