



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO DEL DHA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
 $\Delta 6$ -DESATURASA DURANTE EL DESARROLLO
LARVARIO DEL PARGO AMARILLO, *Lutjanus*
argentiventris

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
Orientación: Acuicultura

Presenta

BIVIANA ISABEL PAZ RAYMUNDO

La Paz, Baja California Sur, Septiembre 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 01 del Mes de Septiembre del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EFECTO DEL DHA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA $\Delta 6$ -DESATURASA DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO DEL PARGO AMARILLO, *Lutjanus argentiventris* "

Presentada por el alumno:

Biviana Isabel Paz Raymundo

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dr. Dariel Tovar Ramírez

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Elena Palacios Mechetnov

CO-TUTOR



Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA

DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez

CIBNOR, La Paz B.C.S

CO-TUTORES

Dra. Elena Palacios Mechetnov

CIBNOR, La Paz B.C.S

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

CIBNOR, La Paz B.C.S.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Suplente: Dr. Héctor Nolasco Soria

RESUMEN

El pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* se distribuye en el litoral del Pacífico americano incluyendo las costas de Baja California Sur. Es una especie que ha sido adaptada al cautiverio desde 1996 en las instalaciones de CIBNOR y se ha caracterizado por ser una especie versátil y adaptable a distintos tipos de alimentación. Los peces contienen naturalmente altos niveles de HUFA (Ácidos grasos altamente insaturados) en sus tejidos corporales y dado que los peces marinos no los pueden sintetizar, tienen altos requerimientos de éstos. Actualmente existe gran interés a nivel molecular de las enzimas que les permiten a estos organismos llevar cabo la biosíntesis de estos ácidos grasos, implicando las rutas de elongación y desaturación y en particular la $\Delta 6$ -desaturasa, que según estudios previos tiene una modulación nutricional y ha sido bien descrita en mamíferos y peces marinos de aguas frías. En cuanto a los teleósteos, la modulación nutricional de $\Delta 6$ -desaturasa se ha estudiado ampliamente para probar si la actividad desaturasa podría compensar la reducción de los niveles de HUFA dada la inclusión cada vez mayor de aceites vegetales de origen terrestre en la dieta. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de DHA (Ácido graso docosaheptaenoico) durante el desarrollo larvario de *Lutjanus argentiventris*, partiendo de los desoves naturales del stock de reproductores de CIBNOR. Para ello, se enriqueció alimento vivo (rotífero *Brachionus plicatilis*) con tres emulsiones ICES (50, 0%, de HUFA y una dilución de ambas con la proporción 1:4); y sin enriquecer, únicamente alimentado con microalga *Nannochloropsis oculata*. Se alimentó a las larvas durante 168 horas posteriores a la eclosión, se colectaron muestras para extracción de ARN (24, 72, 120 hrs. post-primera alimentación). Se cuantificó el contenido de ácidos grasos tanto en los rotíferos enriquecidos y larvas alimentadas al término del experimento. Se clonó un fragmento específico de la secuencia del gen $\Delta 6fad$ para *Lutjanus argentiventris* y se validó la expresión mediante qPCR, cuantificando los transcritos codificantes para esta enzima $\Delta 6$ -desaturasa, como gen endógeno se utilizó el factor de elongación αEfl . Los resultados muestran que existe expresión del gen $\Delta 6fad$ en huevos y larvas recién eclosionadas de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris*, y que además la expresión a las 72 hrs. es significativamente mayor, lo que soporta el papel alternativo que juega esta enzima al mantener los niveles de DHA requeridos en las membranas, en momentos críticos y de alta demanda como lo son el desarrollo embrionario y larval. Se observó una correlación negativa entre los niveles de DHA contenido en rotíferos y la acumulación de EPA en la composición de larvas. No se observó una diferencia significativa en el crecimiento larval al suministrar rotíferos con un elevado porcentaje de DHA, mientras que la sobrevivencia se vio favorecida por una relación de DHA/EPA de 1.2. Finalmente, se observó un efecto negativo entre los niveles de DHA suministrados en la dieta sobre la expresión del gen que codifica para la $\Delta 6$ -desaturasa pero no fue significativo, por lo que este trabajo sugiere realizar más estudios para determinar si esto puede ser atribuido únicamente a la modulación nutricional de la $\Delta 6$ -desaturasa, puesto que es necesario considerar la proporción de ácidos grasos de la serie n-3 y n-6, además de los mecanismos de absorción y degradación de AG durante etapas tan tempranas del desarrollo larval.

Palabras Clave: $\Delta 6$ -Desaturasa, ácido docosaheptaenoico (DHA), larva, metabolismo.

ABSTRACT

The yellow snapper *Lutjanus argentiventris* is distributed on the Pacific coast of America including the coasts of Baja California Sur. It is a versatile specie that has been adapted to captivity since 1996 at CIBNOR facilities. Lipid nutrition of fish during the early stages of development has been extensively studied and their contribution to supply sufficient quantities of fatty acids in order to obtain a successful larval production has been well appreciated especially in species of commercial interest. Fish naturally contain high levels of HUFAs, in body tissues and consequently have high requirements of these. There is currently great interest at the molecular level of enzymes that allow these organisms carry out these fatty acid biosynthesis pathways involving elongation and desaturation. In marine fish, this enzymatic activity is limited, so the studies focus on one of the limiting enzymes, $\Delta 6$ -desaturase, which according to previous studies has a nutritional modulation and has been well described in mammals. As teleosts $\Delta 6D$ nutritional modulation has been widely studied to test whether desaturase activity may compensate for the reduced levels of HUFAs due to inclusion of vegetable oils in the diet. The objective in the present study was evaluate the effect of different concentrations of DHA in live food during larval development of *Lutjanus argentiventris*, starting from natural spawning of broodstock CIBNOR. To this end, the live feed enriched with (Rot. *Brachionus plicatilis*) ICES emulsions (50, 0 %, of HUFA and a dilution of both 1:4 proportion), and fed unenrichend *Nannochloropsis oculata* microalgae. Larvae were fed for 168 hours after hatching, be it for extracting collected RNA samples (24, 72, 120 hrs. Post- first power), also the fatty acid content in both rich and larvae fed at the termination of rotifers . A specific fragment of the gene sequence for *Lutjanus argentiventris* $\Delta 6fad$ cloned and expression was validated by qPCR, quantifying the transcripts coding for the enzyme $\Delta 6$ -desaturase , an endogenous gene αEfl elongation factor was used. The results of this study showed $\Delta 6fad$ gene expression in eggs and newly hatched yellow snapper *Lutjanus argentiventris* larvae, and further expression in unfed larvae to 72hrs is significantly higher , which supports the alternative role of this enzyme to maintain required levels of DHA in the membranes , critical and high-demand such as embryonic and larval development times. No significant difference was observed in the larval growth by providing rotifers with a high percentage of DHA, while survival was favored by a ratio of DHA / EPA of 1.2. This work suggests further studies to determine whether this can be attributed solely to the nutritional modulation of $\Delta 6$ -desaturase, since it is necessary to consider the proportion of fatty acids of the n-3 and n-6, in addition to the mechanisms absorption and degradation as AG during early stages of larval development.

Keywords: $\Delta 6$ -Desaturase, docosahexaenoic acid (DHA), larvae, metabolism.

DEDICATORIA

A mis padres: Sergio Paz Salazar y Clara Raymundo Sánchez, quienes durante toda mi vida han dado lo mejor de sí mismos para brindarme la oportunidad de ser mejor y a pesar de todos mis defectos, siguen creyendo en mí.

A ti, mi bicho: que permaneces con amor y paciencia, animándome a lograrlo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. De registro 412859/26042) y al proyecto SEP-CONACYT 156118, sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las facilidades otorgadas durante mi trabajo en sus instalaciones.

Al Artemia Reference Center por la donación de las emulsiones ICES 50 e ICES 0 utilizadas aquí.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez por aceptar la dirección de esta tesis, por su paciencia y apoyo en cada uno de sus comentarios, por facilitarme los medios para la realización de este trabajo y compartir su conocimiento guiándome durante este tiempo, dándome un ejemplo a seguir como investigador y persona.

Igualmente a mis co-tutores la Dra. Elena Palacios Mechetnov por proporcionarme el material necesario para la realización de este trabajo y por la dedicación de su tiempo para la revisión de esta tesis, agradezco sus comentarios y recomendaciones. Al Dr. Juan Carlos Pérez por la proporción del material biológico y por su ayuda durante el experimento, agradezco también todos sus comentarios, recomendaciones y su tiempo.

A Pablo Monsalvo Spencer, por facilitar todo el material y supervisión durante el bioensayo realizado en el Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos, por todo el trabajo y ayuda que proporcionó para que este estudio fuera posible.

A la M.C. María Olivia Arjona López, responsable del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, por su apoyo técnico y académico en la cuantificación de ácidos grasos, muchísimas gracias por la paciencia, recomendaciones.

Al laboratorio de Microalgas del CIBNOR y sus técnicos, Julián Garzón Favela, Adriana Green Yee y Cynthia Aldana Avilés por el apoyo técnico en el cultivo de microalga necesario en este trabajo.

Asimismo a los técnicos del Laboratorio de Biología Reproductiva, MC. Marcos Fabián Quiñones Arreola y Lic. Francisco Javier Encarnación Ramírez, por su apoyo en lo que a cultivo de rotíferos se refiere y el préstamo de material que ello requirió en el experimento, y por brindarme como apoyo su experiencia.

A Patricia Hinojosa Hernández Baltazar, responsable del Laboratorio de Fisiología Comparada por su apoyo académico y técnico.

Al Biol. Mar. Hever Latisnere Barragán, por su ayuda brindada en el uso de los equipos y material del Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos.

A los técnicos Jorge León Sandoval Soto y José Gilberto Colado Duran por apoyarme con su trabajo en el cultivo y manutención de rotíferos en el patio de cultivos.

De manera personal agradezco a mis compañeras y amigas: Elia Gladys Ayala Borboa quien además de su amistad me brindo toda su ayuda en los protocolos moleculares y compartió sus conocimientos y experiencia, por toda su paciencia y tiempo que me fueron muy útiles durante toda la maestría. A Karina Viveros quien a pesar del distanciamiento sigue echándome porras y gracias a quien fue más amena la maestría.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Requerimientos de lípidos para peces	4
2.2 Biosíntesis de PUFA	5
2.3 Alimento vivo y su enriquecimiento	9
2.4 Estudios sobre la $\Delta 6$ -desaturasa	13
2.5 Características de <i>Lutjanus argentiventris</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
7. MATERIAL Y MÉTODOS	26
7.1 Reproductores y desove	26
7.2 Alimento Vivo	27
7.2.1 Emulsiones y enriquecimiento de rotíferos	27
7.3 Diseño experimental	28
7.4 Muestras	29
7.4.1 Análisis moleculares	29
7.4.2 FAME	30
7.4.3 Crecimiento	31
7.4.4 Supervivencia	32
7.5 Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (FAME)	33
7.6 Análisis Moleculares	34
7.6.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA	34
7.6.2 Diseño de oligonucleótidos para detección de <i>$\Delta 6fad$</i>	34
7.6.3 PCR preparativa y clonación	34
7.6.4 Secuenciación	36

7.6.5	Diseño de oligonucleótidos para qPCR <i>Δ6fad</i> y <i>EF1α</i>	37
7.6.6	Análisis qPCR.....	37
7.7	Análisis estadístico de los parámetros de crecimiento	39
8.	RESULTADOS	40
9.	DISCUSIÓN	55
10.	CONCLUSIONES	68
11.	BIBLIOGRAFÍA	70
12.	ANEXOS	81

Lista de Tablas

Tabla I. Requerimientos cuantitativos de ácidos grasos para peces marinos de importancia comercial en etapa juvenil y sub-adultos.	5
Tabla II. Contenido de ARA, EPA y DHA reportado en especies de rotífero con diferente alimentación.	11
Tabla III. Estudios recientes en los que se han utilizado las emulsiones ICES.	13
Tabla IV. Genes desaturasa $\Delta 6$ y $\Delta 5$ secuenciados para peces.	15
Tabla V. Composición de ácidos grasos (%) de las emulsiones ICES utilizadas para enriquecer rotífero.	27
Tabla VI. Oligonucleótidos diseñados para la detección del gen $\Delta 6fad$	34
Tabla VII. Secuencias parciales de los genes $\Delta 6fad$ y αEfl de <i>Lutjanus argentiventris</i>	36
Tabla VIII. Oligonucleótidos específicos de los genes αEfl y $\Delta 6fad$ de <i>Lutjanus argentiventris</i> diseñados para q-PCR.	36
Tabla IX. Parámetros morfométricos y porcentaje de eclosión medidos inicialmente en el desove dentro de 5hrs posteriores a la colecta.	40
Tabla X. Proporción (%) de Ácidos Grasos de las muestras de rotíferos enriquecidos con diferentes niveles de HUFA n-3 (media \pm D.S).	48
Tabla XI. Proporción (%) de Ácidos Grasos (media \pm D.S.) contenidos en larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i> alimentados con rotífero enriquecido con diferentes proporciones de HUFA.	49

Lista de figuras

Figura 1. A) Elongación y desaturación de los ácidos linoléico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) para sintetizar ácido araquidónico (20:4n-6) y ácido eicosapentaenóico (20:5n-3). B) Elongación y desaturación del ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) para sintetizar ácido docosahexaenóico (22:6n-3) por medio de β -oxidación en peroxisomas (tomado de Sargent <i>et al.</i> , 1995).	7
Figura 2. Distribución de <i>Lutjanus argentiventris</i> (tomado de FISHBASE.ORG).....	18
Figura 3. Esquema de alimentación y manejo de la calidad de agua utilizado en el cultivo larvario del pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> (Tomado de Abdo-de la Parra et al., 2010).	20
Figura 4. Orden cronológico del muestreo de larvas para los análisis moleculares de huevos y larvas alimentadas.	30
Figura 5. Secado de la muestra de larvas para análisis de Ácidos Grasos totales.	31
Figura 6. Mediciones morfométricas para huevos (A) y larvas (B) de pargo amarillo DH= Diámetro de huevo, DGL= diámetro de la gota lipídica; LN= longitud Notocordal, HSV= altura del saco vitelino, LSV=longitud del saco vitelino.....	32
Figura 7. Amplificación de cDNA por PCR, donde se detectaron los genes $\Delta 6$ FAD Y EF1 α , en la muestras de larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i>	35
Figura 8. Amplificación de cDNA por PCR, donde se corrobora los primers para $\Delta 6$ FAD Y Efl	37
Figura 9 . Longitud Notocordal de larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i> desde la eclosión hasta el término del experimento.	41
Figura 10. Evolución del volumen de la gota lipídica de larvas de <i>L. argentiventris</i> alimentadas con diferentes niveles de DHA. ** representa diferencias significativas.	42
Figura 11. Evolución del volumen del saco vitelino en larvas de todos los tratamientos durante las 48 horas posteriores a la eclosión.	43
Figura 12. Expresión normalizada (media y desviación estándar) de $\Delta 6$ -desaturasa ($\Delta 6$ fad) en huevos y larvas recién eclosionadas	44
Figura 13. Expresión normalizada de $\Delta 6$ fad (media y desviación estándar) en larvas del tratamiento en inanición.....	45
Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia (media y desviación estándar) en larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i> a las 168 hrs post-eclosión. Las letras diferentes denotan diferencias significativas.	46
Figura 15. Evolución de la expresión Normalizada con respecto al gen endogeno EF1 α (media y desviación estándar) del gen <i>fads2</i> a lo largo de las 168 hrs. después de la eclosión.	47

Figura 16. Porcentaje total (medias y DS) de HUFA n-3 contenidos en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con diferentes niveles de DHA. Las letras diferentes denotan diferencias significativas.....	50
Figura 17. Regresión Lineal del porcentaje de ácido linoleico de los rotíferos enriquecidos versus el porcentaje de ácido linoleico que se encontró en la composición corporal de larvas de pargo amarillo.	51
Figura 18. Regresión lineal del porcentaje total de EPA en larvas y rotíferos enriquecidos.	52
Figura 19. Regresión lineal de la concentración de EPA en larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i> versus el porcentaje de DHA que contenían los rotíferos con que fueron alimentadas.....	53
Figura 20. Regresión lineal entre los valores promedio del contenido DHA en rotíferos enriquecidos (%) y la expresión normalizada del gen $\Delta 6fad$ en larvas de <i>Lutjanus argentiventris</i>	54

1. INTRODUCCIÓN

El pescado y los productos pesqueros representan una fuente muy valiosa de proteínas y nutrientes esenciales para tener una nutrición equilibrada y disfrutar de buena salud. En 2009, el pescado representó el 16.6 por ciento del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6.5 por ciento de todas las proteínas consumidas, uno de los sectores más productivos de esta proteína animal para el consumo humano, es la acuicultura. Según la FAO (2010), la producción acuícola mundial de pescado comestible (peces de aleta, los crustáceos, los moluscos y otros animales acuáticos) alcanzó los 60 millones de toneladas en 2008 con un valor de \$70 billones de dólares anuales.

El resultado combinado del desarrollo de la acuicultura en todo el mundo y la expansión de la población mundial, es que el suministro per cápita medio anual de pescado comestible procedente de la acuicultura para el consumo se multiplicó por diez y pasó de 0.7 kg en 1970 a 7.8 kg en 2008, lo que supone un incremento medio del 6.6% anual. Esta rápida expansión global, resulta del incremento e intensificación de los sistemas de cultivo y el subsecuente uso de alimentos acuícolas. Por lo menos en el aceite de pescado (FO, por las siglas en inglés Fish Oil) se ha estimado que el 87% disponible globalmente se utiliza como fuente de lípidos para estos alimentos acuícolas, actualmente su precio se encuentra en \$1722.50 dólares por tonelada y fluctúa de acuerdo a la demanda pudiendo llegar a los \$2200 dls/Ton, históricamente los aceites vegetales de palma, soya y canola se han mantenido en un 40% por debajo de este precio, lo que ha llevado a considerarlos como una opción alternativa (GLOBEFISH 2014, Turchini *et al.*, 2009; Tacon *et al.*, 2006). El uso y demanda global de FO por varias especies de acuicultura hasta 2012 fue estimado por Tacon *et al.* (2006), quien predijo que el consumo sería aprox. el 88% de los suministros mundiales. Otros, sin embargo, predijeron que la acuicultura consumiría hasta un 98% de la oferta mundial FO para el año 2010 (Pike y Barlow, 2003). Lo que es un hecho indiscutible es que en los últimos 25 años, la producción anual de FO no ha aumentado más allá de 1.5 millones de toneladas por año y la creciente rapidez de la industria acuícola no puede seguir dependiendo de los stocks finitos de peces pelágicos marinos como un suministro de FO.

El aporte de lípidos en la alimentación de los peces, al igual que en la de mamíferos, es fundamental para satisfacer los requerimientos de ácidos grasos (AG) esenciales, AG no sintetizables por el organismo, éstos son necesarios para el organismo por ser componentes importantes de los fosfolípidos, que constituyen la mayoría de las membranas celulares y las lipoproteínas de transporte; además sirven de sustrato para la síntesis de toda una familia de moléculas de carácter hormonal: las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, que sirven como enlace entre las hormonas y los sitios celulares donde actúan. Tienen funciones múltiples y actúan sobre el sistema nervioso, aparato circulatorio, tubo digestivo, órganos reproductores etc. En peces, las funciones mejor conocidas de estos compuestos son las de reproducción, excreción renal, branquial, y osmorregulación.

El éxito comercial del cultivo de peces marinos depende de la producción controlada de un número suficiente de juveniles de la especie a cultivar. La importancia en la dieta de los ácidos grasos ha sido bien estudiada en peces marinos y se ha obtenido una producción exitosa de larvas al proporcionar cantidades adecuadas de estos en el alimento, ya que el medio acuático se caracteriza por poseer una gran riqueza en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga y ácidos grasos altamente insaturados (HUFA). Los requerimientos más elevados en peces corresponden a los HUFA de la serie omega 3 (n-3). Los HUFA n-3 importantes desde el punto de vista alimentario son el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), están presentes principalmente en pescados grasos, como la macarela, el arenque y salmón. Ambos ácidos grasos no son producidos por los peces, sino por los organismos marinos unicelulares que son consumidos de forma habitual por las especies marinas (Bondia-Pons, 2007; Moyad, 2005)

Debido al menor desempeño en cuanto a crecimiento y supervivencia en larvas de peces marinos asociada a la utilización de dietas artificiales, la falta un sistema digestivo plenamente desarrollado con baja actividad enzimática, y a la complejidad de las dietas suministradas, casi todos los sistemas de larvicultura dependen en gran medida del alimento vivo, principalmente de rotífero, nauplios de *Artemia* y alternativamente de copépodos (Lazo, 2000; Sargent *et al.*, 1999). Dado que se ha establecido que tanto el rotífero como la *Artemia* pueden ser deficientes de EPA y particularmente en *Artemia* no se han encontrado niveles

significativos de DHA (Leger *et al.*, 1986; Navarro *et al.*, 1992), es necesario enriquecer rotífero y *Artemia* con HUFA, para ello existen procedimientos y productos comerciales con aceite de pescado disponibles para lograrlo. La característica principal del aceite de pescado marino es su elevado contenido de HUFA n-3, sin embargo por el aumento de su precio mundial y los suministros limitados, la industria acuícola está bajo intensa crítica de científicos y grupos ambientalistas con respecto a la sustentabilidad a largo plazo de los recursos pesqueros finitos (Naylor *et al.*, 2000; Worm *et al.*, 2006).

Para saber si es posible sustituir los aceites de pescado en la alimentación del cultivo de peces de interés comercial, es necesario comprender cómo se regula la biosíntesis de los HUFA y si ésta puede compensar la sustitución parcial de HUFA n-3 por sus precursores de 18 carbonos. Así, muchos estudios se han centrado en la enzima $\Delta 6$ -desaturasa ó $\Delta 6$ *fad* (por sus siglas en inglés, $\Delta 6$ fatty acid desaturase), ya que es la enzima limitante de velocidad en la biosíntesis de HUFA a partir de precursores. El objetivo de este trabajo fue evaluar si existe expresión del gen $\Delta 6$ *fad* y si la concentración del DHA suministrado a través del enriquecimiento del alimento vivo afecta la expresión del gen que codifica para esta enzima en larvas de pargo amarillo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Requerimientos de lípidos para peces

Los peces al igual que los demás vertebrados, requieren de PUFA para un correcto desarrollo, si hay deficiencia de éstos en la dieta el animal detiene su crecimiento y reproducción, desarrolla patologías y muere. Sin embargo estos requerimientos pueden variar cuantitativamente durante la ontogenia del pez (Tocher, 2010).

De acuerdo a la revisión de Tocher en 2010, los requerimientos de juveniles y subadultos de peces dulceacuícolas y diadromos, estudiados hasta ahora, indican que pueden ser satisfechos con un 1% (peso seco de la dieta) de PUFA de 18C como el ácido alfa-linolénico (ALA, 18:3n-3) y el ácido linoleico (LA, 18:2n-6), en contraste a las especies marinas que requieren estrictamente de EPA y DHA, y mientras que para algunas especies como el turbot *Psetta maxima*, el besugo del mar rojo *Pagrus major* o la lubina europea *Dicentrarchus labrax* los requerimientos de HUFA n-3 son menores al 1% (peso seco) de la dieta, otras especies como *Rhabdosargus sarba*, *Pseudocaranx dentex* y *Pleuronectes ferrugineus* requieren más del 1%. Además en peces marinos destetados es esencial 0.3% de ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) (Castell *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1995). Estos requerimientos cuantitativos pueden variar de acuerdo con el nivel de lípidos y la relación de DHA: EPA en la dieta (Tabla I). Es decir, con una relación de DHA: EPA de 0.5, el requerimiento total será de 1.9% de HUFA n-3 en la dieta, sin embargo, con una relación DHA: EPA de 1 el requerimiento total será de 0.9% de HUFA n-3 (Kalogeropoulos *et al.*, 1992; Watanabe, 1993; Ibeas *et al.*, 1994).

En larvas y estadios tempranos del desarrollo de peces dulceacuícolas, existe poca información acerca de los requerimientos cuantitativos debido a que la alimentación de larvas y alevines no es un problema, ya que por su tamaño pueden aceptar alimentos formulados para su máximo crecimiento y supervivencia. En contraste a las larvas de peces marinos de menor tamaño y sistema digestivo post-eclosión muy poco desarrollado ha influido en la definición precisa de los requerimientos de AG esenciales para cada especie. Sin embargo la elaboración de dietas microparticuladas exitosas es difícil, por lo que aún se necesita del alimento vivo.

Tabla I. Requerimientos cuantitativos de ácidos grasos para peces marinos de importancia comercial en etapa juvenil y sub-adultos.

Nombre común	Especie	Ácidos Grasos Esenciales	Requerimiento (% dieta seca)	Referencia
Rodaballo	<i>Psetta máxima</i>	n-3HUFA	0.8	Gatesoupe <i>et al.</i> , 1977
Besugo	<i>Pagrus major</i>	ARA	0.3	Castell <i>et al.</i> , 1994
		n-3HUFA o EPA	0.5	Yone, 1978
		EPA	1	Takeuchi <i>et al.</i> , 1990
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	DHA	0.5	Takeuchi <i>et al.</i> , 1990
		(DHA:EPA =1)	0.9	Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 1992
		(DHA:EPA=0.5)	1.9	Ibeas <i>et al.</i> , 1994
Cocinero	<i>Pseudocaranx dentex</i>	DHA:EPA	0.5	Ibeas <i>et al.</i> , 1997
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	DHA	1.7	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992
Limanda	<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	n-3HUFA	1	Coutteau <i>et al.</i> , 1996
Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>	n-3HUFA	2.5	Whalen <i>et al.</i> , 1999
Platija	<i>Platichthys stellatus</i>	n-3HUFA	1.4	Takeuchi, 1997
Sargo dorado	<i>Rhabdosargus sarba</i>	n-3HUFA	0.9	Lee <i>et al.</i> , 2003
Corvina	<i>Sciaenops ocellatus</i>	n-3HUFA	1.3	Leu <i>et al.</i> , 1994
		EPA+DHA	0.5-1.0	Lochmann y Gatlin, 1993
			0.3-0.6	Lochmann y Gatlin, 1993

2.2 Biosíntesis de PUFA

Lipogénesis, es el término utilizado para describir las reacciones de biosíntesis de lípidos endógenos. La fuente de carbono de estos nuevos lípidos es el acetyl-CoA formado en la mitocondria a partir de la descarboxilación oxidativa del piruvato o la degradación de algunos aminoácidos. La vía clave en la lipogénesis es catalizada por ácido graso sintetasa citosolica (FAS, por sus siglas en inglés fatty acid synthetase), los principales productos de FAS son los ácidos grasos saturados 16:0 (ácido palmítico) y 18:0 (ácido esteárico) que puede ser biosintetizadas de *novo* por todos los organismos conocidos, incluyendo peces (Sargent *et al.*, 1989) La biosíntesis de PUFA en diferentes organismos implica una variedad de vías, catalizada por una compleja serie de pasos de desaturación y elongación. Una desaturasa es

un tipo especial de oxigenasa que puede remover dos átomos de hidrógeno a partir de una cadena de hidrocarburo, especialmente de una cadena de acilo graso, catalizando la formación de un doble enlace en el sustrato (Meesapyodsuk y Qiu, 2011). Una gama de diferentes desaturasas se han identificado hasta la fecha, capaces de introducir dobles enlaces en varios lugares en la cadena de acilo graso. Algunas nuevas desaturasas recientemente identificadas incluyen D4-desaturasa de hongos marinos, y una bi-funcional D5/D6 desaturasa de pez cebra. Utilizando métodos de genética molecular, estos genes desaturasa se han aislado, identificado y expresado en una variedad de huéspedes heterólogos (Pereira *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004). Todos los organismos son capaces de desaturar 16:0 y 18:0 por un Δ -9 ácido graso desaturasa microsomal para producir, respectivamente, 16:1 Δ 9 = 16:1n-7 (ácido palmitoleico) y 18:1 Δ 9 = 18:1n-9 (ácido oleico). La desaturación de los ácidos grasos en peces, como todos los animales, tiene lugar en el retículo endoplásmico de las células de tejidos particulares a través de un proceso aeróbico utilizando sustratos ligados a la CoA (Coenzima A) y requiere NAD(P)H y O₂. A partir del ácido oleico y mediante la acción de dos enzimas desaturasas (Δ 12 y Δ 15 desaturasas) que actúan consecutivamente, se forman los ácidos grasos linoleico (18:2n-6, LA) y posteriormente linolénico (18:3n-3, LNA) considerados los precursores del resto de ácidos grasos de cadena larga (>20C) (Tiku *et al.*, 1996; Tocher *et al.*, 2003). Sin embargo todos los animales, incluyendo peces, carecen de estas enzimas, lo que no permite formar los ácidos LA y LNA a partir del ácido oleico 18:1n-9, por lo tanto LA y LNA, son considerados ácidos grasos esenciales (EFA, por sus siglas en inglés Essential Fatty Acids) en la dieta de los vertebrados. Estos ácidos grasos esenciales en la dieta pueden continuar siendo desaturados y alargados (Fig.1) para formar PUFA de C20 y C22, tales como 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA) y 22:6 n-3 (DHA).

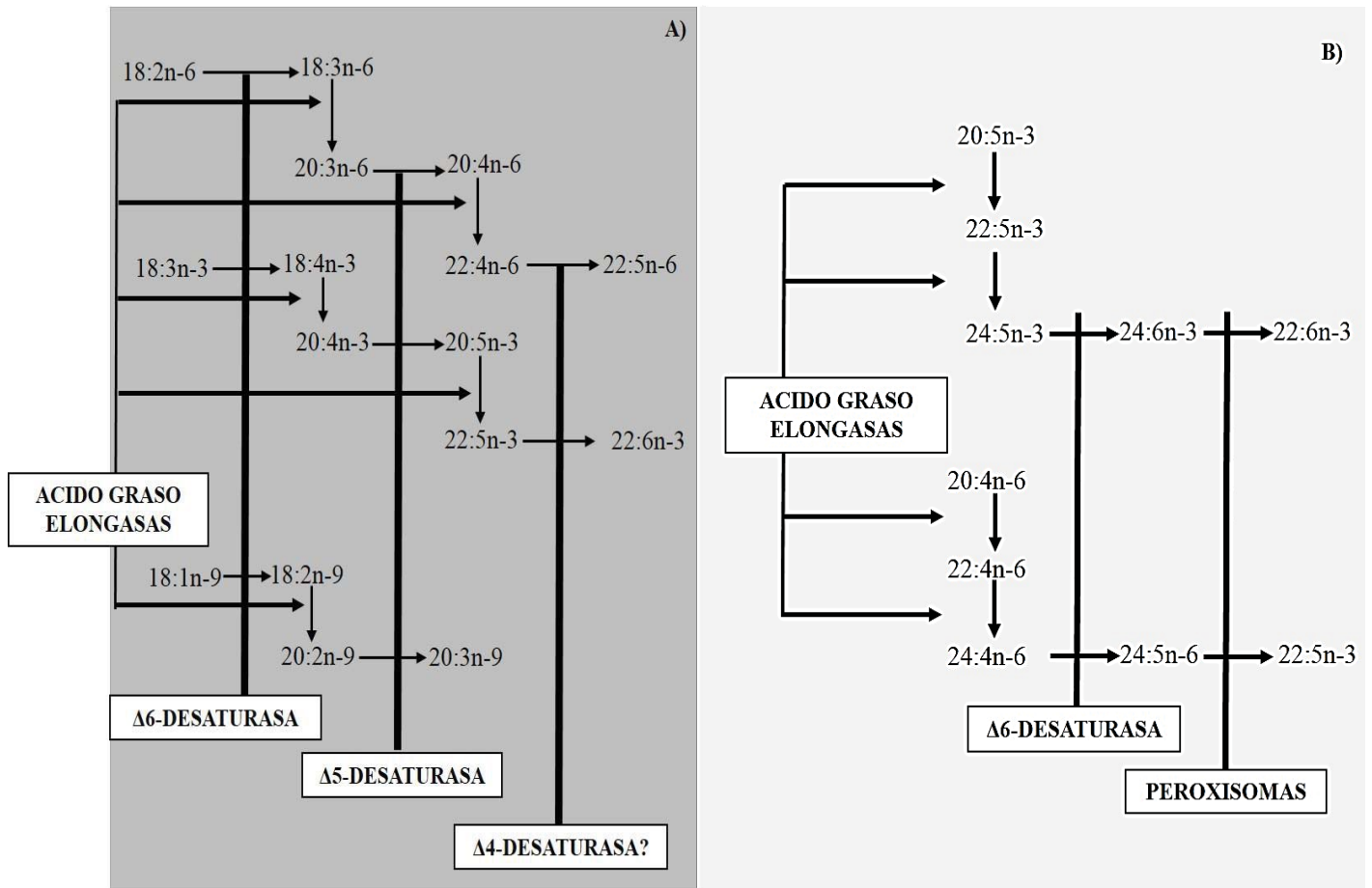


Figura 1. A) Elongación y desaturación de los ácidos linoléico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) para sintetizar ácido araquidónico (20:4n-6) y ácido eicosapentaenóico (20:5n-3). **B)** Elongación y desaturación del ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) para sintetizar ácido docosahexaenóico (22:6n-3) por medio de β-oxidación en peroxisomas (tomado de Sargent *et al.*, 1995).

El grado en el cual un animal puede realizar estas conversiones depende de las actividades relativas de las ácido graso elongasas y desaturasas Δ6 y Δ5, en sus tejidos, y estas actividades a su vez dependen de la medida en que las especies pueden o no obtener fácilmente el producto final, es decir 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3, de su dieta natural. Por ejemplo, un carnívoro extremo como el gato, que puede obtener abundante 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 preformado de sus presas naturales, parece carecer, o expresar muy baja actividad de desaturasas Δ6 y Δ5 (Rivers *et al.*, 1975).

Todos los pasos en la vía de 18:3n-3 a 22:6n-3 han sido establecidos para los peces en los hepatocitos de trucha arco iris (Buzzi *et al.*, 1996, 1997), también hay evidencia acumulada de que la misma vía se produce en los hepatocitos de salmón del Atlántico (Tocher *et al.*, 1997), la trucha marrón (*Salmo trutta*) (Tocher *et al.*, 2001a), pez cebra (Tocher *et al.*, 2001b), y en cultivo celular de carpa (Tocher y Dick, 1999). También hay un extensa evidencia basada en estudios de alimentación con radioisótopos *in vivo* de que la conversión de 18:3n-3 a 20:5n-3 y de ahí a 22:6n-3 se produce en muchas especies de peces de agua dulce de (Sargent *et al.*, 1989, 1995a, 2002.). Igualmente estudios que evidencian que la conversión de 18:3n-3 a 20:5n-3 y 22:6 n-3 se producen poco o nada en peces marinos hasta ahora estudiados (ver Sargent *et al.*, 1989, 1995a, 2002). Esta diferencia es fundamental para determinar los requisitos de ácidos grasos esenciales en la dieta de los peces. Esto refleja el hecho de que 20:5n-3 y 22:6n-3 son muy abundantes en el medio marino, originándose principalmente en diatomeas y flagelados, respectivamente, elementos a base de la red alimenticia que se transmiten a través de zooplancton a los peces. Los peces marinos por lo tanto tienen 20:5n-3 y 22:6n-3 en sus dietas naturales. En contraste, la presa natural de muchos peces dulceacuicolas, particularmente invertebrados, no son ricas en 22:6n-3, pero son ricas en 18: 2n 6, 18: 3n-3 y en menor medida de 20: 5n-3. Sin embargo, pruebas recientes con peces marinos demuestra que su situación es más compleja de lo que parece a primera vista, particularmente en términos de expresión de la actividad de las enzimas necesarias para convertir precursores PUFA de C18 a productos PUFA C22.

2.3 Alimento vivo y su enriquecimiento

Los organismos usados en la alimentación de las fases larvarias de peces y crustáceos son conocidas mediante el término de “presas vivas”, y de su utilización depende el éxito de la fase de cría larvaria en la mayoría de especies marinas. Las presas vivas constituyen un conjunto heterogéneo de organismos pertenecientes a grupos taxonómicos muy diversos dentro del fitoplancton (microalgas) y del zooplancton. El zooplancton marino comprende diversos estadios de desarrollo (larvas, juveniles y adultos) de especies pertenecientes a varios grupos filogenéticos de crustáceos (cladóceros, copépodos, etc.), moluscos (bivalvos, gasterópodos, cefalópodos, etc.), protozoos, etc.

El cultivo de especies zooplanctónicas en condiciones controladas es una de las prácticas más utilizada en larvicultura. Los alimentos vivos utilizado principalmente, son el rotífero y el nauplio de *Artemia*. Esta alternativa permite reducir el número de eslabones tróficos. Las microalgas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica. A pesar de que la mayoría de especies cultivadas de peces marinos son zooplanctívoras, el uso de microalgas es una práctica común en la cría de numerosas especies de peces marinos durante los estadios de desarrollo más tempranos (Reitan *et al.*, 1997). Algunas de las ventajas que aporta la adición de microalgas en los tanques de cría larvaria se relacionan con el aporte nutritivo que proporcionan al ser ingeridas por las larvas (Reitan *et al.*, 1994) o al enriquecer los rotíferos con los que suele combinarse su administración (Howell, 1979; Scott y Middleton, 1979; Lubzens, 1987). Además, se cree que la adición de microalgas mejora las condiciones lumínicas del medio de cultivo y el comportamiento predador de las larvas (Naas *et al.*, 1992).

El siguiente eslabón de la cadena trófica está representado por los rotíferos mixohalinos del género *Brachionus*. El tamaño de los diferentes tipos de rotíferos y la sencillez de su cultivo masivo han convertido a este organismo en el alimento vivo más utilizado para las larvas que acaban de abrir el esófago, especialmente en aquellas especies cuyas fases larvarias con tamaños particularmente pequeños.

El cultivo masivo de rotíferos, estandarizado desde hace décadas, se basa en la enorme tasa reproductiva desarrollada por estos organismos en la fase partenogenética de su ciclo

vital, favorecida por un abundante aporte de alimento, habitualmente formado por microalgas, levaduras de panificación o productos comerciales basados en microalgas secas pulverizadas ricas en nutrientes esenciales. Con estos últimos, se consiguen cultivos con densidades que superan, en ocasiones, los 1000 individuos ml^{-1} (Moretti *et al.*, 1999). Sin embargo, los rotíferos son deficientes de HUFA n-3 (Tabla II) y ricos en ácidos linolénico y linoleico, por lo que deben ser suplementados en HUFA para favorecer la metamorfosis, crecimiento y sobrevivencia de las larvas. Con el fin de corregir estas carencias nutricionales de las presas vivas se han venido desarrollando diversos procedimientos. Éstos coinciden en el aprovechamiento de la condición de filtradores pasivos de rotíferos y *Artemia*, de forma que estos organismos son incubados en medios ricos en sustancias nutritivas cuyo tamaño hace posible su incorporación en su tracto digestivo (p. ej., microemulsiones, micropartículas, microorganismos, etc.). Este proceso se conoce como bioencapsulación ya que implica la incorporación de sustancias en el interior de organismos vivos. En la práctica, la mayoría de los productos enriquecedores utilizados en las plantas dedicadas a la cría larvaria son complejos autoemulsionantes compuestos, principalmente, por aceites de pescado y, por tanto, ricos en los EFA (Ácidos grasos esenciales, por sus siglas en inglés Essential Fatty Acids) con los que se pretende enriquecer los nauplios. A estos aceites se les suele añadir ésteres etílicos de ácido graso derivados sintéticos destinados a mejorar el perfil de ácidos grasos del aceite de pescado original.

Tabla II. Contenido de ARA, EPA y DHA reportado en especies de rotífero con diferente alimentación.

Especie	ARA	EPA	DHA	DHA/ EPA	Alimento	Bibliografía
<i>B. plicatilis</i>	2.9%	16%	0.3%	0.1	Pasta de <i>N. oculata</i>	Palmtag <i>et al.</i> , 2006
<i>B. plicatilis</i>	nd	0.03%	<0.03	1.9	Levadura	Rodríguez <i>et al.</i> , 1996
<i>S. cecilia</i>	1%	6.8%	0.7	0.1	<i>Tetraselmis suecica</i>	Oltra <i>et al.</i> , 2000
<i>B. rotundiformis</i>	1.09%	0.89%	-		<i>Chlorella</i>	Yoshimatsu <i>et al.</i> , 1997
	<0.05	0.2%	0.1	1.9		Rodríguez <i>et al.</i> , 1997
<i>B. plicatilis</i>		14.2%	6.6	0.4	Protein selco®	Tocher <i>et al.</i> , 1997
<i>B. plicatilis</i>	9.6%	14.2%	1.8	0.1	<i>C. muelleri</i>	Seychelles <i>et al.</i> , 2009
	0.2%	0.7%	12.8	18.7	<i>I. galbana</i>	
	6.8%	27.3%	0.2	0	<i>Nannochloropsis</i> sp.	
<i>Brachiouunus</i> sp.		40.6 gk ⁻¹	65.8 gk ⁻¹			Maehre <i>et al.</i> , 2013
<i>B. plicatilis</i>	1.62	7.97	16.54		Protein Selco Plus®	Can Nhu <i>et al.</i> , 2009
<i>B. plicatilis</i>	1.6	2	1	0.5	Selco Culture	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>B. plicatilis</i>	0.6	3.8	0.3	0.07		Salhi <i>et al.</i> , 1997
<i>Brachiouunus</i> sp.	0.9	2	1.2	0.6	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Pousão <i>et al.</i> , 1999

El efecto de suministrar alimento vivo enriquecido a las larvas de peces ha sido probado en diversas especies como el bacalao (*Gadus morhua*) denotando que la combinación de microalga-enriquecedor favorece la supervivencia y el crecimiento larval (García *et al.*, 2008). También Bell *et al.* (1995) encontraron que los juveniles de arenque (*Clupea harengus*) alimentados con nauplios de *Artemia* suplementada con aceites deficientes en DHA, tuvieron una menor capacidad de capturar presas y un menor contenido

de DHA en su composición corporal. En larvas de esturión Persa, alimentar con *Artemia* enriquecida con elevados niveles de DHA resultó favorable para el crecimiento y sobrevivencia (Hafezieh *et al.*, 2009). A diferencia del estudio realizado por Pousão-Ferreira *et al.* (1997) donde a pesar de que el método de enriquecimiento parece ser eficiente para incorporar ácidos grasos en las larvas, los resultados muestran que las presas enriquecidas tuvieron una deficiencia de PUFA n-3 y que posiblemente no aportan los requisitos alimenticios de las larvas de pargo dorado (*Sparus aurata*). Por su parte Seychelles *et al.* (2009) después de evaluar el concentrado congelado y en fresco de 4 especies de microalgas, sugiere la mezcla congelada de las microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Pavlova lutheri* y *Nannochloropsis* sp. como un buen enriquecedor de rotífero *Brachionus plicatilis* antes de alimentar larvas de peces. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (1996) señala que al incrementar el periodo de enriquecimiento en lugar de la cantidad de aceite en el rotífero *Brachionus plicatilis*, hace más eficaz la incorporación de HUFA n-3. En este contexto, al enriquecer alimento vivo no solo es importante la fuente lipídica del enriquecedor o el periodo de enriquecimiento, además se debe considerar la presentación de los ácidos grasos que contienen.

Con el objetivo de establecer una dieta estándar de referencia para los diversos grupos de trabajo que se ocupan de la investigación en nutrición y así facilitar la comparación directa de los resultados entre laboratorios, experimentos y especies, el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES) a través del laboratorio Aquaculture & Artemia Reference Center (Gent, Bélgica) puso a disposición una serie de emulsiones experimentales para el estudio ácidos grasos altamente insaturados (HUFA n-3) requisitados en larvas de peces marinos a través de la técnica de bioencapsulación. Esta serie consta de emulsiones que difieren en la concentración de HUFA n-3 (0, 10, 30 ó 50%) con una relación constante entre el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Estas emulsiones se han utilizado para manipular las concentraciones globales (n-3) HUFA en alimento vivo, (ver Tabla III). En el presente trabajo se utilizaron las emulsiones ICES 50/0.6/C e ICES 0/-/C para suministrar al rotífero un alto y un bajo porcentaje de HUFA n-3 (sobre todo DHA), y también se realizó una dilución de ambos ICES para tener un punto de referencia intermedio (ICES 1:4).

Tabla III. Estudios recientes en los que se han utilizado las emulsiones ICES.

EMULSION	ENRIQUECIMIENTO	BIBLIOGRAFIA
ICES 50/0.6/C	Entre 0.3-0.4 g/l (<i>Artemia</i>)	Han <i>et al.</i> , 2000
50% n-3 HUFA total relación DHA/EPA=0.6	A una densidad de 500 individuos mL ⁻¹ , usando dos dosis separadas de 0.125 g/L en un intervalo de 3hrs.(Rotífero) A una densidad de 200 individuos mL ⁻¹ , usando dos dosis separadas de 0.125 g L en un intervalo de 3hrs.(<i>Artemia</i>) 0.2 g/l al iniciar el enriquecimiento y 12 horas después. A las 24 hrs se puede dar el alimento a las larvas	Nghia <i>et al.</i> , 2007 Han <i>et al.</i> , 2005
ICES 30/0.6/C 30% n-3 HUFA total Relación DHA/EPA= 0.6	Entre 0.2-0.3 g/l (Nauplio de <i>Artemia</i> y Rotífero) 2 dosis de 0.3g/l en un intervalo de 12 hrs. Sin considerar densidad A una densidad de 500 ind mL ⁻¹ , usando dos dosis separadas de 0.125 g L en un intervalo de 3hrs.(Rotífero) A una densidad de 200 ind mL ⁻¹ , usando dos dosis separadas de 0.125 g L en un intervalo de 3hrs.(<i>Artemia</i>) 0.2 g/l al iniciar el enriquecimiento y 12 horas después. A las 24 hrs se puede dar el alimento a las larvas	Han <i>et al.</i> , 2000; Hafezieh <i>et al.</i> , 2008 Coutteau y Soorgelos, 1997 Nghia <i>et al.</i> , 2007 Han <i>et al.</i> , 2005
ICES 0/-/C Ácidos grasos saturados libre de HUFA	A una densidad de 500 ind mL ⁻¹ , usando dos dosis separadas de 0.125 g L en un intervalo de 3hrs.(Rotífero)	Nghia <i>et al.</i> , 2007
ICES 30/4/C 30% n-3 HUFA total Relación DHA/EPA = 4	0.25 mg/L para zooplancton (rotíferos, cladóceros, <i>Artemia</i>)	Boersma y Stelzer, 2000

2.4 Estudios sobre la $\Delta 6$ -desaturasa

La primera desaturasa $\Delta 6$ se clonó en 1993 de la cianobacteria *Synechocystis* mediante un enfoque de expresión “gain-of-function”. En 1997, el primer gen eucariota de $\Delta 6$ -desaturasa fue clonado a partir de la planta de borraja. A diferencia de la desaturasa bacteriana, la proteína codificada por este gen, es modular y tiene un citocromo b5 unido a

la N-terminal del dominio principal de desaturación. Esta estructura modular se observó más adelante como una característica de todas las proteínas $\Delta 6$ -desaturasas aisladas de eucariotas, incluyendo las algas, musgo, plantas, hongos, los animales y humanos (Meesapyodsuk y Qiu, 2011).

En mamíferos existen dos tipos de enzimas desaturasas: estearoil-CoA desaturasas (SCD) y las desaturasas Delta 6 ($\Delta 6D$) y 5 ($\Delta 5D$). Las SCD catalizan la síntesis de ácido oleico (18:1n-9) a partir del ácido esteárico (18:0). Las $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ son enzimas claves para la síntesis de HUFA tales como el ARA (ácido araquidónico, 20:4n-6) y el DHA (22:6n-3). Estos HUFA son incorporados a los fosfolípidos, que llevan a cabo una variedad de funciones fisiológicas, incluyendo señalización de eicosanoides, la pinocitosis, la modulación de los canales iónicos, y la regulación de la expresión génica. En particular, la regulación transcripcional de desaturasas por HUFAs. En roedores, la realimentación con una dieta alta en carbohidratos después de un ayuno, aumenta rápidamente más de 40 veces, la actividad y la producción de mRNAs (ARN mensajeros) de las SCD. Por el contrario los mRNAs de las enzimas $\Delta 6$ y 5 no se ven afectados por la tasa de ayuno/realimentación, ya que, los ácidos grasos de la dieta son el mayor regulador de su expresión (Nakamura *et al.*, 2002). Análisis de bioinformática revelan una región de codificación proteica con una longitud de 445 aminoácidos que contiene todos los rasgos característicos de la enzima desaturasa, incluyendo un dominio citocromo b5, con una hemo-unión, los dos dominios transmembrana y tres regiones ricas en histidina (Jaya-Ram *et al.*, 2011).

La enzima $\Delta 6D$ ó $\Delta 6fad$ (por sus siglas en inglés, fatty acid desaturase Delta 6) ha sido extensamente estudiada en vertebrados, incluyendo los peces, ya que es la enzima limitante de velocidad implicada en la biosíntesis de HUFA. Es responsable del primer paso del proceso desaturación/elongación convirtiendo el ácido linolénico (18:3n-3) y linoléico (18:2n-6) ácido estearidónico (18:4n-3) y γ -linolénico (18:3n-6), respectivamente.

Tabla IV. Genes desaturasa $\Delta 6$ y $\Delta 5$ secuenciados para peces.

Especie	Tipo	No. GenBank	No. de AA	% Identidad con humano		Caracterización Funcional
				FADS2	FADS1	
<i>Salmo salar</i>	$\Delta 6$	AY458652	454	65	54	Zheng <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhynchus masou</i>	$\Delta 6$	AB070444454	454	63	53	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$\Delta 6$	AF30191	454	65	54	Zheng <i>et al.</i> , 2004
<i>Sparus aurata</i>	$\Delta 6$	AY05574	445	65	52	Zheng <i>et al.</i> , 2004
<i>Gadus morhua</i>	$\Delta 6$	DQ054840	447	65	51	Tocher <i>et al.</i> , 2006
<i>Scophthalmus maximus</i>	$\Delta 6$	AY546094	445	63	58	Zheng <i>et al.</i> , 2004
<i>Rachycentron canadum</i>	$\Delta 6$	FJ440238 442	442	66	52	Zheng <i>et al.</i> , 2009
<i>Dicentrarchus labrax</i>	$\Delta 6$	EU647692	445	65	52	Santigosa <i>et al.</i> , 2010
<i>Oreochromis niloticus</i>	$\Delta 6$	AB069727	445			González-Rovira <i>et al.</i> , 2009
<i>Cyprinus carpio</i>	$\Delta 6$	AF309557	444			Zheng <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmo salar</i>	$\Delta 5$	AF478472	454	64	54	Hastings <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhynchus masou</i>	$\Delta 5$	EU098126	452	65	52	-
<i>Danio rerio</i>	$\Delta 5/\Delta 6$	AF309556 444	444	64	58	Hastings <i>et al.</i> , 2001

La $\Delta 6fad$ de peces guarda un 65% de homología con el gen FADS2 del humano (Tabla IV) y los niveles más altos de expresión se han encontrado en el tejido cerebral, hígado, intestino y riñón (Seiliez *et al.*, 2001; Tocher *et al.*, 2006).

Seiliez *et al.* (2003) identificaron por primera vez en un pez marino una enzima similar a la $\Delta 6$ desaturasa a partir de ARN extraído de vísceras de juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con una dieta libre de HUFA, donde el aceite de oliva fue la única fuente lipídica. Estos autores encontraron que en peces alimentados con una dieta libre de HUFA se expresaba altamente mientras que en peces alimentados con dieta rica en HUFA disminuía la expresión.

En la corvina Nibe (*Nibea mitsukurii*) se investigó el efecto de diferentes niveles de DHA, alimento vivo enriquecido y nauplios, sobre el crecimiento y supervivencia larval, además de la expresión de los genes $\Delta 6fad$ y *elovl5*. Después de 15 días de la alimentación, la longitud total, el peso corporal y supervivencia mejoraron significativamente con la

suplementación de DHA, sin embargo el número de transcritos del gen *fad* en larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con ácido oleico fueron significativamente más elevados que cuando se alimentó con *Artemia* enriquecida con DHA, mientras que la elongasa (*elovl5*) no mostro diferencias significativas (Yamamoto *et al.*, 2010).

Morais *et al.* (2011) llevaron a cabo estudios sobre la ruta de biosíntesis de HUFA en el desarrollo temprano del atún azul del Atlántico (*Thunnus thynnus* L.), mediante clonación y caracterización funcional de cDNA. Encontraron que la $\Delta 6$ desaturasa y la elongasa *Elovl5* implicadas en la conversión de EPA a DHA aumentan su expresión durante la utilización del saco vitelino lo que sugiere que una mayor actividad de estas enzimas es importante para el desarrollo óptimo de larvas de atún en relación con la provisión de DHA adecuada para la formación de biomembranas, particularmente neural (cerebro y el ojo) y de tejidos. Izquierdo *et al.* (2008) evaluaron la capacidad de utilizar aceites vegetales y la regulación nutricional de $\Delta 6$ -desaturasa de larvas de dorada (*Sparus aurata*) cuantificando la expresión génica. Para ello utilizaron larvas de 17 días de edad posteriores a la eclosión (PE) y se alimentaron con cuatro microdietas elaboradas a partir de aceite de pescado, aceite de soja, aceite de semillas de lino, y una dieta con un contenido extra de aceite vegetal y aceite de colza. La presencia de los aceites vegetales en la dieta incrementó los niveles 20:2n-9 y 20:2n-6, 18:2n-9, 18:3n-6, 20:3n-6 y 20:4n-6 en las larvas alimentadas con semilla de colza y aceite de soja, en comparación con los alimentados con aceite de pescado. Además, la expresión relativa de $\Delta 6$ -desaturasa aumento seis veces en las larvas alimentadas con aceites de colza y de soja, lo que denota la regulación nutricional de la expresión de esta enzima para esta especie.

La sustitución de aceite de pescado en las dietas, el contenido total de PUFA dietético y su relación con la síntesis de ácidos grasos también se ha evaluado en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Thanuthong *et al.*(2011) utilizaron diversos aceites variantes en su contenido de PUFA C₁₈ y una dieta con aceite de pescado como control experimental, encontrando que: 1) la eficacia de la $\Delta 6$ -desaturasa se vio afectada negativamente por la disponibilidad de PUFA de 18C, pero el total aparente en la actividad enzimática *in vivo* era directamente proporcional a la disponibilidad de sustrato PUFA 18C; 2) la $\Delta 6$ -desaturasa

tenía una mayor afinidad hacia n-3 PUFA en comparación con los n-6 PUFA; 3) la excesiva disponibilidad de sustrato PUFA C18 podría limitar la disponibilidad de Δ -6 desaturasa para actuar en ácidos grasos C24.

Los estudios realizados por Thomassen *et al.* (2012) en el salmón del atlántico (*Salmo salar L.*) alimentados con una dieta de aceite de colza enriquecido con EPA, demuestran una mayor conversión de EPA a DHA que los salmones alimentados con relativamente altos niveles de DHA. Cuando se añadieron tanto EPA y DHA a la dieta con aceite de colza, el proceso total de desaturación, elongaciones y beta-oxidación de DHA se redujo significativamente (alrededor de 50%). Además la expresión génica mostró una inhibición significativa de los genes de las desaturasas Δ 5 y 6.

2.5 Características de *Lutjanus argentiventris*

Distribución

La familia *Lutjanidae* agrupa más de 100 especies de peces tropicales y subtropicales. La mayoría son de interés comercial, y especialmente el género *Lutjanus* ha sido objeto de diversos estudios con el propósito de evaluar su potencial en para el cultivo. Su distribución abarca prácticamente la totalidad de los biotopos marinos existentes en la zona litoral, incluyendo manglares, arrecifes, lagunas costeras, estuarios y áreas de agua dulce con salinidades de hasta 50 ppm. En todas estas áreas, los podemos encontrar desde los 30 centímetros de profundidad hasta 125 metros o más. De acuerdo a CONAPESCA, en 2012 se pescaron aprox. 4.6 toneladas del recurso pargo, producción que ascendió a \$141.7 millones de pesos, siendo Baja California Sur, uno de los cinco estados de mayor producción en México.

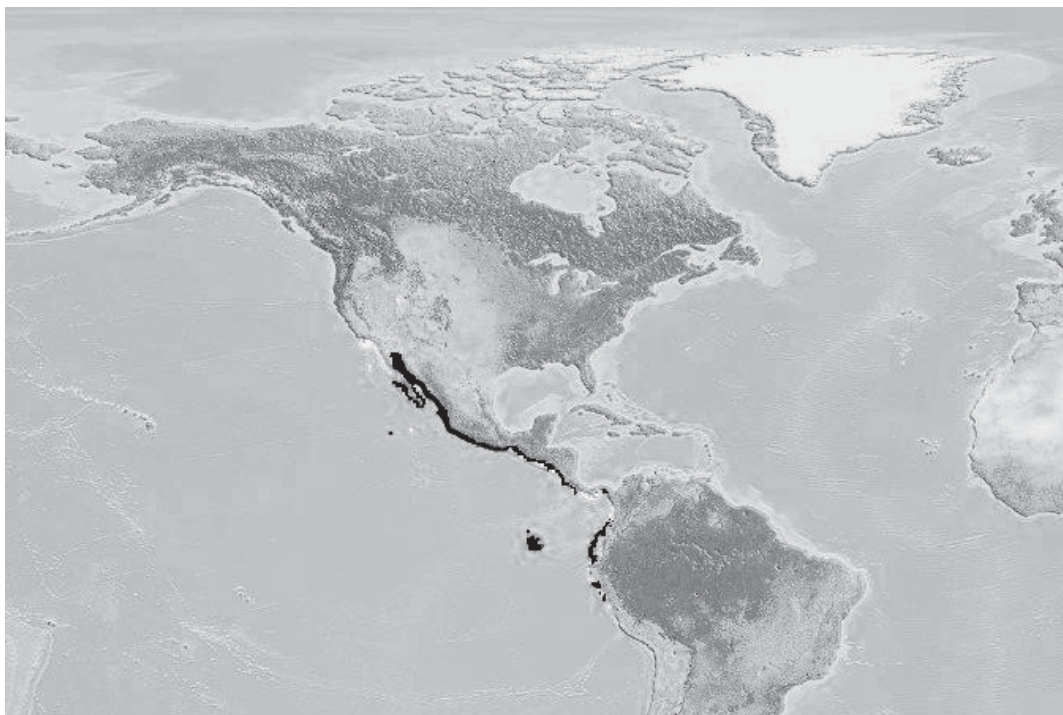


Figura 2. Distribución de *Lutjanus argentiventris* (tomado de FISHBASE.ORG)

Lutjanus argentiventris es una especie que se distribuye en el Pacífico americano desde las costas de Baja California Sur, México hasta el norte de Perú; además se localiza también en las islas Galápagos y Cocos (Allen, 1987). Su cuerpo es de color amarillo y de adultos son ligeramente rosados en su parte anterior y amarillo en su parte posterior. Los juveniles poseen una distintiva lineal azul por debajo de los ojos; llegando a desaparecer por completo con la edad. Su dieta es muy variada, destacan diversas especies de decápodos, crustáceos, peces y anfípodos (Maeda-Martínez, 1981).

Las investigaciones previas sobre esta especie se han enfocado a su distribución en el Golfo de California encontrando que *L. argentiventris* está presente en la mayoría de los sitios de manglar, durante su etapa juvenil y como pre-adultos se asocian a arrecifes someros (Aburto-Oropeza, 2009). Además existen trabajos como Guerrero-Tortolero (1997), sobre el crecimiento y sobrevivencia en jaulas del pargo amarillo en donde se demuestra la factibilidad del cultivo de esta especie. Alarcón *et al.* (2001) reportó inhibidores de proteasas; Serrano-Pinto y Caraveo-Patiño (1999), evaluaron la sobrevivencia de *L. argentiventris* a varios niveles de salinidad en condiciones de cautiverio.

Reproducción

Los pargos son organismos gonocóricos, es decir, poseen sexos separados (Allen, 1987). En Baja California Sur la etapa de desoves naturales ocurre desde finales de junio y hasta los primeros días de noviembre (Avilés-Quevedo *et al.*, 1996). También pueden ser inducidos a la maduración por medio de cambios en el fotoperíodo y mediante implantes hormonales. Existen avances con el pargo rojo *L. peru* en relación a la inducción del desove con la hormona gonadotrofina coriónica (HCG) en organismos que presentan ovocitos de un diámetro mínimo de 400 μm , es decir, que están al final de la vitelogénesis (Dumas *et al.*, 2001). En esta especie, se han reportado desoves con una fecundidad entre 15,584 ovocitos/Kg y 41,675 ovocitos/Kg de peso corporal y eclosión a las 24 h de 90% cuando los huevos estaban a una temperatura de 25°C (Pintos Terán *et al.*, 2005).

Hernández-Rauda y Aldegunde (2002) realizaron estudios sobre los cambios en los niveles de dopamina, norepinefrina y serotonina, durante el desarrollo gonadal de los machos en el pargo amarillo. Finalmente Martínez-Lagos (2003) estudio las condiciones de temperatura y fotoperíodo necesarias para la maduración gonádica y el desove del pargo amarillo.

Larvas

La calidad larval, en base a la supervivencia, crecimiento y tolerancia a stress, es crítica en la acuicultura de peces. En el pargo amarillo, *L. argentiventris* se han logrado obtener desoves sin inducción hormonal (Muhlia-Melo *et al.*, 2003), y últimamente, se han logrado producir juveniles de esta especie (J.C. Pérez-Urbiola, com. pers.). En el pargo lunarejo *L. guttatus* también se han obtenido larvas con buena supervivencia, con y sin inducción hormonal (Álvarez-Lajonchere, 2006).

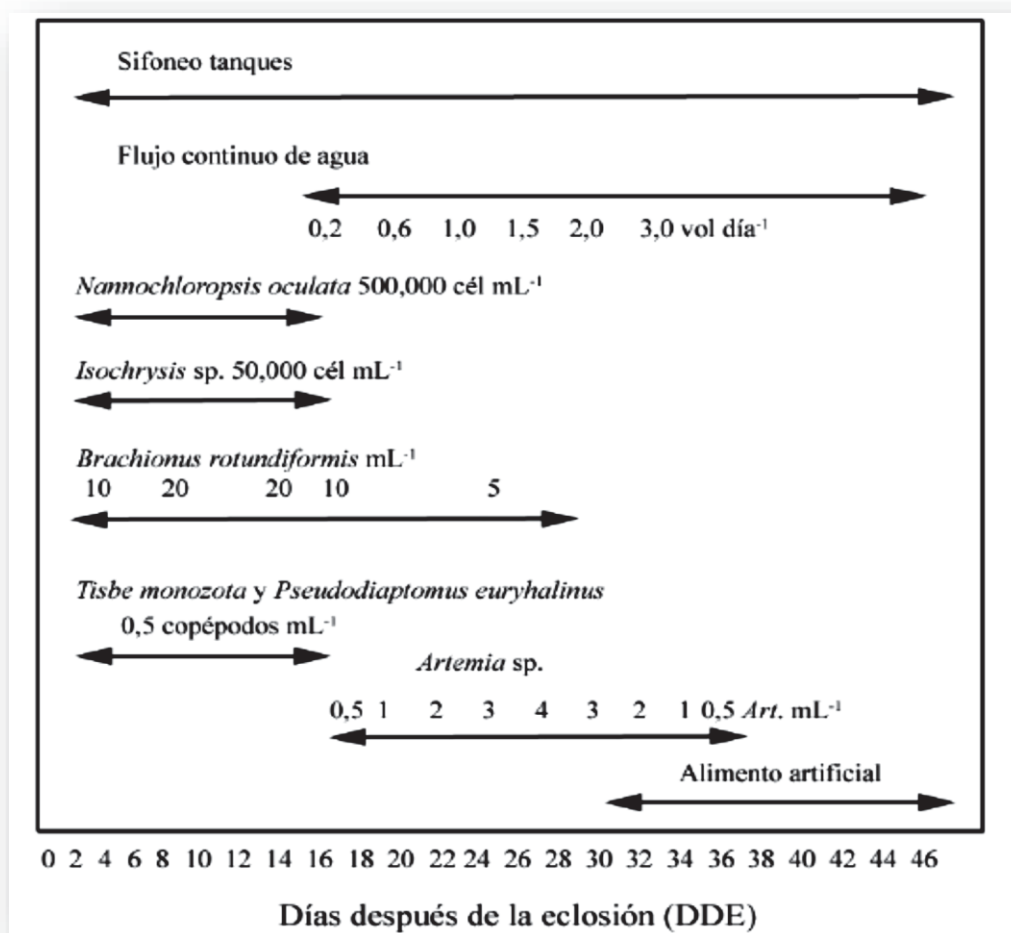


Figura 3. Esquema de alimentación y manejo de la calidad de agua utilizado en el cultivo larvario del pargo lunarejo *L. guttatus* (Tomado de Abdo-de la Parra *et al.*, 2010).

Santamaría-Miranda (2010), evaluó la composición de ácidos grasos y la calidad del desove en respuesta a las dietas de reproductores tanto silvestres como en cautiverio de tres especies de pargo: *Lutjanus argentiventris*, *L. guttatus* y *L. peru*. La comparación de estas tres especies de pargos bajo distintas condiciones de alimentación, maduración y origen permitió analizar una serie de interrogantes en relación a las variables de producción y la acumulación y utilización de acilglicéridos durante el desarrollo lecitotrófico en peces. Además se ha realizado la descripción del desarrollo embrionario y larval de *L. guttatus* que brinda una referencia del tiempo al que suceden eventos como la apertura de la boca, la aparición del ojo y la reabsorción del saco vitelino (Mejía-Narvaez *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura, no es diferente de cualquier otra actividad agropecuaria terrestre ya que su producción depende de la provisión y suministro de insumos nutrientes. El objetivo fundamental es la mayor producción por unidad de espacio y esfuerzo. Dentro de este contexto, la supervivencia de las larvas en cultivo es un aspecto esencial que está directamente relacionado con la plena satisfacción de sus requerimientos nutricionales. Hasta el momento, el desarrollo de metodologías adecuadas de alimentación durante la etapa larvaria constituye una de las principales limitantes en el cultivo de varias especies de peces marinos. Debido en gran parte, a la necesidad de asegurar la ingestión de alimento, así como a las particularidades del sistema digestivo características de la etapa larval, las cuales implican una diferenciación estructural y funcional, relacionados con la evolución de los procesos enzimáticos y finalmente con los mecanismos de absorción de los nutrientes (Lazo, 2000).

El papel de los lípidos en la nutrición de peces ha cobrado mayor importancia en los últimos años debido a la producción y aplicación de dietas con un alto contenido en lípidos, y energéticamente densas. Las mejoras en el crecimiento, la eficiencia de la utilización del pienso y la retención de nutrientes en los peces alimentados con este tipo de dietas con alto contenido energético benefician al acuicultor, dando un período de crecimiento más corto (Sargent *et al.*, 2002). A pesar de su elevado precio, el aceite de pescado sigue siendo utilizado en gran medida para satisfacer los requerimientos lipídicos en los alimentos acuícolas. Ya sea por su familiaridad con el producto o la percepción de que es la mejor fuente de lípidos para el cultivo de peces, en particular especies carnívoras marinas. La característica principal del FO es su alto nivel de los ácidos grasos altamente insaturados n-3 (HUFA n-3), que se sabe que son esenciales para un óptimo crecimiento.

Debido a la demanda global de FO en la actualidad es prioritario para la industria de alimentos acuícolas, encontrar y poner en práctica alternativas sostenibles al FO. El desafío para la producción de peces es mantener, o mejorar, los beneficios reconocidos de los peces para la salud humana y al mismo tiempo buscar maximizar la sostenibilidad, la salud y los beneficios económicos de la piscicultura. En los últimos años, se han llevado a cabo una

intensa actividad de investigación a nivel mundial para evaluar las fuentes alternativas de lípidos (Naylor *et al.*, 2000; Worm *et al.*, 2006).

Para determinar qué regula la síntesis de HUFA, cómo puede ser optimizada la capacidad de biosíntesis en peces y hacer más efectivo el uso de aceites vegetales como alternativas al FO, recientemente las acil graso desaturasas, enzimas críticas en las rutas de biosíntesis de HUFA de cadena larga (20,22 C) partir de PUFA de cadena más corta (18C), se han clonado para numerosas especies de teleósteos. En peces anádromos y dulceacuícolas se han aislado las $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa, mientras que para peces marinos únicamente la $\Delta 6$.

Este estudio busca aportar información sobre la expresión de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, y determinar la influencia que tienen sobre ésta, los diferentes niveles de DHA presentes en el alimento suministrado en larvas de *Lutjanus argentiventris*, un pez marino de importancia comercial en la región y con potencial de cultivo.

4. HIPÓTESIS

Si existe expresión de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa en larvas de *L. argentiventris*, los niveles elevados de DHA suministrados en la dieta, tendrán un efecto negativo sobre la expresión. Por el contrario, si la dieta cuenta con ácidos grasos precursores de DHA, la biosíntesis de ácidos grasos insaturados será beneficiada a través del aumento en la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa.

5. OBJETIVO

Determinar si existe expresión de la enzima Δ -6 Desaturasa en larvas de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* y si dicha expresión es regulada por la concentración de DHA en la dieta.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cuantificar la expresión basal de Δ 6fad en huevos, larvas recién eclosionadas y larvas no alimentadas de *Lutjanus argentiventris*.
- Medir la expresión génica de Δ 6fad en larvas *L. argentiventris* alimentadas con rotíferos enriquecidos con diferentes niveles de DHA.
- Evaluar el efecto de suministrar rotífero enriquecido con diferentes niveles de DHA, sobre la composición lipídica, el tamaño y la sobrevivencia de las larvas alimentadas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Reproductores y desove

Se utilizó un desove natural proveniente del stock de reproductores de pargo amarillo mantenidos en un estanque supralitoral en las instalaciones de CIBNOR, se trata de un estanque rustico recubierto de liner plástico negro con un área de 50 m² y con 2 m de profundidad con aireador eléctrico de inyección de aire de 2 hp (Aquatic Ecos-System Orlando Fl, USA) y flujo de agua de mar filtrada mediante un sedimentador, filtro biológico y filtro de arena. La temperatura del agua de este estanque oscilo entre los 25-27°C durante la época y la salinidad fue la que prevalecía en el ambiente 35ups; el oxígeno se mantuvo entre 5-7 mg/L.

El lote de reproductores se conformó de 22 organismos (9 hembras y 13 machos) , el desove con el que se trabajo fue colectado el día 11 de julio de 2012, con ayuda de un colector instalado en la salida de agua del estanque, una vez que se trasladó al laboratorio y se tamizó con una malla de 300µm, se enjuagaron con agua marina limpia y se colocaron en una probeta de vidrio (1000ml) con suficiente agua , y solo se utilizaron los huevos que flotaban (90 ml), el porcentaje de eclosión fue calculado de acuerdo a Martínez-Lagos (2003), es decir, seleccionando 100 huevos (huevos viables) y colocándolos en placas ELISA, con agua de mar en cada poro, y posterior a 12 hrs, se contabilizó los poros donde había embriones, el conteo se realizó por triplicado. El porcentaje de eclosión se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ eclosión} = \frac{\text{No de huevos eclosionados}}{\text{No huevos totales- huevos s/embrión}} * 100$$

7.2 Alimento Vivo

7.2.1 Emulsiones y enriquecimiento de rotífero.

Las emulsiones para enriquecer el rotífero, se adquirieron del laboratorio Aquaculture and Artemia Reference Center (Universidad de Gent, Bélgica), estas emulsiones experimentales están elaboradas según lo dispuesto por el Working Group on the Mass Rearing of Juvenile Fish de ICES (International Council for the Exploration of the Sea). La primera emulsión ICES 0/-/C está elaborada a partir de aceite de coco y se compone principalmente por triglicéridos, la segunda emulsión ICES 50/0.6/C está basada en etil-esteres de aceite de pescado, contiene 500mg de HUFA n-3 (peso seco) y posee una relación DHA/EPA cercana a 0.6 (ICES, 1994). A partir de estas emulsiones se realizó una dilución de ambas a fin de obtener un punto intermedio entre ICES 0 e ICES 50, resultando así ICES 1:4 que consiste en la mezcla de 20 g de ICES 0 y 5g de ICES 50. Todas estas emulsiones se mantuvieron en ultracongelación (-80°C) hasta ser usadas, para evitar la oxidación de los aceites.

Tabla V . Composición de ácidos grasos (%) de las emulsiones ICES utilizadas para enriquecer rotífero.

AG	ICES 0/-/C	ICES 50/0.6/C
14:0	6.1	0.6
16:0	13.7	8.8
18:0	5.5	4.9
16:1n-9	0.9	0.5
16:1n-7	3.5	3.6
18:1n-9	34.8	25.3
18:1n-7	6.7	3.9
20:1n-x	0.8	2.0
18:3n-3	13.0	13.9
20:4n-6	1.8	1.6
20:5n-3	2.1	14.6
22:6n-3	0.1	7.7
∑ SAT.	25.8	14.9
∑ MON.	48.8	40.3
∑ PUFA	25.4	44.9
∑ HUFA	5.8	27.1
DHA/EPA	0.02	0.53

MON=ácidos grasos monoinsaturados; PUFA=ácidos grasos poliinsaturados (todos los AG con dobles enlaces); HUFA= ácidos grasos altamente insaturados (AG con 4 o más dobles enlaces);

20:1n-x es la suma de 20:1n-11+20:1n-9+20:1n-7; DHA=22:6n-3 y EPA=20:5n-3 (Tomado de Palacios *et al.*, 2004).

El enriquecimiento se llevó a cabo en un volumen de 20Lts y de acuerdo a lo sugerido por Han *et al.* (2005) se adicionó 0.2 g/l de ICES en dos dosis, una 24 hrs. y otra 3hrs. antes de alimentar a las larvas. Una vez enriquecido el rotífero se filtró debidamente con un tamiz de 30µm cuidando quitar todo el excedente de agua.

7.3 Diseño experimental

El experimento fue montado en el laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos, se adaptaron 20 contenedores rectangulares de fibra de vidrio con capacidad de 35Lts, con aireación y se llenaron con agua de mar a una temperatura de 35°C, 35 UPS y 5mg/L de oxígeno, los parámetros fueron monitoreados diariamente durante el experimento.

Se utilizó un sistema de 5*5, donde se incluyeron :1) un control positivo de larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Nannocloropsis oculata* (*N. oculata*), 2) un control negativo de larvas no alimentadas (IN), 3) un tratamiento de larvas alimentadas con rotífero enriquecido con la emulsión libre de DHA (ICES 0); 4) un tratamiento de larvas alimentadas con rotífero enriquecido con un elevado nivel de DHA (ICES 50), y un tratamiento de larvas alimentadas con rotífero enriquecido con una dilución de ICES 0 e ICES 50 (ICES 1:4). Cada uno de estos tratamientos y controles constó de 5 réplicas, en cada una se sembró 3ml de huevos viables, se sifoneo con una varilla de 5 mm el fondo de los recipientes 24 hrs después de la eclosión para limpiar los residuos coriónicos y huevos no eclosionados. A las 48 hrs, después de la eclosión se colocó la primera alimentación, de acuerdo al esquema de alimentación planteado por Abdo-de la Parra *et al.* (2010) se suministró 10 rotíferos mL⁻¹.

El experimento se corrió hasta que las larvas del control negativo murieron (IN), con el fin de poder comparar el mismo número de muestras para los demás tratamientos, por lo que el bioensayo se terminó transcurridas 168 hrs, posteriores a la eclosión.



Figura 4. Instalaciones donde se llevó a cabo el bioensayo

7.4. Muestreos

Los muestreos para análisis moleculares, FAME y crecimiento se realizaron únicamente en tres de las cinco réplicas de cada tratamiento, las dos restantes no fueron muestreadas hasta el final del tratamiento, después de contabilizar las larvas vivas.

7.4.1 Análisis moleculares

Para realizar los análisis moleculares se colectó 100-150 mg de huevos y larvas. La muestra de huevos (H) fue tomada por triplicado, del total de huevos viables del desove, previo a la siembra de huevos en las unidades experimentales. También, se colectó muestra de larvas recién eclosionadas (E). Una vez que se dio la primera alimentación a las larvas, se colectó 1 muestra de cada una de 3 de las réplicas de los tratamientos, este muestreo se repitió hasta el término del experimento, dejando un intervalo de 48Hrs entre cada muestreo (D1, D2, D3) de acuerdo al esquema que se aprecia en la figura 6. Todas las muestras fueron debidamente filtradas, quitando el excedente de agua marina y posteriormente se colocaron en tubos Eppendorf con 500 μ l de RNA LATER (Ambion, USA) se etiquetaron y almacenaron en ultra congelación (-80°C), hasta llevar a cabo la extracción de RNA.

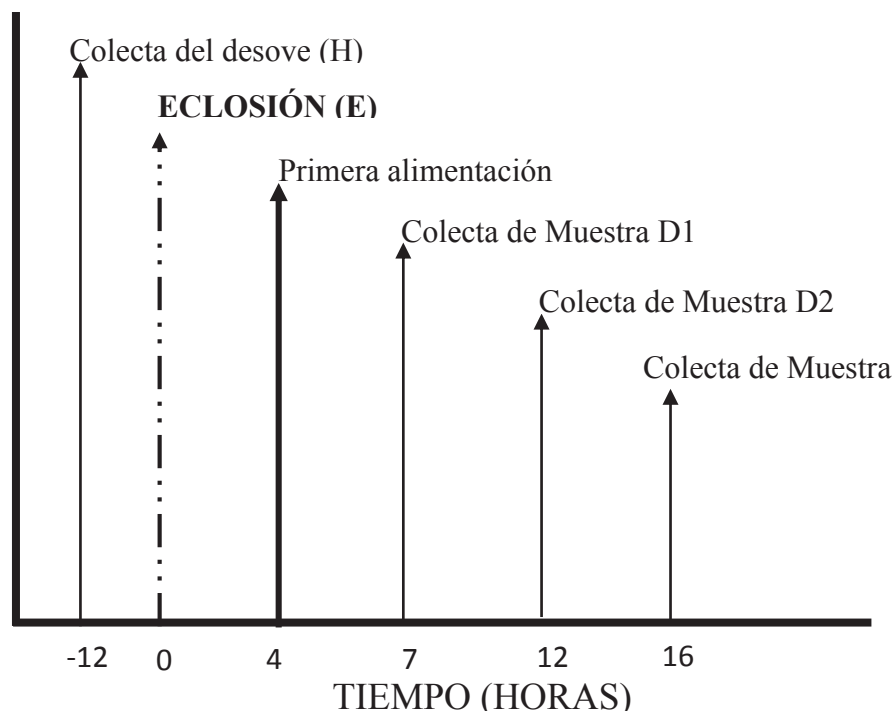


Figura 4. Orden cronológico del muestreo de larvas para los análisis moleculares de huevos y larvas alimentadas.

7.4.2 FAME

Al término del bioensayo se filtró toda el agua con un tamiz de 80 μ m reteniendo únicamente las larvas, se retiró todo el exceso de agua con ayuda de una pipeta Pasteur, y posteriormente estas muestras secadas con bomba de vacío y filtros de fibra de vidrio. Posteriormente los filtros fueron colocados en viales de cristal y se agregaron 6ml de solución Folch.

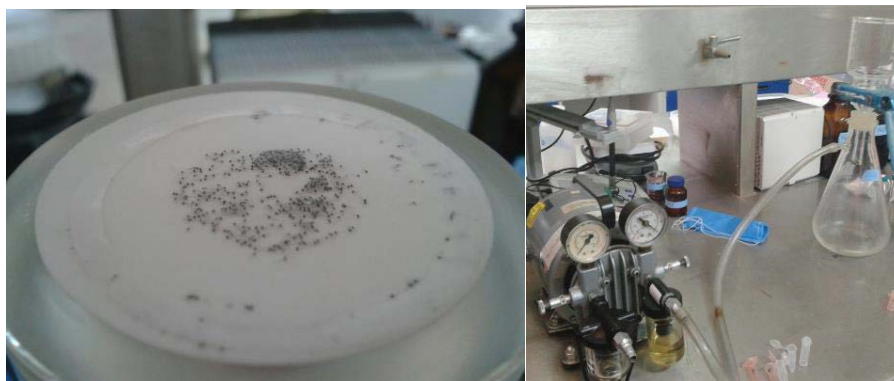


Figura 5. Secado de la muestra de larvas para análisis de Ácidos Grasos totales.

7.4.3 Crecimiento

Diariamente se colectaron 30 larvas vivas de cada tratamiento, cuidando que la notocorda no sufriera ningún daño, se colocaron en un porta objetos excavado y se realizaron observaciones con un microscopio óptico (OLYMPUS Bx4, MediaCybernetics ®). Se capturaron imágenes utilizando una cámara digital (cool SNAP-Pro Colour MediaCybernetics ®) montada sobre el microscopio y las imágenes fueron procesados con el software Image-Pro Plus versión 5.0 (MediaCybernetics ®) a través del cual se obtuvo el diámetro de huevo (DH) y de la gota lipídica (DGL) para el caso de los desoves y la longitud notocordal (LN) y se calculó el volumen del saco vitelino, de acuerdo a Blaxter y Hempal (1966):

$$\text{Volumen del Saco Vitelino (mm}^3\text{)} = \pi/6LH^2$$

Donde:

L= Longitud del saco vitelino

H=Altura del saco vitelino

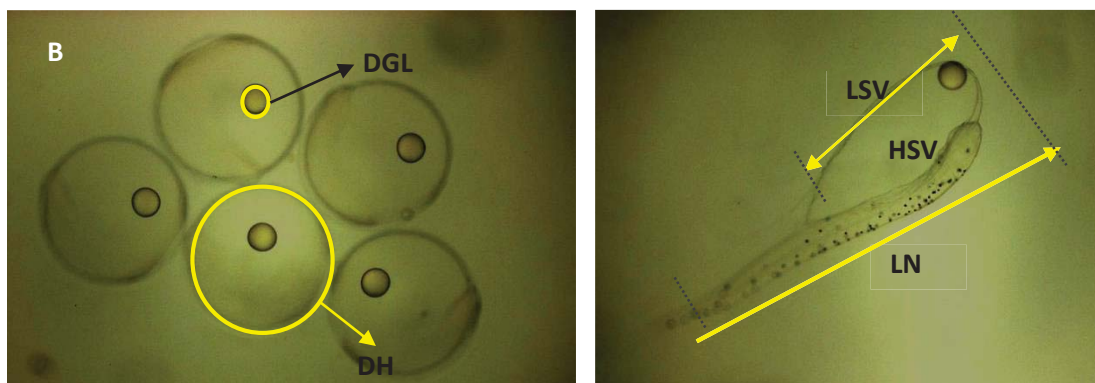


Figura 6. Mediciones morfométricas para huevos (A) y larvas (B) de pargo amarillo DH= Diámetro de huevo, DGL= diámetro de la gota lipídica; LN= longitud Notocordal, HSV= altura del saco vitelino, LSV=longitud del saco vitelino

7.4.4 Supervivencia

El porcentaje de supervivencia (% S) se evaluó al final del experimento, contando las larvas presentes en los tanques replica reservado para esta medición (a las 168hrs PE), y se calculó aplicando la ecuación:

$$\% S = (N^{\circ} \text{ final larvas} / N^{\circ} \text{ inicial larvas}) * 100$$

El número inicial de larvas se determinó tomando en cuenta el número de huevos sembrados y el porcentaje de eclosión.

7.5 Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (FAME)

La extracción de lípidos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Arjona y Palacios (2009): se colocaron las muestras de larvas o rotíferos libre de humedad, en 6 ml de solución Folch (cloroformo: metanol, 2:1 v/v), posteriormente se agregaron 10 μ L del ácido graso 23:0 (2mg/mL) como estándar interno y 10 μ L de antioxidante (5mg de BHT en 10 mL de CHL_3). Las muestras se sometieron a homogeneización por sonicación (Sonicator BRANSON 2510, Danbury, CT, USA) en baño con hielo durante 15 minutos y se agitaron usando un vortex. Se separaron 3 mL de cada muestra y se evaporaron por completo a una temperatura $<30^\circ\text{C}$, se derivatizaron con BF₃ (Trifloruro de Boro al 14% en metanol) a 90°C durante 15 minutos, al enfriarse se les agregó 1 mL de Hexano y se agitó (con Vortex), posteriormente se realizaron de 3 a 4 lavados, que consistieron en adicionar 1 ml de agua bidestilada para retirar las impurezas del hexano, donde se encontraban los metil ésteres de ácidos grasos (FAME), centrifugando a 2000 rpm a 5°C (Centrifuga refrigerada Allegra® 21R, Beckman Coulter, Fullerton, CA. USA) después de cada lavado, se retiró la fase de metanol y se agregó agua destilada, se agitó y posteriormente se repitió el lavado al menos cuatro veces en el caso de larvas, y tres veces para las muestras de rotíferos. Después de los lavados se almacenaron los viales a -20°C , para su congelación (al menos 2 hrs), se apreció una fase congelada (agua) y una fase acuosa (lípidos), sin descongelar el agua se separaron los lípidos con pipeta Pasteur y se traspasó a viales ámbar cada muestra. Las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies Mod. 7820A) y se utilizó una columna D0-23 Agilent J8W. Los FAME fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de estándares externos (Sigma, Bellefonte, PA, USA). La determinación cuantitativa de los ácidos grasos se realizó integrando las áreas de cada uno (programa HPCHEM, de Agilent Technologies, Shanghai, China) y comparando con el área del estándar interno por medio de un macro en el programa Excel.

7.6 Análisis Moleculares

7.6.1 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Se extrajo RNA de 45 muestras de larvas de pargo amarillo, utilizando el kit de RNA isolation de Wizard (PROMEGA, USA), este kit incluye el tratamiento de DNAsa. El RNA total extraído se resuspendió en un volumen de 40 μ L de agua DEPC y se cuantificó mediante un nanofotómetro. Se almacenó en tubos Eppendorf a -80°C para conservar su integridad. Una vez determinada la concentración de RNA en nanogramos/microlitro y su pureza, se procedió a realizar la transcripción reversa del mismo a ADN complementario (cDNA). La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando 5 μ L de RNA tratado con DNAsa de cada muestra colectada siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit de Improm II (PROMEGA, USA).

7.6.2 Diseño de Oligonucleótidos para detección del gen $\Delta 6\text{FAD}$

Para el diseño de oligonucleótidos de la $\Delta 6$ -desaturasa se utilizó la herramienta BLAST (NCBI) para alinear las secuencias de mRNA del gen ($\Delta 6\text{FAD}$) de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* obteniendo un 91% de similitud, y las siguientes secuencias degeneradas, que se utilizaron como primers las secuencias que se indican en la Tabla V.

Tabla VI. Oligonucleótidos diseñados para la detección del gen $\Delta 6\text{fad}$.

Gen	Oligonucleótidos	Longitud (pb)
$\Delta 6\text{fad}$	DIR 5' CATCARCCACTATGCTGGAGAG 3'	22 pb
	REV 3' TTGTTCTTCTGCCTCCACCTGG 5'	22 pb

7.6.3 PCR preparativa y clonación

Se corrió una PCR con una de la muestras de cDNA obtenido de 25 μ l por reacción, tratando de amplificar tanto la desaturasa como el gen de referencia EF1 α (Factor de elongación 1 α).utilizando los oligonucleótidos de la tabla VI Al término de la reacción se corrió una electroforesis en gel de agarosa para observar la amplificación de cada uno de los genes.

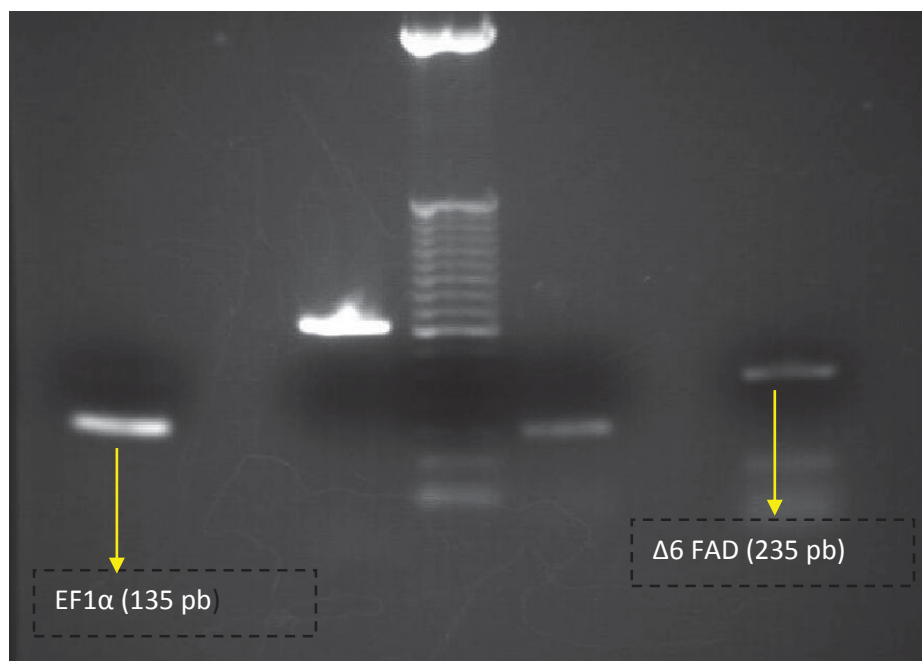


Figura 7. Amplificación de cDNA por PCR, donde se detectaron los genes $\Delta 6$ FAD Y $EF1\alpha$, en la muestras de larvas de *Lutjanus argentiventris*.

Los fragmentos amplificados por PCR (Fig. 9) fueron cortados en un transiluminador de luz UV y purificados a partir del gel de agarosa con el protocolo GENECLEAN (MPI, USA). Para esto nos auxiliamos de un termoblock APOLLO y una centrifuga Eppendorf. Al término de la purificación fueron reamplificados los genes para corroborar el resultado. Posteriormente se procedió a clonar los fragmentos amplificados en plásmidos. La clonación de fragmentos se realizó de acuerdo a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen n° K4550-40). Se eligieron dos colonias positivas por caja de Petri, se colocó aproximadamente la mitad de cada colonia en un tubo Falcon con 10 mL medio LB adicionado con ampicilina (50 μ g/mg) y se dejaron incubar con agitación horizontal constante (60rpm) a 37°C toda la noche. A partir de las células de este cultivo se tomaron 2 mL del medio, se centrifugó en tubos eppendorf por 1 minuto a 10000 rpm; y se eliminó el sobrenadante, esto se realizó 4 veces. Por último se procedió a la extracción de ADN plasmídico con el kit RPM (BIO 101).

7.6.5 Secuenciación

Los plásmidos con el fragmento inserto fueron secuenciados en Genewiz, N. J., USA. De donde se obtuvieron las siguientes secuencias que se muestran en la tabla VI.

Tabla VII. Secuencias parciales de los genes $\Delta 6fad$ y $EF1\alpha$ de *Lutjanus argentiventris*.

Gen	Secuencia	Longitud (pb)
$\Delta 6fad$	GCTTTTCNTCCTGATTTAAAGTTTGCGCAAAAGTTTCTGAAGCCTTTG ATGATTGGAGAGCTGGCAGCGACGGAGCCCAGCCAGGACCGGAACA AAAATGCAGCGATCATACGGGATTTCCACACTTTACGAAATCGGGTG GAGCGTGAGGGTCTGTTTGAAGCTCGGCCTTTGTTCTTCTGCCTCCA CCTGGA	194
$EF1\alpha$	GCTTCGAGGAAATCACCAAGGAAGTGAGCACCTACATCAAGAAGATC GGTTACAACCCCGCCGCTGTTGCCTTCGTCCCCATCTCTGGATGGCA CGGAGACAACATGCTGGAGACCAGTGACAAGATGAGCTGGTTCAAG GGATGGAAGGTTG	153

7.6.6 Diseño de Oligonucleótidos para qPCR $\Delta 6FAD$ y $EF1\alpha$.

A partir de las secuencias específicas obtenidas se diseñaron los primers para la validación por q-PCR (Tabla VII), utilizando el software OLIGO CALCULATOR y PRIMER3 (v. 0.4.0), estos se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla VIII. Oligonucleótidos específicos de los genes $EF1\alpha$ y $\Delta 6fad$ de *Lutjanus argentiventris* diseñados para q-PCR.

Gen	Primer	Longitud (pb)
$EF1\alpha$	Dir 5'CTCATCTTGTCACTGGTCTCCA 3'	22 pb
	Rev 5'AGGAAATCACCAAGGAAGTGAG 3'	21 pb
$\Delta 6fad$	Dir 5'AGC CTT TGA TGA TTG GAG AGC 3'	21 pb
	Rev 5'AGG TGG AGG CAG AAG AAC AAA 3'	22 pb

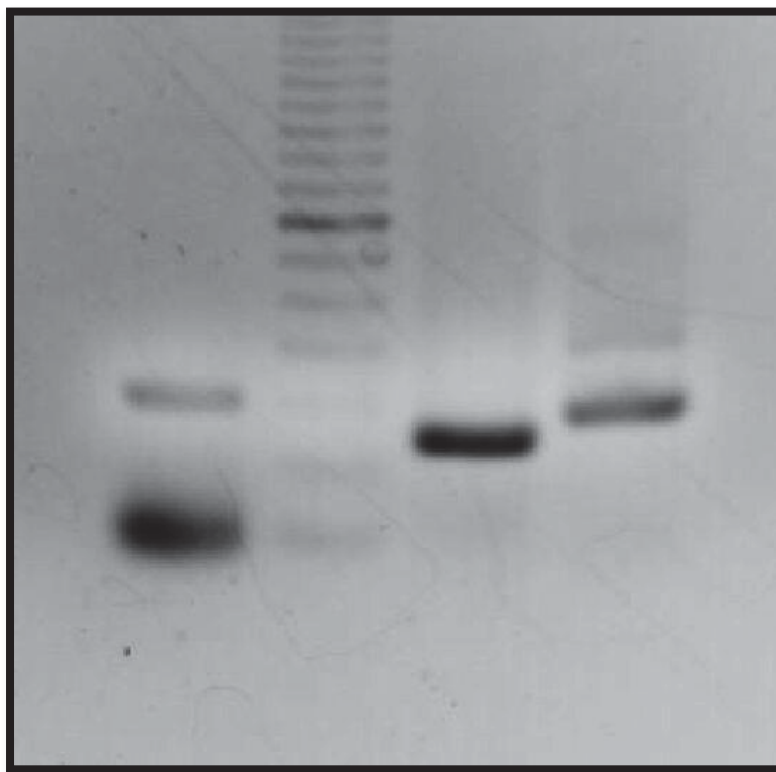


Figura 8. Amplificación de cDNA por PCR, donde se corrobora los primers para $\Delta 6FAD$ Y $Ef1$

7.6.7 Análisis qPCR

Se realizó una curva estándar con los genes ($Ef1\alpha$ y $fad\Delta 6$) a partir de cDNA para determinar el rango dinámico de detección de la reacción, y de esta forma establecer el ciclo al que cada una de las diluciones alcanza su umbral de detección (C_q) con un aproximado 100% de amplificación. Una vez obtenida la dilución exacta a la cual el cDNA alcanza el mejor nivel de amplificación, se procedió cuantificar la cantidad de transcritos en cada una de las muestras de los grupos. Para calcular el número de transcritos en las muestras para cada gen, se utilizó el software llamado CFX manager (Bio-rad®).

El análisis de qPCR se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por el SYBR® Green que es un intercalibrador que se une al producto de la PCR (Bustin *et al.*, 2009) La curva resultante refleja en su fase exponencial la cantidad inicial del templado y ésta se cuantifica comparando el número de ciclos de amplificaciones que se requiere para

alcanzar cierto límite (*threshold*) de fluorescencia lo cual se denomina como ciclo de cuantificación (Cq) (Kubista *et al.*, 2006).

7.7 Análisis estadístico de los parámetros de crecimiento y desarrollo embrionario.

Después de hacer las pruebas de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis de varianza de dos vías (Tratamiento, tiempo) a fin de determinar diferencias significativas en la expresión del gen $\Delta 6fad$, se aplicó una prueba de Tukey para comparar entre medias cuando se observaron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%. Para los datos de crecimiento, supervivencia, concentración de FAME, se realizó un ANOVA de 1 vía. Se realizaron análisis de correlación entre los datos que mostraban tendencia lineal, se calculó el coeficiente de Pearson y se calculó el valor de p para todos los casos. Todos los análisis se realizaron usando el Software STATISTICA 7.0. Para realizar las gráficas correspondientes se utilizó la plataforma SIGMAPLOT 11.0.

8. RESULTADOS

Tabla IX. Parámetros morfométricos y porcentaje de eclosión medidos inicialmente en el desove dentro de 5hrs posteriores a la colecta.

Diámetro de Huevo	$786.2 \pm 5.8 \mu\text{m}$
Diámetro de Gota Lipídica	$148.1 \pm 5.7 \mu\text{m}$
Volumen Total	$254.5 \pm 5.7 \mu\text{m}^3$
Volumen Gota Lipídica	$1.71 \pm 0.12 \mu\text{m}^3$
Volumen del Saco Vitelino	$156.3 \pm 23.0 \mu\text{m}^3$
% Eclosión	96.4 ± 2.8

En la tabla IX se observan las medidas morfométricas cuantificadas en el desove utilizado en este trabajo, estos datos se incluyen como parte de los resultados ya que se consideran importantes para inferir las condiciones de calidad del desove.

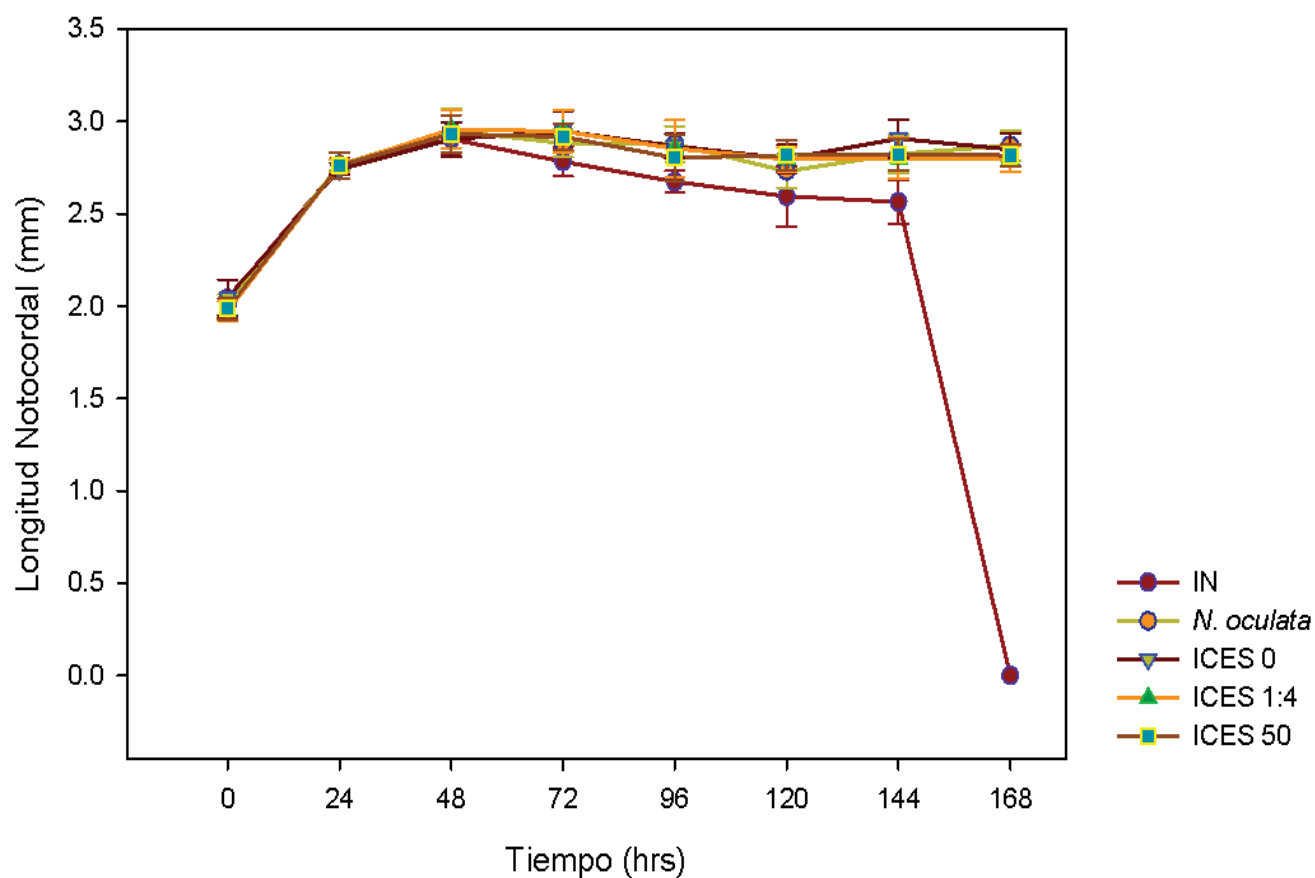


Figura 9 .Longitud Notocordal de larvas de *Lutjanus argentiventris* desde la eclosión hasta el término del experimento.

En la figura 9 se observa la evolución de la longitud notocordal, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos alimentados con rotífero, únicamente el tratamiento de inanición empieza a disminuir significativamente a partir de las 96 horas.

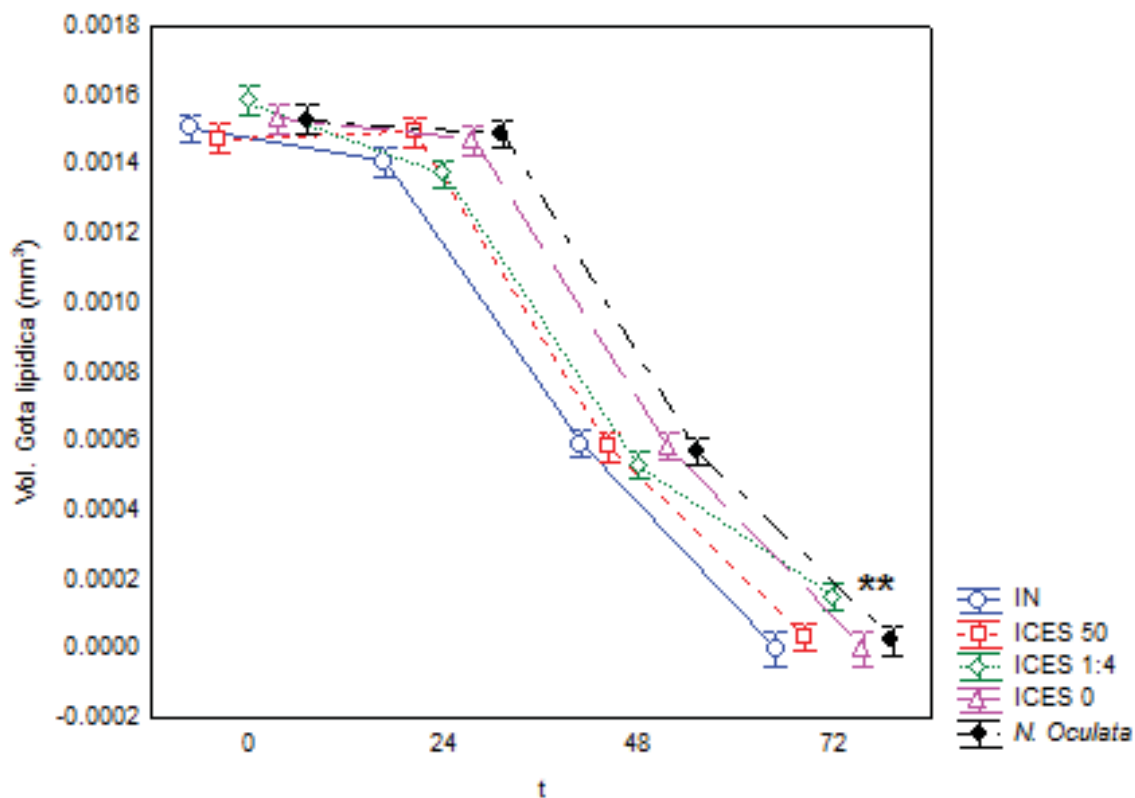


Figura 10. Evolución del volumen de la gota lipídica de larvas de *L. argentiventris* alimentadas con diferentes niveles de DHA. ** representa diferencias significativas.

En la figura 10, se aprecia que inicialmente no existe diferencia significativa en el volumen de gota lipídica ($p > 0,05$), dado que todos los huevos provenían de un mismo desove, sin embargo a las 72 h posteriores a la eclosión el tratamiento ICES 1:4 es significativamente mayor a los demás grupos, incluso para los tratamientos de IN e ICES 0 se había agotado totalmente la gota lipídica a lo que se atribuyó un valor de 0.

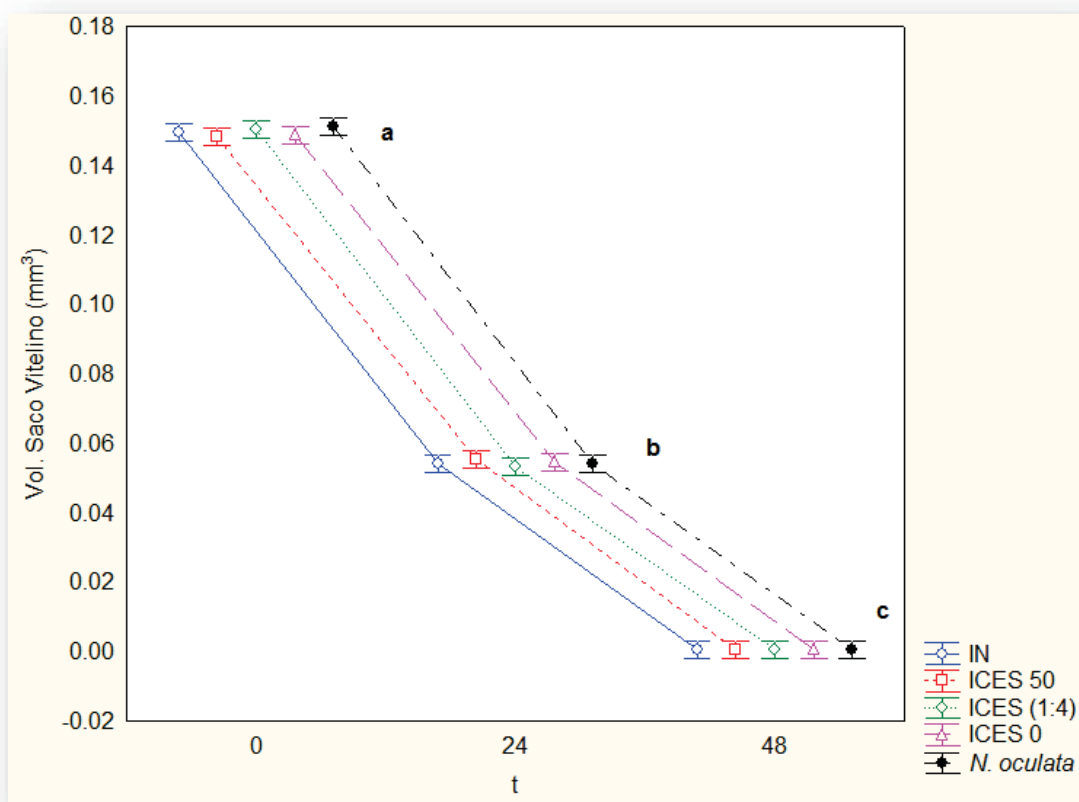


Figura 11. Evolución del volumen del saco vitelino en larvas de todos los tratamientos durante las 48 horas posteriores a la eclosión.

Respecto a la variación del volumen del saco vitelino, como se observa en la Figura 11, no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos, y a las 48 horas post eclosión, todos los tratamientos habían agotado totalmente sus reservas vitelinas.

Cuantificación de transcrito del gen $\Delta 6fad$ en huevos y larvas en ausencia de DHA.

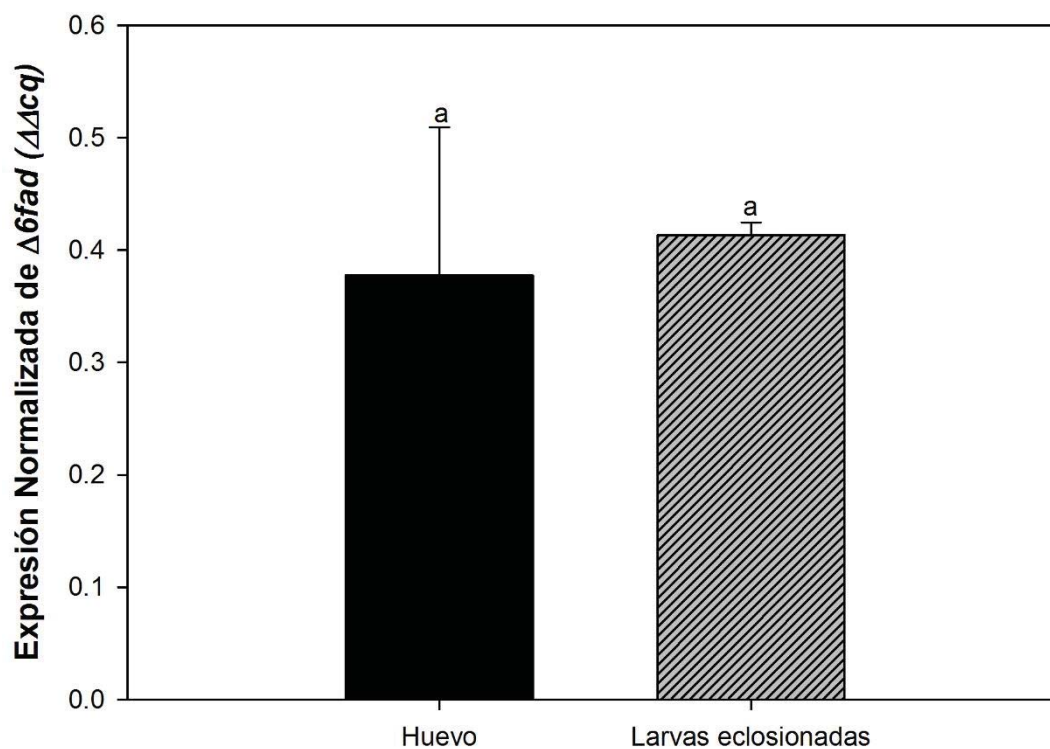


Figura 12. Expresión normalizada (media y desviación estándar) de $\Delta 6$ -desaturasa ($\Delta 6fad$) en huevos y larvas recién eclosionadas .

De acuerdo al primer objetivo se cuantificó la expresión de $\Delta 6fad$ en huevos y larvas recién eclosionadas. Los resultados muestran que si existe expresión $\Delta 6fad$ en las primeras fases del desarrollo embrionario aun cuando su valor promedio fue menor a 1 (0.37 y 0.41 respectivamente). Y esta no mostró un aumento significativo ($p=0.15$) en el momento de la eclosión, la prueba *a posteriori* de Tukey mostró que no existe un aumento significativo de expresión durante las primeras 12 hrs. del desarrollo larval.

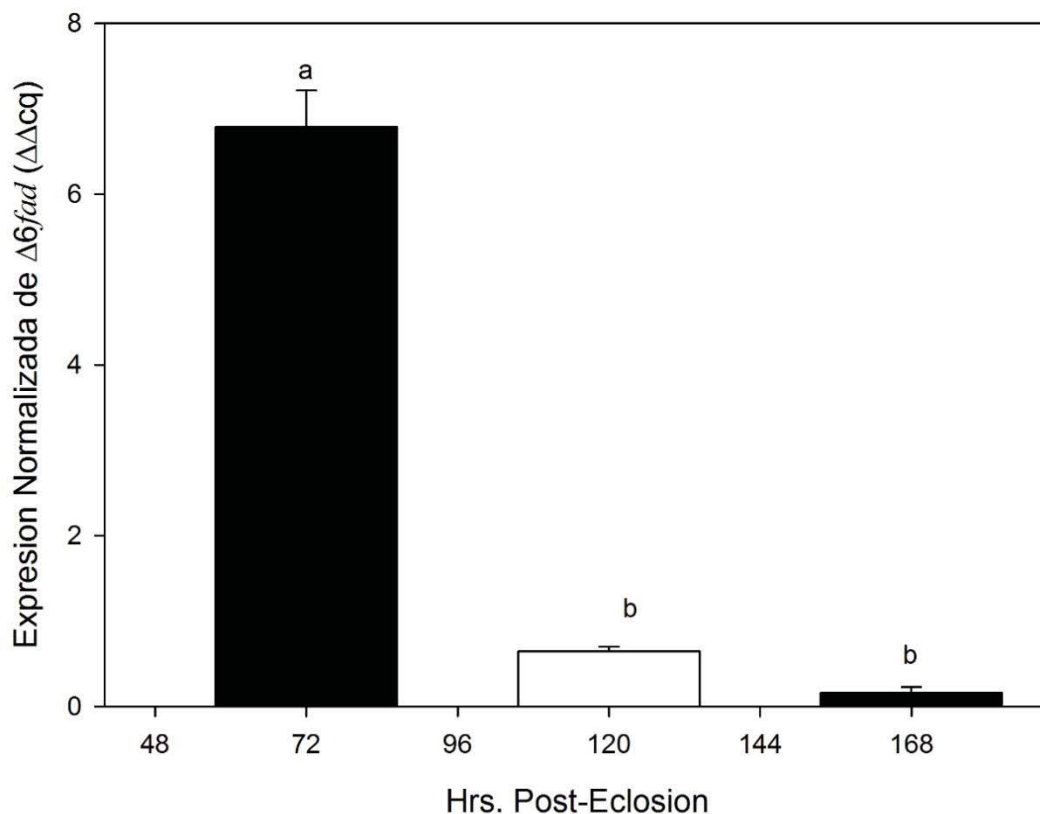


Figura 13. Expresión normalizada de $\Delta 6fad$ (media y desviación estándar) en larvas del tratamiento en inanición.

En cuanto a la variación de la expresión en el control negativo, las larvas no alimentadas (IN), los resultados mostraron que 72 horas después de eclosión, una vez que el volumen de la gota lipídica mostró sus valores más bajos, se observó una expresión significativamente mayor ($p < 0,05$) alcanzando valores de 6.7 ± 0.4 en su $\Delta\Delta cq$ y disminuyendo hacia las 168hrs.

Influencia de los niveles de DHA en la sobrevivencia y crecimiento de larvas.

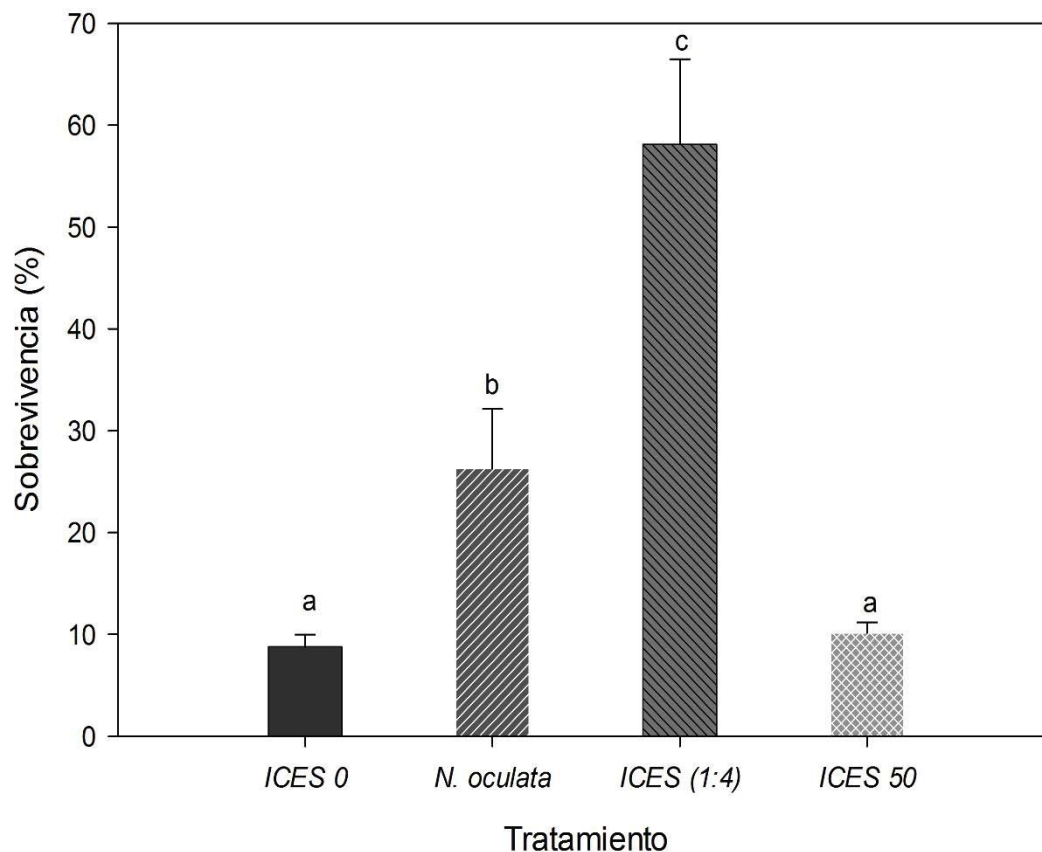


Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia (media y desviación estándar) en larvas *de Lutjanus argentiventris* a las 168 hrs post-eclosión. Las letras diferentes denotan diferencias significativas.

En la figura 14 se muestra la comparación de las medias de supervivencia para cada tratamiento, el ANOVA realizado mostró que las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con la dilución 1:4 (media=58.1±8.3) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al resto de los tratamientos. Las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Nannochloropsis oculata* presentaron el 26.2%, mientras que en los tratamientos de ICES 0 e ICES 50 solo el 8.8% y 10% de las larvas sobrevivieron al termino del experimento.

Expresión de $\Delta 6fad$ con dietas con diferentes niveles y fuentes de DHA.

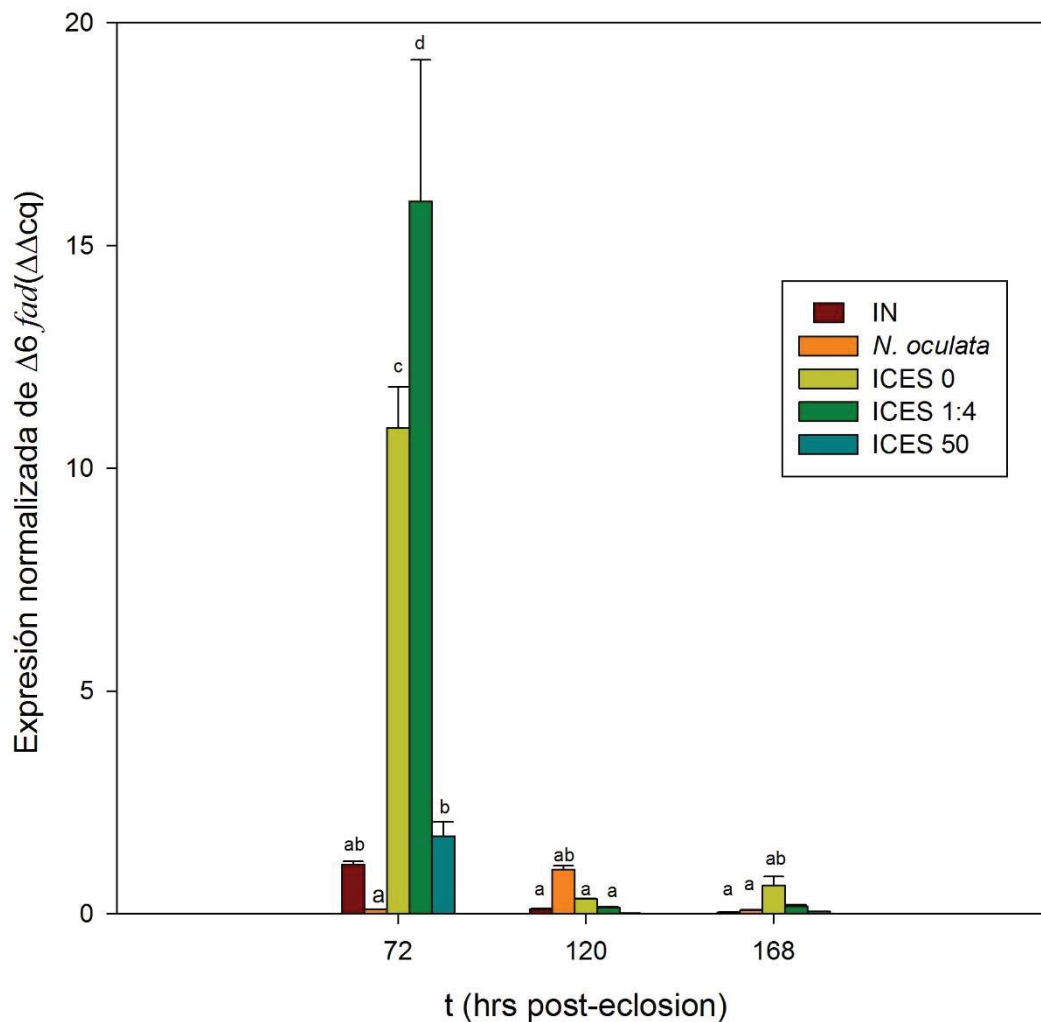


Figura 15. Evolución de la expresión Normalizada con respecto al gen endogeno EF1 α (media y desviación estándar) del gen *fads2* a lo largo de las 168 hrs. después de la eclosión.

Si consideramos la distribución de la expresión de $\Delta 6fad$ a lo largo del experimento, encontramos que a las 72 hrs Post-eclosión se registran los niveles significativamente mayores para ICES 0, ICES 1:4, e ICES 50, posteriormente la expresión tiende a disminuir en todos los casos.

Perfil de ácidos grasos del alimento vivo enriquecido y de larvas de *L. argenteiventris*.

Tabla X. Proporción (%) de Ácidos Grasos de las muestras de rotíferos enriquecidos con diferentes niveles de HUFA n-3 (media \pm D.S) *solo se analizó una muestra.

AG	<i>N. oculata</i>	ICES 0*	ICES 50	ICES 1:4
12:0	0.2 \pm 0.1	6.9	0.2 \pm 0.1	1.2 \pm 1.3
13:0	0.4 \pm 0.4	0.1	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
14:0	1.4 \pm 0.3	5.1	1.2 \pm 0.5	2.1 \pm 0.7
15:0	0.3 \pm 0.2	0.6	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0
16:0	15.4 \pm 2.7	16.3	13.3 \pm 2.7	18.3 \pm 3.5
17:0	0.3 \pm 0.2	0.3	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1
18:0	4.2 \pm 0.4	5.8	5.2 \pm 0.5	5.6 \pm 1.0
20:0	1.4 \pm 0.5	0.8	1.1 \pm 0.9	1.7 \pm 0.7
21:0	0.5 \pm 0.1	0.5	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2
22:0	0.2 \pm 0.2	0.2	1.0 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2
24:0	0.2 \pm 0.0	0.2	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
16:1n-9	0.8 \pm 0.1	0.9	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.3
16:1n-7	3.1 \pm 1.8	1.4	1.8 \pm 0.8	2.0 \pm 0.7
18:1n-9	10.8 \pm 0.4	9.1	8.3 \pm 0.9	11.3 \pm 0.5
18:1n-7	3.0 \pm 0.8	2.3	2.3 \pm 0.9	3.3 \pm 0.7
20:1n-9	1.7 \pm 0.4	1.9	1.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1
22:1n-11	0.5 \pm 0.2	0.5	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1
18:2n-6	17.7 \pm 2.9	15.6	10.4 \pm 3.2	18.1\pm0.4
18:3n-6	0.1 \pm 0.2	0.1	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
18:3n-3	28.5 \pm 6.6	20.7	9.0 \pm 4.3	20.6\pm0.9
20:2n-6	0.8 \pm 0.0	0.8	0.4 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3
20:3n-3	1.7 \pm 0.3	1.6	0.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.4
20:4n-6	1.0 \pm 0.4	0.2	1.4 \pm 0.1	1.0\pm0.3
20:5n-3	3.3 \pm 1.1	3.0	15.9 \pm 6.1	3.2\pm0.6
22:6n-3	2.5 \pm 0.7	4.1	22.9 \pm 9.3	4.0\pm0.8
Σ SAT.	24.0 \pm 4.5	29.7	23.5 \pm 4.7	29.6 \pm 4.0
Σ MONO	19.9 \pm 2.4	16.1	15.1 \pm 2.9	19.4 \pm 2.2
Σ PUFA	48.7 \pm 9.6	38.8	20.7 \pm 8.0	40.6 \pm 2.1
ΣHUFA	6.8 \pm 2.2	7.3	40.2 \pm 15.3	8.2\pm1.8
22:6/20:5	0.8 \pm 0.1	1.4	1.4\pm0.1	1.3\pm0.0

SAT= ácidos grasos saturados; MON=ácidos grasos monoinsaturados; PUFA=ácidos grasos poliinsaturados (todos los AG con dobles enlaces); HUFA= ácidos grasos altamente insaturados (AG con 4 o más dobles enlaces).

Tabla XI. Proporción (%) de Ácidos Grasos (media \pm D.S.) contenidos en larvas de *Lutjanus argentiventris* alimentados con rotífero enriquecido con diferentes proporciones de HUFA.

AG	<i>N. oculata</i>	ICES 0	ICES 50	ICES 1:4
12:0	1.1 \pm 1.67 ^a	0.44 \pm 0.63 ^a	0.8 \pm 0.6 ^a	0.1 \pm 0.04 ^a
13:0	0.2 \pm 0.20	nd	nd	0.1 \pm 0.12
14:0	1.1 \pm 0.59 ^a	0.95 \pm 0.38 ^a	3.8 \pm 1.7 ^b	0.5 \pm 0.01 ^a
15:0	0.3 \pm 0.02 ^a	0.25 \pm 0.03 ^a	0.9 \pm 0.2 ^b	0.2 \pm 0.01 ^a
16:0	22.7 \pm 1.25 ^{ab}	18.85 \pm 1.91 ^a	26.2 \pm 3.6 ^b	17.7 \pm 0.40 ^a
17:0	0.6 \pm 0.04 ^a	0.48 \pm 0.08 ^a	0.5 \pm 0.4 ^a	0.5 \pm 0.02 ^a
18:0	13.8 \pm 0.78 ^a	12.38 \pm 1.80 ^a	12.6 \pm 1.6 ^a	11.5 \pm 0.22 ^a
20:0	0.7 \pm 0.06 ^a	0.53 \pm 0.07 ^a	0.24 \pm 0.4 ^a	0.6 \pm 0.04 ^a
24:0	3.0 \pm 0.21 ^{ab}	3.59 \pm 0.53 ^a	1.9 \pm 0.6 ^b	3.3 \pm 0.08 ^a
16:1n-9	0.1 \pm 0.11 ^a	0.370 \pm 0.14 ^a	1.3 \pm 0.5 ^b	0.2 \pm 0.01 ^a
16:1n-7	1.6 \pm 0.10 ^a	1.51 \pm 0.17 ^a	2.0 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.02 ^a
18:1n-9	6.6 \pm 0.03 ^a	7.35 \pm 0.61 ^{ab}	8.2 \pm 0.3 ^b	7.4 \pm 0.18 ^{ab}
18:1n-7	2.0 \pm 0.09 ^a	2.01 \pm 0.09 ^a	2.2 \pm 0.2 ^a	1.9 \pm 0.08 ^a
20:1n-9	0.0	0.40 \pm 0.01 ^a	0.4 \pm 0.7 ^a	0.1 \pm 0.16 ^a
18:2n-6	1.1 \pm 0.06 ^a	1.32 \pm 0.09 ^{ab}	1.6 \pm 0.4 ^b	1.0 \pm 0.05 ^a
18:3n-3	nd	0.06 \pm 0.10	nd	nd
20:3n-6	-	nd	nd	0.23 \pm 0.40
20:4n-6	2.9\pm0.14^a	2.73\pm0.14^{ab}	2.4\pm0.3^b	3.10\pm0.08^a
20:5n-3	6.0\pm0.41^a	6.71\pm0.66^a	3.8\pm0.4^b	6.58\pm0.10^a
22:6n-3	36.3\pm2.07^{ab}	39.96\pm2.42^{bc}	31.1\pm3.4^a	43.44\pm0.50^c
18:2n-6t	nd	0.10 \pm 0.08	nd	0.060 \pm 0.10
Σ SAT.	42.2 \pm 2.01 ^b	37.03 \pm 2.78 ^{ab}	46.13 \pm 3.3 ^c	34.29 \pm 0.69 ^a
Σ MONO	10.3 \pm 0.27 ^a	11.65 \pm 0.50 ^a	14.05 \pm 0.8 ^b	11.08 \pm 0.38 ^a
Σ POLY	1.1 \pm 0.06 ^a	1.37 \pm 0.03 ^a	1.65 \pm 0.4 ^a	1.29 \pm 0.39 ^a
Σ HUFA	45.2\pm2.60^a	49.40\pm2.77^{ab}	37.35\pm4.1^c	53.12\pm0.52^b

SAT= ácidos grasos saturados; MON=ácidos grasos monoinsaturados; PUFA=ácidos grasos poliinsaturados (todos los AG con dobles enlaces); HUFA= ácidos grasos altamente insaturados (AG con 4 o más dobles enlaces);

En las tablas X y XI puede observarse las medias de la cuantificación de ácidos grasos en las larvas y rotíferos homogenizadas en cada uno de los tratamientos al término del experimento, las letras diferentes indican las diferencias significativas. En cuanto al

contenido de DHA (22:6n-3) en larvas solo hubo diferencia significativa entre los tratamientos de ICES 50 y la dilución 1:4 siendo esta concentración más elevada. La concentración de EPA fue significativamente menor para la muestra de ICES 50.

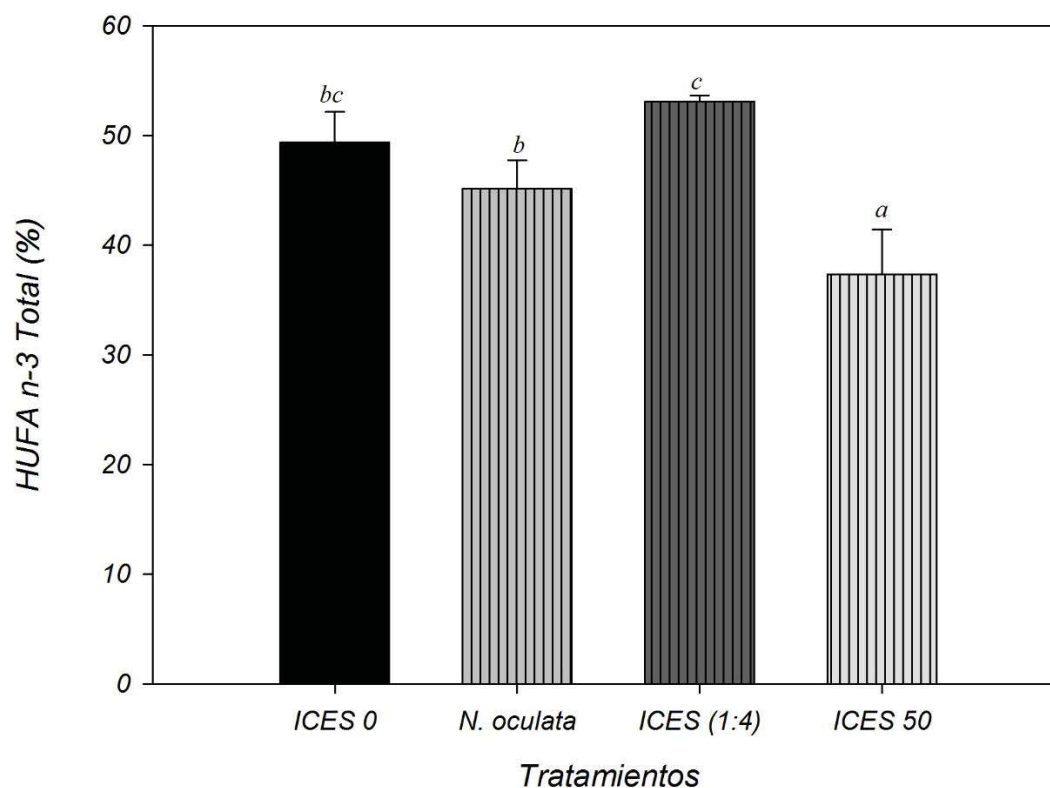


Figura 16. Porcentaje total (medias y DS) de HUFA n-3 contenidos en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con diferentes niveles de DHA. Las letras diferentes denotan diferencias significativas.

En la figura 16 se observan los porcentajes totales de HUFA n-3 en los tejidos de las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con diferentes niveles de DHA. Se observó diferencia significativa entre ICES 50, y los demás grupos. Las larvas procedentes del tratamiento ICES 1:4 presentaron el mayor porcentaje de HUFA n-3 en sus tejidos con un 53.1% y por el contrario el menor porcentaje se presentó en el tratamiento ICES 50 con un 37.3%.

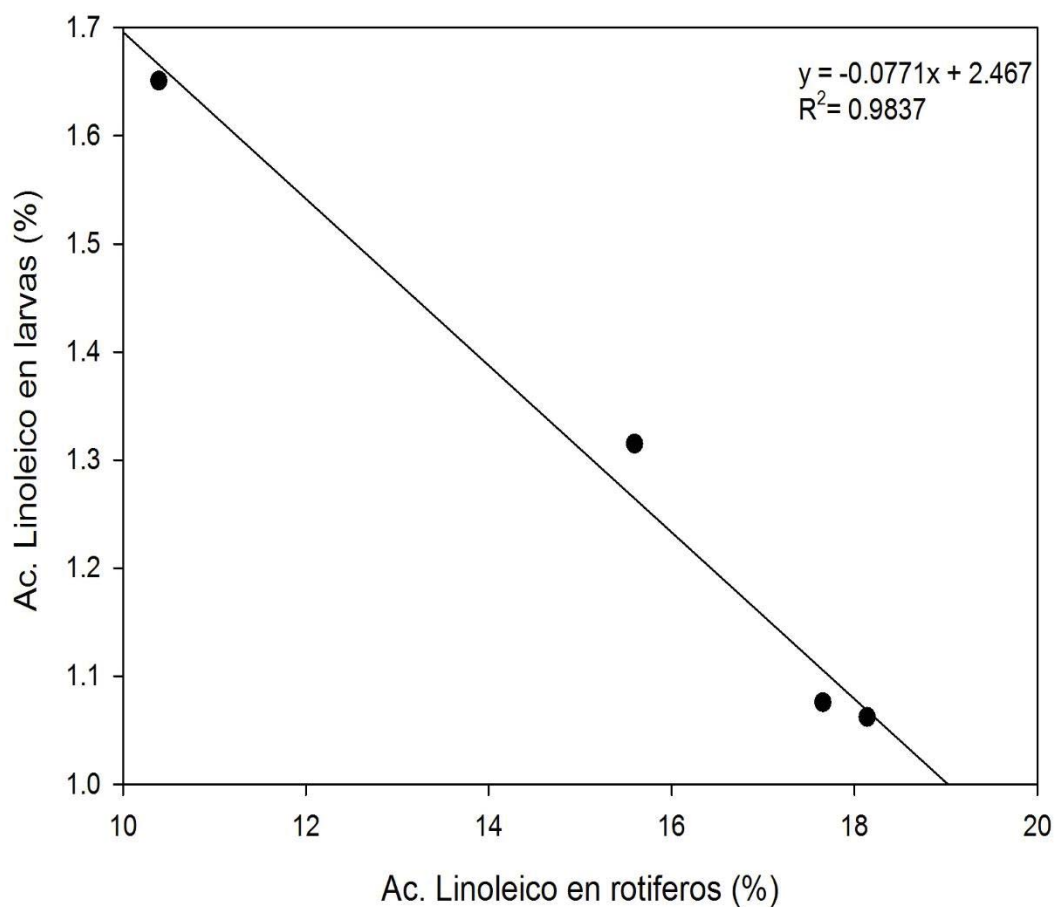


Figura 17. Regresión Lineal del porcentaje de ácido linoleico de los rotíferos enriquecidos versus el porcentaje de ácido linoleico que se encontró en la composición corporal de larvas de pargo amarillo.

La figura 17 muestra que de acuerdo al coeficiente de determinación R^2 solo el 98.3% de la variación de la relación 18:2 n-6 en las larvas puede ser explicada por el porcentaje contenido en rotíferos. El coeficiente de correlación de Pearson $=0.99$ indica que existe una correlación positiva, y al 95% de confianza puede ser considerada como significativa ya que el valor de $p=0.0003$.

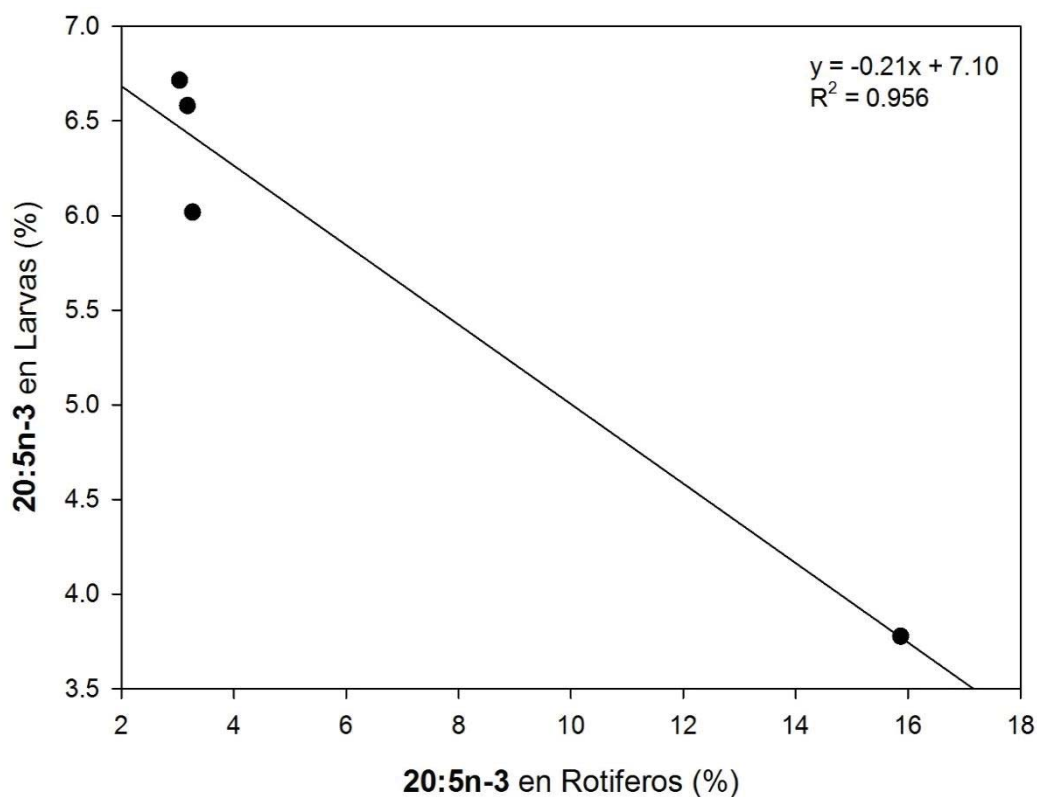


Figura 18. Regresión lineal del porcentaje total de EPA en larvas y rotíferos enriquecidos.

De acuerdo al análisis de regresión lineal, en la figura 18 se muestra la concentración de EPA en larvas puede ser explicada en un 95% por la cantidad EPA que contienen los rotíferos, de acuerdo al coeficiente de Pearson = -0.97 existe una correlación negativa entre ambas variables, es decir, cuanto menos EPA contenían los rotíferos se encontró mayor contenido de HUFA n-3 en las larvas, el valor de $p=0.002$ para esta correlación.

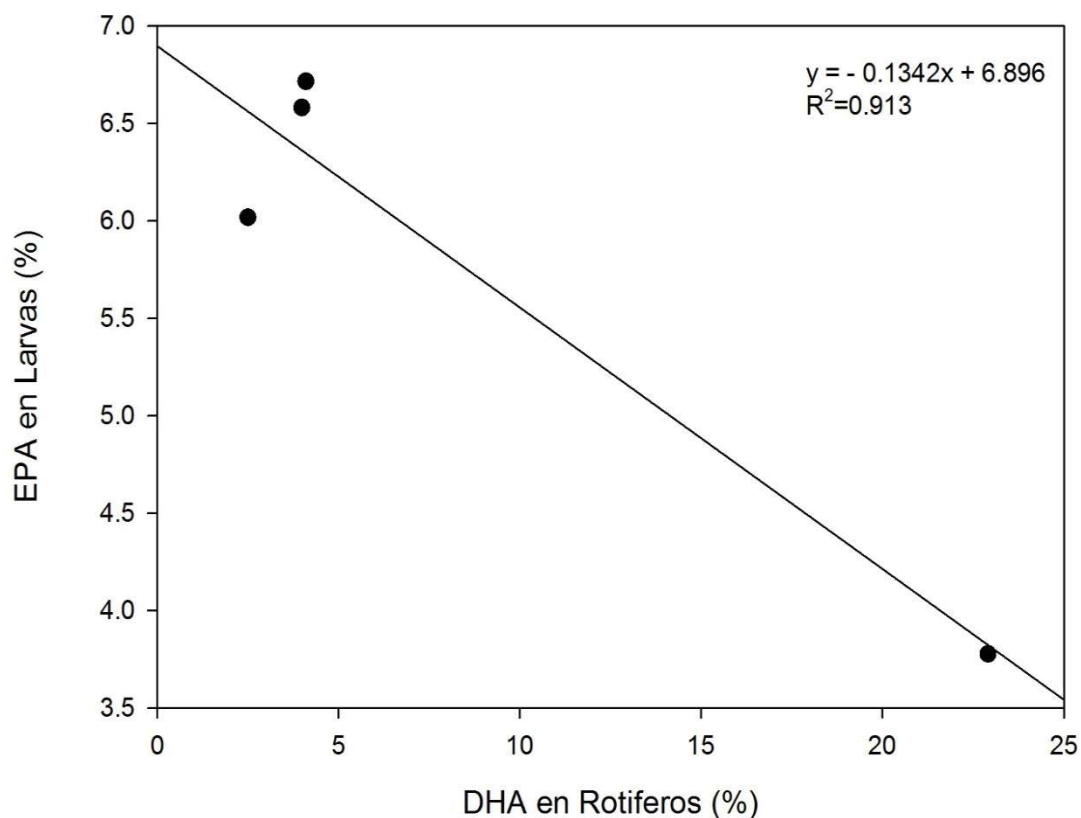


Figura 19. Regresión lineal de la concentración de EPA en larvas de *Lutjanus argentiventris* versus el porcentaje de DHA que contenían los rotíferos con que fueron alimentadas.

Como se muestra en la figura 19 la concentración de EPA en larvas guarda relación con el porcentaje de DHA en rotíferos. De acuerdo al coeficiente de Pearson con valor de -0.95 la relación que guardan estas variables es negativa, es decir a mayor porcentaje de DHA en rotíferos, la concentración de EPA es menor en larvas. Esta correlación entre ambas variables se considera significativa porque $p = 0.009$.

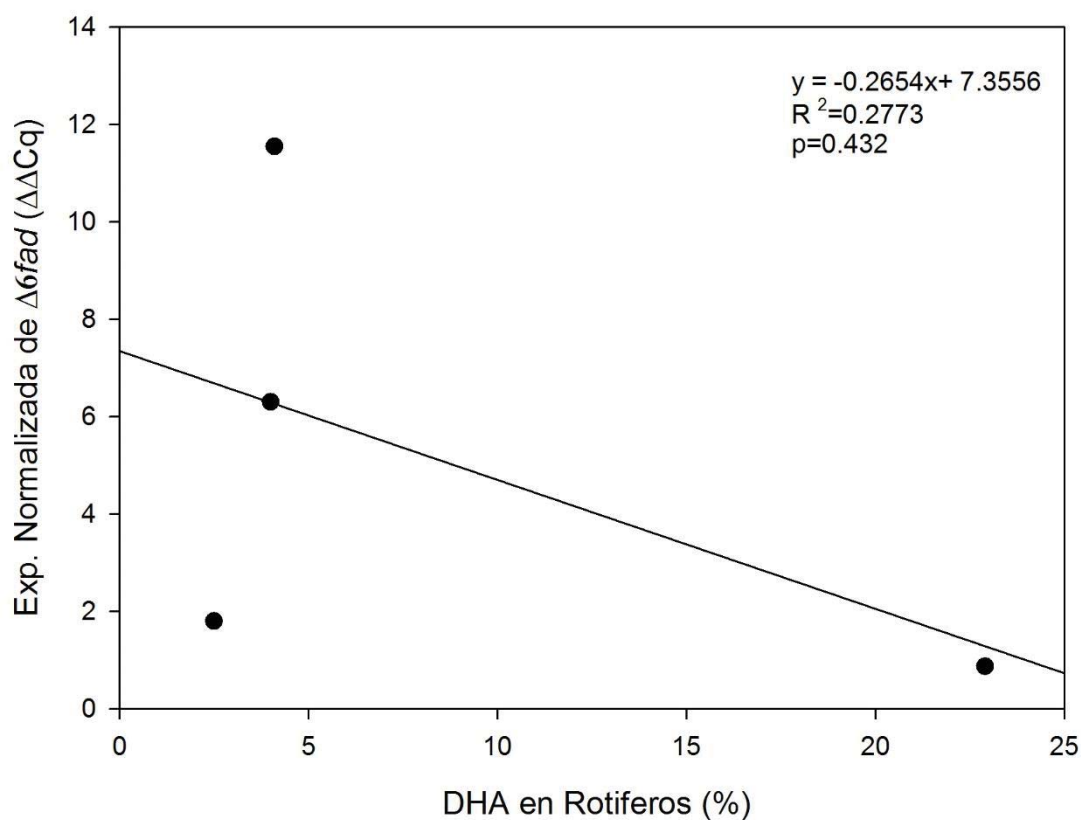


Figura 20. Regresión lineal entre los valores promedio del contenido DHA en rotíferos enriquecidos (%) y la expresión normalizada del gen $\Delta 6fad$ en larvas de *Lutjanus argentiventris*.

La expresión del gen $\Delta 6fad$ en larvas no mostró una correlación significativa ($p=0.432$) con los valores de DHA contenido en rotíferos, el coeficiente de correlación de Pearson = -0.52 nos indica que las variables guardan relación inversa, pero debido al valor de p y Pearson la expresión de $\Delta 6fad$ no es determinada únicamente por el porcentaje de DHA en rotíferos.

9. DISCUSIÓN

Cuantificación de transcrito del gen $\Delta 6fad$ en huevos y larvas en ausencia de DHA.

El éxito de la cría de larvas está fuertemente influenciado por los regímenes de primera alimentación y la calidad nutricional de las dietas de iniciación. La composición lipídica del huevo se reconoce como uno de los factores nutricionales más importantes que afectan el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Watanabe *et al.*, 1983). Los peces marinos, naturalmente, habitan una red alimenticia rica en HUFA y, por lo tanto, reciben suficiente HUFA en su dieta natural para satisfacer sus requerimientos de EFA, y aparentemente no hay una necesidad fisiológica de sintetizar HUFA a partir de los PUFA 18:3n-3 o 18:2n-6 (Sargent *et al.*, 2002). Aunque no existe una presión evolutiva para elevar la actividad de la $\Delta 6$ -desaturasa, puede haber una ventaja evolutiva en ser capaz de mantener, mejorar o regular los niveles de DHA, en particular en tejidos sensibles tales como los tejidos neurales, que son ricos en DHA (Zheng *et al.*, 2009b).

Existen muy pocos estudios enfocados en las enzimas claves de la biosíntesis de PUFA durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario de peces marinos, en este trabajo se encontró que existe una baja expresión $\Delta 6fad$ en huevos de *L. argentiventris* y ésta no se ve influenciada por la ocurrencia de la eclosión (Fig.12). Esto puede ser explicado en cierta medida porque la larva aun no es capaz de llevar a cabo la alimentación exógena, ya que de acuerdo a lo reportado por Mejía-Narvaez *et al.*, 2009 en el pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, la formación de la boca y las aletas pectorales ocurre cerca de las 48 hrs. post-eclosión, en este trabajo las larvas con apertura bucal se observaron entre las 48 y 72 horas. Por el contrario en las larvas no alimentadas a las 72 hrs. PE (Fig.13) presentan una expresión de $\Delta 6fad$ 16 veces mayor que las larvas recién eclosionadas, esto coincide con el agotamiento total del volumen de la gota lipídica (Fig.10) y la aparición de los pigmentos oculares. La mayoría de los estudios realizados en peces que han caracterizado la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, han especulado y sugerido que la expresión de ésta se ve favorecida por la presencia de los precursores de 18C del EPA y DHA, y por lo tanto se han probado una amplia gama de fuentes lipídicas en la dieta, pero, ¿cómo explicar el aumento de la expresión de $\Delta 6fad$ en

larvas que no fueron alimentadas? Morais *et al.*, (2011) en un estudio realizado con larvas de atún de aleta azul sin alimentar, plantea la hipótesis de que los elevados niveles de expresión de la $\Delta 6fad$ y la *elov15* en el cerebro junto con el papel que juega en el paso de EPA a DHA, sugiere que esta enzima está jugando un papel alternativo al mantener los niveles de DHA en la membrana de tejidos neuronales, en momentos de alta demanda energética, como lo son el desarrollo larval y embrionario. La expresión $\Delta 6fad$ tiende a disminuir significativamente a las 168 hrs. post-eclosión lo que podría deberse a que las concentraciones de sustrato disminuyen, en el estudio realizado con larvas de atún de aleta azul en estado de inanición (Moráis *et al.*, 2011) como las larvas murieron de hambre, es probable que relación DHA: EPA haya cambiado debido a una tasa de oxidación relativamente más baja comparada con el desarrollo natural en el que existe alimentación exógena y se eleva la expresión de $\Delta 6fad$ derivado del aumento de la conversión de EPA a DHA, siendo ésta una vía importante para satisfacer la alta exigencia de DHA necesario para el rápido desarrollo de tejido neural (Cerebro y ojo). Por otro lado, en peces se sabe que esta enzima tiene una mayor afinidad con ácidos grasos n-3 que con n-6, por ejemplo en el salmón del Atlántico (*S. salar*) alimentado con dietas donde la fuente lipídica consistía en un 100% de aceite de palma (con 8% de 18:1n-9 y 10% 18:2n-6 como sustratos de la enzima $\Delta 6fad$ comparada con dietas en combinación con aceite de pescado, los resultados mostraron un aumento progresivo del producto de la desaturación de 18:3 n-3 (es decir, 18:4 n-3) cuando se añadió el aceite de palma, pero al suministrar únicamente aceite de palma (100%) aumentó 10 veces la actividad de $\Delta 6D$ (Bell *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado que una elevada proporción entre los AG 18:3n-3/18:2n-6 en la dieta conduce a una mayor actividad $\Delta 6D$ (Bell *et al.*, 1997, 2001; Tocher *et al.*, 1997, 2000, 2001a, 2002).

Influencia de los niveles de DHA sobre la sobrevivencia y crecimiento de larvas.

En general, una deficiencia en HUFA n-3 retrasa el crecimiento, induce la mortalidad y reduce la resistencia al estrés en organismos juveniles del turbot (Gatesoupe y Le Milinaire, 1985), el lenguado japonés (Izquierdo *et al.*, 1992), el besugo (Izquierdo *et al.*, 1989) y la dorada (Salhi *et al.*, 1994). Además, esta deficiencia se ha asociado con algunas alteraciones

anatómicas como hipomelanosis en el lado ocular de los peces planos (Kanazawa, 1993b), disgregación del epitelio branquial e hidropesía (Izquierdo, 1996). Además del requerimiento mínimo de cada ácido graso esencial en la dieta, las proporciones relativas entre los diferentes PUFA en los tejidos de las larvas parecen estar relacionadas con mejores tasas de crecimiento (Sargent *et al.*, 2002). Si existen interacciones competitivas o complementarias entre ácidos grasos, hay una necesidad de controlar tanto las proporciones dietéticas, como las cantidades absolutas. El estudio realizado por Iijima *et al.* (1998) en besugo adulto *Pagrus major*, demuestra que la competencia entre ARA, EPA y DHA podría comenzar incluso a partir de los procesos de digestión, ya que la lipasa activa en sales biliares mostró una mayor eficiencia de hidrólisis por EPA o ARA que por DHA.

Existen diversos trabajos que apoyan una mejora en la tasa de crecimiento y sobrevivencia al incorporar DHA en la dieta. Sin embargo, algunos difieren en cuanto a la proporción de DHA/EPA presente en rotíferos enriquecidos. En el bacalao del atlántico *Gadus morhua*, Park *et al.* (2006) establecen una relación entre los niveles de DHA y la proporción DHA/EPA de rotíferos con el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas, reportando los mejores resultados al alimentar las larvas con rotífero que contenían el 1.6% del contenido total de lípidos (peso seco) de DHA, en comparación con los rotíferos que contenían 1.1-1.2 % de DHA. Por el contrario, Takeuchi *et al.* (1994) reportaron que la tasa de sobrevivencia, y las anomalías de larvas de bacalao (*Gadus macrocephalus*), fueron mejores cuando el nivel de DHA en los rotíferos fue alrededor del 1% del contenido total de lípidos (peso seco), cualquier cantidad superior al 1% de DHA dio como resultado un alto porcentaje de peces anormales, junto con una elevada mortalidad. Por otro lado, Izquierdo *et al.* (1992) demostraron que en larvas de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), el contenido de DHA en *Artemia* no afectó la sobrevivencia, pero las larvas fueron significativamente más grandes cuando la *Artemia* contenía hasta 3.5% de DHA, en comparación con niveles más bajos. Por otro lado, Salhi *et al.* (1994) en dorada (*Sparus aurata*), demostraron que las larvas alimentadas con una microdieta deficiente de DHA (>0.5%) tuvieron una sobrevivencia significativamente menor que las larvas alimentadas con una microdieta rica en DHA (1.2 y 1.3%). A pesar de que en el presente estudio no hubo diferencia significativa en la longitud notocordal de larvas alimentadas con rotíferos, el

tratamiento ICES 1:4 (3.99% de DHA) dio una sobrevivencia significativamente mayor que los tratamientos ICES 50 (22.9% de DHA), ICES 0 (4.1% de DHA) y *Nannochloropsis oculata* (2.5% de DHA), por lo que los niveles de DHA en los rotíferos no parecen haber tenido efecto en la sobrevivencia de larvas de pargo amarillo. Por lo tanto, parece que la exigencia de los niveles de DHA en la dieta de las larvas de peces marinos depende de la especie (Sargent *et al.*, 1999).

Respecto a la proporción DHA/EPA Rodríguez *et al.* (1997) concluyeron que la proporción 1/1.4, en comparación con rotíferos mejoró el crecimiento y la supervivencia de la dorada. Copeman *et al.* (2002) encontraron que *Limanda ferrugine* alimentado con una elevada relación DHA/EPA de 8.2 tuvieron un mayor crecimiento y supervivencia que aquellos alimentados con una proporción de DHA/EPA de 1.9. En el presente trabajo, los tratamientos que mostraron mejor sobrevivencia fueron los alimentados con una proporción de 1.26 (ICES 1:4) y 0.8 (*Nannochloropsis* sp.) siendo significativamente mayores de los tratamientos ICES 50 (1.43) e ICES 0 (1.36).

Generalmente, la calidad larvaria de peces se ha relacionado con el tamaño huevo y de la gota lipídica, la tasa de fertilización, la tasa de eclosión y la morfología de la larva (Cousseau y Perrotta, 1998). El tamaño de los huevos es muy variable y normalmente es una característica de la especie, en lutjanidos como *L. argentimaculatus* se obtuvo un tamaño de 1,400 μm (Emata *et al.*, 1994); 1,390 μm para *L. griseus* (Querales, 2001) y 1,170 μm para *L. campechanus* (Bourque y Phelps, 2007); para *L. peru* se observaron huevos entre 744-807 μm (Santamaria-Miranda, 2010) y para *L. guttatus* de 857 μm . En este trabajo se observó un tamaño de huevo promedio de $786.2 \pm 5.8 \mu\text{m}$ (Tabla IX), valor superior a lo reportado por Martínez-Lagos (2003) en desoves inducidos, y muy cercano al valor obtenido por Santamaría-Miranda (2010) de 769 μm en reproductores alimentados con calamar, ambos valores para esta misma especie. Hasta ahora, se ha considerado que el tamaño del huevo (diámetro) influye en la sobrevivencia larval teniendo efecto en el tamaño de la larva y tasa de crecimiento y se ha asociado a que las hembras grandes, producen huevos grandes o desoves (número de huevos) más numerosos, dando a la progenie una ventaja ecológica con respecto a la de huevos más pequeños (Schreck, 2001). El tamaño de la gota lipídica

únicamente fue significativamente mayor en larvas del tratamiento ICES 1:4 a las 72 hrs. lo que sugiere que si bien todas las larvas provenían de un mismo desove e inicialmente tenían el mismo tamaño de gota lipídica, esta no fue consumida con la misma rapidez. Los lípidos en los huevos y larvas durante el desarrollo lecitotrófico se acumulan como triglicéridos. La gota lipídica está compuesta principalmente por triglicéridos (Silversand *et al.*, 1996). Los triglicéridos son la principal fuente de energía para las necesidades embrionarias y larvarias tempranas. Que este tratamiento haya presentado gota lipídica a las 72 hrs. Post-eclosión puede explicar la mejor supervivencia (Fig. 10).

Expresión génica de $\Delta 6fad$ con dietas con diferentes niveles y fuentes de DHA.

El grado de regulación nutricional a nivel genético de la $\Delta 6$ desaturasa depende de la presencia y niveles de HUFA que se encuentren en la dieta, así como también la relación de 18:3n-3/18:2n-6 y la naturaleza de los ácidos grasos (p.e. origen vegetal y animal) (Tocher *et al.*, 2001a, 2002; Izquierdo *et al.*, 2008; Geay *et al.*, 2010). La eficiencia enzimática máxima se alcanza a niveles particulares de la disponibilidad de sustrato (Bell *et al.*, 2002). En este trabajo la relación 18:3n-3/18:2n-6, fue de 1.6 para rotíferos alimentados únicamente con *Nannochloropsis oculata*.

La biosíntesis de HUFA n-3 en los vertebrados se produce esencialmente en dos escenarios con cinéticas muy diferentes. La síntesis de EPA requiere una $\Delta 6$ desaturación de 18:3n-3 para producir 18:4 n-3 que es alargada a 20:4 n-3 seguida por una desaturación $\Delta 5$ para producir EPA (Cook, 1996). Esta es la vía esencial temprana más investigada en los estudios con relación a la síntesis de HUFA en los vertebrados, más específicamente 20:4 n-6, y el paso limitante de la velocidad se encontró que era la $\Delta 6$ desaturación (Zheng *et al.*, 2009b). La síntesis de DHA a partir de EPA requiere dos nuevos pasos de elongación, una segunda desaturación $\Delta 6$, y un acortamiento de la cadena peroxisomal para producir DHA (Sprecher, 2000).

No ha quedado claro si la modulación nutricional de $\Delta 6fad$ es debida más a la reducción de productos de desaturación que al aumento del suministro de sustrato, o si ambos están involucrados. Algunos autores demostraron que la tasa de desaturación de ácidos grasos de C18 fue más fuertemente regulado por la competencia entre los sustratos C18 que por

DHA (Ruyter *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2007). Sin embargo, Tocher *et al.* (2002) especuló que esta tasa de desaturación es un resultado directo del producto de reducción en lugar de un aumento de la disponibilidad de los precursores. Por el contrario, otros autores llegaron a la conclusión de que tanto la reducción de producto y el aumento del suministro de sustrato fueron factores determinantes en la actividad desaturasa realizada en hepatocitos de *Salmo salar* (Christiansen *et al.*, 1991; Horrobin, 1991; Tocher *et al.*, 2003). Por lo anterior, se requiere más investigación para identificar los mecanismos involucrados.

Aunque no todos los trabajos muestran diferencias estadísticamente significativas, existen varios estudios que han demostrado mayores niveles de mRNA de genes $\Delta 6D$ en peces de agua dulce alimentados con aceites vegetales (\downarrow HUFA) que en aquellos alimentados con aceites de pescado (\uparrow HUFA). Por ejemplo, el aumento de los niveles de $\Delta 6D$ mRNA fue medido en el hígado y músculo rojo del salmón del Atlántico alimentado con dietas en que 75% de FO había sido reemplazado por una mezcla de aceites de colza, de palma y linaza con una relación 3.7:2:1 en comparación con los peces alimentados con una dieta rica en HUFA con sólo FO como fuente de lípidos (Zheng *et al.*, 2005). Se obtuvieron resultados similares en salmón y trucha arcoíris alimentadas con dietas que contenían aceite de linaza como fuente lipídica en comparación con organismos cuya única fuente de lípidos era el aceite de pescado (Seiliez *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2004). Tales datos moleculares a partir de peces dulceacuícolas, podrían interpretarse como una inhibición de la $\Delta 6$ por n-3 HUFA, como ya ha sido demostrado en mamíferos (Garg *et al.*, 1988; Christiansen *et al.*, 1991; Ulmann *et al.*, 1992).

En salmónidos alimentados con aceites vegetales ricos en LNA y LA, la actividad de $\Delta 6FAD$ se ve estimulada en comparación con los alimentados con aceites de pescado, ricos en n-3 HUFAs (EPA y DHA). Según diversos trabajos, esta estimulación es correlacionada con un aumento de la expresión génica de $\Delta 6fad$ ligado a un bajo contenido de HUFAs en la dieta y combinado con altos niveles de LA y LNA (Geay *et al.*, 2010). Hasta ahora, esta regulación metabólica ha causado controversia en especies de peces marinos, que han demostrado que la sustitución parcial del aceite de pescado con aceite vegetal no favoreció la actividad de la desaturasa. El consumo de una dieta piscívora, naturalmente ricos en

HUFA, podría haber dado lugar a un proceso evolutivo represor de la actividad enzimática de desaturasas que se requiere para la conversión de los FA C18 a HUFA (Sargent *et al.*, 2002).

Entre los estudios realizados en peces marinos podemos mencionar el de Seiliez (2003) cuyo estudio mostró un incremento de 18:3n-6 en la dorada alimentada con una dieta libre de HUFA lo que podría indicar actividad $\Delta 6D$ en estos peces. Del mismo modo, niveles altamente significativos de 18:2n-9 y 18:3n-6 y un aumento de más de 6 veces de mRNA de $\Delta 6D$ fueron reportados en larvas de esta especie alimentadas con dietas donde el aceite de pescado fue reemplazado totalmente por aceite de soya (Izquierdo *et al.*, 2008). Por otro lado el trabajo de Vagner *et al.* (2007) mostró que los niveles de mRNA de $\Delta 6D$ fueron mayores en larvas de lubina alimentadas con una dieta baja en HUFA. Un nuevo estudio de González-Rovira *et al.*, 2009 también mostró un alto nivel de mRNA de $\Delta 6D$ en el hígado de la lubina alimentada con aceites de linaza y soya en comparación al hígado de peces alimentados con FO. Ninguno de estos estudios informo de un aumento de 18:4n-3 (producto de desaturación de 18:2 n-3 por $\Delta 6D$). Esto podría deberse al alto nivel relativo de este ácido graso presente inicialmente en los peces y a los niveles insignificantes de 18:3 n-3 en aceites vegetales utilizados en las dietas libres de HUFA.

A diferencia de los resultados descritos, en este trabajo no se observó (Figura 15) la influencia del contenido HUFA n-3 sobre la actividad de la enzima desaturasa, pero no podemos atribuir esta expresión únicamente al HUFA n-3 en la dieta, aunado al corto tiempo de experimentación. González-Rovira *et al.* (2009) reportó que los niveles de mRNA de $\Delta 6D$ en hígado no aumentaron al alimentar larvas de lubina con aceite de soya. Por otra parte, en contraste con los resultados que se obtuvieron con lubina alimentadas con dos mezclas diferentes aceites vegetales (60% de sustitución de FO con los aceites de colza, de linaza, y aceite de oliva), la expresión de la $\Delta 6D$ sólo fue significativamente sobre regulada en los peces alimentados con una de las mezclas (González-Rovira *et al.*, 2009). Estos datos contradictorios obtenidos de lubina podrían deberse a la baja expresión de $\Delta 6D$ en el hígado de esta especie. Además, la expresión $\Delta 6D$ no se determinó en otros tejidos tras la ingestión de la dieta VO (González-Rovira *et al.*, 2009). Estudios previos han demostrado que la

inclusión de aceite vegetal no condujo a un aumento significativo de la actividad desaturasa en hepatocitos de lubina (Mourente y Dick, 2002; Mourente *et al.*, 2005b), mientras que el aumento de la actividad se registró en los enterocitos del ciego pilórico de lubina alimentados con una mezcla de VO (Mourente *et al.*, 2005a). Para este trabajo, las larvas de pargo amarillo son muy pequeñas para evaluar diferentes tejidos, pero esto sería muy viable en juveniles.

Existen otros estudios en peces marinos que presentan datos contradictorios; Tocher *et al.* 2006, reporta niveles de mRNA de $\Delta 6D$ en hígado e intestino del bacalao (*G. morhua*) alimentados con dietas con aceites vegetales y aceite de pescado que no reflejaron cambios en la actividad de la enzima en hepatocitos ni enterocitos. Estos resultados sugieren que la regulación nutricional de $\Delta 6D$ puede variar en función tanto de la especie como de la etapa de desarrollo.

La aparición de datos contradictorios, tanto en la expresión de genes $\Delta 6D$ y la actividad enzimática en los peces marinos, puede ser debido a los menores niveles registrados en tejidos de peces marinos en comparación con los peces y los salmónidos de agua dulce (Tocher *et al.*, 2006, González-Rovira *et al.*, 2009). Puede haber otros factores ambientales, genéticos u hormonales que podrían explicar por qué $\Delta 6D$ parece ser apenas funcional en peces marinos (González-Rovira *et al.*, 2009).

Existen otros mecanismos de regulación genética, por ejemplo, en mamíferos, a nivel molecular los análisis nucleares “run on” han mostrado que la regulación transcripcional explica en gran medida la abundancia de mRNA de *Δ6fad*, encontrando que, a pesar de las diferencias entre SCD (estearoil-CoA desaturasas) y *Δ6fad* en las funciones fisiológicas y regulación, estos dos grupos de desaturasas comparten características reguladoras comunes, incluyendo: (1) la dependencia de la expresión de la insulina, (2) la supresión por PUFA n-6 y n-3 y (3) la inducción por proliferadores de peroxisomas, siendo las desaturasas los únicos genes cuya transcripción se activan por los factores de transcripción SREBP-1 (Elemento regulador de esteroides 1, por sus siglas en inglés: sterol regulatory element binding protein) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas PPARs (Nakamura y Nara, 2002). Los PPARs forman un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a los elementos de respuesta presentes en los genes blanco. Los PPARs controlan

la expresión de genes de la síntesis y de la oxidación de ácidos grasos, y están involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos en diferentes tejidos. Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos poliinsaturados (Leaver *et al.*, 2005). En peces, estudios recientes sugieren que los PPARs están implicados en la modulación transcripcional del gen *Δ6fad* (Kennedy *et al.*, 2006). En larvas de lubina alimentadas con una dieta baja en HUFA n-3 (0.3-0.5%), los niveles de mRNA de PPARs fueron significativamente mayores en comparación con los alimentados con una dieta alta en HUFA n-3 (0.7-3.7%), además, la estimulación de mRNA PPAR β se mantuvo cuando se alimentaron a los juveniles con una dieta muy baja en HUFA n-3 (0,3% de EPA + DHA). Estos resultados llevaron a la hipótesis de que la transcripción de genes $\Delta 6D$ en lubina podría ser estimulada por PPAR en condiciones nutricionales drásticas, y por encima de un cierto umbral de HUFA en la dieta, otros mecanismos como los observados en mamíferos pueden estar implicados, tales como SREBP-1 y PPAR (Vagner *et al.*, 2007, 2009).

En este trabajo la cuantificación de transcritos de mRNA del gen *Δfad* únicamente mostro una diferencia significativa entre los tratamientos a las 72 hrs. posteriores a la eclosión, sin embargo al correlacionar los valores promedio de la expresión durante todo el experimento (es decir hasta las 168 hrs.) la correlación no es significativa lo que apoya la hipótesis de que la expresión de este gen no está determinado únicamente por los niveles de HUFAn-3 o la presencia de sus precursores.

Todas las especies de peces marinos estudiados hasta el momento tienen un estricto requisito en la dieta de 20:5n-3 y 22:6n-3, y, probablemente, también de 20:4n-6 (Sargent *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios in vivo y cultivos celulares in vitro utilizando precursores radiactivos, en particular con el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y la dorada (*Sparus aurata*), han mostrado muy bajos, pero significativas, tasas de conversión de 18:3n-3 a 20:5n-3, y especialmente de 20:5n-3 a 22:5n-3 y 22: 6 n-3, y también la presencia de muy bajo $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ -desaturasa y PUFA actividades de elongasa (Koven *et al.*, 1997; Salhi *et al.*, 1994; Bransden *et al.*, 2005). Sin embargo, las tasas de conversión de C18 a C20 y C20 a C22 de n-3 PUFA de peces marinos están muy por debajo de lo necesario para satisfacer las necesidades dietéticas de los peces de 20: 5n-3 y 22:6 n-3. Aunque tales estudios detallados

no se han llevado a cabo en *Lutjanus argentiventris*, no hay ninguna razón para sugerir que esta especie es fundamentalmente diferente de las especies marinas estudiadas hasta el momento. De hecho, la acumulación de 22:5n-3 en condiciones de privación de 22:6n-3 en el pargo amarillo es de esperar si nos basamos en los conocimientos actuales de la bioquímica nutricional de peces y los diversos estudios de alimentación de peces marinos que se refiere anteriormente.

Perfil de ácidos grasos del alimento vivo enriquecido y de larvas de *L. argentiventris*

La composición de ácidos grasos de huevos y larvas en estadios tempranos está altamente influenciada por los niveles de HUFA y PUFA suministrados en la dieta de los reproductores. Los peces teleósteos están dotados de la capacidad de detectar su estado nutricional y regular su desarrollo reproductivo (Cerdá *et al.*, 1994, Camargo y Urbinati, 2008). Sin embargo, algunos autores mencionan que no está claro el tiempo que deben alimentarse los reproductores con alguna dieta en particular, para afectar la composición bioquímica del huevo (Yanes-Roca *et al.*, 2009). Las reservas lipídicas en huevos de peces son utilizadas por el embrión en desarrollo para el metabolismo energético, como componentes estructurales de las biomembranas y como precursores de hormonas derivadas de lípidos (Sargent *et al.*, 2002). Los lípidos de reserva en huevos de teleósteos se almacenan como lipoproteínas en el saco vitelino y en algunas especies en glóbulos de aceite discreto o fragmentado (Morais *et al.*, 2011). Las lipoproteínas del saco vitelino contienen principalmente fosfolípidos como la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que contienen altos niveles de PUFA, particularmente de la serie n-3, es decir EPA y DHA (Sargent *et al.*, 2002).

La composición lipídica de los organismos no sólo depende de los lípidos de la dieta ingerida, sino también en la capacidad de las especies para transformar estos lípidos a través de las vías de desaturación y elongación. Satisfacer los requisitos de larvas usando fuentes pobres en EFA, exige porcentajes cada vez mayores en la dieta, potencialmente excesivos que pueden dar lugar a un desequilibrio lipídico, de hecho, algunos estudios han informado acerca de un pobre crecimiento de larvas con una dieta elevada en lípidos, donde los autores

plantearon la hipótesis de que el desequilibrio en la composición de macronutrientes de la dieta, en particular el exceso de lípidos neutros, puede conducir a una inferior digestión y capacidad de absorción (Kjørsvik *et al.*, 1991a; Hoehne, 1999; Pousão-Ferreira *et al.*, 1999, Izquierdo *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2000a), lo que resulta en la reducción del crecimiento y performance. También Gara *et al.* (1998) sugiere que el nivel de ingesta de lípidos puede tener un impacto significativo en el éxito de la metamorfosis peces planos, en su estudio, alimentar con *Artemia* enriquecida con aceite orbital de atún disminuyo la migración del ojo y la distribución de los pigmentos (35.9% y 39.9, respectivamente) en comparación con la *Artemia* enriquecida con Superselco® (59.8%) y Algamac 2000® (54.6%). En el presente estudio, la elevada proporción de DHA en rotíferos enriquecidos con ICES 50 (Tabla X) no se vio reflejada en la composición larval, por el contrario este tratamiento mostró un porcentaje significativamente menor al resto de los tratamientos en su contenido de DHA (Tabla XI).

La explicación más comúnmente propuesta para el crecimiento inferior de las larvas que a veces se obtiene con dietas altas en lípidos se ha relacionado con una sobrecarga de los sistemas digestivo y capacidad de absorción causada por el exceso de lípidos. Sin embargo, otra posibilidad alternativa o adicional es que cuanto mayor es el nivel de lípidos en la dieta, lo que resulta en dietas de alto contenido energético, puede inducir a una menor ingesta de alimentos y por lo tanto una ingesta insuficiente de proteínas y nutrientes esenciales (por ejemplo HUFA) y micronutrientes. Esta posibilidad ha sido sugerida previamente (Pousão-Ferreira *et al.*, 1999; Gawlicka *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2005), Pero no ha sido probado directamente en larvas de peces marinos.

Por otro lado, se encontró una significativa correlación inversa entre los niveles de DHA en los rotíferos enriquecidos y el porcentaje de EPA en larvas (Figura 19) esto concuerda con lo encontrado por Furuita *et al.* (1999) en *Paralichthys olivaceus* quien sugiere que la conversión de 20:5n-3 a 22:5n-3 incrementa en las larvas cuando los niveles de DHA son más bajos en la dieta, este mismo efecto se observó en el lenguado japonés (Izquierdo, 1992) y en la lubina blanca (*Morone chrysops*). Santamaría-Miranda (2010) obtuvo mejores resultados al alimentar con calamar a reproductores de pargo amarillo, reflejándose en una

mejor calidad de desove (Tamaño de huevo, gota lipídica y sobrevivencia) en comparación con los alimentados con sardina, cuya proporción de DHA y EPA es menor al calamar. Sin embargo, los resultados en adultos no se pueden extrapolar dado que las larvas de los peces tienen requerimientos mucho más altos de energía y los componentes estructurales, mientras que los lípidos de la dieta (especialmente EFA) son también muy importante para el desarrollo de órganos y de procesos fisiológicamente exigentes, como la metamorfosis (Morais *et al.*, 2007).

Los estudios sobre el agotamiento de los ácidos grasos en los embriones en desarrollo y larvas tempranas realizados en una serie de especies Perciformes han encontrado un catabolismo preferencial por ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) junto con la retención de DHA, ARA y algunos ácidos grasos saturados, por lo general 16:0 o 18:0 (Mourente y Vázquez, 1996; Mourente *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 2002; Ortega y Mourente, 2010). Esto refleja el papel esencial estructural del DHA en las membranas, la importancia de ARA en la producción de eicosanoides y funciones específicas de ácidos grasos saturados en la posición sn-1 de los fosfolípidos estructurales (Morais *et al.*, 2011).

Por otro lado, aunque los rotíferos sintetizan de *novo* algunos ácidos grasos HUFA n-3, tales como el DHA (Lubzens *et al.*, 1985), la tasa de la síntesis no es lo suficientemente alta para suministrar las cantidades necesarias en larvas de peces marinos (Seychelles *et al.*, 2009). Otros nutrientes limitantes son algunos aminoácidos (Aragão *et al.*, 2004a, b), vitaminas y minerales (Hamre y Harboe, 2008). Por lo que el enriquecimiento de estos organismos para mejorar su valor nutricional antes de alimentar a las larvas es una necesidad, y el objetivo principal ha sido tradicionalmente para optimizar el perfil de ácidos grasos. Numerosos estudios han sido realizados y publicados en este campo de investigación, con énfasis en el crecimiento, la tasa de supervivencia y el perfil de ácidos grasos; por ejemplo en larvas de besugo negro (*Sparus macrocephalus*) se encontró que los rotíferos enriquecidos con HUFAn-3 influyen en la composición de larvas y benefician el crecimiento, si son enriquecidos con aceite de pescado (Liu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006; García *et al.*, 2008).

En el presente trabajo el enriquecimiento de rotíferos no tuvo un efecto significativo en su composición, como se observa en la tabla X. También se observó que los

rotíferos son capaces de acumular EPA mejor que el DHA cuando se exponen a una concentración de ICES 1:50, lo que ha sido observado previamente por Rainuzzo *et al.* (1994b) y Rodríguez (1994) en rotíferos y por Izquierdo (1988) y McEvoy *et al.* (1995) en la *Artemia*. Las razones para esta acumulación diferencial todavía no está clara, pero existen dos explicaciones posibles; en primer lugar, los rotíferos son principalmente organismos filtradores de agua dulce, y la mayoría de las microalgas de agua dulce tiene EPA como el HUFA n-3 dominante (Stewart, 1974). Así, el sistema enzimático de rotíferos podría estar pre-adaptado para incorporar EPA más fácilmente que DHA. Una segunda explicación para este hallazgo podría ser una mayor tasa de catabolismo de DHA en comparación con la de la EPA. Los resultados obtenidos por McEvoy *et al.* (1995) parecen indicar que en nauplios de *Artemia*, enriquecidos con diferentes aceites de pescado, la proporción final de EPA/DHA fue mayor que en el medio original, lo que sugiere que la relación podría ser metabólicamente alterado por la *Artemia* misma (Rodríguez *et al.*, 1996), usando un proceso de retroconversión de 22:6n-3 (DHA) a 20:5n-3 (EPA) sugerido en este organismo (Navarro *et al.*, 1999) y también en rotíferos (Barclay y Zeller, 1996).

10. CONCLUSIONES

- Existe expresión normalizada del gen *Δ6fad* en *Lutjanus argentiventris* y fue detectada desde el estadio de huevo y a lo largo del desarrollo embrionario.
- La expresión de *Δ6fad* en larvas de *Lutjanus argentiventris* para todos los tratamientos, fue significativamente mayor a las 72 hrs. posteriores a la eclosión.
- No se observó una diferencia significativa en el crecimiento larval al suministrar rotíferos con un elevado porcentaje de DHA.
- No se encontró un efecto negativo entre los niveles de DHA suministrados en la dieta sobre la expresión del gen.
- Se observó una correlación inversa entre la concentración de EPA en larvas y los niveles de DHA en rotíferos.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo la caracterización funcional de la enzima, para determinar sobre que sustratos presentes en la dieta está actuando.

Realizar q-PCR en tiempo real con más de un gen de referencia.

Evaluar la expresión y actividad elongasa en paralelo.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Rezq, T., K. Al-Abdul-Elah, R. Duremdez, A. Al-Marzouk, C.M. James, H. Al-Gharabally, Al-Shimmari J. 2002. Studies on the effect of using the rotifer, *Brachionus plicatilis*, treated with different nutritional enrichment media and antibiotics on the growth and survival of blue-fin sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes), larvae. *Aquaculture Research*. 33(2):117–128.
- Abdo-de la Parra, M.A, L.E. Rodríguez-Ibarra, F. Campillo-Martínez, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar, L.S. Álvarez-Lajonchère, D. Voltolina. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 141-146.
- Aburto-Oropeza, O. 2009. Recruitment and ontogenetic habitat shifts of the yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*) in the Gulf of California. *Marine biology*. 2461–2472.
- Arjona, M.O., E. Palacios. 2009. Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (derivatización directa) en alimento peletizado enriquecido con lípidos. *Manual de Laboratorio*. CIBNOR. La Paz, México, 18 p.
- Barclay, W., S. Zeller. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquacult. Soc.* 27, 314–322.
- Bell, J.G., R.J. Henderson, D.R. Tocher, F. McGhee, J.R. Dick, A. Porter, R. Smullen, J.R. Sargent. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 132, 222–230.
- Bell, M., J.R. Dick, A.E. Porter. 2003. In vivo assays of docosahexaenoic acid biosynthesis in fish. *The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference*. Institute of Marine Research, Postboks 1870 Nordnes, N-5817, Bergen, Noruega.
- Bell, M.V., R.S. Batty, J.R. Dick, K. Fretwell, J.C. Navarro, J.R. Sargent. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring *Clupea harengus* L. *Lipids* 30, 443–449.
- Boersma, M., C. Stelzer. 2000. Response of a zooplankton community to the addition of unsaturated fatty acids : an enclosure study. 179–188.
- Bondia-Pons, I. 2007. Estudio del perfil de Ácidos grasos en la evaluación de la dieta Mediterránea como patrón de dieta saludable en poblaciones europeas. *Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia. Departament de Nutrició i Bromatologia. Tesis de Doctorado*. 290 pp.

- Boza-Abarca, J., E. Calvo-Vargas, N. Solís-Ortiz, J. Komen. 2008. Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the marine biology station, Puntarenas, Costa Rica. *Ciencias Marinas* 34(2):239-252.
- Brandsen, M.P., S.C. Battaglene, D.T. Morehead, G. A. Dunstan, P.D. Nichols. 2005. 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(1-4):331–344.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer. 2009. The MIQE Guideline: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4): 611-622.
- Calder, P.C. 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: explained and mechanism explored. *Clin Sci LondI*; 107:1-11.
- Cousseau, M.B. y R. Perrotta .1998. Peces Marinos de Argentina, Biología, Distribución, Pesca. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP).163 p.
- Coutteau, P., G. Van Stappen, P. Sorgeloos. 1995. A standard experimental diet for the study of fatty acid requirements of weaning and first on growing stages of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): selection of the basal diet. *ICES Marine Science Symposia* 201: 130-137.
- Dumas, S., M.O. Rosales-Velazquez, J.L. Ortiz-Galindo, R.I. Ochoa-Báez, J.R. Torres-Villegas, J.A. Ocampo-Cervantes. 2001. Control of gonad maturation in laboratory and hormonal induced spawning of the pacific red snapper *Lutjanus peru* Nichols and Murphy Congress International World Aquaculture Society (WAS). 26 de November-01 December Orlando, Florida U.S.A.
- Emata, A.C., B. Eullaran, T.U. Bagarinao. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture* 121:381-387.
- FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma, FAO.219p.
- Furuita, H., K. Konishi, T. Takeuchi. 1999. Effect of Different Levels of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid in *Artemia* nauplii on Growth, Survival, and Salinity Tolerance of Larvae of the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture* 170, 59–69.
- Gara, B., R.J. Shields, L. McEvoy.1998. Feeding strategies to achieve correct metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus L.*, using enriched Artemia. *Aquaculture Research*, 29: 935-948.

- Garg, M., E. Sebokova, A. Thomson, M. Clandini. 1988. Delta-6 desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or omega-3 fatty acids. *Biochem. J.* 249, 351–356.
- Gawlicka, B.A., M.A. Herold, F.T. Barrows, J. De Nou. 2002. Effects of dietary lipids on growth, fatty acid composition, intestinal absorption and hepatic storage in white sturgeon (*Acipenser transmontanus R.*) larvae. 18:673–681.
- Geay, F., E. Santigosa, C. Corporeau, P. Boudry, Y. Dreano, L. Corcos, N. Bodin, M. Vandeputte, J.L. Zambonino-Infante, D. Mazurais, C.L. Cahu. 2010. Regulation of $\Delta 6fad$ expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax, L.*) fed a vegetable diet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (156) 237–243.
- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* (1), 71–124.
- González-Rovira, A., Mourente G., Zheng X., Tocher D.R., Pendón C. 2009. Molecular and functional characterization and expression analysis of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase cDNA of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax L.*) *Aquaculture* (298) 90–100.
- Hamre, K., T. Harboe. 2008. Critical levels of essential fatty acids for normal pigmentation in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) larvae. *Aquaculture*. 277(1-2):101–108.
- Han, K., I. Geurden, P. Sorgeloos. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n–3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*. 183 (34):335–347.
- Hernández-Rauda, R., M. Aldegunde. 2002. Changes in dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, telencephalon and hypothalamus during gonadal development of male *Lutjanus argentiventris* (Teleostei). *Marine Biology* 141: 209–216.
- Howell, B.R., 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus L.* *Aquaculture* 18, 215–225.
- Ibarra-Castro, L., L. Álvarez-Lajonchère. 2009. Improved induced-spawning protocol for the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 61(2): 121–133.
- ICES (International Council for the Exploration of the Sea). 1994. Report of the ICES working group on mass rearing of juvenile marine fish. *Int. Counc. Explor. Sea Comm. Meet. (Maricult. Comm.) F: 6.*

- Izquierdo, M.S., T. Arakawa, T. Takeuchi, R. Haroun, T. Watanabe .1992. Effect of n-3 HUFA Levels in Artemia on Growth of Larval Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture* 105, 73–82.
- Izquierdo, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2: 183–191.
- Izquierdo, M.S., L. Obach, D. Arantzamendi, L. Montero, L. Robaina, G. Rosenlund. 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*. 9(6):397–407.
- Izquierdo, M. S., L. Robaina, E. Juárez-Carrillo, V. Oliva, M. Hernández-Cruz, J.M. Afonso. 2008. Regulation of growth, fatty acid composition and delta 6 desaturase expression by dietary lipids in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*.34: 2 117-127.
- Jaya-Ram, A., D.I Sairatul, E. Yee-Ling, K. Meng-Kiat, W. Kah-Loon, C.A. Shu-Chien. 2011. Molecular cloning and ontogenic mRNA expression of fatty acid desaturase in the carnivorous striped snakehead fish (*Channa striata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158 415–422 pp.
- Kennedy, S.R., M.J. Leaver, P.J. Campbell, X. Zheng, J.R. Dick, D.R. Tocher. 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 41 (5), 423–436.
- Kotani, T., T. Genka, M. Tanabe, A. Miyashima, H. Fushimi, M. Hayashi. 2010. Effect of Nutritional Enrichment Method on Fatty Acid Contents of Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41(6):884–892.
- Kjørsvik, E., Y. Olsen, G. Rosenlund, O. Vadstein. 1991. Effect of various lipid enrichments in rotifers and the development of early stages in turbot. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi '91—Fish and Crustacean Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 15, Gent, Belgium, 20–22.
- Koven, W.M., R.J. Henderson, J.R. Sargent. 1997. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): in-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. *Aquaculture*. 151(1-4):155–171.
- Lazo, J. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 noviembre. Mérida, Yucatán, México.

- Liu, J., K. Li, B. Huang, X. Chen. 2004. Effect of n-3 HUFA levels in rotifers and *Artemia* on growth and survival of larval black sea bream (*Sparus macrocephalus*). 22(4):421–424.
- Leaver, M.J., E. Boukouvala, E. Antonopoulou, A. Diez, L. Favre-Krey, M.T. Ezaz, D.R. Tocher, J.M. Bautista, G. Krey. 2005. Three peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology* 146, 3150–3162.
- Leaver, M.J., J.M. Bautista, B.T. Björnsson, E. Jönsson, G. Krey, D.R. Tocher, B.E. Torstensen. 2008. Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Finfish Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1):73–94.
- Martínez-Lagos, R. 2003. Maduración y desove del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo. Tesis de Maestría. CIBNOR, La Paz, B.C.S., México. 134 p.
- McEvoy, L.A., J.C. Navarro, J.G. Bell, J.R. Sargent. 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, 134: 101 - 112.
- Meesapyodsuk, D., X. Qiu. 2011. The Front-end Desaturase: Structure, Function, Evolution and Biotechnological Use. Review. *Lipids*
- Mejía-Narváez, L.M., C.L. Rodríguez-Araujo, J.N. López-Macías. 2009. Evaluación de la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) a diferentes dosis, en la reproducción inducida de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*, Stendaichner 1869) en condiciones de cautiverio. *vet.zootec.* 3(2): 28-40.
- Monroig, M.O. 2007. Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis de doctorado. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions. 289 pp.
- Morais, S., W. Koven, I. Rønnestad, M.T. Dinis, L.E.C. Conceição. 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. *Aquaculture*. 246(1-4):347–357.
- Morais, S., Conceição L., I. Rønnestad, W. Koven, C. Cahu, J.L. Zambonino, M.T. Dinis 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture*. 268(1-4):106–122.
- Morais, S., G. Mourente, A. Ortega, J. Tocher, D.R. Tocher. 2011. Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA: EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 313 (2011) 129–139 pp.

- Moretti, A., M.P. Fernández-Criado, G. Cittolin, R. Guidastrì. 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. FAO Corporate Document Repository (Vol. 1), 195 pp.
- Mourente, G., J.R. Dick. 2002. Influence of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on the metabolism of [1-14C] 18:3n-3 in isolated hepatocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Fish Physiol. Biochem.* 26, 297–308.
- Mourente, G., D.R. Tocher. 1994. In vivo metabolism of [1-14C] linolenic acid (18:3n-3) and [1-14C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 109–118.
- Mourente, G., J.E. Good, J.G. Bell. 2005a. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2alpha, immune function and effectiveness of a fish oil. *Aquaculture Nutrition*. 11(1):25–40.
- Mourente, G., J.R. Dick, J.G. Bell, D.R. Tocher. 2005b. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C] 18:3n-3 (LNA) and [1-14C] 20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquaculture* 248, 173–186.
- Moyad, M.A. 2005. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part I Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations; 23:28-35.
- Naas, K.E., T. Nress, T. Harboe. 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus L.*) in green water. *Aquaculture*, 105: 143- 156.
- Nakamura, M.T., T.Y. Nara. 2002. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochemical Society Transactions*. Volume 30, part 6. 1076-1079 pp.
- Navarro, J.C., R.J. Henderson, L. McEvoy, M. Bell, y F. Amat. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture*. 174(1-2):155–166.
- Naylor, R.L., R.J. Goldberg, J.H. Primavera, N. Kautsky, M.C.M. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney, M. Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Nghia, T.T., M. Wille, S. Vandendriessche, Q.T. Vinh, P. Sorgeloos. 2007. Influence of highly unsaturated fatty acids in live food on larviculture of mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador 1949). *Aquaculture Research*. 38(14):1512–1528.

- Palacios, E., I.S. Racotta, B. Aparicio, O. Arjona, C.A. Martínez-Palacios. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside from Pátzcuaro Lake *Chirostoma estor estor*. Fish Physiol. Biochem. 33:81-91.
- Palacios, E., A. Bonilla, A. Pérez, I.S. Racotta, R. Civera. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 299: 201–215.
- Papanikos, N., R.P. Phelps, K. Williams, A. Ferry, D. Maus. 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. Fish Physiol. Biochem. 28:487–488.
- Park, H.G., V. Puvanendran, A. Kellett, C.C. Parrish, J.A. Brown. 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). ICES Journal of Marine Science, 63: 285e295.
- Pereira, L.S., A.E. Leonard, P. Mukerji. 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (68) 97–106.
- Pousão-Ferreira, P., S. Morais, E. Dores, L. Narciso. 1999. Eggs of gilthead seabream *Sparus aurata* L. as a potential enrichment product of *Brachionus* sp. in the larval rearing of gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquac. Res. 30, 751–758.
- Narciso, L., F. Nery, F. Cairrão, P.P. Ferreira. 1997. El perfil de los ácidos grasos de larvas de *Sparus aurata* se correlaciona con la composición de dietas de enriquecimiento de *Brachionus plicatilis* y *Artemia* sp.
- Rainuzzo, J.R., K.I. Reitan, Y. Olsen. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. Aquaculture (155) 103-115.
- Reitan, K.I., S. Bolla, Y. Olsen. 1994. A study of the mechanism of algal uptake in Yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). J. Fish Biol. 44, 303-310.
- Reitan, K.I., J.R. Rainuzzo, G. Oie, Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. Aquaculture 155, 207-221.
- Rivers, J. P. W., A. J. Sinclair, M. J. Crawford. 1975. Inability of the cat to desaturate essential fatty acids. Nature, 285: 171-173.
- Rodríguez, C., J.A. Prez, M.S. Izquierdo, J.R. Cejas, A. Boltios, A. Lorenzo. 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. 147:93–105.

- Ruiz, L.A., B.E. Girón, V.J. Madrid, B.A. González. 1985. Determinación de edad, crecimiento y algunas constantes biológicas del huachinango del Pacífico, *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922). Mem. VII Congr. Nal. Zool.
- Ruyter, B., C. Rosjo, O. Einen, M.S Thomassen. 2000. Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquacult. Nutr.* 6,119–127
- Salhi, M., M.S. Izquierdo, C.M. Hernández-Cruz, M. González, H. Fernández-Palacios. 1994. Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 124: 275e282.
- Santamaría-Miranda, A., J.F. Elorduy Garay, A.A. Rojas-Herrera, M. Villalejo-Fuerte. 2003. Ciclo reproductivo y desarrollo gonadal de *Lutjanus peru* en Guerrero, Mex. *J. Biol. Trop.* 50:489-502.
- Santamaría-Miranda, A., M. Saucedo-Lozano, M.N. Herrera-Moreno, J.P. Apún-Molina. 2005. Hábitos alimenticios de *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el norte de Sinaloa México. *Rev. Cienc. Mar.* 40:33-44.
- Santamaria-Miranda, A. 2010. Composición de ácidos grasos y calidad del desove en respuesta a las dietas de reproductores silvestres y en cautiverio de tres especies de pargos *Lutjanus argentiventris*, *L. guttatus* y *L. peru*. Tesis de Doctorado. UABCS.196 pp.
- Sargent J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson y D. Tocher.1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions
- Sargent J.R., D.R. Tocher, J.G. Bell. 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 181–257.
- Schreck C., W. Contreras-Sanchez, M. Fitzpatrick. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197:3-24.
- Seiliez I., S. Panserat, S. Kaushik, P. Bergot. 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Δ 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (130) 83-93.
- Seiliez I., S. Panserat, G. Corraze, S. Kaushik, P. Bergot. 2003. Cloning and nutritional regulation of a D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 135 449–460 pp.

- Seychelles L.H., C. Audet, R. Tremblay, R. Fournier, F. Pernet. 2009. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquaculture Nutrition*. 15(4):431–439.
- Silversand C., B. Norberg, C. Haux. 1996. Fatty-acids composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Mar. Biol.* 125:269–278.
- Suzuki, K., S. Hioky. 1979. Spawning, behavior, eggs and larvae of the Lutjanid fish, *Lutjanus kasmira*, in aquarium. *Japanese Journal of Ichthyology*. Vol 26:2 161-166.
- Tacon, A.G.J., M.R. Hasan, R.P. Subasinghe. 2006. Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular No. 1018. FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Takeuchi, T., F. Zheng, T. Takeuchi, M. Yosheda, J. Hirokawa, T. Watanabe. 1994. Nutritive value of DHA-enriched rotifer for larval cod. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 60: 641-652 (In Japanese).
- Thomassen, M.S., D.Rein, G. Berge, T. Østbye, B. Ruyter. 2012. High dietary EPA does not inhibit $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed rapeseed oil diets. *Aquaculture* 360-361 (2012) 78–85.
- Thanuthong, T., D. Francis, E. Manickam, S. Senadheera, D. Cameron-Smith, M.G. Turchini. 2011. Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion. *Aquaculture* 322-323. 99–108.
- Tiku, P.E., A. Gracey, A.I. Macartney, R.J. Beynon, A. Cossins. 1996. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818.
- 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., M. Agaba, N. Hastings, A.J. Teale. 2003. Biochemical and molecular studies of the fatty acid desaturation pathway in fish. In: Browman, H., Skiftesvik, A.B. (Eds.), *the Big Fish Bang*. Institute of Marine Research, Bergen, Norway, pp. 211–227.
- Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*. 41(5):717–732.

- Tocher, D.R., X. Zheng, C. Schleichriem, N. Hastings, J.R. Dick, A.J. Teale. 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*. 41 (11):1003–16.
- Turchini, G.M., B.E. Torstensen, N. Wing-Keong. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1, 10–57.
- Ulmann, L., M. Bouzianne, V. Mimouni, J. Belleville, J.P. Poisson. 1992. Relationship between rat liver microsomal $\Delta 6$ - and $\Delta 5$ -desaturase activities and fatty acid composition: comparative effects of coconut and salmon oils during protein restriction. *J. Nutr. Biochem.* 3, 188–193.
- Vagner, M., E. Santigosa. 2011. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture* 315 :131–143.
- Vagner, M., J.L. Zambonino-Infante, J.H. Robin, J. Person-Le Ruyet. 2007. Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? *Aquaculture*. 267(1-4):165–174.
- Vagner, M., J.H. Robin, J.L. Zambonino Infante, J. Person-Le Ruyet. 2007. Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*. 266(1-4):179–190.
- Vagner, M., J.H. Robin, J.L. Zambonino-Infante, D.R. Tocher, J. Person-Le Ruyet. 2009. Ontogenic effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a range of dietary n-3 highly unsaturated fatty acid levels on the functioning of polyunsaturated fatty acid desaturation pathways. *Br. J. Nutr.* 101, 1452–1462.
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73A:3–15.
- Watanabe, T., R. Vassallo-Agius. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture* 227:35–61.
- Yamamoto, Y., K. Naoki, Y. Takeuchi, Alimuddin, Yutaka Haga, Shuichi Satoh, Toshio Takeuchi Goro Yoshizaki. 2010. Cloning and nutritional regulation of polyunsaturated fatty acid desaturase and elongase of a marine teleost, the nibe croaker *Nibea mitsukurii*. *Fish Sci* (2010) 76:463–472
- Yanes-Roca, C., N. Rhody, M. Nystrom, K. Main. 2009. Effects of Fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture* 287, pp 335-340

- Zheng, X., I. Seiliez, N. Hastings, D.R. Tocher, S. Panserat, C.A. Dickson, P. Bergot P. A.J. Teale. 2004. Characterization and comparison of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (139) 269–279.
- Zheng, X., M.J. Leaver, D.R. Tocher. 2009a. Long-chain polyunsaturated fatty Acid synthesis in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) $\Delta 6$ fatty acyl desaturase gene promoters. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (154) 255–263.
- Zheng, X., Z. Ding, Y. Xu, O. Monroig, S. Morais, D.R. Tocher. 2009b. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterization of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elov15 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 290 (1-2):122–131.
- Zheng, X., B.E. Torstensen, D.R. Tocher, J.R. Dick, R.J. Henderson, J.G. Bell. 2005. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta* (1734) 13– 24.

ANEXOS

ANEXO 1

Síntesis de cDNA con ImProm II (RT) (Promega)

1.- Mezclar 5 μ l de RNA total con 1 μ l de random primer (ó 1 μ l de oligo dT)

2.- Incubar a 70°C 10 min y poner en hielo

3.- Mientras se incuba el RNA preparar mezcla maestra (IX)

a. Agua DEPC	5.3 μ l
b. 5X Buffer para ImProm II	4.0 μ l
c. 25 mM MgCl ₂	2.4 μ l
d. 10 mM dNTP's	1.0 μ l
e. RNAsin	0.5 μ l
f. Improm II	0.8 μ l
	<hr style="width: 50px; margin: 0 auto;"/>
	14 μ l

4. Repartir 14 μ l de la mezcla maestra por cada tubo que contenga el RNA + random primers (Oligo (dT) (Total 20 μ l) *recuperar el líquido del RNA con una centrifugada rápida

5.- Incubar a temperatura ambiente 10min

6.- Incubar a 45°C por 60 min

7.- Incubar a 90°C por 5 min



En termociclador.

8. Poner de inmediato en hielo

9.- Recuperar líquido con centrífuga rápida

10.- Almacenar a -20°C

ANEXO 2

GENECLEAN (MP Biomedicals)

Purificación de cDNA a partir de un gel de agarosa

Productos y materiales:

Geneclean spin kit (BIO 101, REF 1101-200) **ATENCIÓN:** la solución New Wash deberá ser ajustada con 25mL de etanol antes de ser utilizada!!

Las bandas a purificar deberán ser de aproximadamente de 300mg

Baño maría o termo block a 55°C

Centrifuga para tubos Eppendorf

Procedimiento:

- 1.- Agrega 400µl de GC Spin Glassmilk al tubo que contiene 300mg de gel
- 2.- Calentar 5 minutos a 55°C, hasta derretir completamente el gel
- 3.- Pipetear la solución: meterla al Spin filter
- 4.- Centrifugar 60 seg. a 14000 G a temperatura ambiente. Vaciar el eppendorf
- 5.- Agregar 500µl de GC spin New Wash sobre Spin filter
- 6.- Centrifugar 30 seg. Aproximadamente (no deberá quedar líquido en la columna).
- 7.- Centrifugar 2 min. para secar el tubo
- 8.- Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de fondo reducido del kit.
- 9.- Agregar 15µl de GC Spin Elution sobre el Spin filter (el cDNA retenido sobre el filtro será eluído). Agitar levemente por 3 seg. en vortex (a la mitad de la intensidad máxima)
- 10.- Centrifugar 30 seg.
- 11.- Desechar filtro
- 12.- La solución de cDNA obtenida (aprox. 20µl) almacenarla en el refrigerador.

ANEXO 3

Preparación de medios para clonación

Productos:

Medio LB (**SIGMA** L3022)

Agar (**SIGMA** A5054)

ITPG (**SIGMA** I6758)

Xgal (**BIO 101** 4063-102)

Ampicilina (**SIGMA** A0166)

Dimetil formamida (**SIGMA** D8654)

Ampicilina

Solución madre: 100mg/ml en agua destilada estéril

Filtrar a 0.2 μ m y alicuotar en 1ml

Almacenar a -20°C

Medio LB líquido

1. 20 g LB Broth Base en 1 litro de agua destilada.
2. Autoclavear (20 min; 15 PSI).
3. Enfriar a 55°C en baño -María; agregando 500 μ l de ampicilina (100mg/ml).
4. Conservar a 4°C.

Medio LB sólido

1. 20 g de LB Broth Base + 15g de agar en 1 litro de agua destilada.
2. Autoclavear (20 min; 15 PSI).
3. Enfriar a 55°C en el baño María; agregando 500 μ l de ampicilina (100mg/ml).
4. Agregar 20 ml aprox. a cada placa.

5. Dejar solidificar.

6. Meter las placas en bolsas de plástico. Conservar a 4°C.

X-Gal

Solución madre: 40 mg/ml en dimethylformamide

Conservación a -20°C en una botella ámbar.

Utilización

Agregar 40µl de la solution madre sobre una caja Pétri conteniendo medio LB y preincubado a 37°C.

Esparcir uniformemente.

Dejar secar 15 minutos.

IPTG

Solution madre: 100mM en agua destilada

Filtrar en 0.2µm y alicuaotar en 1ml

Almacenar a -20°C

Utilización

Agregar 40µl de la solution madre sobre una caja Pétri conteniendo medio LB y preincubado a 37°C.

Esparcir uniformemente.

Dejar secar 15 minutos.

ANEXO 4

Clonación de fragmentos de PCR con TOPO TA Cloning Kit

(Invitrogen n° K4550-40)

Materiales y Productos:

Baño María a 42° C

Incubadora a 37°C + agitador horizontal

Cajas de Pétri (Ø=10cm)

Tubos de 10 ml con fondo cónico

Pipetas Pasteur

Tubos Eppendorf estériles

Medio LB (+ 50µg/ml de ampicilina): líquida y sólido (agar)

Xgal (40mg/ml en dimethylformamide)

IPTG 100mM

Protocolo:

A. Preparación de los medios y las células

1. Dejar el medio SOC a temperatura ambiente.
2. Dejar las placas conteniendo el medio LB+ampicilina 30 minutos a 37° C.
3. Agregar 40µl de Xgal, esparcir. Dejar secar durante 15 minutos.
4. Agregar 40µl de IPTG, esparcir. Dejar secar durante 15 minutos.
5. Incubar a 37°C hasta su uso.

Después de hacer esto...proceder a la clonación

1. Descongelar sobre hielo, las células competentes One Shot (1 tubo por transformación).

B. Clonación

Producto reciente de PCR	0,5µl a 2µl	(3 µl)
H2O estéril		1µl
TOPO-Vector		<u>1µl</u>
Salt		<u>1µl</u>
	<i>Volumen final</i>	6µl

1. Mezclar suavemente, agitando en círculos con la punta de la pipeta.
2. Dejar **5 MINUTOS** a temperatura ambiente (~25°C).
3. Centrifugar brevemente y dejar en hielo.
4. Proceder a la transformación inmediatamente.

C. Transformación

1. Agitar **en círculos con la punta de la pipeta**.
2. Agregar 2µl de la solución de clonación. Mezclar suavemente.
3. Dejar 30 minutos en hielo.
4. Meter 30 segundos a las células a 42°C: **No agitar**.
5. Transferir los tubos al hielo: dejar 2 minutos.
6. Agregar a cada tubo 200µl de medio SOC (que deberá estar a temperatura ambiente).
Cerrar bien los tubos.
7. Agitar horizontalmente los tubos durante 60 minutos a 37°C.
8. Meterlos en hielo.
9. Agregar de 50 a 100µl de cada tubo a cada caja petri precalentada.
10. Dejar toda la noche a 37°C.

D. Análisis de las clonas positivas

Una clonación eficaz, produce cientos de colonias. Tomar una docena de colonias blancas o azul claro.

Método 1 (para desarrollar una mini-prep):

1. Cultivar una colonia positiva en 2 ml de medio LB+ampicilina.
2. Dejar una noche a 37°C en agitación horizontal (60rpm).
3. Recuperar 0.6 ml de medio de cultivo para la conservación de clonas positivas agregando 0.4 ml de glicerol estéril).
4. Centrifugar las bacterias 20 segundos a 10000 rpm; eliminar el sobrenadante.
5. Proceder a la mini-prep.

Método 2:

1. Tomar una colonia positiva.
2. Ponerla en 25µl de mezcla para PCR (dNTP, Tp 10X, primers, Taq, agua).
3. Proceder la PCR (de 30 ciclos), **comenzando por 10 minutos a 94°C.**
4. Correr en gel.

ANEXO 5

Miniprep

RPM kit (MP Biomedicals)

Productos

RPM kit (BIO 101, ref. 2070-400)

ATENCIÓN: antes del primer uso, preparar la solución de lavado (WASH) agregando un volumen de etanol absoluto.

Protocolo

Los cultivos bacterianos de toda una noche deberán estar concentrados en un tubo Eppendorf estéril de 2 ml.

1. Centrifugar los cultivos (volumen 1,5ml) durante 30 seg. a 12000RPM.

Desechar el sobrenadante.

2. Agregar **50µl de Pre-lysis Buffer** para resuspender el pellet.

Homogenizar (pipeta).

3. Agregar **100µl de Alkaline lysis Solution (deberá estar entre a 22-25°C).**

Mezclar bien agitando con la pipeta varias veces.

Esperar 1 min (la solución deberá estar clara).

4. Agregar **100µl de Neutralizing Solution**: vortexear brevemente.

Se formará un precipitado blanco, correspondiente a membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos...

Centrifugar durante 2 min. a 12000 RPM

5. Para cada tubo de ensayo, poner un **Spin filter** colocar sobre el tubo **Catch**.

Agregar **250µl de Glassmilk Spin Buffer** (bien agitado y mezclado previamente) en el filtro.

6. Recuperar el sobrenadante de la centrifugada y meterlo al filtro.

7. Mezclar con la pipeta (aspirar y soltar 2-3 veces).

Esperar 1 min

Centrifugar durante 1 min. Vaciar el tubo

8. Agregar **350µl de Wash Solution** al filtro.

Centrifugar durante 1 min. Vaciar el líquido de tubo.

Centrifugar nuevamente 1 min. para secar el filtro.

9. Transferir el filtro sobre un nuevo tubo.

Agregar **40µl de H₂O destilada estéril o tampón TE.**

Agitar en vortex (a la mitad de la intensidad máxima) para resuspender la resina.

Esperar 5 min.

Centrifugar 30 seg para eluir el DNA.

10. Cuantificar

[DNA]=(A₂₆₀). (50).dilution en µg/ml

11. Conservar a 4°C o -20°C.

Anexo 6

Curva estándar y de temperatura de fusión de los genes Efl α y $\Delta 6fad$

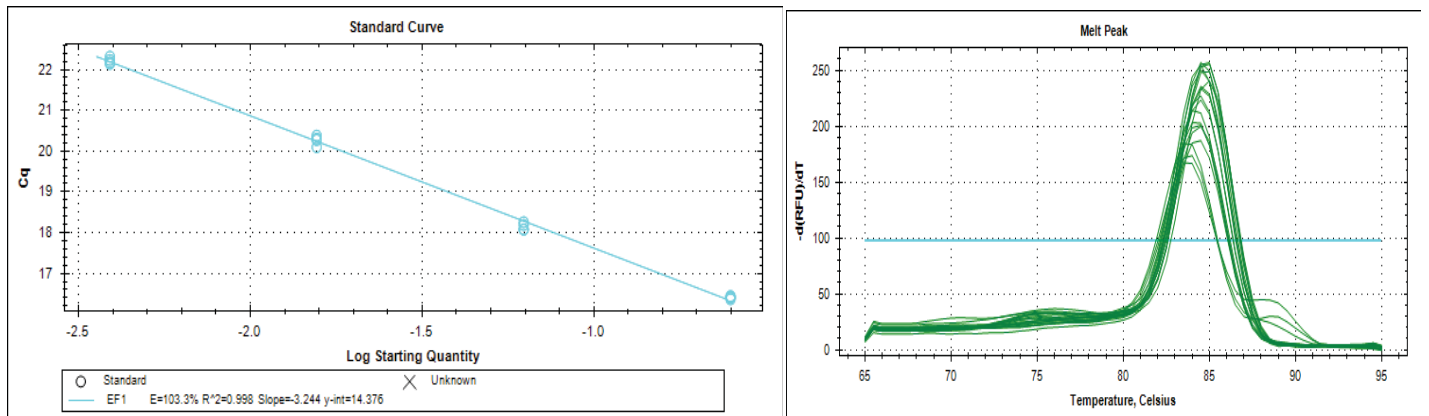


Figura 21. Curva estándar y disociación del gen Efl.

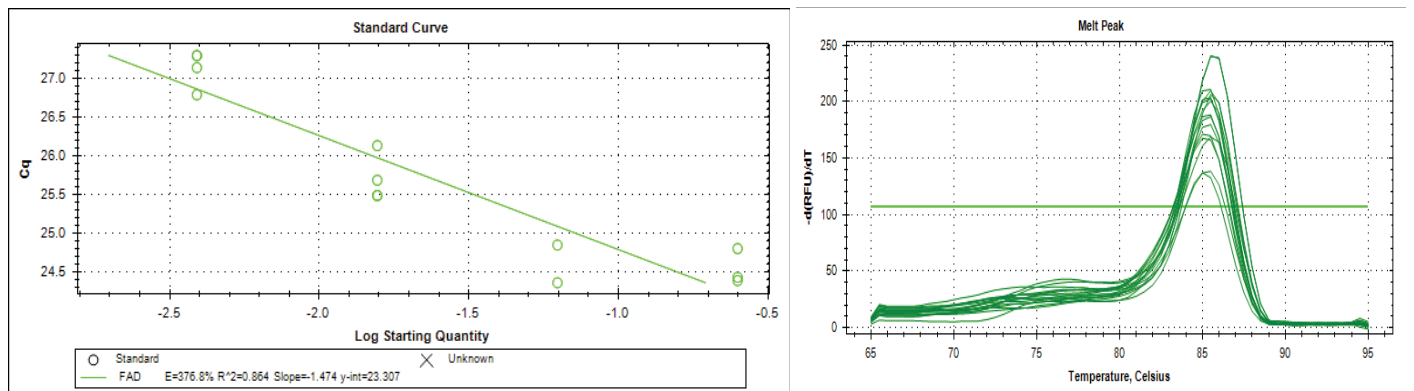
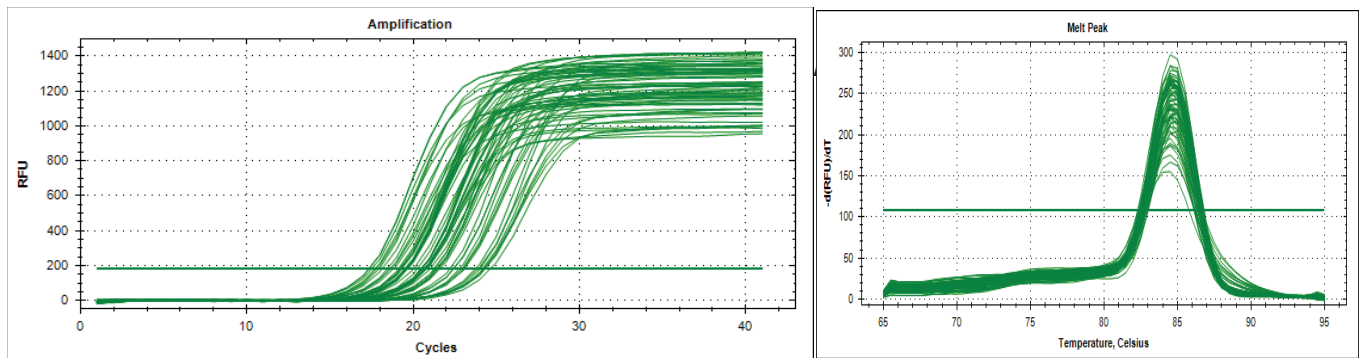


Figura 22. Curva estándar y disociación del gen $\Delta 6fad$



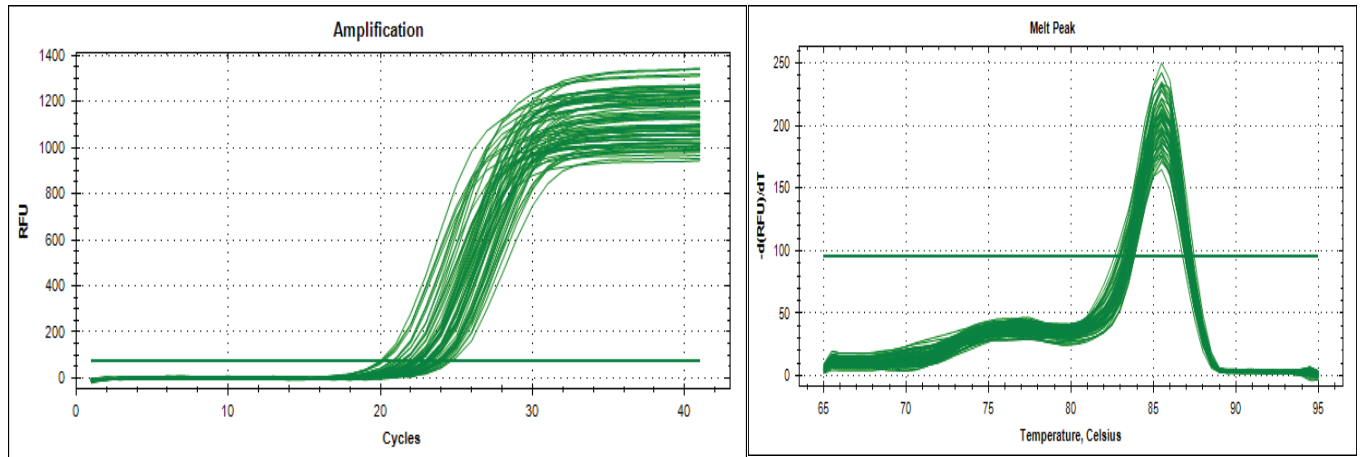


Figura 23. Amplificación del gen $\Delta 6fad$ por qPCR del cDNA de *Lutjanus argentiventris*