

# Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (VLC-PUFA) durante el desarrollo de las fases larvares de dorada (*Sparus aurata*) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

M. Torres<sup>1</sup>, J.C. Navarro<sup>1</sup>, I. Varó<sup>1</sup>, M.J. Agulleiro<sup>2</sup>, S. Morais<sup>2</sup>, Ó. Monroig<sup>3</sup> y F. Hontoria<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC), 12595, Ribera de Cabanes (Castellón), España. <sup>2</sup>IRTA, Ctra. Poble Nou km 5.5, 43540, Sant Carles de la Ràpita (Tarragona), España. <sup>3</sup>Institute of Aquaculture, University of Stirling, FK9 4LA, Stirling, Escocia, UK



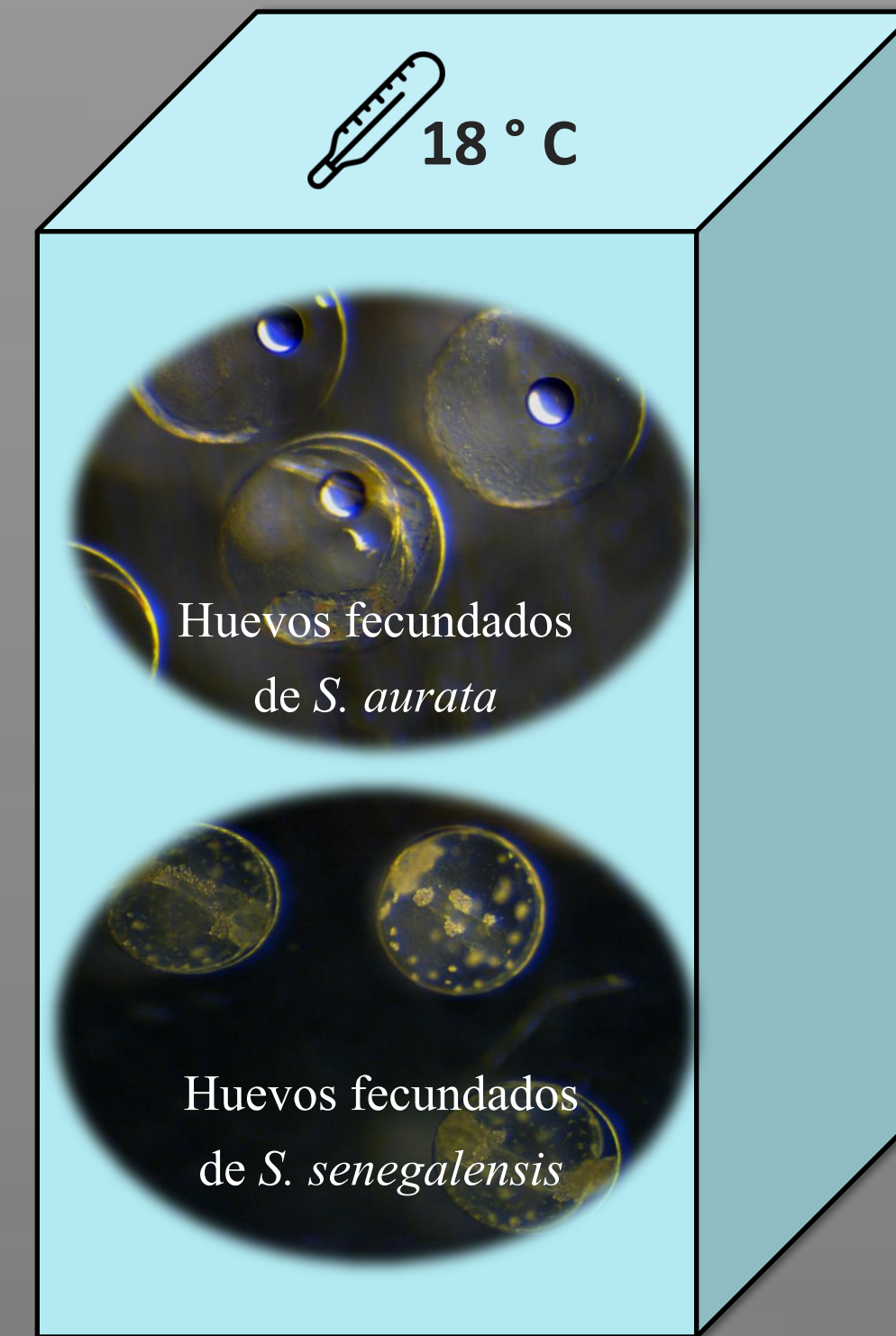
## Resumen

Aunque los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (VLC-PUFA) no han sido prácticamente estudiados en teleosteos, pueden tener un papel determinante en el desarrollo de diferentes tejidos y diversos procesos fisiológicos (visión, reproducción). El objetivo de este trabajo es determinar los niveles de expresión de los genes *elov15* y *fad2*, implicados en el proceso de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) así como los genes *elov14a* y *elov14b*, implicados en la síntesis de VLC-PUFA, durante las primeras etapas del desarrollo larvario de lenguado (*Solea senegalensis*) y dorada (*Sparus aurata*). Los resultados obtenidos ofrecen una visión integrada de cómo se expresan estos genes en larvas de ambas especies, revelando diferencias notables entre los diferentes genes dentro de la misma especie y a nivel inter-específico, al tiempo que ofrecen una visión de los requerimientos de LC-PUFA (sustratos para la biosíntesis de VLC-PUFA) en las dietas durante las etapas tempranas.

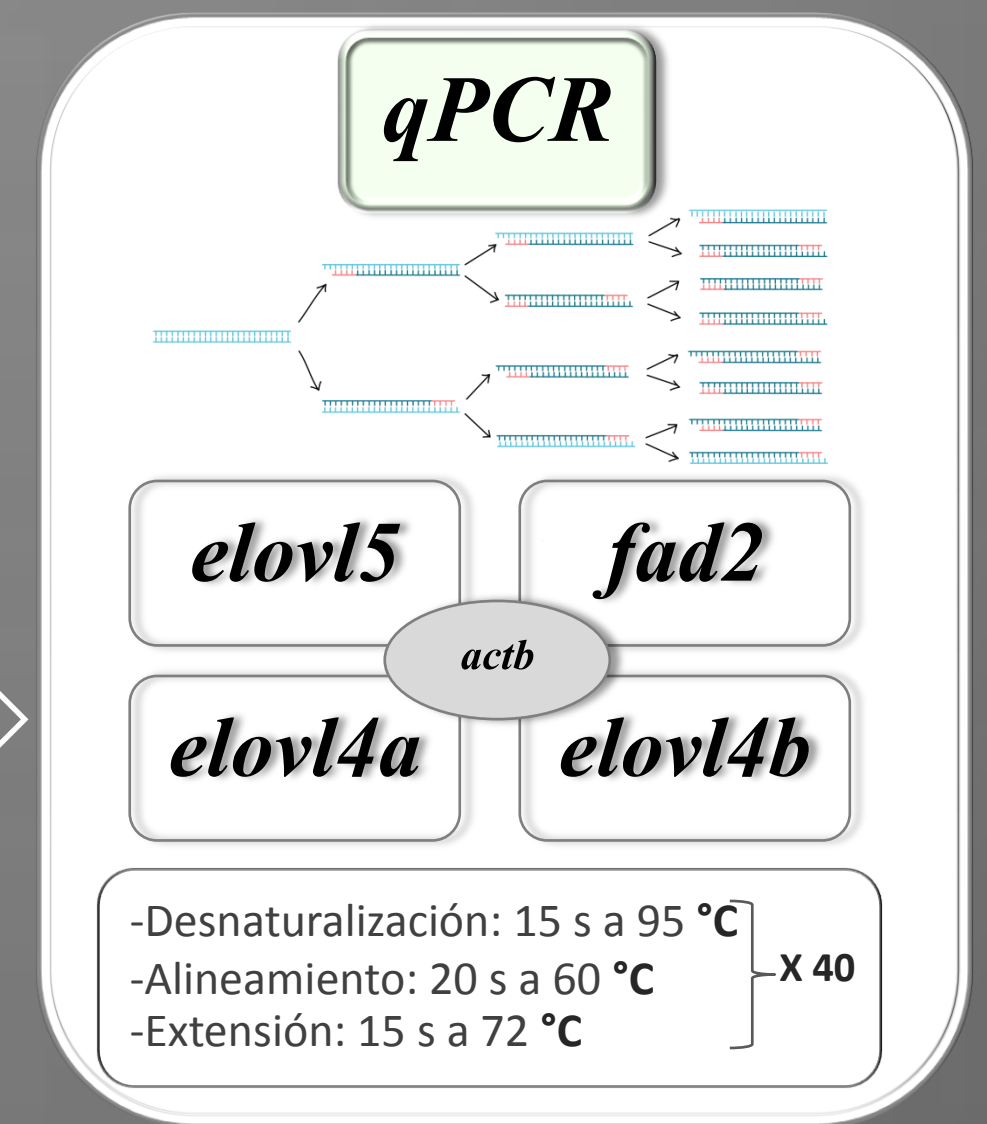
## Introducción

La importancia de los LC-PUFA (20-24C) en la nutrición humana ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios, resaltando el papel fundamental de estos compuestos en diversos procesos fisiológicos y metabólicos. El pescado representa la principal fuente de LC-PUFA, especialmente de la serie n-3, para el consumo humano. Esta circunstancia, junto con los especiales requerimientos en estos compuestos por parte de los teleosteos marinos durante su cultivo, ha motivado el estudio de su metabolismo y de sus mecanismos de regulación con fines aplicados a la acuicultura. Curiosamente, el estudio de los VLC-PUFA (>24C) no parece haber despertado el mismo interés, a pesar de que parecen tener gran importancia para el correcto funcionamiento de diferentes órganos como la retina, el cerebro y las gónadas de vertebrados. Los VLC-PUFA son el resultado de sucesivas elongaciones de LC-PUFA bajo el control de la elongasa 4 llegando a transformar compuestos como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA) hasta polienos de 36 carbonos. En los peces, se ha demostrado que las funciones y patrones de expresión de las dos isoformas de esta elongasa, *elov14a* y *elov14b*, son diferentes, por lo que el estudio de las rutas biosintéticas de ambas isoformas es importante para caracterizar adecuadamente los procesos biológicos en las que participan. Esto parece especialmente relevante en las primeras fases del desarrollo, donde la provisión de LC-PUFA y VLC-PUFA puede ser determinante para el óptimo funcionamiento de las capacidades visuales y de aprendizaje. Es por ello que el objetivo de este ensayo se centra en determinar los niveles de expresión de los genes implicados en el proceso de síntesis de LC-PUFA (*elov15*, *fad2*) y VLC-PUFA (*elov14a*, *elov14b*) durante las primeras etapas del desarrollo de larvas de lenguado (*Solea senegalensis*) y dorada (*Sparus aurata*).

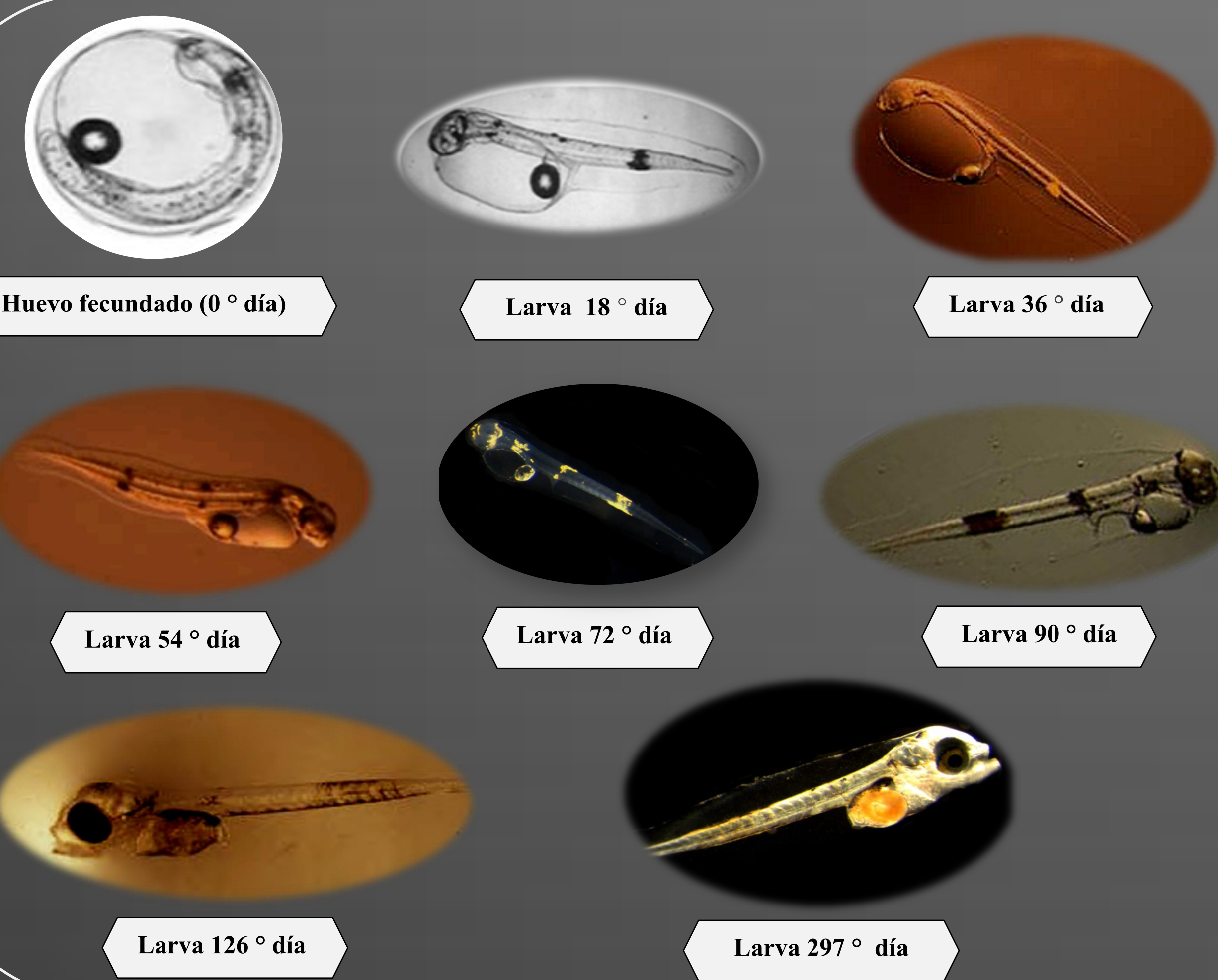
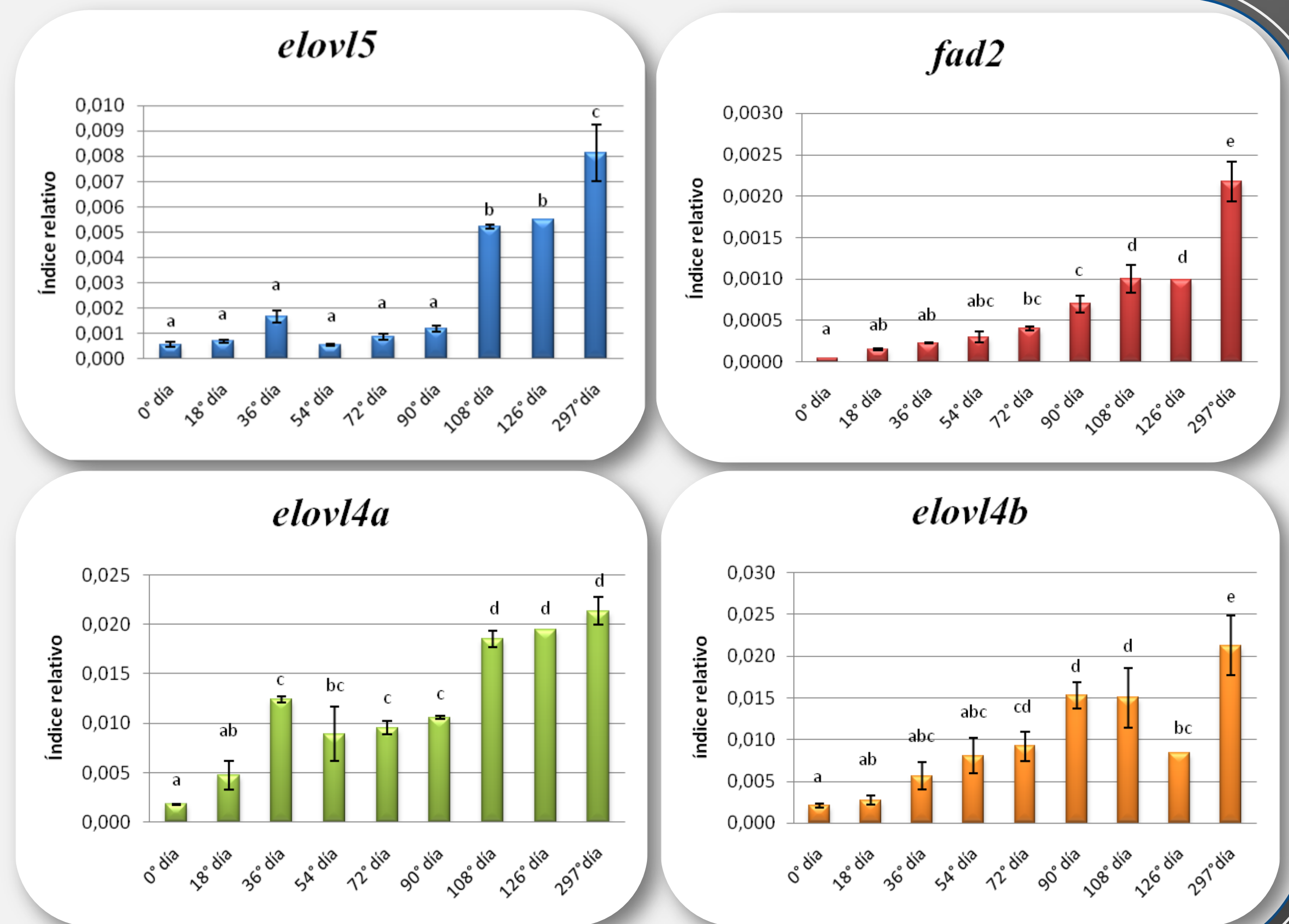
## Material y métodos



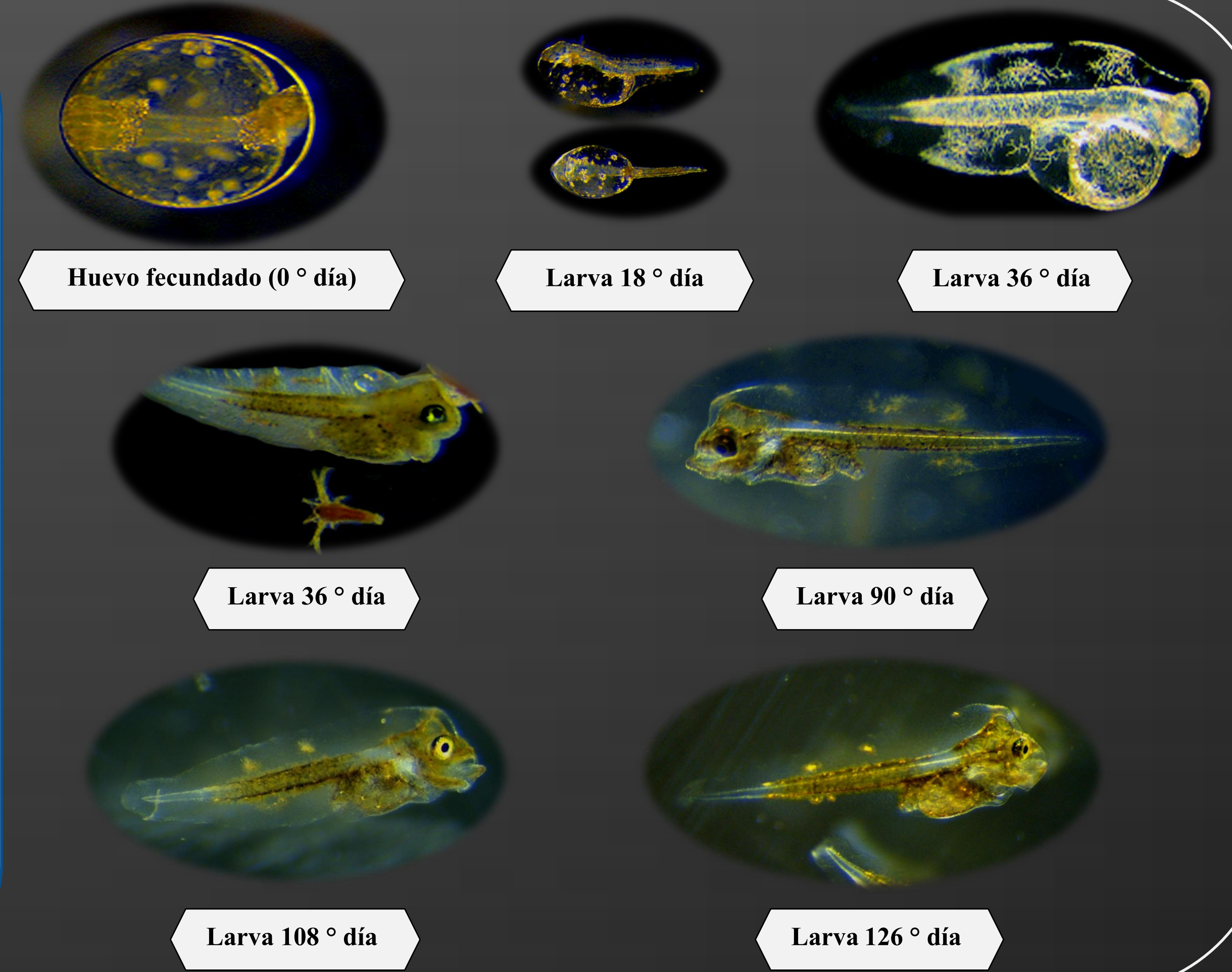
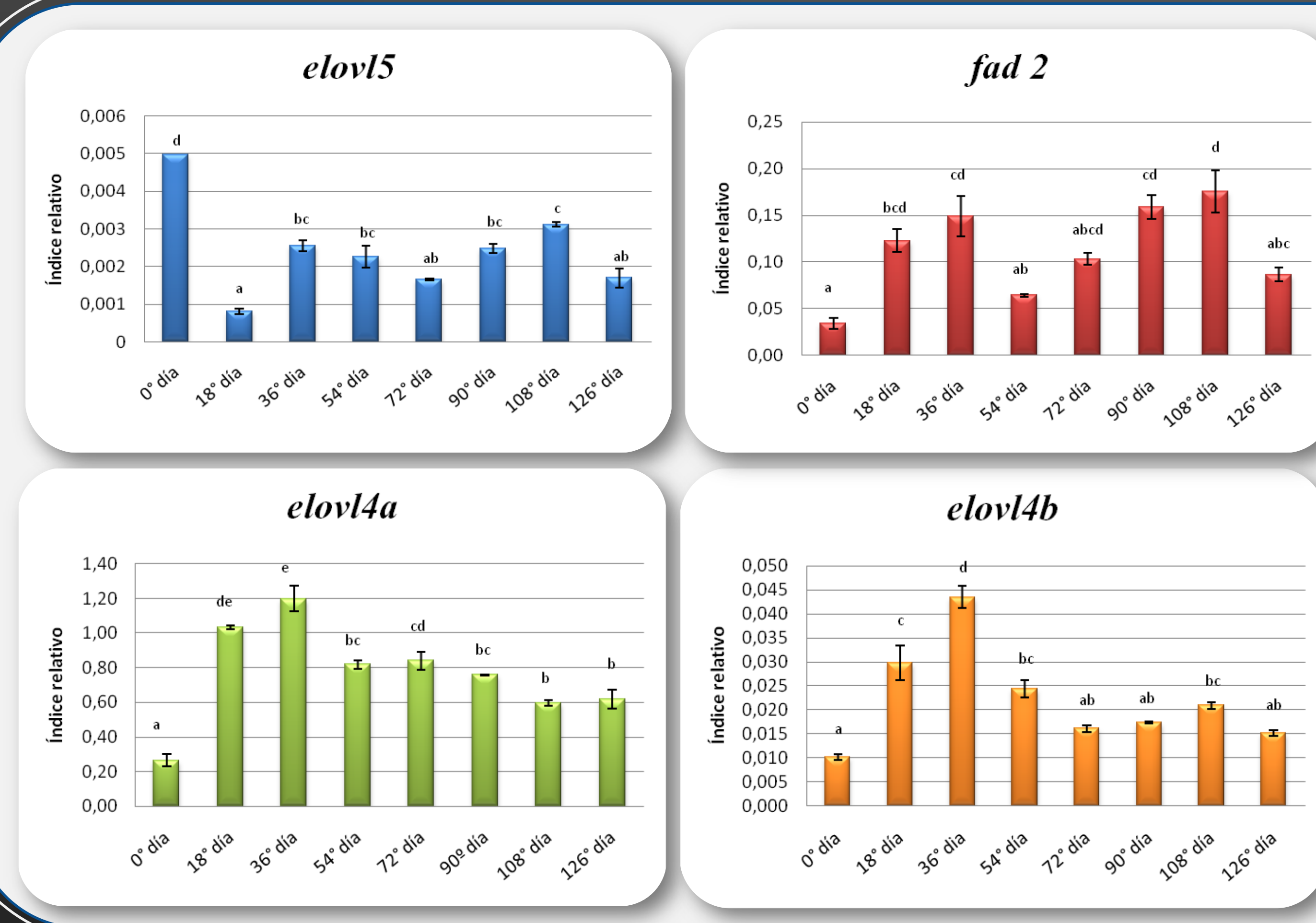
Se cultivaron huevos fertilizados de dorada y lenguado a una temperatura de 18°C en agua de mar filtrada, manteniéndose estas condiciones una vez eclosionados. La alimentación exógena se inició con el rotífero *Brachionus plicatilis*, seguido por nauplios de *Artemia franciscana*. Se recolectaron muestras por triplicado diariamente durante el seguimiento del desarrollo, para su posterior análisis. Se extrajo el RNA de todas las muestras para el estudio de la expresión relativa de los genes estudiados con respecto a la de  $\beta$ -actina (*actb*), por medio de la amplificación de las muestras con PCR cuantitativa (qPCR)



**Figura 1.** Expresión relativa de los genes que codifican para la desaturasa *fad2* y las elongasas *elov14a*, *elov14b* y *elov15* durante el desarrollo larvario de *S. aurata* en huevos (0 ° día) y larvas, determinada por qPCR. Los valores (medias  $\pm$  SD,  $n=3$ ) se muestran como índice relativo del número de copias de cada gen con respecto al de  $\beta$ -actina (gen de referencia). Las distintas letras sobre las columnas indican diferencias significativas (ANOVA y Tukey's test,  $P \leq 0.05$ ) entre periodos de desarrollo, expresados en grados día (IBM SPSS Statistics 24).



**Figura 2.** Expresión relativa de los genes que codifican para la desaturasa *fad2* y las elongasas *elov14a*, *elov14b* y *elov15* durante el desarrollo larvario de *S. senegalensis* en huevos (0 ° día) y larvas, determinada por qPCR. Los valores (medias  $\pm$  SD,  $n=3$ ) se muestran como índice relativo del número de copias de cada gen con respecto al de  $\beta$ -actina (gen de referencia). Las distintas letras sobre las columnas indican diferencias significativas (ANOVA y Tukey's test,  $P \leq 0.05$ ) entre periodos de desarrollo, expresados en grados día (IBM SPSS Statistics 24).



## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos para cada gen se muestran en las Figuras 1 y 2 para dorada y lenguado, respectivamente. Para ambos casos, se detecta la presencia de dos isoformas de *elov14* antes de la eclosión. Además, se constata la existencia de variaciones inter e intra-específicas en los niveles de expresión de los distintos genes estudiados, reflejo de sus diferentes requerimientos de LC-PUFA y de las distintas capacidades funcionales de sus enzimas.

***S. aurata*:** La expresión de los genes se mantiene baja hasta el final del periodo analizado cuando aumenta apreciablemente, denotando una baja actividad de los genes *fad2* y *elov15* durante los primeros días de alimentación exógena, y la necesidad de un aporte de LC-PUFA en la dieta. Los niveles de expresión para ambas isoformas de *elov14* aumentan a partir de 36° día, momento en el que comienzan los cambios más relevantes en el proceso de retinogénesis en esta especie, experimentando los mayores niveles de expresión a partir de 108° día (mayoritariamente en *elov14a*), cuando el ojo está completamente desarrollado (Pavón-Muñoz *et al.*, 2016). Durante este proceso de organogénesis ocular y desarrollo cerebral, podría ser crítica la síntesis de VLC-PUFA. Para ello, sería necesario la actividad de las elongasas 4 y la disponibilidad de LC-PUFAs como sustratos, que deben ser aportados por la dieta.

***S. senegalensis*:** La expresión de las dos isoformas de *elov14* experimentan un aumento durante el periodo correspondiente a 18-36° día, coincidiendo con la introducción de alimento exógeno, para descender después. Este es el mismo patrón observado por Morais *et al.* (2012) para *elov15* y *fad2*, que puede indicar la actividad de las elongasas 4 en un momento en el que se están desarrollando el cerebro y los ojos. Según Bejarano-Escobar *et al.* (2010) durante los primeros cinco días post-eclosión (18-90° día) se dan los mayores cambios en el proceso de retinogénesis del lenguado, quedando el ojo completamente desarrollado al término de este periodo. Esto ocurre al mismo tiempo que parece existir una mayor disposición de sustratos LC-PUFA gracias a la actividad  $\Delta 4$  de la desaturasa *Fad2* (Morais *et al.*, 2012). Todo ello permitiría una correcta disponibilidad de VLC-PUFA. La expresión de *elov15* en lenguado en el momento de la eclosión es particularmente elevada, lo que podría indicar transferencia de RNA materno a los embriones, como apuntan Morais *et al.* (2012).

## Conclusión

•*S. aurata* y *S. senegalensis* presentan diferentes requerimientos de LC-PUFA durante su desarrollo larvario, repercutiendo en la estrategia de alimentación.

•Existe relación entre el periodo de retinogénesis-desarrollo cerebral y los niveles de expresión de las dos isoformas de *elov14* encargadas de la síntesis de VLC-PUFA, pudiendo ser ello indicativo de la importancia de estos compuestos para el correcto desarrollo de ojos y cerebro durante la fase larvaria de ambas especies.

## Bibliografía

- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Degrip, W. J., Oyola-Velasco, J. A., Martín-Partido, G. and Francisco-Morcillo, J. (2010). *Journal of Experimental Zoology B*, 314: 580-605.
- Morais, S., Castanheira, F., Martínez-Rubio, L., Conceição, L.E.C y Tocher, D.R. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821: 660-671.
- Pavón-Muñoz, T., Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2016). *Journal of Fish Biology*, 88: 492-507.

## Agradecimientos

La investigación ha sido financiada en el seno de los proyectos: PERG08-GA-2010-276916, AGL 2013-40986-R (MICINN), y PROMETEO II/2014/085 (G. Valenciana). Material biológico aportado por Stolt Sea Farm e IES Els Alfacs.