



Tesis de doctorado en Biotecnología

Posgrado en Biotecnología

Efecto de la salinidad sobre la biosíntesis de LC-PUFA en *Paralichthys orbignyanus*, una especie autóctona de interés para la acuicultura

M.Sc. Elena Fernandez López

Orientador: Dr. Martin Bessonart

Co-orientador: Dra. Yanina Panzera

Co-orientador: Dra. María Salhi

Montevideo, 12 de julio de 2024

Julio, 2024

Tesis para la obtención del título de Dra. en Biotecnología del Programa de Posgrado en Biotecnología realizada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

Título:

Efecto de la salinidad sobre la biosíntesis de LC-PUFA en *Paralichthys orbignyanus*, una especie autóctona de interés para la acuicultura.

Autora:

M.Sc. Elena Fernandez López

Orientadores:

Dr. Martín Bessonart González

Dra. María Salhi Romero

Dra. Yanina Panzera

Tribunal:

Dra. María Valeria Silva

Dra. Laura Quintana

Dr. Ali Saadoun

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis orientadores, Martín, María y Yanina, por darme la oportunidad de desarrollar este posgrado. Por todo el soporte que me han dado y el acompañamiento durante este viaje.

A la coordinación del posgrado en Biotecnología.

A la Agencia Nacional de Investigación e innovación (ANII) por el apoyo económico mediante la beca de doctorado (POS-NAC_2017_1_140114).

A mi comisión académica y al tribunal.

A Ana Marandino por haberme iniciado en el mundo de la biología molecular, en la extracción de ARN y en qPCR.

A Florencia Feola con la que compartí muchas horas de trabajo durante la experimentación animal y los análisis bioquímicos.

Al servicio de informática de la Facultad de Ciencias, particularmente a Bernardo de los Santos y a Enrique de La Torre, por ayudarme a resolver la infinidad de problemas que tuve en mis primeros pasos con el sistema operativo Linux.

A todos los que estuvieron conmigo en el laboratorio. En el Laboratorio de Recursos Naturales, a Juan Gadea y Larisa Magnone. En el Laboratorio de Genética Evolutiva a Lucía Calleros, Emma, a Maila y a Paula. Siempre estaban ahí para resolverte una duda o para hablar de cualquier cosa.

A Biko SA, la empresa en la que trabajo en la actualidad, especialmente a Marisol y a Nicolás por toda la flexibilidad y el apoyo brindado en los últimos años.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y en especial a mi esposo por el apoyo infinito.

Contenidos

Contenidos.....	4
Lista de tablas.....	8
Lista de figuras.....	10
RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. El rol de la acuicultura en el mundo.....	14
1.2. Importancia de lípidos y ácidos grasos.....	17
1.2.1. Ácidos grasos.....	17
1.2.2. Lípidos polares y lípidos neutros.....	18
1.3. Funciones de los LC-PUFA.....	21
1.3.1. Sistema inmune.....	21
1.3.2. Tejido nervioso.....	22
1.3.3. Expresión génica.....	23
1.3.4. Salud cardiovascular y metabolismo.....	23
1.4. Biosíntesis de LC-PUFA en peces.....	25
1.4.1. Desaturasas (Fads2).....	27
1.4.2. Elongasas (Elovl).....	31
1.4.3. <i>fads</i> y <i>elovl</i> descritos en peces.....	33
1.4.4. Salinidad, estrés osmótico y LC-PUFA.....	39
1.5. Descripción del modelo de estudio: <i>Paralichthys orbignyanus</i>	41
2. HIPÓTESIS.....	44
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo general.....	44
3.2. Objetivos específicos.....	44
4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	45

CONTENIDOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
5.1. Transcriptoma de <i>Paralichthys orbignyanus</i> mediante secuenciación masiva (mRNA-Seq)	46
5.1.1. Obtención y muestreo de peces	46
5.1.2. Extracción de ARN.....	47
5.1.3. Síntesis de ds cDNA.....	47
5.1.4. Secuenciación: RNAseq y análisis bioinformático	48
5.2. Identificación y caracterización de <i>fads2</i> y <i>elovl</i> en <i>P. orbignyanus</i>	48
5.2.1. Análisis filogenético de <i>fads2</i> y <i>elovl</i>	49
5.3. Ensayo de cultivo a diferentes salinidades.....	50
5.3.1. Diseño de la dieta experimental.....	50
5.3.2. Diseño experimental	52
5.4. Cuantificación de la expresión génica	53
5.4.1. Extracción de ARN.....	54
5.4.2. Diseño de qPCR para la cuantificación de <i>fads2</i> , <i>elovl4</i> y β -actina.....	54
5.4.3. Cuantificación relativa de la expresión génica de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> en <i>Paralichthys orbignyanus</i>	55
5.5. Análisis bioquímicos	56
5.5.1. Proteínas, cenizas y humedad.....	57
5.5.2. Lípidos totales.....	57
5.5.3. Lípidos polares y neutros.	58
5.5.4. Ácidos grasos.....	58
5.6. Expresión heteróloga en levaduras	60
5.6.1. Amplificación del CDS de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i>	60
5.6.2. Digestión del plásmido y los productos de PCR.....	63
5.6.3. Recombinación del plásmido vector de expresión PYES2	64
5.6.4. Transformación y clonación en <i>E. coli</i>	66

CONTENIDOS

5.7.	Análisis de datos	68
6.	RESULTADOS.....	69
6.1.	Transcriptoma de <i>P. orbignyanus</i>	69
6.1.1.	RNAseq.....	69
6.2.	Identificación y caracterización de <i>fads2</i> y <i>elovl</i> en <i>P. orbignyanus</i>	72
6.2.1.	<i>fads2</i> en <i>P. orbignyanus</i>	72
6.2.2.	<i>elovl</i> en <i>P. orbignyanus</i>	74
6.3.	Cultivo de <i>P. orbignyanus</i> a diferentes salinidades	76
6.3.1.	Dieta.....	76
6.3.2.	Experimentación animal.....	78
6.4.	Cuantificación de la expresión génica	81
6.4.1.	Diseño metodológico.....	81
6.4.2.	Extracción de ARN total	83
6.4.3.	Cuantificación de la expresión génica.....	85
6.5.	Lípidos y ácidos grasos en <i>P. orbignyanus</i> cultivados a diferentes salinidades	86
6.5.1.	Contenido de lípidos.....	86
6.5.2.	Ácidos grasos en lípidos totales	87
6.5.2.1.	Perfil de ácidos grasos del músculo (% del total de AG).....	87
6.5.2.2.	Contenido de ácidos grasos del músculo (mg AG / g).....	89
6.5.3.	Ácidos grasos en lípidos polares y neutros.....	91
6.6.	Diseño de clonación de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> en <i>E. coli</i> para su expresión heteróloga en levaduras.....	96
7.	DISCUSIÓN	102
8.	CONCLUSIONES FINALES.....	120
9.	PERSPECTIVAS	122
10.	BIBLIOGRAFÍA	124

CONTENIDOS

ANEXO: Artículo científico publicado en revista arbitrada	153
---	-----

Lista de tablas

Tabla 1- Juveniles de lenguado obtenidos del medio natural (Arroyo Valizas) para estudios de transcriptómica (RNA-Seq).	46
Tabla 2- Formulación de la dieta experimental.	51
Tabla 3 – Combinación de reactivos para la digestión del plásmido PYES2 y de los productos de PCR de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i>	63
Tabla 4- Reacción de recombinación de los productos diferidos, PYES2 con <i>fads2</i> y <i>elovl4</i>	64
Tabla 5 - Lecturas obtenidas tras el filtrado con Trimmomatic utilizando las lecturas pareadas y las no pareadas para realizar el ensamblado <i>de novo</i>	71
Tabla 6 - Evaluación de la representación del transcriptoma de <i>P. orbignyanus</i> mediante el análisis BUSCO.	72
Tabla 7- Contenido de ácidos grasos (% peso seco) de las harinas y aceites, utilizados para la elaboración de la ración.....	76
Tabla 8 – Composición proximal de la dieta experimental de <i>P. orbignyanus</i>	77
Tabla 9- Composición de ácidos grasos de la ración elaborada.	78
Tabla 10- Parámetros de crecimiento de juveniles de lenguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> , para los diferentes grupos de tamaño (P: pequeño, M: mediano y L: grande) cultivados a diferentes salinidades.	79
Tabla 11 - Tasa de alimentación diaria (TAD) calculado para todo el periodo de experimentación animal (60 días).	81
Tabla 12 – Secuencias utilizadas durante el proceso de cuantificación relativa de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i>	81
Tabla 13 - Calidad del ARN extraído cuantificado por espectrofotometría con NanoDrop.	84
Tabla 14 – Composición del músculo de <i>P. orbignyanus</i> al final del experimento.....	87

CONTENIDOS

Tabla 15- Perfil de ácidos grasos (% Área) de los LT del músculo de juveniles de <i>P. orbignyanus</i> cultivados a diferentes salinidades.	88
Tabla 16- Concentración de ácidos grasos (mg AG/g muestra en peso seco) de los LT del músculo de juveniles de <i>P. orbignyanus</i> cultivados a diferentes salinidades.	90
Tabla 17- Perfil de ácidos grasos de los LP (% del total de ácidos grasos) del músculo de juveniles de <i>P. orbignyanus</i> cultivados a diferentes salinidades.	92
Tabla 18- Perfil de ácidos grasos de los LN (% del total de ácidos grasos) del músculo de juveniles de <i>P. orbignyanus</i> cultivados a diferentes salinidades.	94
Tabla 19 – Cebadores utilizados en la PCR anidada para la amplificación del CDS de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> de <i>P. orbignyanus</i>	96
Tabla 20 – Condiciones de ciclado para la amplificación específica de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> de <i>P. orbignyanus</i>	97
Tabla 21 – Condiciones de ciclado para la amplificación de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> incluyendo los sitios de restricción.	98

Lista de figuras

Fig. 1- Ruta de biosíntesis de los LC-PUFA.	25
Fig. 2- Representación en 3D de una Fads2.	28
Fig. 3 – Representación de la cadena transportadora de electrones durante la inserción de una insaturación (www.lipidmaps.org).	29
Fig. 4 - Representación de las diferentes etapas durante un ciclo de elongación de un ácido graso (Denic y Weissman, 2007).	31
Fig. 5 – Representación de una elongasa expresada en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ..	32
Fig. 6 - Árbol filogenético de la familia FADS, realizado con diferentes secuencias proteicas FADS1 y FADS2 (Castro et al., 2012).	36
Fig. 7 – Distribución natural del lenguado (<i>Paralichthys orbignyanus</i>) (www.fishbase.mnhn.fr).	42
Fig. 8 – Representación esquemática del plásmido PYES2.	62
Fig. 9- Representación esquemática de la digestión de PYES2.	64
Fig. 10 – Reconstrucción <i>in silico</i> del plásmido recombinante que contiene el CDS completo de <i>fads2</i>	65
Fig. 11 – Reconstrucción <i>in silico</i> del plásmido recombinante que contiene el CDS completo de <i>elovl4</i>	65
Fig. 12 – Crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> transformadas con plásmido recombinante.	66
Fig. 13 – Selección de colonias y repique en placa para su crecimiento.	67
Fig. 14 – Electroferograma del ds cDNA obtenido del ARN mensajero de la muestra (PO10H).	69
Fig. 15 – Análisis de calidad de las librerías secuenciadas.	70
Fig. 16- Representación gráfica en dos dimensiones de la Fads2 identificada en <i>P. orbignyanus</i>	73

CONTENIDOS

Fig. 17 - Análisis filogenético de <i>Fads2</i> de <i>P. orbignyanus</i> (Fernandez-López et al., 2024).	74
Fig. 18- Análisis filogenético de <i>Elovl4</i> de <i>P. orbignyanus</i> (Fernandez-López et al., 2024).	75
Fig. 19 – Pesos promedios y desviación estándar de los peces en cultivo a lo largo de las cuatro biometrías realizadas durante el ensayo de salinidad.	80
Fig. 20 - Anotación de la secuencia <i>fads2</i> utilizada para el diseño en qPCR de sondas (Probe) y cebadores (Primer FW y Primer RV).	82
Fig. 21- Curvas de eficiencia de <i>fads2</i> , <i>elovl4</i> y β -actina. Se muestran las curvas de eficiencia con un rango dinámico de cinco puntos.	83
Fig. 22 – Visualización de muestras de ARN total extraído de tejido hepático de <i>P. orbignyanus</i> a partir de los ejemplares de la experimentación animal.	85
Fig. 23 - Expresión génica relativa de <i>fads2</i> y <i>elovl4</i> (<i>Fold change</i>) (Fernandez-López et al., 2024).	86
Fig. 24 – Representación de la proporción de ALA y DHA en LN (% Área).....	95
Fig. 25 – Análisis de componentes principales de LP (izqda.) y LN (dcha).	95
Fig. 26- Electroforesis en agarosa de los productos digeridos de <i>fads2</i> , <i>elovl4</i> y PYES2.	99
Fig. 27- Comparación de secuencia obtenida por método de Sanger con la secuencia del plásmido recombinante con <i>fads2</i>	100
Fig. 28 – Comparación de secuencia obtenida por método de Sanger con la secuencia del plásmido recombinante con <i>elovl4</i>	100
Fig. 29 – Muestra a modo de ejemplo del electroferograma obtenido para las secuencias <i>fads2</i> (arriba) y <i>elovl4</i> (abajo).	101

RESUMEN

El lenguado, *Paralichthys orbignyanus*, es un pez eurihalino de alto valor comercial para la región. En su ambiente natural se encuentra expuesto a grandes variaciones de salinidad y perfil de ácidos grasos dietarios. Debido a estos factores, se presenta como una especie candidata a ser producida en acuicultura a bajas salinidades y con bajos niveles de aceite de pescado. Esto es debido a que las diferentes condiciones de salinidad, particularmente, salinidades bajas o salobres, podrían estimular la biosíntesis endógena de *long chain poli-unsaturated fatty acids* (LC-PUFA) en esta especie.

En este trabajo hemos estudiado el efecto que tiene la salinidad sobre los niveles de expresión génica de las enzimas involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA, *fatty acid desaturase 2* (*fads2*) y *elongation of very long chain fatty acid* (*elovl*) y hemos comparado estos resultados con el perfil de ácidos grasos a nivel de la musculatura. Para ello, hemos cultivado juveniles de lenguado a diferentes salinidades 2ppt, 10ppt, 18ppt y 26ppt y a una dieta pobre en LC-PUFA, pero rica en sustratos de biosíntesis, 18:2n-6 y 18:3n-3.

Dada la ausencia de recursos genéticos para esta especie, hemos aplicado una metodología para la obtención de secuencias de interés mediante secuenciación masiva (mRNA-Seq) y ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático. Los resultados obtenidos sugieren que el lenguado expresa de manera natural una *fads2* y una *elovl4*.

Las secuencias obtenidas permitieron el desarrollo de metodologías basadas en biología molecular para cuantificar la expresión génica de *fads2* y *elovl4*. Ambos genes experimentaron un aumento de la expresión génica en el tratamiento de salinidad más bajo, 2ppt, mostrando los menores niveles de expresión a 18ppt y 26ppt.

El contenido de lípidos totales mostró una adaptación a la salinidad observándose el mayor contenido de lípidos totales en la salinidad más próxima al punto isosmótico (10,9ppt) y decreciendo a medida que la salinidad de cultivo se aleja de este punto, hacia 2ppt y 26ppt.

RESUMEN

El perfil de ácidos grasos acompaña esta adaptación por medio de algunos ácidos grasos fundamentalmente *monounsaturated fatty acids* (MUFA) y *poly-unsaturated fatty acids* (PUFA), aunque también refleja el perfil de ácidos grasos de la dieta, por un aumento en sustratos de biosíntesis, *α -linolenic acid* (ALA) y *linoleic acid* (LA), y una reducción de los productos de biosíntesis *arachidonic acid* (AA), *eicosapentaenoic acid* (EPA) y *docosahexaenoic acid* (DHA).

Los ácidos grasos relacionados con las rutas de biosíntesis de LC-PUFA, ALA, LA, AA, EPA y DHA, reflejan una adaptación a la salinidad preparando al lenguado para la biosíntesis de LC-PUFA en las salinidades más bajas y a la acumulación de LC-PUFA en las salinidades más altas, reflejando la clásica dicotomía entre ambientes de agua dulce y agua marina. Este patrón es evidente en el perfil de ácidos grasos en la porción de lípidos neutros, mientras que, en la fracción de lípidos polares, la adaptación de los ácidos grasos refleja el rol de éstos a nivel de las membranas para las diferentes salinidades de cultivo.

Los resultados de este trabajo reflejan el gran potencial eurihalino del lenguado para ser cultivado a diferentes salinidades, demostrando la capacidad de adaptación por medio de cambios en la expresión de *fads2* y *elovl4* y por la adaptación del perfil de ácidos grasos a las diferentes salinidades de cultivo. A su vez, se abren nuevas interrogantes a desarrollarse en nuevas líneas de investigación hacia el desarrollo del lenguado en un marco de desarrollo sostenible de esta especie en el sector de la acuicultura.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El rol de la acuicultura en el mundo

La acuicultura es el sector productor de proteína animal que más ha crecido en los últimos años, con una tasa anual del 5,3% desde 2001. Esta tasa es muy superior a la evolución de la producción pesquera que, en términos generales, se ha mantenido constante en los últimos 20 años (FAO, 2022). Actualmente, a nivel mundial se producen 178 millones de toneladas de animales acuáticos, de los cuales la acuicultura aporta el 49% y la pesca el 51%. Del total producido en 2020, el 89% fue destinado a consumo humano (56% proveniente de la acuicultura), mientras que el resto 11% restante fue destinado para la producción de harina y aceite de pescado. Es importante destacar que la mayor parte de la harina y aceite de pescado producida (81%) es derivada nuevamente al sector de la acuicultura (FAO, 2022), particularmente para la elaboración de raciones (Boyd, 2015a; Little *et al.*, 2016). Se trata de una tendencia importante, dado que el 69,5% de la industria acuícola usa raciones elaboradas especialmente para la alimentación de su biomasa de cultivo (FAO, 2020) y por este motivo, la sustentabilidad de este sector se encuentra amenazada (Tocher, 2015).

El crecimiento del sector de la acuicultura ha acompasado el crecimiento demográfico y el aumento en el consumo per cápita anual de pescado que ha pasado de 9kg en 1961 a 20,5kg en 2019 (FAO, 2022, 2020). Debido a esto, numerosos stocks pesqueros se encuentran altamente explotados, estando agotados o en situación de vulnerabilidad (Shepherd y Jackson, 2013). Frente a esta situación, la acuicultura ha contribuido de manera notoria a la disponibilidad de pescado para consumo humano a lo largo de todos estos años (Boyd, 2015).

Uno de los principales motivos para el consumo de pescado es que es la fuente principal de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, *Long Chain Poli-Unsaturated Fatty Acids*), ácidos grasos esenciales (AGE) para los humanos (Tocher, 2003), en especial el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). A su vez, aporta otros ácidos grasos que si bien son comunes en la dieta, como los PUFA ácido linoléico (LA) y ácido alfa-linolénico

1. INTRODUCCIÓN

(ALA), entre otros, éstos se encuentran en relaciones altas de ácidos grasos ω -3/ ω -6 (Tacon y Metian, 2013). Por esta razón, constituyen una fuente de alimento ideal para aquellos países con desnutrición o con dietas desbalanceadas que, por ser pobres en LC-PUFA y ricas en ácidos grasos omega-6, aumentan la incidencia de enfermedades coronarias, obesidad, diabetes, entre otras enfermedades relacionadas (Tacon *et al.*, 2020). Además de ácidos grasos esenciales, el pescado nos aporta proteínas de alto valor biológico con el perfil de aminoácidos esenciales recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO) y un aporte calórico más bajo que otras fuentes de proteína animal (Tacon y Metian, 2013).

Para asegurar el crecimiento del sector de la acuicultura en un marco de desarrollo sostenible, la investigación ha centrado sus esfuerzos en reducir la dependencia de la acuicultura sobre la harina y el aceite de pescado para su inclusión en los alimentos para acuicultura (Adarme-Vega *et al.*, 2014; Turchini *et al.*, 2019). Un parámetro muy utilizado es el índice FIFO (Fish-In Fish-Out) que relaciona la cantidad de pescado procedente de las pesquerías necesaria para el cultivo de especies animales en acuicultura (Tacon *et al.*, 2022). Entre las estrategias para reducir el índice FIFO o la inclusión de aceites y harinas de pescado en la ración destacan la sustitución de materias primas de origen marino, por la incorporación de microalgas con alto contenido en LC-PUFA (Ansari *et al.*, 2021) o por la inclusión de materias vegetales de origen terrestre (Bell *et al.*, 2001; Boyd, 2015b). Sin embargo, los efectos anti-nutricionales de algunos componentes de estas materias primas llevan a una reducción en el rendimiento de producción por la reducción en las tasas de crecimiento (Browdy *et al.*, 2013; De Santis *et al.*, 2015). Además, el perfil de ácidos grasos de la dieta se ve reflejado en el perfil de ácidos grasos en los tejidos (Arts *et al.*, 2009; Iverson, 2009) causando fuertes desbalances y repercutiendo en la salud de los peces (Tocher, 2015).

La mejora de los procesos de elaboración de la ración (Glencross *et al.*, 2011), la adición de componentes que facilitan la digestión del alimento (Francis *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2012) o el desarrollo de organismos genéticamente modificados (Adarme-Vega *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2014; Kiteessa *et al.*, 2014) son algunas de las estrategias adoptadas para poder introducir este tipo de materias primas en las raciones para peces.

1. INTRODUCCIÓN

Adicionalmente, el desarrollo del cultivo de especies con capacidad endógena para producir LC-PUFA permitiría reducir la inclusión de aceite de pescado en la ración (Castro *et al.*, 2012; Monroig *et al.*, 2016). Para ello, se ha estudiado el efecto de distintos perfiles nutricionales y condiciones ambientales para estimular la biosíntesis endógena de LC-PUFA sin comprometer el bienestar de las poblaciones en cultivo (Turchini *et al.*, 2009) y sin que por ello, repercuta en el perfil lipídico final de los peces, beneficioso para el consumo humano. El desarrollo del cultivo de especies de agua dulce, al ser especies con capacidad para la biosíntesis de LC-PUFA, no requieren de una inclusión de aceite de pescado en la ración y, por lo tanto, favorecen el desarrollo sustentable del sector, al menos desde esta perspectiva. Sin embargo, buena parte de las especies de mayor valor comercial provienen de la acuicultura marina (O'Shea *et al.*, 2019), casi todas de régimen omnívoro o carnívoro con altos requerimientos de LC-PUFA dietarios (Belton *et al.*, 2020).

Las políticas de desarrollo sostenible de este sector son prioritarias tanto a nivel internacional como a nivel regional para minimizar el impacto de la acuicultura sobre el medio ambiente y los recursos naturales (Alexander *et al.*, 2016; Barrington *et al.*, 2010; Sylvia, 1997). Entre las estrategias de desarrollo sostenible destaca la diversificación de la acuicultura, por medio del cultivo de especies nativas. Este tipo de estrategias favorecen el uso responsable de los recursos de un país, al cultivar especies locales adaptadas al medio. Además, favorece el desarrollo económico y social de la región, y genera alimento de alta calidad (FAO, 2022). Esto a su vez, está en consonancia con las políticas nacionales de Uruguay donde se establecen pautas de desarrollo sostenible de la acuicultura (DINARA, 2008). En este texto, desarrollado en el marco del Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura (TCP/URU/3101), describe las actividades de investigación en acuicultura para el desarrollo del conocimiento y tecnología de cultivo como actividades prioritarias.

1. INTRODUCCIÓN

1.2. Importancia de lípidos y ácidos grasos

Los lípidos son un tipo de compuestos que se caracterizan por ser insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. Son biomoléculas con una diversidad química y estructural muy amplia. Esa diversidad estructural está estrechamente relacionada con sus extraordinarias funcionalidades en los organismos como reserva energética, generalmente en forma de grasas y aceites, y a sus funcionalidades estructurales y metabólicas.

1.2.1. Ácidos grasos

Los componentes principales de los lípidos son los ácidos grasos (AG), aunque algunas moléculas de lípidos (como las vitaminas A, K, D y E) no contiene AG. Los AG son ácidos carboxílicos que constan de un grupo carboxilo unido covalentemente a una cadena alifática. Esta cadena define las propiedades fisicoquímicas de los AG. Los AG más predominantes suelen tener entre 4 y 22 carbonos, aunque también se pueden encontrar AG que contengan hasta 36 carbonos.

Estos ácidos grasos pueden ser saturados, SAFA (*Saturated Fatty Acids*), donde la cadena alifática se encuentra completamente saturada, o insaturados, UFA (*Unsaturated Fatty Acids*), conteniendo una o más insaturaciones. Normalmente, cuando hay varias insaturaciones, éstas se encuentran en posiciones alternas. Son más raros los casos en que se encuentran en posiciones consecutivas, formando ácidos grasos conjugados. Los UFA, generalmente poseen dobles enlaces en configuración *cis*, confiriéndole un determinado ángulo a la cadena carbonada, lo que le aporta propiedades únicas a cada ácido graso. Estas insaturaciones son especialmente importantes por las propiedades que le confieren al AG y consecuentemente, por los efectos que tienen sobre la fisiología, la salud y el buen funcionamiento de los organismos. Los ácidos grasos monoinsaturados, MUFA (*Monounsaturated Fatty Acids*) son aquellos con una sola insaturación mientras que los ácidos grasos poli-insaturados, *Poliunsaturated Fatty Acids* (PUFA), contienen dos o más insaturaciones. A su vez, nos referimos a los ácidos grasos de cadena larga, LC-PUFA, cuando estos ácidos grasos PUFA poseen más de C18 y más de 2 insaturaciones (Sargent *et al.*, 2003).

1. INTRODUCCIÓN

La nomenclatura de los ácidos grasos viene determinada por la longitud de la cadena hidrocarbonada, en la que también se refleja el número de insaturaciones que poseen. De esta manera, el ácido esteárico (18:0) es un ácido graso que posee 18 carbonos y, al ser un ácido graso saturado, posee cero insaturaciones. Otro ejemplo es el del ácido oleico, un ácido graso de 18 carbonos, con una insaturación (18:1).

Dado que las insaturaciones en los ácidos grasos pueden situarse en diversas posiciones, además de la insaturación también se hace referencia a la posición de estas insaturaciones, ya sea tomando como referencia el extremo metilo terminal (ω o n) o el extremo carboxilo terminal (Δ). Por conveniencia, en este trabajo nos referimos a los ácidos grasos ω -3, como ácidos grasos n -3 y de esta misma manera, los ácidos grasos de la serie ω -6 los veremos identificados como n -6. Un ejemplo, es el caso del ácido linolénico, 18:3 n -3, el cual posee la primera insaturación en la tercera posición desde el extremo metilo terminal. Cuando la posición se menciona teniendo como referencia el extremo carboxilo terminal también podemos indicar todas las posiciones de las insaturaciones de AG en cuestión (18:3- $\Delta^{9,12,15}$). Algunos de estos AG poseen un nombre común o se denominan con una abreviación de éste (Tocher, 2003). Tomando como ejemplo el último caso, el 18:3 n -3 es comúnmente conocido como ácido linolénico o α -linolénico (ALA), mientras que al 18:2 n -6 también se le conoce como ácido linoleico (LA). El nombre común suele estar relacionado con la fuente en la que se encuentra abundantemente o donde se descubrió inicialmente. Por otro lado, la nomenclatura IUPAC también permite mencionarlos según sea la longitud de la cadena acilo y el número de insaturaciones, aunque en este caso se cuentan desde el carbono delta (grupo carboxílico).

1.2.2. Lípidos polares y lípidos neutros

En su mayor parte los ácidos grasos suelen estar ligados a otras biomoléculas, como puede ser un glicerol (glicerolípidos) o una esfingosina (esfingolípidos), formando lípidos complejos de diversa naturaleza. Las propiedades de la cabeza polar con la que se asocian determinan la funcionalidad de estos lípidos.

1. INTRODUCCIÓN

A su vez, en función de si el glicerolípido contiene uno, dos o tres AG, nos referiremos a ellos como monoacilgliceroles (MAG), diacilgliceroles (DAG) o triacilgliceroles (TAG) (también llamados triglicéridos). Estos lípidos forman parte de la fracción de lípidos neutros (LN) y se encuentran fundamentalmente en los depósitos de grasa constituyendo una reserva de energía metabólica y un reservorio de ácidos grasos importantes para el metabolismo de los vertebrados. Su naturaleza química hace que sean hidrófobos y, en función de la temperatura, la longitud y grado de insaturación de los ácidos grasos que los componen, pueden encontrarse en forma de aceite si están en fase líquida o grasa si se encuentran en fase sólida. Las ceras, también son lípidos neutros que contiene ácidos grasos. Algunos organismos, como los copépodos, las utilizan como reserva de energía además de tener funciones de flotabilidad (Cavallo y Peck, 2020).

El ácido graso de la posición sn-3 en los glicerolípidos puede ser reemplazado por un grupo fosfato formando un glicerofosfolípido o fosfolípido. La polaridad adquirida convierte a la molécula en un lípido anfipático lo que le permite organizarse en bicapas lipídicas, razón por la cual los fosfolípidos son el lípido complejo principal en las membranas celulares animales (Dowhan *et al.*, 2016). Concretamente, el principal componente de los lípidos de membrana son los fosfolípidos. Dentro del conjunto de estos lípidos, nos referimos a los glicerofosfolípidos cuando un grupo fosfato se encuentra unido por un enlace fosfodiéster a una molécula de glicerol y a los esfingofosfolípidos o esfingolípidos cuando lo hace a una molécula de esfingosina. El grupo fosfato de los fosfolípidos puede presentar diferentes radicales como la etanolamina (fosfatidiletanolamina, PE), una colina (fosfatidilcolina, PC), una serina (fosfatidilserina, PS) o un inositol (fosfatidilinositol, PI) (Van Meer *et al.*, 2008), por citar algunos ejemplos.

La distribución y la abundancia de estos fosfolípidos, así como su composición en AG, a través de la membrana plasmática y de las membranas de los diferentes organelos, no es arbitraria sino que responde a las necesidades propias de cada caso (Raghunathan y Kenworthy, 2018). La PC, es una molécula casi de geometría cilíndrica y, por lo tanto, le confiere a la bicapa lipídica una geometría planar, mientras que la PE al tener una morfología cónica, tiende a conferirle cierta curvatura a la bicapa lipídica. Estas conformaciones moleculares son fundamentales

1. INTRODUCCIÓN

para entender la distribución de los lípidos y la funcionalidad en la membrana. De esto resultan determinadas interacciones lípido-proteína que favorecen el plegamiento y las conformaciones proteicas determinando la actividad enzimática de las mismas (Lee, 1998).

La PE suele conjugarse con DHA generalmente en forma de 16:0/22:6n-3, 18:0/22:6n-3 y 18:1n-9/22:6n-3 mientras que la PC suele conjugarse con 16:0 y 18:1n-9 (Sargent *et al.*, 2003). Cambios en la composición de LC-PUFA y su conjugación en lípidos complejos en las membranas celulares, conlleva cambios en la composición los *rafts* lipídicos, generando microdominios y cambios en el comportamiento de estas membranas al alterar los procesos de señalización celular y tráfico de proteínas a nivel bioquímico (Calder, 2015; Chapkin *et al.*, 2008). En este trabajo nos referiremos a este conjunto de lípidos como lípidos polares (LP).

De esta manera, podemos clasificar a los lípidos en dos grandes grupos, los LP y los LN (Nelson y Cox, 2013). Esta clasificación también responde a las propiedades químicas que nos permite separar LN y LP, los cuales a su vez presentan funciones biológicas distintivas. Las propiedades físico-químicas de los LP son las que le confieren la fluidez a la membrana celular que permite la inserción de proteínas y la realización de sus actividades enzimáticas (Quinn *et al.*, 1989).

Además de las funciones biológicas de los LP y LN y de la relación de éstos con la fisiología de los organismos, otra razón del gran interés que despierta su estudio es su base nutricional. La acumulación de LC-PUFA, EPA y DHA, cuándo éstos se encuentran esterificados a un fosfolípido (sn2) es 50 veces superior que cuando se encuentran esterificados a un TAG (Parmentier *et al.*, 2007). Esto se debe a que la fosfolipasa A2 presenta una mayor facilidad de acceso a PL por el carácter anfipático de éstos. El AG en posición sn2 entra al ciclo de Land al ser liberado por la fosfolipasa A2 y transferido a otro PL que generalmente es una PC mediante la lisofosfatidil colina acetil transferasa (LPCAT) (Nelson y Cox, 2021). Esta transferencia de AG se realiza a nivel de las membranas tanto a través de lipoproteínas como quilomicrones, VLDL, LDL y HDL, como a través de membranas, plasmática y de organelos, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosoma, etc. (Nelson y Cox, 2021).

1. INTRODUCCIÓN

Los productos de la pesca y la acuicultura son la fuente principal de ácidos grasos omega-3 entre los que se destacan, EPA y DHA, donde una alta proporción se encuentran esterificados en la posición sn2 de los fosfolípidos de membrana (Bessonart et al., 1999), aumentando la absorción intestinal de monoglicéridos y liso-fosfolípidos ricos en DHA y EPA (Parmentier *et al.*, 2007).

1.3. Funciones de los LC-PUFA

Los LC-PUFA junto con los productos intermediarios de biosíntesis cumplen actividades biológicas fundamentales. Las investigaciones relacionadas con la salud humana destacan el rol de estos AG en los desequilibrios relacionados con la carencia de n-3 LC-PUFA en la dieta y su actividad terapéutica en numerosas enfermedades (Calder, 2015). Por otra parte, en el área de la acuicultura, el desarrollo de formulaciones dietarias con un aporte adecuado de LC-PUFA en lípidos, además de proteínas e hidratos de carbono, se relaciona con un mejor desempeño en el cultivo y un perfil de AG final con un balance de n-3 LC-PUFA adecuado para el consumo humano (Hixson, 2014).

1.3.1. Sistema inmune

A nivel del sistema inmune, los LC-PUFA están involucrados en diversas funciones, entre ellas, las respuestas inmunes mediadas por células y los procesos inflamatorios (Miles *et al.*, 2021). A modo de ejemplo, tan sólo el ácido araquidónico (AA) comprende entre el 15 y el 20% de los ácidos grasos en las células mononucleares (Miles *et al.*, 2021). Un cambio en el perfil de LC-PUFA puede conllevar cambios en el número y tipo de células inmunitarias incidiendo sobre la capacidad de respuesta inmunitaria (Calder, 1999). En peces, concretamente en *Sebasticus marmoratus* (Perciformes, Scorpaenoidei), se demostró que mayores niveles de n-3 LC-PUFA incrementaban la presencia de inmunoglobulina M y actividad lisozima, sugiriendo que una carencia de EPA y DHA en dietas de sustitución podría aumentar la susceptibilidad de esta especie a enfermedades infecciosas (Peng *et al.*, 2014).

1. INTRODUCCIÓN

Además, los LC-PUFA son precursores de eicosanoides, gracias a la acción de ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX) para la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos respectivamente (Calder, 2006). Los LC-PUFA de la serie n-6, particularmente aquellos derivados del AA, tienden a formar eicosanoides pro-inflamatorios, estando involucrados en procesos alérgicos y en enfermedades como el asma (Jastrzebska *et al.*, 2011). Por otro lado, los LC-PUFA de la serie n-3 son precursores de resolvinas, protectinas y maresinas, eicosanoides con actividad anti-inflamatoria (Zárate *et al.*, 2017). De esta manera, una proporción alta de n-3 LC-PUFA es capaz de reducir la biodisponibilidad del AA en las rutas COX y LOX y por lo tanto, reduce la producción de eicosanoides pro-inflamatorios (Miles *et al.*, 2021). De forma similar que en humanos, dietas ricas en n-6 LC-PUFA puede aumentar la respuesta inflamatoria en peces (Bell *et al.*, 1996).

1.3.2. Tejido nervioso

Otra de las características fundamentales de los LC-PUFA, es su predominancia en la composición de algunos tejidos como la retina y el tejido nervioso, particularmente de DHA, como componente principal de los ácidos grasos de membrana (Denic y Weissman, 2007). De hecho, el AA y el DHA son los ácidos grasos más abundantes en la leche materna durante el periodo de lactancia teniendo funciones clave en el desarrollo visual y cognitivo en los infantes (Miles *et al.*, 2021).

La composición única de DHA de las células fotorreceptoras se fundamentan en la estructura química de este AG la cual le confiere a la rodopsina la suficiente movilidad como para responder a la absorción de los fotones (SanGiovanni y Chew, 2005). La alta proporción de n-3 LC-PUFA, particularmente DHA se asocia con una buena funcionalidad de la retina y evita enfermedades asociadas con la vista (Querques *et al.*, 2011). Del mismo modo, en acuicultura es especialmente importante un buen aporte de n-3 LC-PUFA en la dieta de reproductores para asegurar altos niveles de DHA en las reservas vitelinas de las larvas que garanticen el buen desarrollo de la vista en peces (Tocher, 2010).

1. INTRODUCCIÓN

1.3.3. Expresión génica

A nivel genético, los ácidos grasos entre otras biomoléculas como los eicosanoides, actúan como ligandos en receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR) en tejido adiposo, hígado y musculatura, induciendo cambios en el metabolismo debido a cambios en la expresión génica de múltiples proteínas (Escher y Wahli, 2000). Un ejemplo muy estudiado, es el efecto de PUFAs sobre los receptores nucleares PPAR- α , los cuales estimulan el aumento de la expresión génica de enzimas involucradas en el transporte de lípidos, oxidación de ácidos grasos y termogénesis. Al mismo tiempo, los PUFAs reducen la expresión génica de enzimas involucradas en la lipogénesis por su acción antagónica sobre los *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP) (Clarke, 2001). A nivel de la biosíntesis de LC-PUFA, estos procesos son especialmente importantes en acuicultura por la sustitución en dietas de aceite de pescado por alternativas vegetales, pues los ácidos grasos dietarios son capaces de modular la expresión de receptores PPAR- α y SREBP-1, cuya expresión a su vez modula la expresión génica de *Fatty Acid Desaturase 2* (*fads2*), a nivel de la región promotora (Dong *et al.*, 2017).

1.3.4. Salud cardiovascular y metabolismo

Con respecto a la salud cardiovascular y el metabolismo en humanos, una dieta rica en n-3 PUFA en general se asocia con una reducción en el riesgo de padecer enfermedades diversas (Bergé y Barnathan, 2005; Simopoulos, 2000). A modo comparativo, los niveles de ingesta actuales de PUFA la relación n-6/n-3 se encuentran en una proporción 20:1, mientras que las dietas ancestrales se estima que rondaban una proporción proporción 1:1 (Simopoulos, 2000, 2002; Zárate *et al.*, 2017). Esto es llamativo sobre todo teniendo en cuenta la insuficiente capacidad del ser humano para la biosíntesis de LC-PUFA (Burdge y Calder, 2005). Se estima que para cubrir los requerimientos de EPA y DHA, se recomienda un consumo mínimo de 0,5-1 g por día para reducir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Sushchik *et al.*, 2020).

1. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios indican que son necesarios al menos 3 g de n-3 PUFA para inducir cambios en el metabolismo lipídico y reducir así el riesgo cardiovascular (Cormier *et al.*, 2014). De cualquier forma, se ha comprobado que el consumo regular de n-3 LC-PUFA reduce los niveles de triglicéridos (TAG) en sangre y el riesgo de cardiopatía isquémica, mejorando enfermedades como el síndrome metabólico. También aumentan la sensibilidad a la insulina reduciendo la aparición de enfermedades como la diabetes (Clarke, 2001). Además, únicamente los ácidos grasos de la serie n-3 son capaces de reducir los triglicéridos plasmáticos (Simopoulos, 2000).

Uno de los efectos directos de los PUFA es la reducción en la producción de Malonyl-CoA el cual representa un efector regulatorio sobre la carnitina palmitoiltransferasa. Esto favorece la entrada de ácidos grasos a las mitocondrias y peroxisomas, aumentando la oxidación de estos ácidos grasos (Price y Valencak, 2012). Por otro lado, entre algunas de las funciones que se le atribuyen a los VLCFAs (*Very Long Chain Fatty Acids*), entendiéndose por ello los ácidos grasos de cadena larga de más de 20 carbonos, se encuentran el papel estabilizador de membranas marcadamente curvas como lo son las membranas nucleares o los complejos del poro presentes en el núcleo celular. Esto se debe a la acción de sostén por abarcar todo el ancho de la bicapa lipídica (Denic y Weissman, 2007). Se han observado también ácidos grasos de más de C30 siendo fundamentales en la creación de la barrera de permeabilidad selectiva de la membrana a nivel de la piel humana (Denic y Weissman, 2007).

Considerando que el pescado es la fuente principal de LC-PUFA n-3 en la dieta humana y su importancia en la salud es importante entender de qué manera se obtienen estos AG y dónde se encuentran las limitaciones en la biosíntesis de LC-PUFA.

1. INTRODUCCIÓN

1.4. Biosíntesis de LC-PUFA en peces

Para la biosíntesis de LC-PUFA, los ácidos grasos saturados son inicialmente sintetizados mediante la ácido graso sintasa (*Fatty acid synthase*, FAS I) a través de condensaciones sucesivas de malonil-CoA hasta la formación de un ácido graso de C18, el ácido esteárico (18:0) (William W. Christie, 2010). Estas reacciones, también llamadas elongaciones, ocurren alargando la cadena en dos C por cada ciclo. Por este motivo, los ácidos grasos generalmente tienen un número de carbonos par, siendo los ácidos grasos 16:0 y 18:0 comunes en la mayoría de los organismos. En menor medida existen ácidos grasos impares los cuales suelen provenir de la dieta y tienen un origen microbiano (Zhang *et al.*, 2020).

De forma previa a la biosíntesis de LC-PUFA, el 18:0 es sometido a una desaturación en posición $\Delta 9$, dando lugar al ácido oleico, 18:1n-9. A continuación, ese ácido graso experimenta una o dos desaturaciones sucesivas adicionales en posición $\Delta 12$ y $\Delta 15$ generando los sustratos de biosíntesis de los LC-PUFA, 18:2n-6 (ácido linoleico, LA) y 18:3n-3 (ácido α -linolénico, ALA) respectivamente. Es importante destacar que las plantas y las microalgas son los únicos organismos, a excepción de algunos invertebrados, que poseen enzimas desaturasas con actividades $\Delta 12$ y $\Delta 15$ (Tocher, 2003), y por lo tanto, LA y ALA son ácidos grasos esenciales (AGE) para los vertebrados teniendo que ser incluidos en la dieta (Tocher, 2010).

Estos LA y ALA pueden experimentar diferentes reacciones de desaturación y elongación secuenciales durante la biosíntesis de los LC-PUFA (Fig. 1). Las enzimas responsables de llevar a cabo las reacciones bioquímicas de desaturación y elongación en la biosíntesis de LC-PUFA son las ácido graso desaturasas (*Fatty Acid Desaturase*, Fads) y las elongasas (*Elongation Of Very Long Fatty Acids*, Elovl). De esta manera, los peces pueden obtener los LC-PUFA a través de la dieta pero también mediante la producción endógena a partir de los correspondientes sustratos (March, 1993).

1. INTRODUCCIÓN

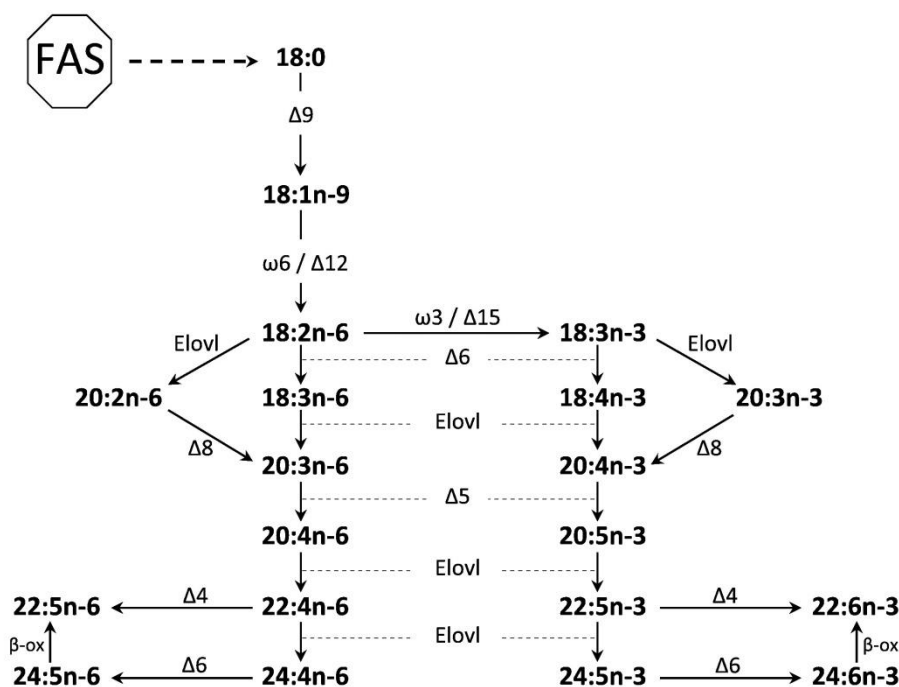


Fig. 1- Ruta de biosíntesis de los LC-PUFA. Se describe de forma esquematizada las reacciones bioquímicas de desaturación y elongación que experimentan los distintos sustratos desde el producto de biosíntesis de la ácido graso sintasa (FAS) hasta la producción de los LC-PUFA. Las actividades desaturasa están designadas por ω/Δ y la posición de la insaturación en función de si se toma como referencia el extremo metilo o carboxilo terminal, respectivamente. Por otro lado, las elongasas se designan como Elovl (Castro *et al.*, 2016)

Concretamente en peces, al suministrar el perfil adecuado de ácidos grasos como posibles sustratos enzimáticos, 18:3n-3 y 18:2n-6, éstos experimentan una primera desaturación $\Delta 6$, seguida de una elongación y una segunda desaturación $\Delta 5$, para dar lugar al EPA (20:5n-3) y al AA (20:4n-6), respectivamente. Además, el EPA puede volver a experimentar dos elongaciones y una desaturación $\Delta 6$. Finalmente, el AG (24:6n-3) al salir del retículo endoplasmático (ER) viaja al peroxisoma experimentando una beta-oxidación para dar lugar al DHA (22:6n-3). A esta ruta de biosíntesis se le conoce como la ruta de Sprecher (Sprecher, 2006). Adicionalmente, existe una vía alternativa para la síntesis de DHA a partir de EPA, mediante una elongación y una insaturación directa en la posición $\Delta 4$ (Qiu, 2003) la cual se cree que metabólicamente es más favorable pues evita una elongación adicional y una β -oxidación en el peroxisoma.

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados sobre el metabolismo lipídico en peces en los últimos años han definido una clara dicotomía entre ambientes de agua dulce y marinos, en la que los peces marinos en su mayoría carecen de la capacidad metabólica para producir LC-PUFA posiblemente debido a una adaptación a un ambiente naturalmente rico en estos ácidos grasos (Gladyshev *et al.*, 2013). Por otro lado, los peces de agua dulce, al no poder cubrir los requerimientos de LC-PUFA a través de una dieta menos rica en LC-PUFA, posiblemente evolucionaron seleccionando positivamente aquellas actividades enzimáticas que permiten la biosíntesis de estos ácidos grasos a partir de sus precursores, ALA y LA (Alhazzaa *et al.*, 2011b).

1.4.1. Desaturasas (Fads2)¹

Las ácido graso desaturasas, acyl-CoA desaturasas o “*front end desaturases*” son enzimas deshidrogenasas que introducen un doble enlace en la posición Δ desde el grupo carboxilo terminal, siendo una actividad específica de cada desaturasa (López *et al.*, 2003; Meesapyodsuk y Qiu, 2012). Se trata de una reacción donde la enzima recluta una molécula de oxígeno mediante la coordinación con un ión ferro-divalente (Shanklin *et al.*, 2009).

Fundamentalmente, existen dos grandes clases de desaturasas: una de ellas está constituida por las ácido graso desaturasas solubles de tipo acyl-ACP, las cuales se encuentran en el estroma de los plástidos en las plantas superiores. La otra clase de enzimas desaturasas son las más abundantes y se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana del retículo endoplásmico (ER). Estas últimas se encuentran frecuentemente en todos los organismos conocidos, tanto procariotas como eucariotas (Shanklin y Cahoon, 1998). Ambos tipos de desaturasa llevan a cabo una deshidrogenación *cis* regioselectiva (Lim *et al.*, 2014).

¹ En este trabajo seguimos la siguiente nomenclatura para hacer mención a genes y proteínas (Xie *et al.*, 2021): *Homo sapiens*, gen: todo el gen en mayúsculas y cursiva (*FADS2*) y proteína: todo en mayúscula sin cursiva (FADS2); *Mus musculus*, gen: sólo la primera letra en mayúscula y todo en cursiva (*Fads2*) y proteína: todo en mayúsculas y sin cursiva (FADS2); Zebrafish y otras especies de peces, gen: todo minúscula y cursiva (*fads2*) y proteína: sólo la primer letra en mayúscula y sin cursiva (Fads2)

1. INTRODUCCIÓN

El agente oxidante se encuentra en el mismo lugar que la posición del ácido graso en la que se va a llevar a cabo la desaturación o la deshidrogenación con la formación de una molécula de agua (Shanklin *et al.*, 2009).

Dada la naturaleza de las enzimas, la arquitectura de la región activa difiere significativamente entre ambas clases. En el caso de las desaturasas solubles la salida del acyl-ACP de la región hidrófoba de la enzima requiere de una solvatación energéticamente desfavorable del acilo en un medio acuoso, mientras que en el caso de las desaturasas integrales de membrana, el lípido que sale del bolsillo hidrófobo de la enzima se sigue encontrando en el medio hidrófobo que ofrece la membrana del RE (Shanklin *et al.*, 2009) (Fig. 2). Por otro lado, la interacción de las desaturasas integrales de membrana Fads requieren de un ácido graso activado con un Coenzyma A (Meesapyodsuk y Qiu, 2012).

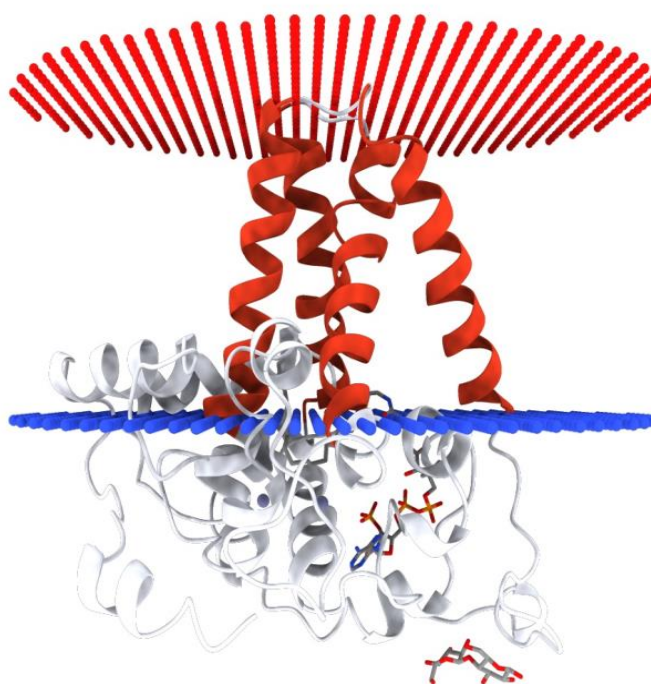


Fig. 2- Representación en 3D de una Fads2. La proteína representada corresponde al modelo 4ZYO de *Protein Data Bank* (PDB) visualizada mediante (iCn3D). En la figura se representa el espacio intermembrana, delimitado por el lado luminal (rojo) y el lado citoplasmático (azul) del retículo endoplásmico (RE). Los dominios transmembrana se encuentran representados por las hélices alfa (rojo) y las regiones orientadas hacia el citoplasma de la célula (gris) formando la región activa de la proteína junto con diferentes ligandos. (Wang *et al.*, 2015)

1. INTRODUCCIÓN

El origen de las desaturasas tendría lugar en oxidasas ancestrales que surgieron en respuesta a un enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera para evitar los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (Shanklin y Cahoon, 1998). De ellas, surgieron las desaturasas y peroxidasas que si bien, hoy en día poseen una baja homología entre sí, mantienen una alta similaridad en las regiones activas en relación con las interacciones con el átomo de hierro divalente. En ambos casos, las cadenas laterales de dos ácidos glutámicos (Glu), generan puentes con dos iones Fe(II) . A su vez cada ión Fe(II) está coordinado simultáneamente con otro ácido glutámico y una histidina (His). La enzima desaturasa en esta región activa posee una treonina (Thr), un dador de protones débil que favorece la abstracción de los hidrógenos procedentes de la cadena acilo del ácido graso. La sustitución de esta treonina por un ácido aspártico (Asp) resulta en un aumento de la tasa de oxidación o desaturación (Shanklin *et al.*, 2009). Esta reacción bioquímica globalmente implica la unión a un oxígeno inactivado, la interacción con una cadena transportadora de electrones para la reducción con dos electrones y la interacción del sustrato en cuestión a la enzima (Shanklin y Cahoon, 1998) (Fig. 3).

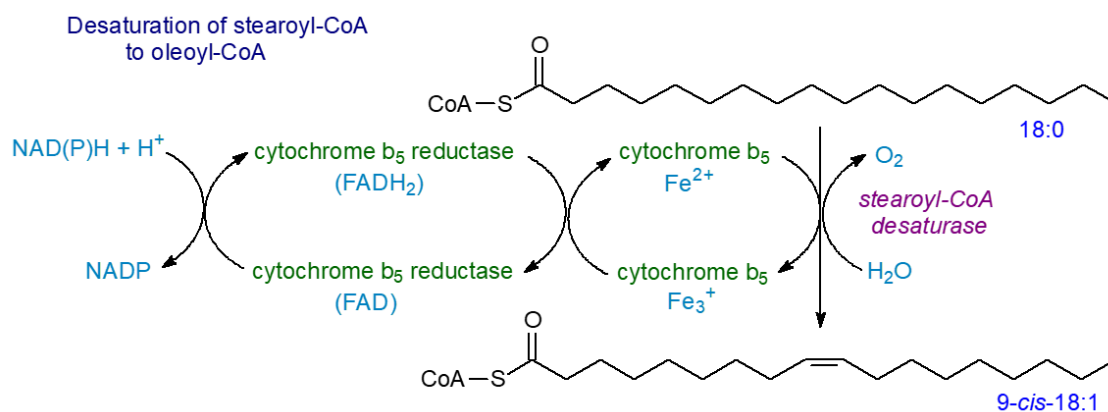


Fig. 3 – Representación de la cadena transportadora de electrones durante la inserción de una insaturación (www.lipidmaps.org)

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de las enzimas desaturasas descritas es muy amplia; éstas además de introducir insaturaciones diversas en configuración *cis* y *trans* también son capaces de introducir otro tipo de modificaciones. De esta manera, encontramos enzimas desaturasas con actividades acetilenasa/desaturasa, desaturasa/conjugasa, desaturasa/hydroxilasa, entre otras (Shanklin y Cahoon, 1998). Estas enzimas son regioespecíficas, modificando la cadena acilo en posiciones específicas, y regioselectivas, mostrando una alta especificidad de sustrato en función de la cabeza polar a la que se encuentra esterificado el ácido graso (Meesapyodsuk y Qiu, 2012). En este sentido, se han descrito acyl-CoA desaturasas, esfingolípido desaturasa, ACP-desaturasa, etc. Sin embargo, en este trabajo nos centraremos en el estudio de las acyl-CoA desaturasas por ser las enzimas involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA (Shanklin y Cahoon, 1998).

Las diferencias en las actividades enzimáticas descritas en las acyl-CoA desaturasas (Fads2) se deben a cambios en la secuencia de aminoácidos de regiones adyacentes a la región activa de la enzima o en el mismo sustrato (Meesapyodsuk y Qiu, 2012). Ejemplos de esto son los trabajos realizados de mutagénesis dirigida sobre enzimas desaturasa donde al sustituir las posiciones adyacentes a las cajas de histidina, S213 y K218, modificaron tanto la actividad enzimática de la proteína como la afinidad por determinados sustratos en *Mucor rouxii* (Na-Ranong *et al.*, 2006). De forma similar, Lim *et al.* (2014) demostraron que 4 aminoácidos localizados entre las regiones transmembrana III y IV eran los responsables de determinar la regioespecificidad de la enzima mientras que modificaciones en la región transmembrana IV alteraba la actividad catalítica. Por otro lado, estudios sobre la Fads2 en las microalgas *Glossomastix chrysoplata* y *Thalassiosira pseudonana*, determinaron que la región catalítica de la enzima se encuentra entre la región transmembrana IV y V, donde cambios en las posiciones 302T y 322S alterarían la conformación del bolsillo hidrofóbico y por lo tanto la interacción de la región activa con el sustrato (Shi *et al.*, 2018). Variaciones en la región activa o posiciones cercanas alterarían la interacción enzima-sustrato modulando la actividad de la enzima y la especificidad de sustrato.

1. INTRODUCCIÓN

1.4.2. Elongasas (Elovl)

El otro proceso fundamental en la biosíntesis de LC-PUFA, es la elongación de los ácidos grasos. Esta reacción se lleva a cabo en ciclos de 4 reacciones bioquímicas sucesivas: condensación de un malonil-CoA con un acil-CoA creciente, reducción del 3-cetointermediario, deshidratación del 3-hidroxi-acilo, reducción del enoil produciendo el ácido graso final elongado en 2C (Nelson y Cox, 2013) (Fig. 4). De estos cuatro pasos, el paso limitante es el primero: la condensación de tipo *Claisen* del malonil-CoA y la cadena acilo precursora.

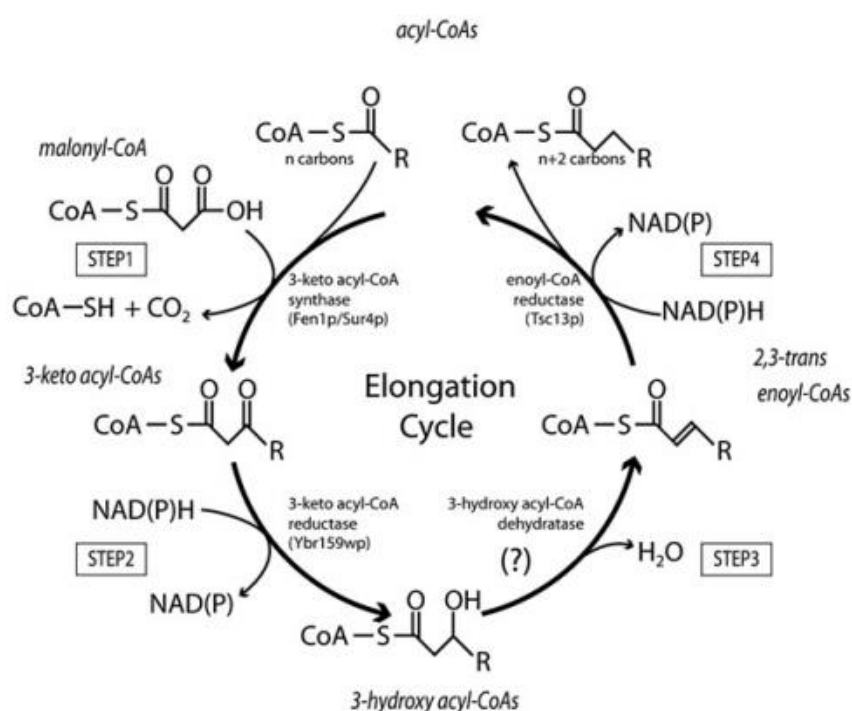


Fig. 4 - Representación de las diferentes etapas durante un ciclo de elongación de un ácido graso (Denic y Weissman, 2007)

El estudio de la ELOVL responsable de esta condensación ha tenido en vilo a la comunidad científica debido a su funcionalidad. Dado que esta enzima, es una proteína integral de membrana, resulta difícil llevar a cabo estudios *in vitro* sobre su actividad enzimática, siendo necesario su estudio en modelos vivos (Klug y Daum, 2014).

1. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, algunos autores como Denic y Weissman (2007) han podido realizar estudios *in vitro* mediante el uso de proteoliposomas. En su trabajo encontraron que la actividad elongasa o de condensación de la proteína viene determinada por la posición de una caja de histidina, junto con los residuos de lisina y arginina altamente conservados, próximos a esa caja de histidina, los cuales interaccionarían con el grupo CoA del ácido graso (Fig. 5).

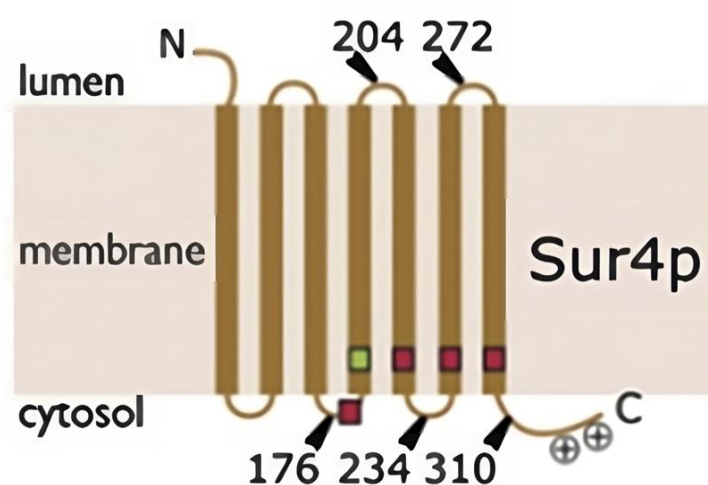


Fig. 5 – Representación de una elongasa expresada en *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes variantes introducidas por mutación dirigida (caja roja) generan cambios en la secuencia de aminoácidos. Estas variaciones determinan la longitud del AG como sustrato, produciendo diferentes VLC-PUFA. Caja de histidina: caja verde. Números: posiciones en la cadena de aminoácidos de la proteína (Denic y Weissman, 2007).

Dichos autores encontraron que la región activa de la enzima se situaba en el lado citosólico de la membrana y que, entre las regiones transmembrana, se formaba un bolsillo hidrófobo en el que se insertaba el ácido graso. La construcción de quimeras de ELOVL les permitió definir la región que determinaba la capacidad para elongar ácidos grasos de 18 a 26C. Esta región estaba constituida por siete aminoácidos en las regiones luminales o terminales de las regiones transmembrana 6 y 7 (Denic y Weissman, 2007).

1. INTRODUCCIÓN

La modificación de la secuencia de aminoácidos alteraba la geometría del bolsillo hidrófobo, modulando la actividad elongasa o la capacidad para elongar hasta una determinada longitud de la cadena acilo del ácido graso (Denic y Weissman, 2007).

1.4.3. *fads* y *elovl* descritos en peces

La capacidad que tiene un organismo para biosintetizar LC-PUFA está determinada por el repertorio de genes *fads* y *elovl* que contiene, los niveles de expresión de estas enzimas, la actividad enzimática de las correspondientes proteínas y la especificidad de sustrato.

Particularmente, en peces, por el interés que despiertan para su cultivo en acuicultura, se han descrito una variedad muy amplia de Fads y Elovl con capacidades de biosíntesis de LC-PUFA muy diversas. Esto es como consecuencia de la necesidad de reducir la dependencia sobre el uso creciente de harinas y aceites de pescado, principal fuente de LC PUFA n-3, para la elaboración de alimentos para la acuicultura.

Entre las especies estudiadas, se destacan las especies eurihalinas que, al alejarse de la clásica dicotomía de ambientes de agua dulce y agua marina, presentan diferentes capacidades de biosíntesis en salinidades salobres. Sin embargo, cambios en el perfil de ácidos grasos dietarios a diferentes salinidades pueden tener un impacto negativo sobre el estado sanitario de las poblaciones de peces en cultivo y sobre su fisiología (Tocher, 2015). Esto se puede ver reflejado en los índices de crecimiento, y tasas de conversión alimenticia, entre otros parámetros de cultivo y, por lo tanto, afecta de manera significativa los rendimientos de producción de las actividades acuícolas (Turchini *et al.*, 2009). Así, los requerimientos en AGE varían con la especie y varios estudios han demostrado que pueden ser modulables mediante la adaptación de la zootecnia de cultivo por la variación de las condiciones ambientales y del perfil de la dieta.

1. INTRODUCCIÓN

Se postula que los diferentes genes *fads* y *elovl* identificados en peces son copias genéticas siendo el resultado de eventos evolutivos por duplicaciones completas del genoma (*Whole Genome Duplication*, WGD), duplicaciones en tándem y duplicaciones segmentarias, ocurridas durante la evolución de los peces (Monroig *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012). Procesos posteriores de sub-funcionalización y neo-funcionalización de estas nuevas copias de genes dieron lugar a las diversas actividades desaturasa y elongasa otorgando las distintas capacidades de biosíntesis de LC-PUFA a los peces (Castro *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2019).

Concretamente en humanos, se han descrito tres desaturasas, FADS1, FADS2 y FADS3, situadas en el cromosoma 11 y dispuestas de manera contigua en una región que abarca 92 kb (Marquardt *et al.*, 2000). Tanto en humanos como en el resto de los vertebrados estudiados, los genes para las desaturasas descritas como FADS1 y FADS2 codifican proteínas que tienen la capacidad de introducir insaturaciones en las posiciones $\Delta 5$ y $\Delta 6$, respectivamente (Castro *et al.*, 2012). Los genes *fads1* y *fads2* se han descrito también en peces agnatos y condriktios aunque en peces teleósteos tan sólo se han descrito desaturasas de tipo *fads2*, sugiriendo la pérdida evolutiva del gen *fads1* de forma previa a la evolución de los peces teleósteos (Castro *et al.*, 2012) (Fig. 6).

Durante la radiación evolutiva en peces teleósteos, las diferentes copias de *fads2* fueron adquiriendo variaciones en su secuencia, dando lugar a nuevas capacidades de desaturación. Estas nuevas capacidades de biosíntesis de LC-PUFA permitieron la colonización de nuevos ambientes de salinidad y niveles tróficos, generando como resultado la gran diversidad de fenotipos encontrados hasta ahora (Panserat *et al.*, 2018).

De hecho, los peces constituyen uno de los grupos de vertebrados más diversos que existe actualmente con una marcada distribución latitudinal de las especies de peces conocidas (Rabosky *et al.*, 2018). A su vez, también presentan una amplia distribución por su adaptación a diferentes ambientes de salinidad donde el 80% de las especies de agua dulce estudiadas por Rabosky (2020) se engloban en dos órdenes fundamentales, Otophysi y Cichlidae, con tan sólo un 7,4% del conjunto total de las especies estudiadas clasificadas como eurihalinas y/o diádromas.

1. INTRODUCCIÓN

La historia evolutiva de cada especie pudo haber generado presiones selectivas que favorecieron la selección de las diferentes capacidades para la biosíntesis de LC-PUFA (Castro *et al.*, 2016).

Las enzimas desaturasas, identificadas en peces teleósteos son de tipo *fads2* y pueden presentar actividades monofuncionales, delta-5 ($\Delta 5$) o delta-6 desaturasa ($\Delta 6$), aunque también se han observado algunos casos con actividad delta-4 desaturasa ($\Delta 4$) (Monroig *et al.* 2013; Morais *et al.* 2012; Li *et al.* 2010) (Fig. 6).

De hecho, proteínas Fads2 con actividad bifuncional $\Delta 5/\Delta 6$ se han descrito en numerosas especies de peces como es en el caso de *Danio rerio* (Hastings *et al.*, 2001), *Siganus canaliculatus* (YLi *et al.*, 2010), *Oreochromis niloticus* (Tannoman *et al.* 2013), *Channa striata* (Kuah *et al.*, 2015), *Clarias gariepinus* (Kabeya *et al.*, 2018) (Hastings *et al.* 2001; Li *et al.* 2010; Fonseca-Madrigal *et al.* 2014) y son todavía más frecuentes las $\Delta 6$ desaturasas con actividad bifuncional $\Delta 6/\Delta 8$, aunque se encuentran fundamentalmente en especies marinas y no tanto en especies de agua dulce (Lopes-Marques *et al.*, 2017).

Las evidencias acumuladas en la actualidad permiten pensar que la mayoría de estas enzimas desaturasas poseen diversas actividades desaturasa pudiendo ejercer su actividad sobre diferentes sustratos, aunque con variaciones en las actividades específicas sobre cada uno de ellos (Monroig *et al.*, 2011). Esto se debe a la naturaleza competitiva de los sustratos por la región activa de la enzima. En el caso del tambaqui, *Colossoma macropomum* se ha observado que posee un metabolismo completo para la biosíntesis de LC-PUFA teniendo una desaturasa de tipo *fads2* multifuncional. Curiosamente, esta enzima posee las tres actividades conocidas hasta ahora, $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 8$. Por ello, es capaz de desaturar desde los ácidos grasos iniciales 18:2n-6 y 18:3n-3 hasta los de cadena larga 24:5n-6 y 24:6n-3, produciendo AA, EPA y DHA (Ferraz *et al.*, 2018).

1. INTRODUCCIÓN

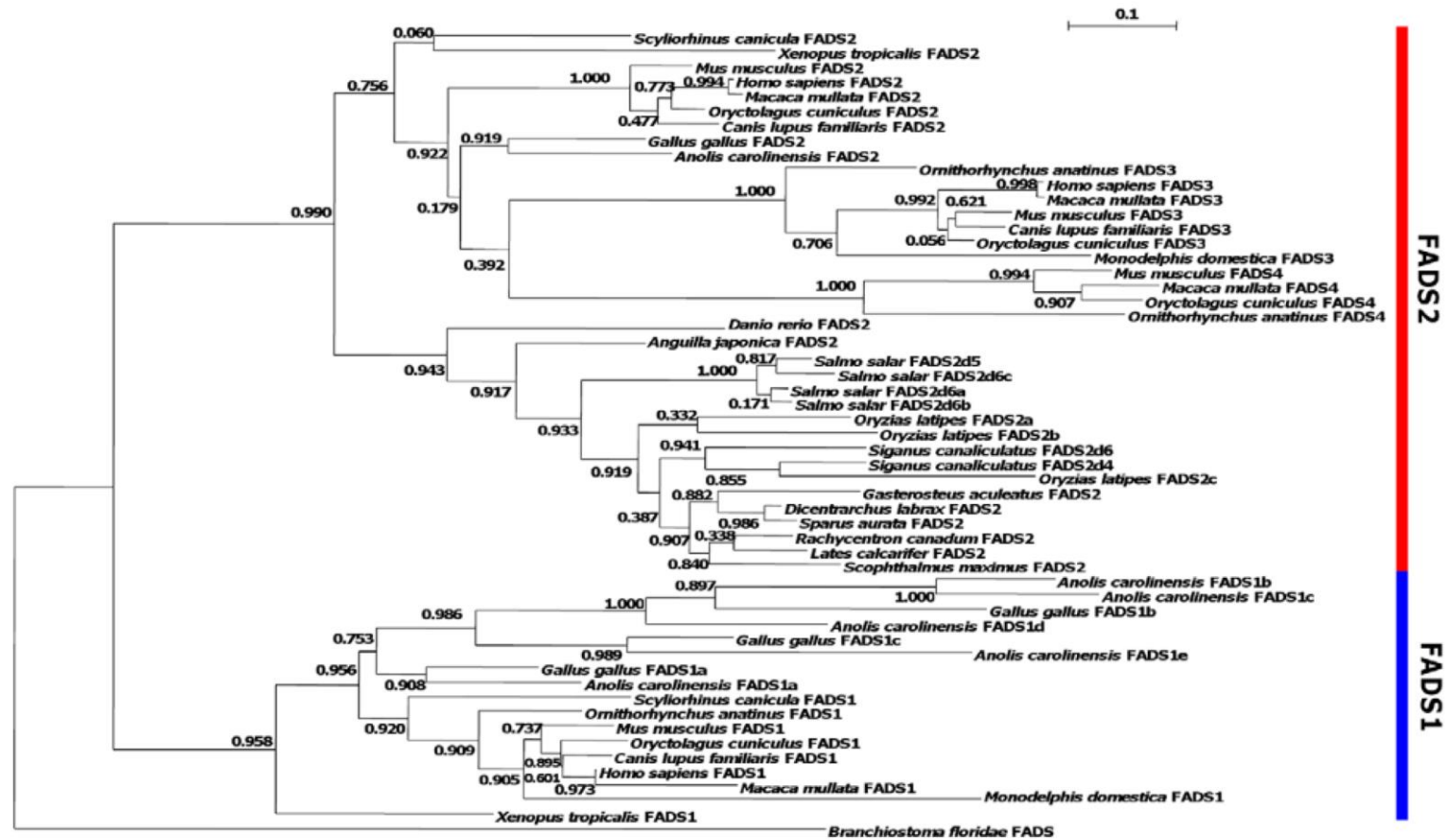


Fig. 6 - Árbol filogenético de la familia FADS, realizado con diferentes secuencias proteicas FADS1 y FADS2 (Castro *et al.*, 2012)

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de enzimas Elov1, en peces encontramos fundamentalmente dos, Elov12 y Elov15. La diferencia entre ellas radica en la especificidad de sustratos donde Elov15 muestra mayor afinidad hacia AG de cadena más corta $C18 > C20 > C22$, mientras que Elov12 tiene una mayor afinidad por los AG poliinsaturados de cadena más larga $C22 > C20 > C18$ (Agaba *et al.* 2005).

Algunas especies como el tambaqui, *Colossoma macropomum*, poseen las dos elongasas, Elov15 y Elov12. La Elov15 de esta especie puede elongar PUFA de C18 y C20, pero no puede elongar los ácidos grasos de C22. Pero la Elov12 de tambaqui sí mostró actividad sobre los AG de C18, C20 y C22, siendo mayor su actividad sobre los AG de C20 (Ferraz *et al.*, 2018). De esta manera, tambaqui posee el repertorio completo de enzimas para la biosíntesis de DHA desde sus precursores de C18. Adicionalmente se han descrito enzimas Elov14, las cuales se caracterizan por ser capaces de elongar ácidos grasos de cadena larga a partir de $C20 \geq C22$ (Deák *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2021).

Se ha planteado que el repertorio de enzimas *fads* y *elovl* en los peces responde a un patrón asociado a una adaptación a la alimentación carnívora en la que naturalmente el perfil de ácidos grasos de su dieta es rico en LC-PUFA (Mourente y Tocher, 1993). De esta manera, tendrían cubiertos los requerimientos nutricionales de AA, EPA y DHA, sin tener que producirlos metabólicamente.

Por otro lado, las especies herbívoras, de agua dulce, se exponen a un perfil de AG rico en sustratos de biosíntesis, LA y ALA, siendo necesaria la biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores (Gladyshev *et al.*, 2013b). Curiosamente, la mayoría de los peces marinos producidos en acuicultura son carnívoros, mientras que la mayoría de las especies de peces de agua dulce cultivadas son omnívoras o herbívoras (Sargent *et al.*, 2003).

Sin embargo, sería más correcto reflejar estas ideas desde un punto de vista ecológico y hablar de nivel o ambiente trófico. Las especies cultivadas en acuicultura de agua dulce generalmente tienen un nivel trófico bajo, al alimentarse fundamentalmente de invertebrados, mientras que las especies de agua marina tienen un nivel trófico alto, al alimentarse de otros peces (Magnone *et al.*, 2015a; Parrish *et al.*, 2016; White *et al.*, 2019).

1. INTRODUCCIÓN

La salinidad en peces eurihalinos también ha demostrado ser un factor fundamental en la biosíntesis de LC-PUFA, al estimular la adaptación de sus actividades biosintéticas por cambios en la expresión de elongasas y desaturasas (Fonseca-Madrigal *et al.*, 2006). Se han descrito numerosas especies de agua dulce con capacidad para producir LC-PUFA con actividades desaturasa $\Delta 6$ y $\Delta 5$, entre las que se encuentran también enzimas bifuncionales $\Delta 6/\Delta 5$, a excepción de algunas especies en las que tan sólo se les han identificado enzimas desaturasas con actividad $\Delta 6$ desaturasa como en *Arapaima gigas* (Lopes-Marques *et al.*, 2017). Por otro lado, las especies marinas se caracterizan por poseer $\Delta 6$ desaturasa pero no $\Delta 5$ desaturasa, aunque algunas especies como *Solea senegalensis* a pesar de ser especies fundamentalmente marinas presentan actividad $\Delta 4$ desaturasa cuando son estimuladas tempranamente a dietas pobres en LC-PUFA (Morais *et al.*, 2015).

En este sentido, las especies estudiadas hasta el presente han mostrado resultados contradictorios entre sí, aportando una complejidad aún no resuelta (Kabeya, *et al.* 2017). En el caso del pez eurihalino *Lates calcarifer*, la estimulación por cambios en la salinidad ambiental y nutricional permite acumular productos intermedios, EPA, sin llegar a producir DHA (Alhazzaa *et al.* 2011).

Contrariamente, existen diversos trabajos que sí evidencian la estimulación de las actividades enzimáticas, desaturasas y elongasas, para la producción *de novo* de LC-PUFA cuando los peces son cultivados a bajas salinidades, como se muestra en los trabajos realizados por Li *et al.* (2008) y Xie *et al.* (2015) sobre *Siganus canaliculatus*, satisfaciendo los requerimientos de LC-PUFA sin mostrar por ello, diferencias en los parámetros de crecimiento. Lo mismo ocurre en el tambaqui amazónico, *Colossoma macropogum*, que posee todas las enzimas necesarias para producir LC-PUFA (Ferraz *et al.*, 2018). Fonseca-Madrigal *et al.* (2012) destacan, además que las condiciones salobres de cultivo en peces de agua dulce como *Chirostoma estor* podrían estimular la expresión genética de dichas enzimas consiguiéndose las mayores tasas de biosíntesis hepática de LC-PUFA. Resultados muy similares fueron documentados para *Pagrus major* (Sarker *et al.* (2011) y más recientemente en *Siganus canaliculatus* (D. Xie *et al.*, 2015a; Dizhi Xie *et al.*, 2018), ambas especies marinas, donde dietas caracterizadas por tener niveles elevados de ALA en relación a LA estimulan la producción de LC-PUFA en aguas salobres.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que cada vez son más numerosas las especies estudiadas en relación con este tema, los trabajos realizados hasta el momento siguen siendo insuficientes para poder relacionar la capacidad de biosíntesis de una especie con el ambiente de salinidad y el nivel trófico.

1.4.4. Salinidad, estrés osmótico y LC-PUFA

Como se ha visto, los factores ambientales tales como la salinidad y la temperatura son clave para la producción de las distintas especies de interés en acuicultura. Su influencia tiene efectos directos sobre el rendimiento de cultivo, más allá del efecto sobre la biosíntesis de LC-PUFA (Strüssmann y Nakamura, 2002; Toni, 2017). Además, el buen manejo de los factores ambientales permite la diversificación de la acuicultura por medio de una optimización en el uso de los recursos naturales y permite adaptarnos al cambio climático (Ahmed y Thompson, 2019; FAO, 2017).

Entre los impactos del cambio climático se encuentran cambios en la circulación de las corrientes y cambios de salinidad en los cuerpos de agua. Un ejemplo de esto, son los programas de mejoramiento genético en *Pangasionodon hypophthalmus* para adaptar los sistemas de cultivo de esta especie debido a un aumento en la entrada de aguas marinas al río Mekong (Thanh *et al.* 2014). En otro caso similar, Alam *et al.* (2015) lograron reducir el estrés osmótico, mediante una suplementación de sal en la dieta, frente a ciertos eventos ambientales donde, *Centropristis striata* es sometido de forma irremediable a la influencia de aguas salobres.

La alteración de la salinidad de cultivo también se usa para reducir el estrés osmótico y aumentar la tolerancia a otros estímulos en acuicultura. Es frecuente este tipo de prácticas en el cultivo de especies de agua dulce y durante actividades rutinarias como el transporte de peces (Alam *et al.*, 2015; Harmon, 2009). Por otro lado, la simulación artificial de variaciones de temperatura, salinidad y fotoperiodo, permite un manejo controlado del desarrollo y el ciclo reproductivo de algunas especies (Björnsson *et al.*, 2011). En el caso del cultivo de *Dicentrarchus labrax* un control integral, hormonal y ambiental, se usa para acortar el ciclo reproductivo de la lubina aumentando el número de puestas al año (Zanuy *et al.*, 2001). Otro ejemplo es la variación de la salinidad de cultivo en el salmón (*Salmo salar*), pues al ser una

1. INTRODUCCIÓN

especie anádroma, debe de pasar por un proceso obligatorio de esmoltificación. En este proceso de transformación a través de diferentes estadios de desarrollo *parr-smolt*, los alevines experimentan cambios profundos, durante su transición a ambientes de agua marina (Betancor *et al.*, 2016). La influencia de estos parámetros incide directamente sobre la fisiología de los peces en cultivo, interfiriendo en procesos de reproducción, crecimiento, sobre el sistema inmunológico y la alimentación (Jobling, 2016; Lam, 1983; Magnadottir, 2010). Es fundamental evitar condiciones de estrés en acuicultura que afecten negativamente a la población (Toni, 2017) y hacer un uso favorable de los parámetros ambientales de cultivo para el control de la productividad (Bobe, 2015).

Las respuestas fisiológicas desencadenadas por la salinidad ambiental son complejas afectando a los órganos osmorreguladores, por ejemplo, branquias e intestino. A nivel celular, cambios en la salinidad generan cambios en la presión osmótica de la célula y desestabilizan la estructura de las proteínas activando una respuesta celular al estrés (*Cellular Stress Response*, CSR). Como respuesta, el factor de transcripción HSF (*Heat Shock Factor*) aumenta la expresión de numerosos genes involucrados en diferentes procesos celulares (Evans y Kültz, 2020) desencadenando una cascada de respuestas. Entre estas respuestas destacan el aumento en las actividades en la Na/K-ATPasa (NKA) en tejidos como branquias, riñones, e hígados en teleósteos, aumentando hacia las salinidades más altas (Alam *et al.*, 2015; Arjona *et al.*, 2009; Polakof *et al.*, 2006). Estos procesos requieren de energía metabólica para la reorganización celular de los tejidos y para el transporte activo de iones contra gradiente (Jeffries *et al.*, 2019; Scott y Brix, 2013).

Las respuestas a cambios de la salinidad también tienen lugar en tejidos involucrados en el metabolismo energético, como el hígado y la musculatura (Evans y Kültz, 2020; Tseng y Hwang, 2008). En una respuesta primaria y secundaria se produce una respuesta hormonal por la liberación de catecolaminas y cortisol, desencadenando respuestas metabólicas en tejidos diversos (Arjona *et al.*, 2009).

1. INTRODUCCIÓN

Concretamente, a nivel de la glándula pituitaria además de producirse una liberación de hormonas liberadoras de corticotropinas (crh) también se inducen cambios en la expresión génica de receptores glucocorticoides (gr2) y receptores mineralocorticoides (mr) desencadenando procesos de osmorregulación (Aruna *et al.*, 2015). A nivel del hígado, se moviliza la glucosa y los lípidos que van a tener una función importante en el suministro de energía metabólica para afrontar los cambios en la salinidad de cultivo (Zhang *et al.*, 2017). Como resultado, los peces desarrollan una variedad de respuestas adaptativas logrando diferentes estados de homeostasis según sean las condiciones ambientales (Kültz, 2015).

Las diferentes respuestas observadas en peces frente a cambios de salinidad dependen de la capacidad natural de cada pez para adaptarse a determinados rangos de salinidad. Peces cultivados en salinidades sub-óptimas reducirían su capacidad de osmorregulación, desencadenando respuestas de estrés y manifestando desequilibrios osmóticos como desviaciones en la osmolaridad plasmática más allá del rango natural de valores (Alam *et al.*, 2015). En el caso particular de los peces eurihalinos, éstos llegan a experimentar pequeños cambios en la osmolaridad plasmática pero dentro de rangos estrechos y desencadenando respuestas fisiológicas en tejidos diversos (Alam *et al.*, 2015; Jarvis y Ballantyne, 2003).

1.5. Descripción del modelo de estudio: *Paralichthys orbignyanus*

El lenguado, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) es una especie eurihalina que se distribuye en las costas de Brasil, Uruguay y Argentina (Fig. 7). Se consume ampliamente en Uruguay como producto de la pesca y su valor ha generado interés para su cultivo en acuicultura llegándose a desarrollar numerosas investigaciones en esta especie. Algunas de ellas se relacionan con el desarrollo del cultivo larvario (Cerqueira, 2005; López *et al.*, 2009; Luís A Sampaio *et al.*, 2007), otras con aspectos tróficos de la especie (Magnone *et al.*, 2015a; Norbis y Galli, 2004), tópico de crucial importancia para el desarrollo de los protocolos y dietas para su alimentación en acuicultura. Otros estudios han estado dirigidos específicamente a estudiar la respuesta de esta especie a diferentes factores de estrés en procesos de cultivo en acuicultura y transporte (Bolasina, 2011). Incluso,

1. INTRODUCCIÓN

como resultado de la trayectoria de investigación y desarrollo del cultivo de esta especie en Uruguay, recientemente se elaboró un manual sobre el cultivo de esta especie (Bessonart y Salhi, 2018) que recoge la mayoría de la información que hay actualmente relativas a *P. orbignyanus*.



Fig. 7 – Distribución natural del lenguado (*Paralichthys orbignyanus*) (www.fishbase.mnhn.fr)

Se trata de un pez plano que habita a profundidades no mayores a 20-30 m, cuyas hembras pueden alcanzar tallas de hasta 1 m de longitud. *P. orbignyanus* se alimenta en lagunas costeras y se reproduce en el mar. En todo su rango de distribución, se extiende una franja importante de lagunas costeras de las que hace un importante uso, siendo uno de los predadores top del sistema.

Magnone *et al.* (2015), mediante el análisis del perfil de ácidos grasos de las presas, encuentran que su dieta se compone básicamente de pejerrey y minoritariamente de camarones, en concordancia con los resultados obtenidos con estudios basados en contenidos estomacales (Magnone *et al.*, 2015). La eurihalinidad de *P. orbignyanus* se ha demostrado en juveniles en cautividad (Wasielesky *et al.*, 1995) en un rango de salinidad comprendido entre 0 y 55‰, pudiéndose caracterizar como un teleósteo marino/estuarino, eurihalino, capaz de hiper/hipo iono-osmorregulación en el régimen de fluctuación de salinidades al que esta especie se

1. INTRODUCCIÓN

enfrenta en el medio natural. En respuesta a la salinidad de cultivo, Sampaio *et al.* (2007) observaron que la tasa de fertilización de huevos es directamente proporcional a la salinidad, aunque la eclosión no se da a salinidades de 25‰ o inferiores, pero sí a 35‰ de salinidad. Por otra parte, no observó supervivencia de las larvas tras 6 días de cultivo a 5‰ de salinidad, pero sí un efecto sobre el crecimiento de las larvas, obteniendo los mejores valores a 20 y 30ppt de salinidad. Tras la metamorfosis, los juveniles pueden sobrevivir incluso en agua dulce, demostrando la fuerte eurihalinidad de esta especie aún en edades tempranas de desarrollo.

Recientemente, nuestro equipo ha caracterizado histológica y bioquímicamente su reproducción en la costa uruguaya (Gadea *et al.* 2015), constatándose que las hembras de *P. orbignyanus* maduran sus gónadas en el ambiente marino pero eventualmente, si se ven impedidas de salir al mar, maduran en las lagunas, aunque esto les implica marcadas variaciones en el balance de ácidos grasos corporales con respecto a lo que se observa en el mar (Magnone *et al.*, 2009a), lo que se podría interpretar como que las lagunas costeras constituyen áreas de alimentación para los adultos en donde satisfacen sus necesidades nutricionales al menos cuantitativamente (Magnone *et al.* 2009b). Con respecto a los requerimientos cualitativos de ácidos grasos en esta fase de permanencia en las lagunas se abren importantes interrogantes respecto a sus habilidades para sintetizar n-3 LC-PUFA a partir de precursores de 18 carbonos y qué efecto tienen las variaciones de salinidad en la activación de estas rutas enzimáticas.

2. HIPÓTESIS

Paralichthys orbignyanus es capaz de biosintetizar LC-PUFA a partir de sus precursores y esta biosíntesis se ve influenciada por la salinidad ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la salinidad sobre la capacidad de biosíntesis endógena de LC-PUFA en *Paralichthys orbignyanus* para su posterior aplicación en la reducción de la inclusión de aceite de pescado en la ración.

3.2. Objetivos específicos

- Implementar un procedimiento de ensamblado *de novo* de transcriptoma hepático en *P. orbignyanus* que permita generar recursos genéticos e identificar transcriptos *novel* en organismos no modelo de interés para la acuicultura.
- Identificar y caracterizar las secuencias nucleotídicas de las enzimas *fads2* y *elovl* involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA en *P. orbignyanus*.
- Evaluar los cambios de expresión génica de *fads2* y *elovl* de *Paralichthys orbignyanus* bajo diferentes condiciones de salinidad ambiental.
- Estudiar el perfil de ácidos grasos en *Paralichthys orbignyanus* cultivado a diferentes salinidades.

4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La diversificación de la acuicultura conlleva el desarrollo del cultivo de nuevas especies para las cuales la disponibilidad de recursos genéticos, son escasos o incluso nulos. Dada la ausencia de recursos genéticos en el lenguado, en una primera etapa nos planteamos caracterizar el transcriptoma hepático (mRNA-Seq), por ser el centro metabólico de biosíntesis de LC-PUFA. La aplicación de esta tecnología de secuenciación masiva (NGS) nos permitió identificar las secuencias nucleotídicas de los transcritos codificantes de las enzimas, *fads2* y *elovl*, además de los genes de expresión constitutiva en *P. orbignyanus*. Los datos crudos de secuenciación fueron sometidos al análisis bioinformático con ensamblado *de novo*. Una vez, identificadas y caracterizadas las secuencias de interés, las mismas fueron utilizadas para el diseño de un sistema de cuantificación de la expresión génica basado en qPCR.

En paralelo, se llevó a cabo una experimentación animal con juveniles de lenguado para estudiar el efecto de la salinidad sobre la biosíntesis de LC-PUFA. Para ello, se pusieron a punto 4 sistemas de recirculación, cada uno de ellos con una salinidad de cultivo diferente y se diseñó una dieta pobre en LC-PUFA y rica en sustratos de biosíntesis. De la experimentación animal, se obtuvieron muestras de tejido hepático y músculo con piel de cada tratamiento de salinidad para poder estudiar el efecto de la salinidad en la biosíntesis de LC-PUFA en *P. orbignyanus*.

Las muestras de tejido hepático fueron utilizadas en la cuantificación de la expresión génica de *fads2* y *elovl* en las diferentes condiciones de salinidad. Las muestras de musculatura se utilizaron para el análisis del perfil de ácidos grasos en lípidos totales, lípidos polares y lípidos neutros para estudiar más en detalle el efecto de la salinidad sobre el perfil de ácidos grasos en este tejido.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Transcriptoma de *Paralichthys orbignyanus* mediante secuenciación masiva (mRNA-Seq)

Para la generación de los recursos genéticos necesarios de la especie objetivo se llevó a cabo una secuenciación masiva del transcriptoma hepático (mRNA-seq) y un ensamblado *de novo* a partir del ARN mensajero obtenido del tejido hepático.

5.1.1. Obtención y muestreo de peces

Los peces para realizar la secuenciación del transcriptoma hepático de *Paralichthys orbignyanus*, se obtuvieron mediante una pesca de arrastre en el Arroyo de Valizas (Rocha, Uruguay). Se capturaron varios ejemplares vivos de la especie objetivo, todos ellos juveniles, que se encontraban a una salinidad de 0,1ppt y a una temperatura de 17,7°C (Tabla 1).

En todo momento, los peces se mantuvieron en la misma agua del arroyo y con aireación constante hasta su sacrificio y posterior muestreo en el mismo día. Para no comprometer la integridad del ARN de los tejidos, la extracción de los tejidos de cada uno de los peces se llevó a cabo con una dosis letal de anestesia en el momento de ser sacrificados. Para ello, se administró benzocaína en baño a una concentración de 0,5 g/L. Las muestras de tejido hepático se conservaron en RNAlater (ThermoFisher) a 4°C durante toda una noche y posteriormente a -80°C hasta su próximo uso.

Tabla 1- Juveniles de lenguado obtenidos del medio natural (Arroyo Valizas) para estudios de trascríptómica (RNA-Seq).

Ejemplar	Peso (g)	Longitud total (cm)
PO05H	74	18,9
PO06H	22	12,5
PO07H	28	13,6
PO08H	12	10,7
PO09H	18	11,6
PO10H	14	10,8

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Además, de las muestras obtenidas de peces procedentes del ambiente natural, más adelante en este proyecto, se incluyó una segunda muestra, obtenida durante la experimentación animal (Sección 5.4.1) para validar los resultados obtenidos. Esta muestra se seleccionó en base a los primeros resultados de cuantificación de la expresión génica obtenidos. La muestra se procesó bajo las mismas condiciones y procedimientos que se describen en este apartado.

5.1.2. Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las muestras de tejido hepático conservado en RNAlater (Thermo) mediante el procedimiento Quick RNA Miniprep Kit (Zymo Research) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El proceso de extracción de ARN se inicia con el homogeneizado y lisis del tejido. Para ello, se cortó un fragmento inicial de la muestra en RNAlater de 3x3mm, que equivale aproximadamente a 50mg de tejido. A continuación, se centrifugó la muestra en un tubo cónico, a 4°C y 3000g durante 3min, para eliminar restos de RNAlater. Finalmente, se eluyó el ARN total en 50 µL de agua libre de RNasa y se adicionaron 2.5µL de RNaseOUT (ThermoFisher). Se realizó una electroforesis en agarosa con el ARN total y se cuantificó por espectrofotometría con NanoDrop para evaluar su calidad. De esta manera, se verificó el nivel de pureza de las muestras y la ausencia de degradación manteniendo aquellas que tuvieran relaciones $260/280 > 2$ y $260/230 > 1,8$.

5.1.3. Síntesis de ds cDNA

A partir de la muestra que presentó la mejor calidad aparente de ARN total se sintetizó el ADN complementario de doble cadena (dscDNA) mediante el kit *Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis* de Thermo Fischer y con cebadores poli-d(T)₁₈ de Macrogen, para la síntesis de cDNA a partir de la fracción de mRNA. Finalmente, el ds cDNA obtenido fue purificado con esferas magnéticas 1,8x AMPure XP de Thermo Fischer y eluído en 20 µL de agua. El ds cDNA obtenido se analizó con Nanodrop para comprobar que la pureza y la concentración fueran adecuadas para los procesos posteriores de preparación de librerías y secuenciación por RNASeq.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.4. Secuenciación: RNAseq y análisis bioinformático

Se enviaron dos muestras de dscDNA a secuenciar por RNA-Seq a Macrogen (PO10H y PO26H) con una cobertura estimada de 100 millones de lecturas. Las lecturas contenidas en los archivos *fastq* se analizaron con FastQC para determinar la calidad de los datos de secuenciación, antes y después de la eliminación de los adaptadores y del filtrado de calidad mediante Trimmomatic (*Phred Score* > 30).

Finalmente, con las lecturas resultantes se hizo un ensamblado *de novo* con Transabyss. El ensamblado se llevó a cabo con k-mers desde k21 a k57 a intervalos de 4 k-mers. Los transcriptos obtenidos de cada uno de los ensamblados fueron unificados mediante el uso de la herramienta Transabyss-merge. A su vez, dada la tendencia de estos procedimientos multi k-mer a generar transcriptos duplicados, se realizó un análisis de clusterización con CD-HIT-EST, lo que permitió construir transcriptos más largos, a partir de transcriptos parciales con alta identidad. Para ello, se definió un punto de corte de 0,99 de identidad entre las secuencias a clusterizar. Para evaluar la calidad del ensamblado *de novo* se aplicaron estadísticas sobre los distintos sets de datos obtenidos con los transcriptos ensamblados y adicionalmente, se usó Bowtie2 para alinear las lecturas a los transcriptos ensamblados.

5.2. Identificación y caracterización de *fads2* y *elovl* en *P. orbignyanus*

Los transcriptos ensamblados se identificaron con Blastx usando como referencia diferentes bases de datos. Esta herramienta traduce a proteína cada transcripto usando los seis marcos de lectura posibles y los compara por identidad de secuencia con las bases de datos usadas como referencia. En esta ocasión, se construyó un set de secuencias fasta mediante una búsqueda de todas las secuencias proteicas identificadas en peces hasta el momento que estuvieran presentes en la base de datos nr (*Non redundant* de NCBI) y Uniprot. Estos sets de secuencias fueron utilizados para construir dos referencias diferentes con makeblastdb para utilizarlas finalmente en la identificación de transcriptos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Alternativamente, se usó HMMER para extraer las secuencias por similitud de dominios. Para ello, se elaboró una referencia con HMMER-build, construida a partir de alineamientos realizados con ClustalW sobre un set de secuencias aminoacídicas representativas de cada proteína objeto de estudio. Para obtener las secuencias de interés se tradujeron a proteína los transcritos ensamblados con Transeq usando los 6 marcos posibles de lectura. El conjunto de las secuencias de proteína posibles fue identificado con HMMER y confirmados finalmente por su identificación con Blastp y por alineamiento con ClustalW.

5.2.1. Análisis filogenético de *fads2* y *elovl*

Para estudiar la relación filogenética entre las diferentes secuencias de aminoácidos de Fads2 y Elovl5 se llevaron a cabo dos alineamientos de secuencias representativas en peces con ClustalW. El alineamiento correspondiente a Fads2 contenía 46 secuencias Fads2 identificadas en peces además de secuencias de FADS2 de mamíferos, humano, rata y ratón y algunas secuencias Fads1, que se utilizaron como grupo externo. Por otro lado, el alineamiento correspondiente a Elovl, contenía 45 secuencias de Elovl5, Elovl4 (a y b) y Elovl2 identificadas en peces. Para asegurar la buena calidad del alineamiento, en ambos casos se seleccionaron aquellas secuencias de buena calidad, que estuvieran completas y que no tuvieran *gaps*.

Una vez realizado el alineamiento se llevó a cabo un análisis para determinar el mejor modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos con MegaX.

El análisis filogenético se llevó a cabo con métodos bayesianos. Para ello se usó Mr Bayes (Ronquist *et al.*, 2012) en la plataforma CIPRESS (Miller *et al.*, 2015). El análisis se llevó a cabo con 4 cadenas (*heated chains*) y con 100.000 generaciones o hasta que la desviación entre las diferentes topologías sea menor a 0,01. Se utilizó un modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos JTT (Jones *et al.*, 1992). La visualización de las diferentes topologías resultantes, se llevó a cabo con iTOL (Letunic y Bork, 2021).

5.3. Ensayo de cultivo a diferentes salinidades.

Para conocer el efecto de la salinidad en el lenguado *P. orbignyanus*, se realizó una experimentación animal con una duración de 60 días en la Estación Experimental de Investigaciones Marinas y Acuicultura (EEIMA), en Rocha (Uruguay). En ese periodo, se alimentaron juveniles de lenguado con una única dieta, deficiente en LC-PUFA, pero rica en sustratos 18:2n-6 y 18:3n-3, mantenidos a cuatro tratamientos de salinidad (2ppt, 10ppt, 18ppt y 26ppt), en cuatro sistemas de recirculación (RAS, por sus siglas en inglés).

5.3.1. Diseño de la dieta experimental

Se diseñó una dieta con un perfil nutricional que estimulara la biosíntesis de LC-PUFA y que además fuera adecuada para el lenguado en los diferentes ambientes salobres. Este tipo de diseños requiere de la combinación de materias primas de origen terrestre, con los ingredientes habituales en una dieta marina.

El diseño experimental de la dieta se basó en una dieta con perfiles sub-óptimos, de acuerdo con experiencias previas realizadas por nuestro grupo de trabajo (Gadea, 2019). En el estudio, se ensayaron diferentes perfiles de ácidos grasos dietarios, determinando el mejor perfil dietario para un ambiente salobre en *P. orbignyanus*. También nos basamos en diferentes publicaciones bibliográficas que estudiaban el efecto de variaciones en los perfiles dietarios sobre la estimulación de la biosíntesis endógena de LC-PUFA (Betancor *et al.*, 2017; Fonseca-Madrigal *et al.*, 2006; Kabeya *et al.*, 2018; Turchini *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2016) por citar algunas de ellas. El diseño de la dieta contiene una alta proporción de PUFA C18 y baja proporción de LC-PUFA. Además, se mantiene una mayor proporción de ácidos grasos n-3/n-6 y una alta relación EPA/DHA.

Para obtener los macronutrientes necesarios en la dieta experimental, se incluyó harina de pescado de origen peruano (*Steam dried fish meal*, Tecnología de Alimentos SA, Perú), como fuente principal de proteínas. Se usó harina de pescado como fuente de proteína por su mayor parecido con la alimentación natural un pez marino carnívoro/piscívoro como *P. orbignyanus* (Furuita *et al.*, 1999).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta harina fue previamente desengrasada mediante tres lavados con cloroformo para reducir el aporte de LC-PUFA. A su vez, se complementó con harina de krill por su alto contenido en EPA, para reducir la relación DHA/EPA de la dieta final.

Con el fin de proporcionar niveles de LC-PUFA bajos, pero no nulos, estas dos materias primas se complementaron con un bajo contenido de aceite de pescado, aportando a la dieta una baja proporción de AA, EPA y DHA. Como fuente de 18:2n-6 y 18:3n-3 se incluyó en la dieta una alta proporción de aceite de linaza que además de contener una proporción alta de sustratos de biosíntesis de C18 PUFA, contiene una alta relación n-3/n-6. Para asegurar el aporte necesario de micronutrientes se incluyó una mezcla de vitaminas y minerales (Tabla 2), además de carboximetil celulosa (CMC) como agente aglutinante.

En base a la composición de ácidos grasos de las diferentes materias primas a utilizar, analizados según se describe en la Sección 5.5, se formuló la dieta experimental (Tabla 2). Todos los ingredientes fueron mezclados y peleteados a un tamaño adecuado y secado a 45°C (Tabla 2). Se prepararon 9,6 kg de ración en un único lote, que se mantuvo refrigerada durante todo el experimento.

Tabla 2- Formulación de la dieta experimental.

Ingredientes (g/kg ración)	(g/kg)
Harina de pescado	820,80
Harina de Krill	30,00
Aceite de linaza	78,70
Aceite de pescado	5,00
Mezcla de vitaminas	7,75
Mezcla de minerales	7,75
CMC	50,00
<i>CMC</i> : carboximetil celulosa. Mezcla de vitaminas (mg/kg ración): retinol acetato (9,06), colecalciferol, D3 (2), tocoferol acetato, E (200), menadiona, K3 (79,83), tiamina mononitrato, B1 (40,18), riboflavina, B2 (40), piridoxina-HCl, B6 (39,6), D-pantotenato de calcio (98), niacina (148,5), ácido fólico (5), cianocobalamina, B12 (0,02), ácido ascórbico, C (1980), cloruro de colina (3500). Mezcla de minerales (mg/kg ración: NaCl (581,4), CoCO ₃ (0,24), Ca(IO ₃) ₂ (7,80), ZnO (49,79), NaSeO ₃ (0,01), MnO (3,8), Fe(CO ₃) ₂ (29,08), CuSO ₄ (10,05).	

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.2. Diseño experimental

El ensayo de cultivo de *P. orbignyianus* a diferentes salinidades se realizó en la Estación Experimental de Investigaciones marinas y Acuicultura (EEIMA, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - DINARA). Para ello, se seleccionaron juveniles, con un tamaño promedio de $33,82 \pm 8,77$ g con un rango de pesos comprendidos entre 20 y 50 gramos. Los juveniles procedían de una única puesta natural y cultivados de acuerdo a los procedimientos habituales de la base experimental, a una salinidad de 29-31 ppt hasta alcanzar 285 días post-desove (Bessonart y Salhi, 2018).

Para reducir la variabilidad de tamaños en las unidades de cultivo que pudiera resultar en diferentes niveles de ingesta, los ejemplares fueron separados en tres clases de tamaños: pequeños, medianos y grandes. Un total de 120 juveniles fue distribuido en cuatro sistemas de recirculación de agua (RAS) con tres tanques cada uno a 10 peces por tanque de 100 L cada uno. Para cada sistema RAS se definió un tratamiento experimental de salinidad: 2ppt, 10ppt, 18ppt o 26ppt. De esta manera, cada sistema RAS correspondía a una salinidad diferente y cada tanque de cada sistema RAS correspondía a una clase de tamaños: pequeños, medianos y grandes, donde no había diferencias estadísticamente significativas para cada grupo de tamaño entre las diferentes salinidades (Tabla 10).

Las salinidades objetivo se obtenían mediante la mezcla de agua de mar y agua dulce, esta última procedente de agua de lluvia (acumulada en aljibe). Las mezclas de agua se dejaban reposar un día para evitar estratificaciones y se usaban para lograr una renovación diaria del agua de cultivo del 10%.

De forma previa al inicio del experimento, se maduró el biofiltro de cada sistema RAS a las diferentes salinidades de cultivo mediante la adición al sistema de NH_4Cl y NO_2Na hasta conseguir valores constantes a las 24 horas. Durante el transcurso del experimento, se midieron los parámetros ambientales de oxígeno disuelto (mg/L y % de saturación) y pH con una frecuencia diaria y, según las necesidades, de compuestos nitrogenados $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$. Los mismos siempre se mantuvieron en valores óptimos con niveles de saturación de oxígeno superiores al 80% y 7 mg/L, asegurando el bienestar de los ejemplares durante todo el

5. MATERIALES Y MÉTODOS

experimento. La temperatura ambiental del laboratorio húmedo se mantuvo constante a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. El mantenimiento de las unidades de cultivo se llevó a cabo por el sifoneo de fondo y la limpieza del biofiltro, una vez al día.

Los peces en cultivo fueron alimentados durante 60 días, seis veces al día y con una tasa de alimentación diaria del 2% con respecto a la biomasa de cultivo. Para ajustar la alimentación, de acuerdo con el crecimiento durante el experimento, se hizo biometría de los peces en cultivo en los días 14 y 28.

Al finalizar la experimentación animal, se sacrificaron 9 peces por tratamiento de salinidad (3 peces por tanque) con una dosis letal de benzocaína (0,5g/L). El sacrificio se realizó individualmente para evitar posibles cambios en el transcriptoma hepático. De cada ejemplar se obtuvo el peso individual y talla (LT) y se diseccionó para la obtención de muestras de músculo con piel, para análisis bioquímico conservadas a -20°C . *P. orbignyanus* acumula la grasa fundamentalmente en el tejido adiposo subcutáneo (Magnone *et al.*, 2015b, 2015a).

Adicionalmente, también se tomaron muestras de hígado para cuantificación de la expresión génica por qPCR, conservadas en RNAlater y a -80°C . Adicionalmente, se tomaron muestras de cerebro, ojo, branquias e intestino para desarrollar futuras líneas de investigación. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con las regulaciones de manipulación de animales de experimentación (CEUA DINARA 001/2016).

5.4. Cuantificación de la expresión génica

Las secuencias identificadas de *fads2* y *elovl4* (Sección 2.2) se utilizaron para el diseño de procedimientos de cuantificación relativa por qPCR y, posteriormente, para estudiar los cambios de expresión génica de las proteínas de interés en las condiciones experimentales ensayadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante el kit Quick RNA MiniPrep Kit de Zymo Research. A diferencia del procedimiento descrito anteriormente, en este caso, se agregó un paso de homogeneizado previo de la muestra con nitrógeno líquido, debido a diferencias en las propiedades de la matriz del tejido.

La muestra tomada a partir del tejido conservado en RNA later , se transfirió a un nuevo tubo y se homogeneizó con nitrógeno líquido hasta formar una pasta. A esta muestra se le adicionaron 600 μL de RNA Lysis Buffer, se terminó de homogeneizar con un émbolo y se continuó con el procedimiento habitual del kit de extracción de ARN.

La calidad de ARN total, se evaluó mediante Nanodrop, consiguiéndose en todas las muestras una concentración alta de ARN total así como unas relaciones 260/230 y 260/280 por encima de 1,8 y 2, respectivamente. Adicionalmente, se realizó electroforesis bidimensional en agarosa de las muestras para evaluar su integridad. En todas ellas, se identificaron las bandas correspondientes a los ribosomas 18S y 28S manteniéndose una relación entre las bandas, donde el 28S mostraba una intensidad mayor a la del 18S. En ningún caso se observó degradación por debajo de las bandas ribosomales ni contaminación por DNA genómico.

El ARN total fue conservado a -80°C hasta su próximo uso en presencia de Ribolock para asegurar la integridad del ARN total.

5.4.2. Diseño de qPCR para la cuantificación de *fads2*, *elovl4* y β -*actina*.

Para estudiar el efecto de la salinidad sobre la expresión de *fads2* y *elovl4*, se diseñaron varias parejas de cebadores, para los genes de interés, así como del gen de expresión constitutiva, β -*actina*, a partir de los transcriptos obtenidos en la secuenciación del transcriptoma hepático de *P. orbignyanus* (Nolan *et al.*, 2006). El procedimiento desarrollado se basó en la amplificación específica de una región del CDS de los genes de interés, usando un método de identificación y cuantificación por la hibridación de sondas TaqMan para aumentar la especificidad y sensibilidad de la técnica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron *in silico* todos los oligos diseñados para descartar la formación de estructuras secundarias y dímeros de cebadores, de sondas y/o de la combinación de ambos. Adicionalmente, se determinó mediante análisis BLAST, la especificidad de amplificación *in silico* de cada gen. De todos ellos, y con el fin de evitar sesgos en la cuantificación de la expresión génica debido a factores experimentales propios de la técnica, se seleccionaron aquellas combinaciones que, reuniendo las características mencionadas anteriormente, presentaban una eficiencia de amplificación superior al 95%, con un rango dinámico de cinco puntos, la cual fue determinada por el método de la pendiente (Schmittgen y Livak, 2008a).

$$E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1$$

Dichas eficiencias de amplificación fueron utilizadas posteriormente durante el análisis de datos de la cuantificación de la expresión génica.

5.4.3. Cuantificación relativa de la expresión génica de *fads2* y *elovl4* en *Paralichthys orbignyanus*

El proceso de cuantificación génica relativa por PCR a tiempo real se llevó a cabo en dos etapas: transcripción reversa y PCR en tiempo real. En la primera etapa, se sintetizó el ADN complementario (cDNA) de las muestras de ARN total extraído mediante el *Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para seleccionar el mRNA, la síntesis del cDNA complementario se realizó con cebadores poli-d(T)₁₈. Con el objetivo de homogeneizar las condiciones de transcripción reversa, en todos los casos, se utilizó la misma cantidad de ARN total de partida (5µg). Finalmente, se llevó a cabo la qPCR en una reacción de 20 µL conteniendo 1x Hot Rox Master Mix (Bioron, Ludwigshafen, Germany). El ciclado comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos con un paso de desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una etapa de síntesis a 60°C durante 1 minuto. Finalmente, el proceso de qPCR terminó con un paso final adicional de síntesis a 60°C durante 1 minuto. En todas las etapas la rampa de temperatura fue del 100%. Todas las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un ABI Prism 7500 (Applied Biosystems).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La cuantificación de la expresión génica de las diferentes enzimas se realizó en tubos separados para asegurar la sensibilidad de la técnica en cada caso. Por este motivo, todas las sondas incluyeron el fluoróforo FAM y el *quencher* 3' Iowa Black® FQ. Se trata de un *quencher* negro que absorbe fluorescencia, pero emite en su lugar energía en forma de calor, aumentando la sensibilidad de la técnica al reducir la fluorescencia basal. La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, con tres réplicas intra-ensayo por muestra y con los tres genes cuantificados en paralelo en la misma placa. En todos los casos se incluyó un control negativo por triplicado y por cada set de cebadores y sonda. A su vez se incluyeron réplicas inter-ensayo con el que se validó el análisis de cuantificación de la expresión génica.

Los cálculos de cuantificación de la expresión génica se llevaron a cabo mediante el método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de (Pfaffl, 2001). Los valores de Ct obtenidos para *fads2* y *elovl4* se normalizaron con los valores de Ct obtenidos para la β -actina como gen de expresión constitutiva (ΔCt). Los valores de cuantificación de la expresión génica relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de *fads2* y *elovl4* se obtuvieron al comparar todos los valores de cada tratamiento de salinidad, 2ppt, 10ppt y 18ppt, con el menor de los valores obtenidos a la salinidad 26ppt (grupo control). Finalmente, se tomaron estos valores para llevar a cabo el análisis estadístico que permitiera estudiar las diferencias en los niveles de expresión de *fads2* y *elovl4* en las diferentes salinidades.

5.5. Análisis bioquímicos

Se realizaron análisis de composición de las harinas y aceites, utilizados en la elaboración de la dieta, de la dieta resultante y del músculo de los peces al principio ($n = 12$) y al final del experimento ($n = 36$, 9 peces por tratamiento de salinidad). Los análisis bioquímicos (humedad, proteína, cenizas, lípidos y ácidos grasos) se realizaron en el Laboratorio de Recursos Naturales (Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, IECA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.5.1. Proteínas, cenizas y humedad

El contenido de humedad se determinó en las harinas, como materias primas en la elaboración de la ración, en la dieta experimental y en las muestras de músculo de los peces. La humedad se determinó, secando aproximadamente 500mg de muestra en un horno a 110°C hasta obtener un peso constante (AOAC, 2006). En todos los casos, la muestra se tomó por duplicado y en simultáneo con la toma de muestra para otros análisis.

El contenido en cenizas y de proteína bruta se determinó sobre las harinas y la dieta elaborada. El contenido en cenizas se determinó mediante incineración de la muestra en un horno mufla a 500°C (AOAC, 2006). Mientras que el contenido en proteína bruta se calculó a partir del contenido en nitrógeno total determinado mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 2006). Se utilizó 6,25 como factor de conversión de N a proteína, asumiendo que el contenido de N de la proteína es de 16%.

5.5.2. Lípidos totales

De acuerdo a la técnica descrita por Folch *et al.* (1957), los lípidos totales se extrajeron con una mezcla de cloroformo:metanol (C:M 2:1). La muestra húmeda (aproximadamente 1 g pesado exactamente, 0,1 mg) se homogeneizó con C:M y se filtró el homogeneizado utilizando 20 mL de mezcla C:M. A continuación, se agregó al extracto 4 mL solución de NaCl 0,73% (1/5 parte del volumen de C:M utilizado) para una adecuada separación en dos fases. Se descartó la fase hidroalcohólica y se recuperó la fracción clorofórmica que contenía los lípidos extraídos.

El cloroformo se evaporó en el rotavapor (temperatura $\leq 40^{\circ}\text{C}$) y los lípidos totales se trasvasaron cuantitativamente a un tubo de ensayo previamente pesado usando 1ml de cloroformo. Tras la eliminación del cloroformo en una corriente de gas nitrógeno, los lípidos totales se cuantificaron por gravimetría en una balanza de precisión 0,1 mg. Cada muestra se analizó por duplicado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.5.3. Lípidos polares y neutros.

Para cada muestra de músculo, una de las dos réplicas obtenidas durante la extracción de lípidos totales fue utilizada para la separación de lípidos polares (LP) y neutros (LN). Esta separación se realizó mediante una cromatografía de adsorción en columna de sílice (SepPack® Classic Silica cartridges, Waters Corporation) según un procedimiento descrito por Juaneda y Rocquelin (1985).

Esta separación consistió en cargar 30 mg de LT en una columna SepPack® por la que a continuación, se hicieron pasar 20 mL de cloroformo y 20 mL de cloroformo-metanol (49:1) para la elución de los lípidos neutros. A continuación, sobre el mismo cartucho SepPack®, se hicieron pasar 30 mL de metanol para la elución de los lípidos polares. Las fracciones colectadas en matraces de evaporación se evaporaron en rotavapor. Los lípidos fueron recuperados de igual forma como se describió para los lípidos totales para su cuantificación por gravimetría. Los contenidos de LP y LN se expresaron como porcentaje de los lípidos totales y como porcentaje de la muestra (músculo con piel) en base al contenido de LT de la misma.

5.5.4. Ácidos grasos

Los ácidos grasos de los lípidos totales (LT), polares (LP) y neutros (LN) de las muestras se utilizaron para la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*) por transesterificación con metanol en medio ácido (H_2SO_4) (William W Christie, 2010).

Los ésteres metílicos obtenidos se separaron por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890) acoplado a un sistema de detección por ionización en llama (GC-FID). Para ello, la muestra metilada se inyectó en modo *split* a 250°C, en una columna capilar ZB-WAX (Zebron, Phenomenex), utilizando nitrógeno como gas portador. La columna inicialmente se mantuvo a 190°C durante 5 minutos y a continuación, se llevó a 225°C con una rampa de 1,8°C/min durante 35 minutos. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con estándares de ésteres metílicos (37 Component FAME Mix, Supelco CRM47885, Bellefonte, USA) y estándares preparados a partir de un aceite de pescado caracterizado (Salhi y Bessonart, 2012).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la cuantificación de ácidos grasos de los LT de la dieta experimental y sus ingredientes se usó 19:0 como estándar interno al 7% de la muestra de lípidos, mientras que, para el análisis del perfil de ácidos grasos de los LT, LP y LN de las muestras de músculo no se usó estándar interno, expresando su contenido como porcentaje del total de ácidos grasos (% de área).

En los casos en los que se usó estándar interno (ingredientes y dieta) para la expresión del contenido de ácidos grasos en % de la muestra se aplicó la siguiente relación:

$$\% AG \text{ en } PS = \frac{\text{Área } AG \times \% Std \times \% \text{ Lípidos en } PS}{\text{Área } Std \times 100}$$

- Área AG: área absoluta del AG.
- Área Std: área absoluta del estándar.
- % Std: porcentaje del estándar utilizado (19:0) sobre la muestra de lípidos.
- % Lípidos en PS: Porcentaje de lípidos sobre la muestra en peso seco.

Mientras que en los casos en los que no se usó estándar interno, en las muestras de músculo, el contenido de AG se calculó usando la siguiente relación:

$$\% AG \text{ en } PS = \frac{\text{Área } AG \times \% \text{ Lípidos en } PS}{\text{Área } Std}$$

El contenido de AG en músculo se expresó finalmente en mg AG / g de la muestra en peso seco.

$$mg \text{ AG/g muestra } PS = \% AG \text{ en } PS \times 10$$

5.6. Expresión heteróloga en levaduras

El estudio de la actividad enzimática de Fads2 y Elovl de *P. orbignyanus* se realizó parcialmente en esta tesis llegando hasta la obtención del plásmido recombinante de *elovl* y *fads2*. En esta sección se describe el diseño desarrollado para la generación de un plásmido recombinante que contiene la región codificante (CDS) de *fads2* y *elovl*. Este plásmido recombinante se usó en la transformación de *E. coli* para la clonación del plásmido. La expresión posterior de este plásmido en *S. cerevisiae* es necesaria debido a que, al ser un organismo eucariota, posee los mecanismos de plegamiento de proteínas transmembrana necesarios para una expresión funcional de las proteínas Fads2 y Elovl.

5.6.1. Amplificación del CDS de *fads2* y *elovl*

La amplificación de los CDS de *fads2* y *elovl* se llevó a cabo mediante una PCR anidada (Nested PCR) por la alta complejidad de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR de ambos transcriptos. La amplificación del CDS se llevó a cabo en dos etapas. La primera de ellas permitió una amplificación específica de una región que incluye el CDS, así como regiones parciales 5'-UTR y 3'-UTR. La segunda etapa incluyó una segunda amplificación a partir de los amplicones generados y la adición de secuencias de restricción que se usaron para generar extremos cohesivos.

Para el diseño de los cebadores, se usó Artemis y OligoAnalyzer™ Tool (IDT). Con ellas, se crearon diferentes candidatos de cebadores para la amplificación de las regiones de interés. Los cebadores seleccionados fueron adquiridos en IDT (www.idtdna.com). Todas las PCR fueron optimizadas y realizadas con ADN complementario obtenido de las muestras de tejido hepático de *P. orbignyanus* (Sección 5.3).

Las amplificaciones por PCR se realizaron con la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL) de Thermo Scientific™. El mix de PCR se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La optimización de las Ta (*Annealing temperature*) se realizó mediante una PCR en gradiente, usando rangos de temperatura alrededor de la temperatura óptima determinada *in silico* para cada pareja de cebadores (56-68°C).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) usando un marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder de Thermo Scientific™. Para cada pareja de cebadores, se determinó la T_a (temperatura de annealing) óptima en la que se obtiene un producto de PCR del tamaño esperado. Se descartaron aquellas temperaturas donde no hubo amplificación o donde los productos secundarios eran numerosos y/o muy predominantes. Se asumió cierta ineficiencia de amplificación debido a las características tan dispares de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR por su contenido en GC, su tendencia a formar estructuras secundarias y dímeros de cebadores.

Los amplicones visualizados en la electroforesis fueron purificados mediante recorte de banda y purificación posterior en gel con Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado por NanoDrop. También se verificó la ausencia de contaminantes que pudieran inhibir la segunda PCR, mediante las relaciones $280/260 > 1,80$ y $230/260 > 2$.

De igual forma, para la segunda PCR se diseñaron varias parejas de cebadores. En este caso la secuencia del cebador contenía una secuencia de amplificación específica en 5'-UTR y 3'-UTR más una secuencia de restricción reconocibles por las enzimas de restricción KpnI y XbaI respectivamente. El amplicón generado, contiene el CDS completo de la proteína objeto de interés, incluyendo los codones *start* y *stop*, así como los sitios de restricción que generan extremos cohesivos, facilitando su recombinación con el plásmido PYES2 (Thermo Scientific™) (Fig. 8).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

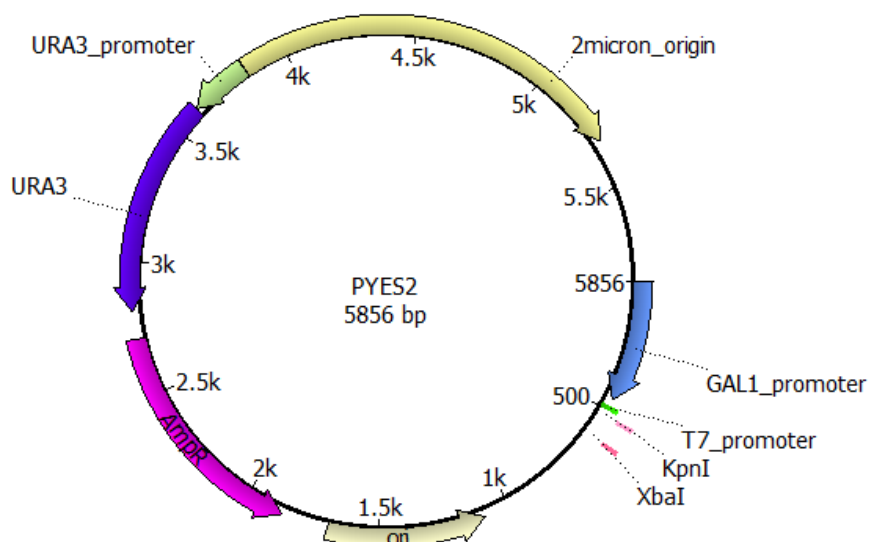


Fig. 8 – Representación esquemática del plásmido PYES2. En él se muestran las posiciones de los sitios de restricción KpnI y XbaI utilizados en el diseño de recombinación. En dirección 5' al primer sitio de restricción, KpnI, se encuentra la región promotora GAL1 que induce la expresión de la proteína en presencia de galactosa. Contiene los orígenes de replicación del plásmido, ori y 2micron_origin, además de los genes de selección, AmpR y URA3, en *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Se hizo una PCR en gradiente para optimizar la segunda amplificación de la PCR anidada (46-63°C). Debido a que los cebadores presentan dos regiones diferenciables, se determinaron dos ciclados diferentes en la misma reacción de PCR. Se definió una temperatura óptima para el primer ciclado (3 ciclos) con la Ta óptima para la hibridación específica del cebador al amplicón generado en la primer PCR. Posteriormente se definió una segunda Ta específica más alta en el segundo ciclado (32 ciclos) para la hibridación del cebador completo a los nuevos productos de PCR, generados durante los primeros tres ciclos. Finalmente, el producto de PCR obtenido durante la segunda amplificación también se sometió a recorte de banda y purificación en gel.

Los productos de PCR de *fads2* y *elovl4* fueron verificados por secuenciación Sanger (Macrogen). Una vez optimizado el diseño se realizaron tantas PCR como fueron necesarias hasta acumular al menos 1 µg de producto de PCR. Una vez se obtuvieron las cantidades suficientes de productos de PCR para *fads2* y *elovl4*, tanto los productos de PCR como el plásmido circular PYES2 fueron digeridos en reacciones

5. MATERIALES Y MÉTODOS

separadas, con las enzimas de restricción KpnI y XbaI (New England BioLabs, NEB). Las condiciones finales de PCR optimizadas para la generación de los insertos se encuentran en la sección de resultados en el apartado 6.6.

5.6.2. Digestión del plásmido y los productos de PCR

La digestión de los productos de PCR y del plásmido PYES2, se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proporciones de las enzimas y la elección del búfer de digestión se determinaron mediante la aplicación web de NEB, NEBcloner (www.nebcloner.neb.com) (Tabla 3).

Tabla 3 – Combinación de reactivos para la digestión del plásmido PYES2 y de los productos de PCR de *fads2* y *elovl4*.

Componente	PYES2	<i>fads2</i>	<i>elovl4</i>
ADN (plásmido, inserto)	2µl	40µl	17µl
10x NEB buffer r2.1	5µl	5µl	5µl
KpnI	2µl	2µl	2µl
XbaI	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Agua	41µl	3µl	26µl

Las tres reacciones se incubaron en un termo bloque a 37°C durante una hora. Los productos digeridos fueron purificados con *beads* magnéticas en una proporción 1x (AMPure XP beads) para eliminar fragmentos inferiores a 300pb. Este diseño contempla que el producto purificado correspondiente al plásmido contenga el plásmido PYES2 linearizado con los extremos cohesivos de las secuencias de restricción KpnI y XbaI (Fig. 9). Los insertos obtenidos fueron cuantificados por NanoDrop.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

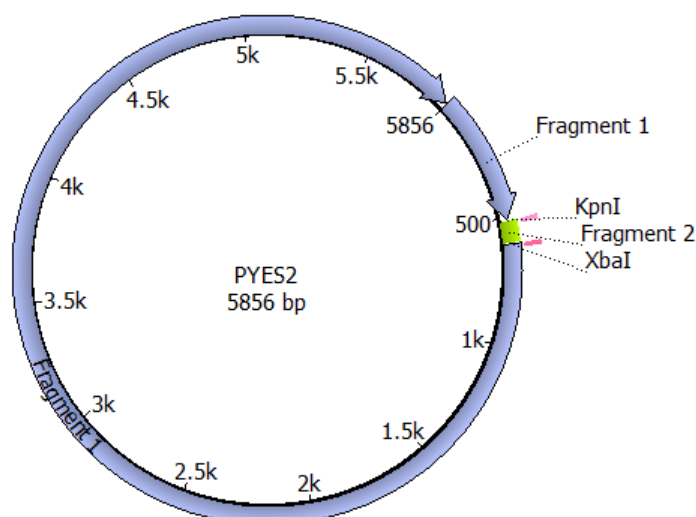


Fig. 9- Representación esquemática de la digestión de PYES2. Tras la digestión del plásmido, originalmente circular, la molécula pasa a ser lineal. El fragmento 1 (Fragment 1) representa el plásmido con los fragmentos cohesivos de KpnI y XbaI. Tras la purificación con *beads* magnéticas, el fragmento 2 (Fragment 2), el espacio delimitado por los sitios de restricción KpnI y XbaI, es eliminado. Durante la ligación, el fragmento 2 es sustituido por el inserto de *fads2* o *elovl4* respectivamente.

5.6.3. Recombinación del plásmido vector de expresión PYES2

Los insertos generados de *fads2* y *elovl4*, se utilizaron en un proceso de recombinación con el plásmido PYES2 también digerido (Tabla 4).

La ligación de los productos se llevó a cabo con una T7 ligasa de New England BioLabs. Se usó NEBio Calculator (www.nebiocalculator.neb.com) para determinar la cantidad de inserto y de plásmido que debe de combinarse en la reacción de ligación. Los reactivos se mezclaron manteniendo una relación 3:1 ng del inserto con respecto al plásmido.

Tabla 4- Reacción de recombinación de los productos diferidos, PYES2 con *fads2* y *elovl4*.

Componente	<i>fads2</i>	<i>elovl4</i>
T7 DNA Ligase Buffer (2x)	10 µL	10 µL
Vector DNA (50ng)	11,4 µL	11,4 µL
Insert DNA (<i>fads2</i> , <i>elovl4</i>)	2,2 µL	1,9 µL
T7 DNase Ligase	1 µL	1 µL

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La mezcla de reactivos se incubó a 25°C durante 30 minutos. A continuación, el producto de ligación se conservó a -20°C hasta su uso para la transformación de *Escherichia coli*. De este procedimiento, se espera que el plásmido construido para *fads2* (Fig. 10) y *elovl4* (Fig. 11) contenga todos los elementos para la transformación y selección en *E. coli* y en *S. cerevisiae* además de tener la capacidad de expresar las proteínas Fads2 y Elovl.

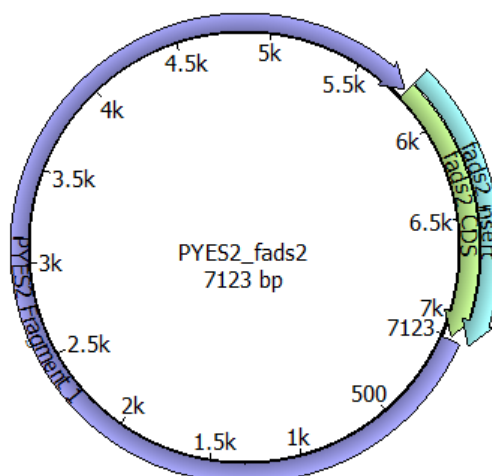


Fig. 10 – Reconstrucción *in silico* del plásmido recombinante que contiene el CDS completo de *fads2*. El constructo final contiene la región del plásmido PYES2 (PYES2 Fragment 1) y el inserto generado para *fads2* (*fads2* insert). El inserto a su vez contiene el CDS de *fads2* y los sitios de restricción que actúan como extremos cohesivos durante la ligación.

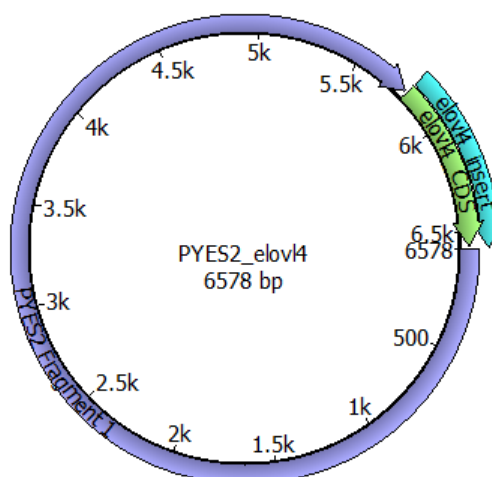


Fig. 11 – Reconstrucción *in silico* del plásmido recombinante que contiene el CDS completo de *elovl4*. El plásmido recombinante contiene todos los elementos necesarios de PYES2 para la transformación y expresión en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, así como el CDS completo de *elovl4* incluyendo el codón *start* y *stop* para la traducción de la proteína.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.6.4. Transformación y clonación en *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó con NEB® Stable Competent *E. coli* (High Efficiency) (New England BioLabs) usando el protocolo de transformación de NEB, *High Efficiency Transformation for NEB® Stable Competent E. coli*. En este caso, se usó el mayor volumen de plásmido recombinante, 2µL, en 50µL de células competentes recién descongeladas. Una vez finalizada la transformación se sembraron 100µL de células transformadas en cuatro placas de medio de cultivo LB suplementadas con 50µg/mL de Ampicilina. Las placas se dejaron secar de 30 minutos a una hora y a continuación se pusieron a incubar a 37°C durante 48 horas. Las colonias se visualizaron en una lupa (Fig. 12), eligiendo aquellas colonias aisladas lo suficientemente definidas.

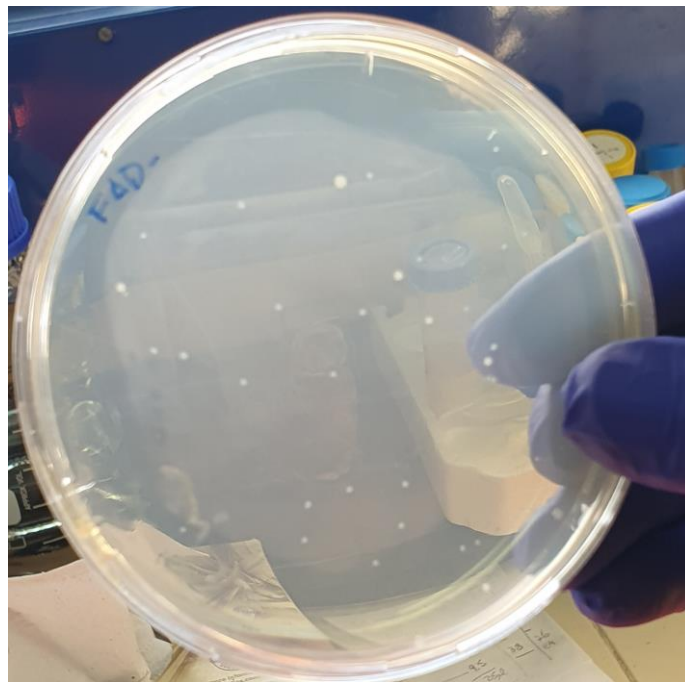


Fig. 12 – Crecimiento de colonias de *E.coli* transformadas con plásmido recombinante. Placa de cultivo LB suplementada con Ampicilina. Crecimiento a las 48 horas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se verificó la presencia del inserto en las colonias transformadas mediante una PCR. Para realizar la PCR se usaron los cebadores de la segunda PCR de la *nested PCR*. Se usó la Ta de la segunda amplificación. Para realizar la PCR se preparó un mix de PCR con Phusion de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con un volumen equivalente al número de colonias seleccionadas y con los cebadores correspondientes a cada proteína. El mix de PCR fue alicuotado y mantenido en hielo hasta su uso.

Las colonias seleccionadas (Fig. 13 izqda.) se repicaron con un palillo autoclavado en una nueva placa de LB suplementada con ampicilina, para su crecimiento. Tras repicar la colonia en la nueva placa (Fig. 13 dcha.), el palillo se introdujo en el mix de PCR preparado previamente. Se llevó a cabo la PCR correspondiente a cada proteína amplificada. Se verificó la presencia de producto de PCR mediante electroforesis en agarosa (1%), usando una escalera molecular para confirmar el tamaño esperado del amplicón. Una vez verificada la presencia del CDS en la colonia, ésta se vuelve a repicar (Fig. 13 dcha) en 5ml de caldo LB suplementado con Ampicilina, siendo necesario su cultivo a 37°C durante 24h a 48h con agitación constante a 150 rpm.

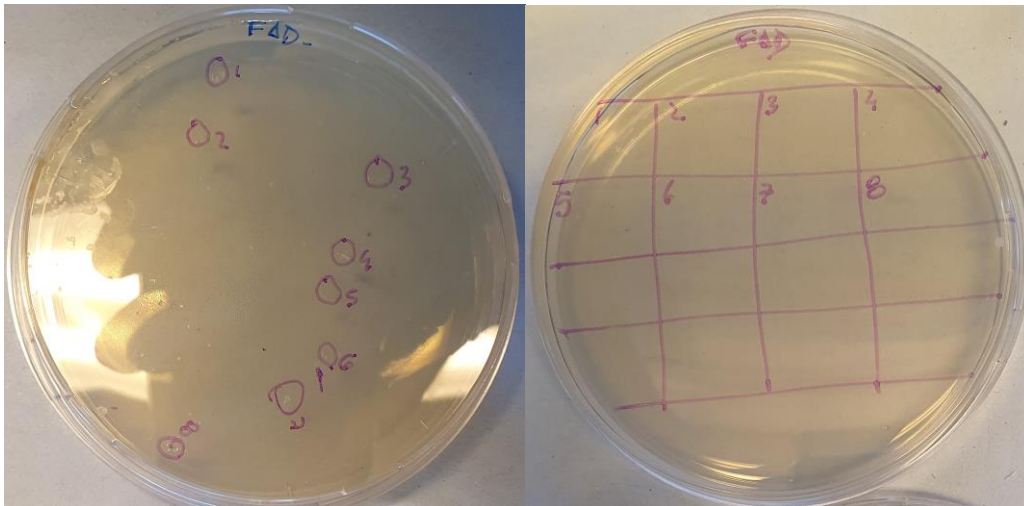


Fig. 13 – Selección de colonias y repique en placa para su crecimiento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Pasadas las 48 horas, el medio fue sometido a extracción de plásmido con Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Del volumen de cultivo generado, se conservó 1ml a -80°C . En paralelo, el medio de cultivo restante se centrifugó a 10.000 g (30 s) hasta conseguir un pellet de células y eliminando el sobrenadante. A continuación, se procedió a la extracción del plásmido. El método consistió en una lisis inicial de las células en un medio alcalino. A continuación, se neutralizó la solución homogénea y se aglutinaron los restos celulares. El sobrenadante que contenía el ADN, fue recuperado y se filtró por una columna de adsorción que en la que se adhiere el ADN a una matriz de sílica. El ADN contenido en la matriz se lavó con una solución etanólica y finalmente fue eluído en el búfer de elusión. Los plásmidos obtenidos fueron cuantificados por NanoDrop y enviados a Macrogen para la verificación de la presencia del inserto y su correcta orientación en el plásmido recombinante. Para ello, se secuenció por método de Sanger usando un cebador universal universal T7promoter, el cual se encuentra corriente arriba del inserto (Fig. 8).

5.7. Análisis de datos

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo en R v4.0.3. En aquellos casos en los que se demostró que los datos seguían una distribución normal y presentaban homocedasticidad se usaron test paramétricos. Para determinar el efecto de diferentes de la salinidad en diferentes variables de interés se usó ANOVA de una vía y análisis Post-hoc para hacer comparaciones múltiples por mediante la prueba de Tukey HSD. En el resto de los casos se usaron test estadísticos no paramétricos, Kruskal-Wallis para estudiar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Wilcoxon. A su vez el análisis de componentes principales se realizó con prcomp.

6. RESULTADOS.

6.1. Transcriptoma de *P. orbignyana*

6.1.1. RNAseq.

El análisis de calidad de la muestra del ds cDNA del mRNA en 2100 Bioanalyzer de Agilent, mostró que la muestra no presentaba degradación, concentrándose la mayor parte del ds cDNA alrededor de los 600 y los 2000 pb (Fig. 14). En ese rango, se observaron los picos característicos correspondientes a los mRNA de distinta longitud y con diferentes niveles de representación en la muestra. No se pudo calcular el *RNA integrity number* (RIN) debido a que el cDNA corresponde al mRNA y por ello no se observan los picos característicos del ARN ribosomal en el electroferograma.

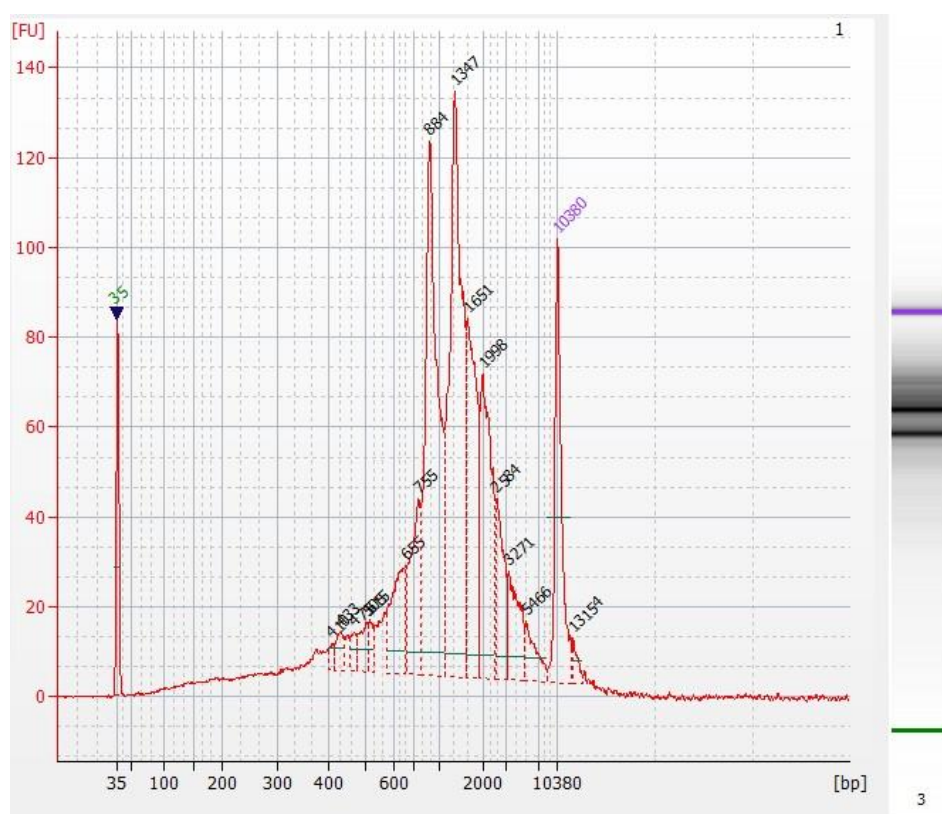


Fig. 14 – Electroferograma del ds cDNA obtenido del ARN mensajero de la muestra (PO10H). Se destaca la ausencia de picos ribosomales debido a la estrategia de síntesis de cDNA mediante el uso de cebadores poli-d(T).

6. RESULTADOS

Tras la preparación de la librería, el análisis de calidad de la muestra mostró una distribución de tamaños de los fragmentos alrededor de los 363 y 333 pares de bases (Fig. 15) y una concentración resultante de 190.82 nM.

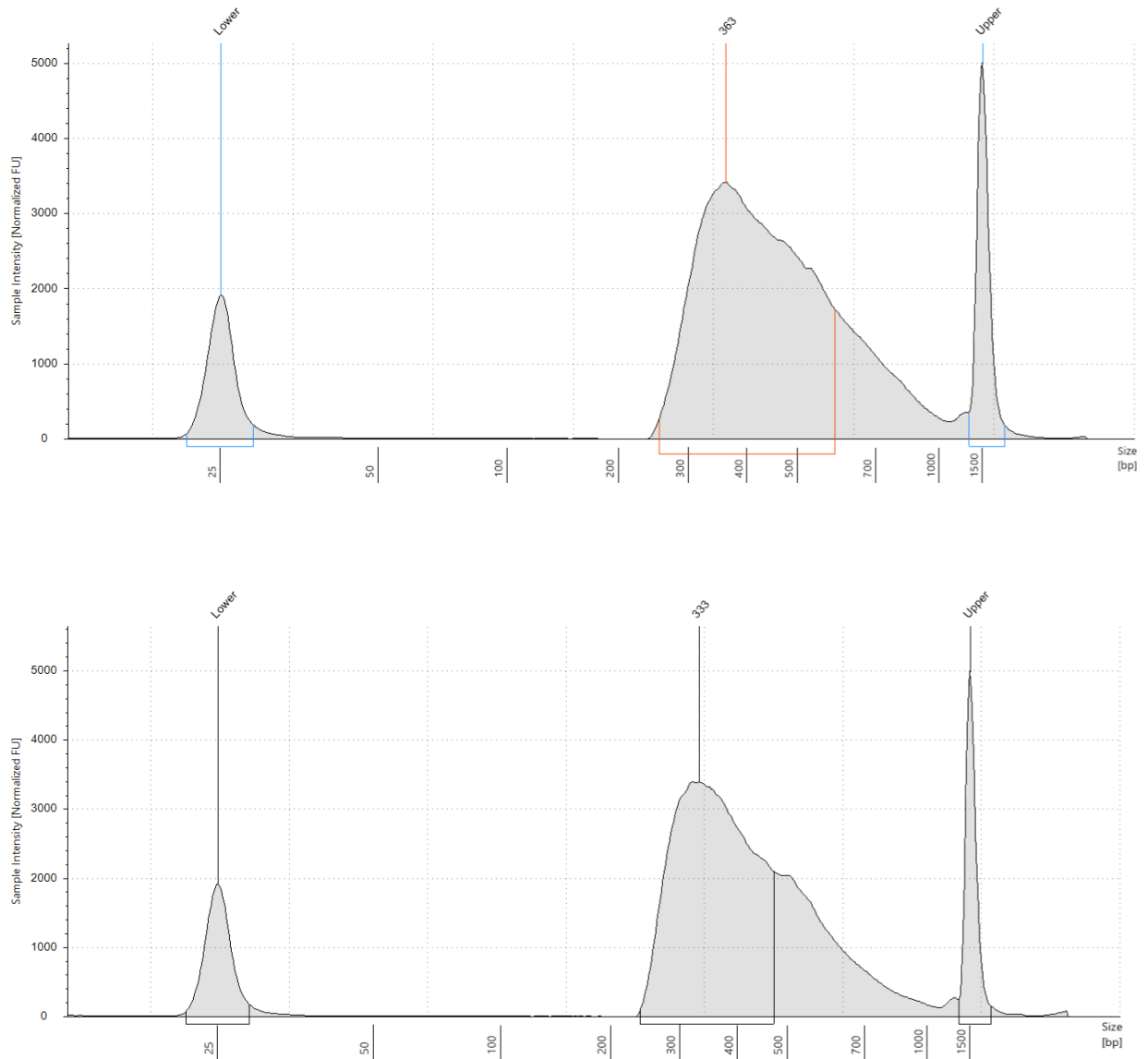


Fig. 15 – Análisis de calidad de las librerías secuenciadas. Análisis de fragmentos donde se muestra la distribución de tamaños de la librería preparada para secuenciar. Ambos perfiles muestran dos librerías sin fragmentos cortos ni presencia de contaminantes. (arriba: PO10H, abajo: PO26H).

Como resultado de la secuenciación, las muestras secuenciadas (PO10H y PO26H) generaron 114,6 y 125.9 millones de lecturas (*reads*), respectivamente (Tabla 5). Los mismos han sido depositados en las bases de datos GenBank con los números de

6. RESULTADOS

acceso, SRR25109571 y SRR25109572. El análisis inicial de la calidad de los archivos, realizado mediante FastQC, demostró la ausencia de adaptadores y una alta calidad de los *reads*. El filtrado de los *reads* mediante Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), habiendo fijado un umbral de calidad Q Score de 28, retuvo la gran mayoría de los reads (Tabla 5).

Tabla 5 - Lecturas obtenidas tras el filtrado con Trimmomatic. utilizando las lecturas pareadas y las no pareadas para realizar el ensamblado *de novo*.

	SRR25109571		SRR25109572	
	Nº <i>reads</i>	Porcentaje	Nº <i>reads</i>	Porcentaje
Reads pareados inicial	57.291.789		63.163.041	
Conservados ambos:	54.103.661	94,44	61.126.704	96,78
Conservados sólo <i>forward</i>:	1.737.425	3,03	1.039.215	1,65
Conservados sólo <i>reverse</i>:	1.088.087	1,90	802.512	1,27
Eliminados:	362.616	0,63	194.610	0,31
TOTAL	56.929.173	99,37	62.968.431	99,7

Finalmente, el ensamblado multi *k-mer* generó 1.263.743 y 13.328.285 *contigs* para PO10H y PO26H, respectivamente. Dichos *contigs* se redujeron tras una clusterización por identidad de secuencia con CD-HIT-EST a 1.221.188 y 2.101.637 *unigenes*.

Del ensamblado de las lecturas usando el transcriptoma ensamblado *de novo* como referencia se obtuvo un alineamiento del 86,81% y del 93,31% de SRR25109571 y SRR25109572, respectivamente.

Mediante el análisis BUSCO se analizó la representación de las diferentes proteínas en la base de datos de BUSCO para actinopterigios. Los resultados mostraron que el 74,8% y 77.9% de los transcriptos se encontraban representados en la base de datos. Además, el 63,4% y el 63.7% de las proteínas identificadas se encontraban completas y que particularmente, la muestra SRR25109572, se destaca por contener mayor porcentaje de proteínas completas duplicadas (Tabla 6).

6. RESULTADOS

Tabla 6 - Evaluación de la representación del transcriptoma de *P. orbignyanus* mediante el análisis BUSCO. Se usó la base de datos de Actinopterigios en BUSCO representada por 4584 grupos ortólogos de proteínas.

BUSCO (%)	SRR25109571	SRR25109572
Complete	63	63,7
Single-copy	35,3	26
Duplicated	27,7	37,7
Fragmented	11,8	14,2
Missing	25,2	22,1

De todos los transcriptos obtenidos, 106.327 y 251.499 identificaron con alguna secuencia de proteína en peces de la base de datos nr de GenBank, mientras que 47.111 y 101.741 lo hicieron con alguna secuencia de Swissprot de UniProt.

6.2. Identificación y caracterización de *fads2* y *elovl* en *P. orbignyanus*

6.2.1. *fads2* en *P. orbignyanus*

De los transcriptos identificados como *fads2* se obtuvo una secuencia completa de 2069 pb. En ella, se pudieron identificar las regiones CDS (región codificante) y las 5' y 3' UTR. La región 3'UTR contenía también la cola poli-A característica de los ARN mensajero en eucariotas. La calidad del ensamblado de este transcripto pudo ser verificada mediante su alineamiento con otras secuencias homólogas bien caracterizadas. El CDS presenta una extensión de 1332 pb que codifica para una proteína de 443 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de Fads2 mostró una identidad del 98,8% con la misma proteína identificada en *P. olivaceus* (AJG36440.1) y del 98,42% con *P. lethostigma* (WJY55134.1).

En la secuencia proteica se identificó el dominio citocromo-b con el grupo hemo característico y el dominio desaturasa, con las tres cajas de histidina, HXXXH, HXXHH y QXXHH, en la región activa de la enzima y los 4 dominios transmembrana. Los 4 aminoácidos, FHIQ, que determinan la actividad $\Delta 6$ desaturasa se encontraron en la tercera región transmembrana (Fig. 16).

6. RESULTADOS

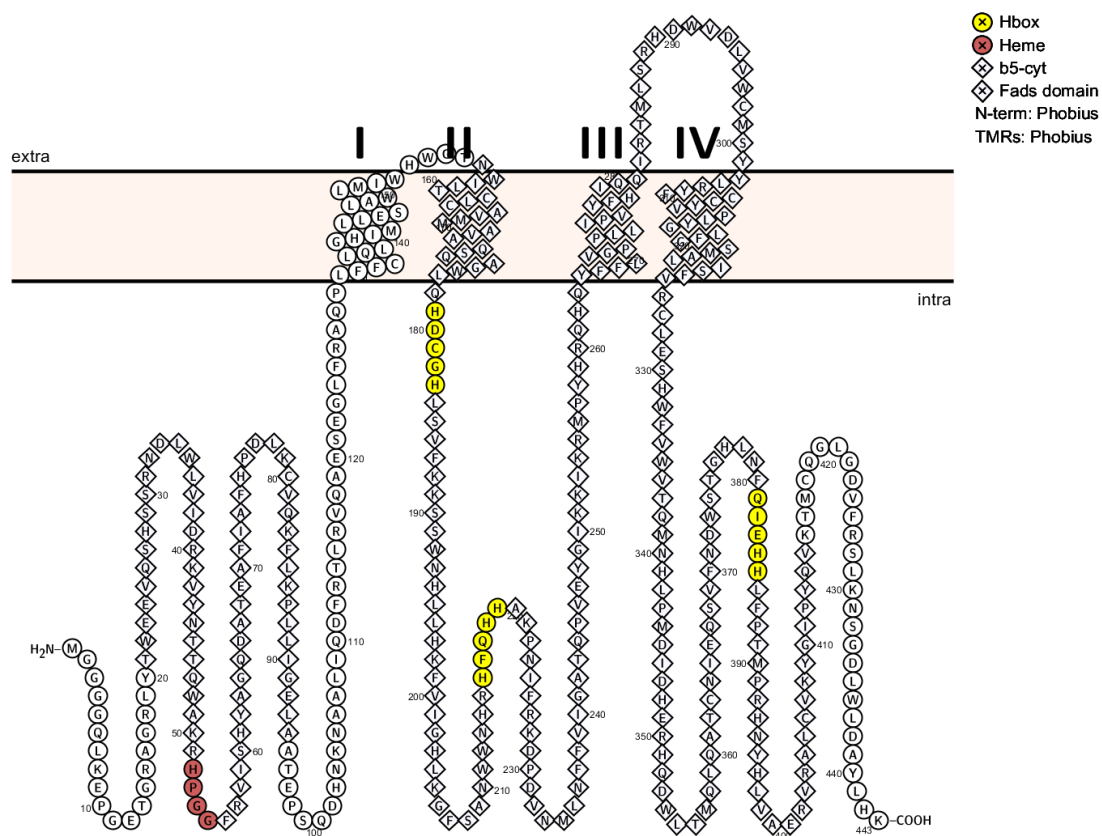


Fig. 16- Representación gráfica en dos dimensiones de la Fads2 identificada en *P. orbignyanus*. *Hbox*: caja de histidina, *Heme*: grupo hemo, *b5-cyt*: citocromo b5.

El análisis filogenético mostró una topología donde se refleja la relación filogenética que existe entre las especies seleccionadas (Fig. 17). La secuencia correspondiente a la Fads2 de *P. orbignyanus* se agrupó en el clado en conjunto con especies filogenéticamente relacionadas como *P. olivaceus* y *P. lethostigma*.

6. RESULTADOS

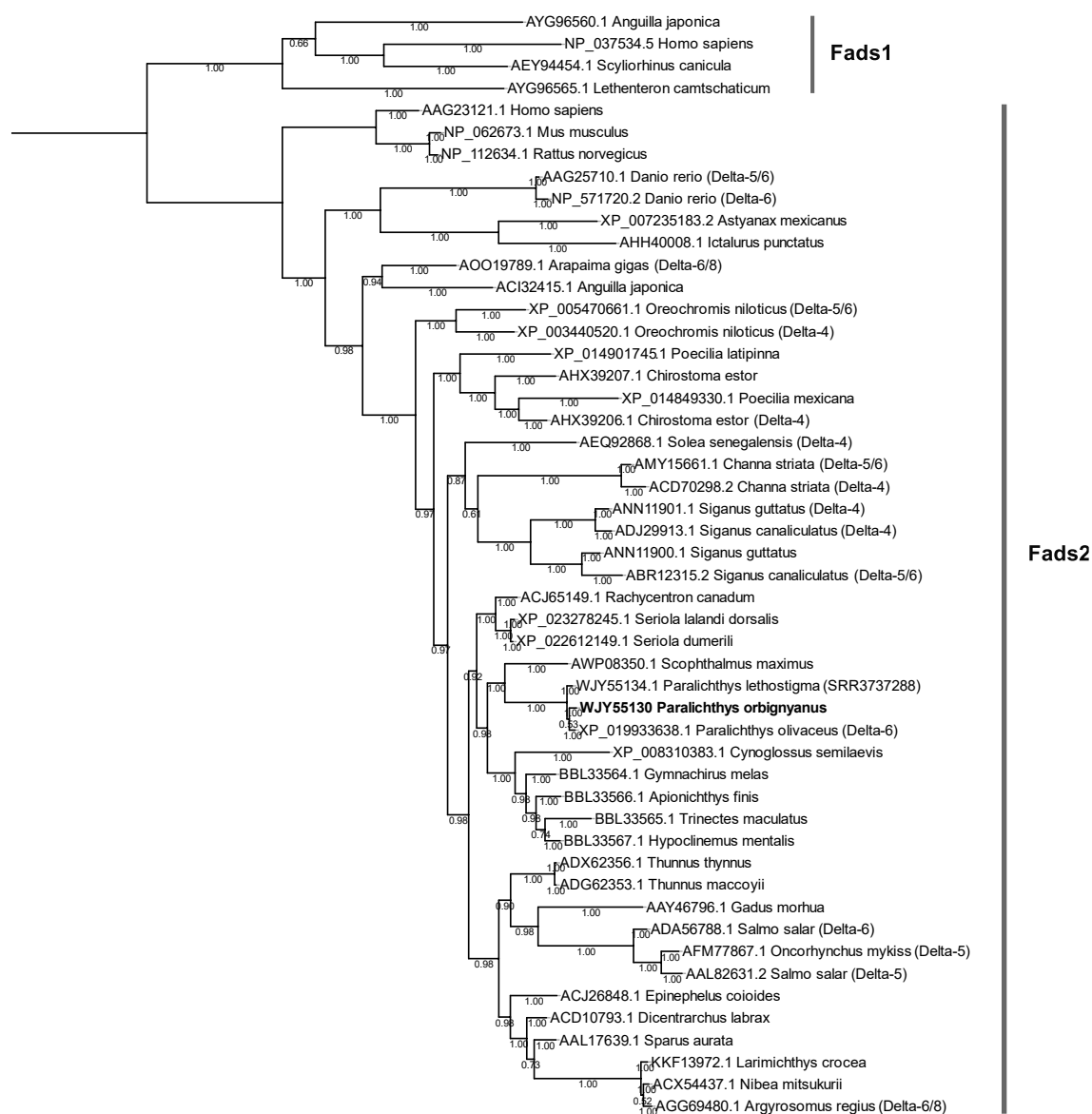


Fig. 17 - Análisis filogenético de Fads2 de *P. orbignyanus* (Fernandez-López *et al.*, 2024).

6.2.2. *elovl* en *P. orbignyanus*

A partir de los transcritos obtenidos durante el ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático de *P. orbignyanus*, se identificaron varias secuencias *elovl*. Entre ellas, una *elovl4* completa y secuencias parciales cortas con diferentes porcentajes de identidad con varias *elovl*. No se identificaron otras *elovl* involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA como *elovl2*.

El transcritro identificado como *elovl4* contenía una secuencia de 1746pb con un CDS que codifica para una proteína de 263 aminoácidos además de las regiones 5'UTR y 3'UTR con la cola poli-A característica en la región 3'UTR. La proteína Elov14

6. RESULTADOS

de *P. orbignyanus* presentó una identidad del 96,20% con la misma secuencia publicada para *P. olivaceus* (XM_020091769), 88,21% con *Hippoglossus hippoglossus* (XP_034437921) y 82,13% con *Lates calcarifer* (XP_018522864). El test de hidrofobicidad predijo 6 dominios transmembrana (Gasteiger *et al.*, 2005). Se identificó una caja de histidina, HXXHH, como es común en las Elov14.

El análisis filogenético mostró que la secuencia identificada como Elov14, se encuentra en el clado correspondiente a Elov14b en proximidad con otras especies del grupo de los pleuronectiformes (Fig. 18).

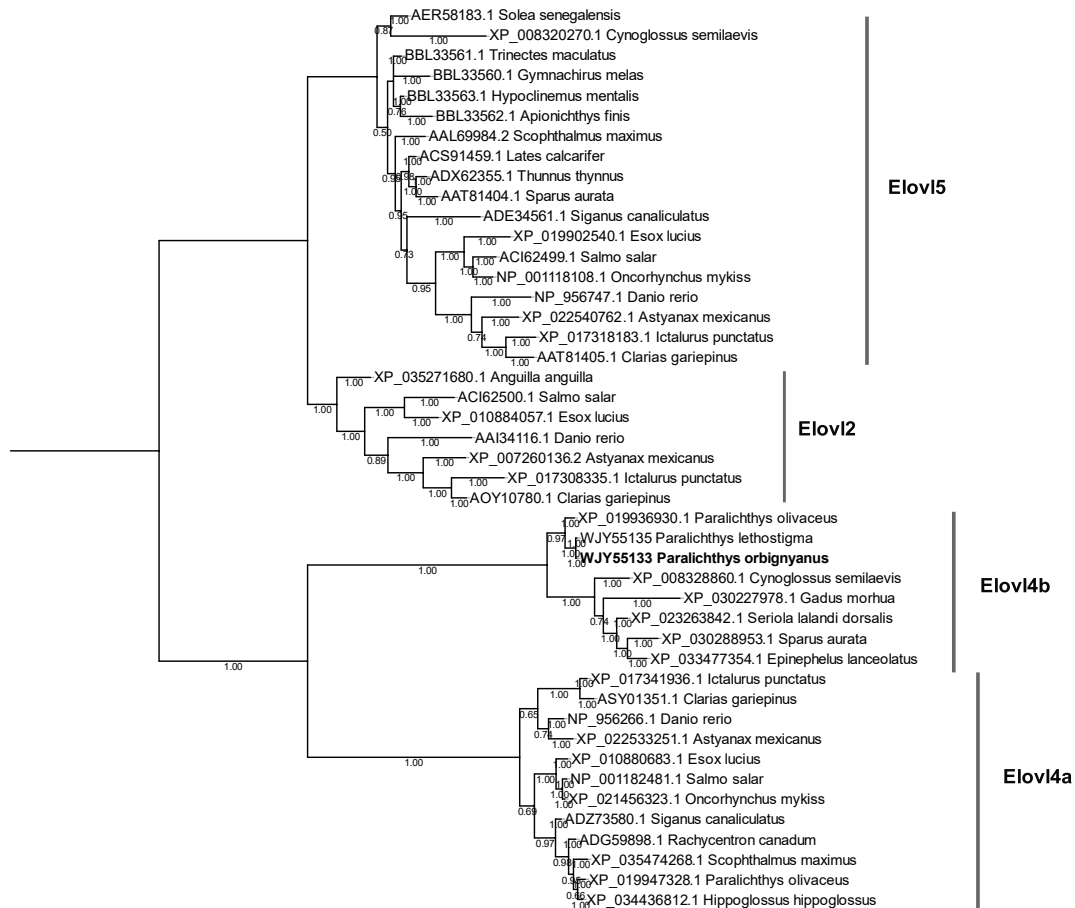


Fig. 18- Análisis filogenético de Elov14 de *P. orbignyanus* (Fernandez-López *et al.*, 2024)

6. RESULTADOS

6.3. Cultivo de *P. orbignyianus* a diferentes salinidades

6.3.1. Dieta

Los perfiles de AG de las harinas y aceites utilizados en la elaboración de la dieta experimental se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7- Contenido de ácidos grasos (% peso seco) de las harinas y aceites utilizados para la elaboración de la ración.

Ácido graso	Harina de krill	Harina de pescado*	Aceite de pescado	Aceite de linaza
14:0	1,12	0,13	4,69	0,10
16:0	2,01	0,51	12,58	8,01
18:0	0,18	0,12	2,79	5,28
18:1n-9	1,42	0,17	17,46	22,89
18:1n-7	0,79	0,08	3,89	0,30
18:2n-6	0,24	0,02	3,35	18,40
18:3n-6	0,01	0,01	0,20	0,01
19:0	1,17	0,24	0,17	0,03
18:3n-4	0,01	0,00	0,23	0,09
18:3n-3	0,06	0,03	1,48	42,19
18:4n-3	0,28	0,03	3,66	0,01
20:0	0,00	0,00	0,01	0,01
20:1n-11	0,11	0,00	3,98	0,16
20:1n-9	0,04	0,03	0,47	0,10
20:1n-7	0,00	0,01	0,08	0,04
20:2n-6	0,01	0,00	0,38	0,01
20:3n-6	0,02	0,01	0,18	0,09
20:4n-6	0,06	0,03	0,88	0,08
20:3n-3	0,01	0,00	0,22	0,06
20:4n-3	0,04	0,01	0,92	0,01
20:5n-3	1,65	0,27	8,91	0,00
22:1n-11	0,00	0,04	2,15	0,01
22:1n-9	0,10	0,01	0,86	0,17
22:1n-7	0,03	0,00	0,17	0,02
23:0	0,05	0,01	0,45	0,02
22:4n-6	0,01	0,00	0,14	0,03
22:5n-6	0,01	0,01	0,37	0,02
22:5n-3	0,05	0,06	1,04	0,13
22:6n-3	0,90	0,32	13,82	0,00
SAFA	3,53	0,81	21,83	14,71
PUFA	3,72	0,88	38,15	60,01
PUFA_n3	3,00	0,73	30,14	38,14
LC_PUFA	2,77	0,72	26,93	0,75
LC_PUFAn3	2,65	0,66	24,91	0,48
ALA/LNA	0,23	1,44	0,44	1,77
DHA/EPA	0,54	1,17	1,55	0,22
n3/n6 PUFA	8,19	8,71	5,43	1,77

* Harina de pescado desengrasada

6. RESULTADOS

El contenido de lípidos de las harinas fue concordante con el tratamiento de desengrasado de la harina de pescado. De esta manera el tenor lipídico de la harina de krill y de la harina de pescado fue de 16,7% y 3,4% respectivamente. La harina de krill se caracterizó por tener una alta relación de EPA/DHA.

La composición de macronutrientes de la dieta elaborada que se usó para alimentar a los peces en cultivo durante este proyecto se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 – Composición proximal de la dieta experimental de *P. orbignyana*.

Composición	(%ps)
Materia seca	89,81
Proteínas	58,8
Lípidos	9,43
Cenizas	14,36
NFE	17,41
NFE: Extracto Libre de Nitrógeno (100-% proteínas-%lípidos-%cenizas)	

El perfil de ácidos grasos de la dieta resultante se muestra en la Tabla 9. El perfil de la dieta resultante se caracterizó por un porcentaje elevado de sustratos de biosíntesis, LA y ALA en una proporción alta de n-3/n-6. Pero pobre en productos de biosíntesis, ARA, EPA y DHA.

6. RESULTADOS

Tabla 9- Composición de ácidos grasos de la ración elaborada. Porcentaje de AG en peso seco de la ración (%ps).

Ácido graso	% ps
14:00	0,12
16:00	0,82
18:1n-9	1,27
18:1n-7	0,19
18:2n-6 (LA)	0,88
18:3n-6	nd
18:3n-3 (ALA)	2,80
18:4n-3	0,03
20:1n-9	0,04
20:2n-6	0,01
20:3n-6	Nd
20:3n-3	0,01
20:4n-6 (AA)	0,03
20:4n-3	0,01
20:5n-3 (EPA)	0,26
22:4n-6	nd
22:5n-3	0,03
22:6n-3 (DHA)	0,30
SAFA	2,09
MUFA	1,76
n-3 PUFA	3,44
n-6 PUFA	0,94
n-3 LC-PUFA	0,61
LA/ALA	3,18
DHA/EPA	1,20
DHA/AA	11,46
n-3/n-6	3,68
nd: no detectado	

6.3.2. Experimentación animal

En todos los tratamientos, la supervivencia al finalizar el experimento fue del 100%. Los peces en cultivo duplicaron su peso, y no se observaron diferencias significativas en los pesos finales (p -valor=0,5967) ni en ninguno de los parámetros de crecimiento ni en el factor de condición ($p>0,05$) para ningún tratamiento de salinidad (Tabla 10).

6. RESULTADOS

Tabla 10- Parámetros de crecimiento de juveniles de lenguado, *Paralichthys orbignyanus*, para los diferentes grupos de tamaño (P: pequeño, M: mediano y L: grande) cultivados a diferentes salinidades.

	2 ppt			10 ppt			18 ppt			26 ppt		
	P	M	G	P	M	G	P	M	G	P	M	G
Pi (g)	24,10 (3,00)	32,80 (2,66)	43,80 (5,05)	24,00 (2,79)	33,30 (2,79)	44,20 (3,65)	23,90 (2,73)	33,30 (2,67)	44,10 (3,84)	24,50 (3,03)	33,40 (2,59)	44,30 (3,59)
Pf (g)	48,34 (10,28)	69,66 (17,78)	94,02 (11,97)	52,19 (8,20)	68,22 (11,19)	79,07 (8,53)	53,63 (8,64)	65,32 (8,21)	82,62 (9,14)	53,93 (6,54)	73,37 (6,23)	89,96 (11,98)
LTf (cm)	15,62 (1,06)	17,58 (1,55)	19,58 (0,74)	16,15 (0,77)	17,75 (0,92)	18,70 (0,55)	16,20 (0,62)	17,33 (0,72)	18,95 (0,72)	16,45 (0,78)	18,07 (0,38)	19,48 (0,86)
FC	1,25 (0,06)	1,25 (0,04)	1,25 (0,04)	1,23 (0,04)	1,21 (0,06)	1,21 (0,05)	1,22 (0,05)	1,25 (0,03)	1,22 (0,04)	1,21 (0,05)	1,24 (0,06)	1,25 (0,04)
WGR (%)	103,85	114,74	113,78	121,72	109,97	74,77	115,68	97,48	84,00	128,52	113,71	102,52
SGR (%)	2,92	3,25	1,55	2,58	2,34	1,64	2,63	2,24	1,73	2,59	2,12	1,70
FCR	1,54	1,57	1,58	1,56	1,67	1,89	1,58	1,79	1,96	1,50	1,57	1,71

Valores mostrados como promedio (desviación estándar) Pi: Peso inicial, Pf: Peso final, LTf: Longitud total final, FC: Factor de condición = $Pf (g)/LTf (cm)^3 \times 100$, WGR (*Weight gain rate*) = $(Pf - Pi)/(Pi \times 100)$, SGR (*Specific growth rate*) = $[\ln(Pf) - \ln(Pi)]/n^\circ \text{ días}$, FCR (*Feed conversion ratio*) = ingesta de alimento/ganancia de peso.

6. RESULTADOS

El crecimiento de los peces en los diferentes tratamientos de salinidad fue homogéneo, presentando un aumento de la dispersión en los pesos individuales hacia el final del experimento (Fig. 19).

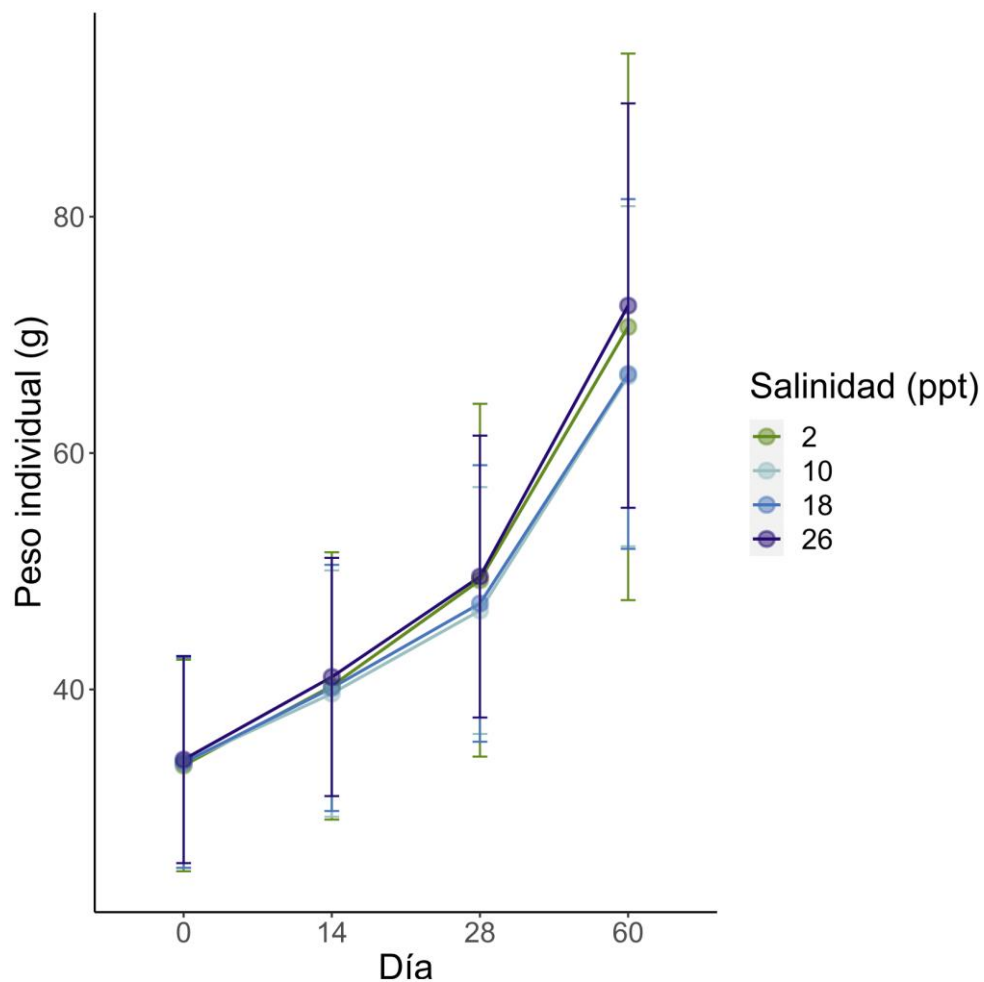


Fig. 19 – Pesos promedios y desviación estándar de los peces en cultivo a lo largo de las cuatro biometrías realizadas durante el ensayo de salinidad.

La tasa de conversión alimenticia fue de 1,5 a 1,96. La tasa de alimentación promedio para todo el periodo fue del 2,11% (Tabla 11).

6. RESULTADOS

Tabla 11 - Tasa de alimentación diaria (TAD) calculado para todo el periodo de experimentación animal (60 días). Es el valor promedio para cada unidad experimental. Se muestran las 4 salinidades (S2-S26) y los diferentes tanques (P, M, G) de cada salinidad.

Salinidad	Tamaño	%
S2	P	2,10
	M	2,06
	G	2,09
S10	P	2,10
	M	2,12
	G	2,13
S18	P	2,09
	M	2,14
	G	2,16
S26	P	2,08
	M	2,08
	G	2,12

6.4. Cuantificación de la expresión génica

6.4.1. Diseño metodológico

Como resultado de la puesta a punto de los métodos de cuantificación de la expresión génica por qPCR de *fads2*, *elovl4* y β -actina de *P. orbignyanus*, se utilizaron los cebadores y sondas diseñados para la cuantificación por qPCR de la Tabla 12.

Tabla 12 – Secuencias utilizadas durante el proceso de cuantificación relativa de *fads2* y *elovl4*.

Cebadores y sondas	Secuencias
FADS.PROBE	5'- FAM T+T T+C+C A+CATTTCAGCAAATTC IBFQ -3'
ELOVL4.PROBE	5'- FAM CTCAGTGACACGCTCTTCTTCATCCT IBFQ -3'
BA.PROBE	5'- FAM TCCTCGGTATGGAGTCCTGTGGAAT IBFQ -3'
FADS.RV	5'- CGTAGATAGTACGACATGCACC -3'
FADS.FW	5'- TTCTTTCTTGTGGGACCTCC -3'
ELOVL4.FW	5'- CAGAGTCTGCTGGTGGTTC -3'
ELOVL4.RV	5'- ACCAGTTGAAGATCATGGTGC -3'
BA.FW	5'- AATGAGAGGTTCCGTTGTCC -3'
BA.RV	5'- ACAGTGTTGGCGTACAGATC -3'

A+, T+, C+, G+: Affinity Plus Modified Bases (IDT)

6. RESULTADOS

En el caso de la sonda diseñada para la detección de *fads2* la secuencia incluyó la región de aminoácidos que determinan la actividad desaturasa de *fads2* tal como describe Lim (2014) (Fig. 20). Para poder adecuar la temperatura de hibridación de la sonda al ADN molde en el diseño de *fads2*, se agregaron algunos nucleótidos modificados.

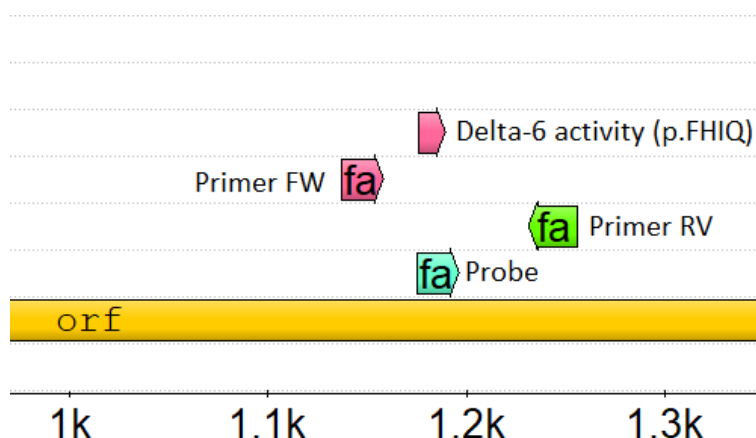


Fig. 20 - Anotación de la secuencia *fads2* utilizada para el diseño en qPCR de sondas (Probe) y cebadores (Primer FW y Primer RV). Se muestra la región que contiene el diseño de amplificación y detección del gen. Adicionalmente, se muestra la localización de los cuatro aminoácidos que determinan la actividad delta-6 desaturasa (FHIQ). La representación se realizó con Artemis (Carver *et al.*, 2012).

El diseño de cuantificación de la expresión génica realizado en base a la previa caracterización de los genes *fads2*, *elovl4* y β -actina evidenció una amplificación lineal a lo largo de cinco diluciones (Fig. 21). Además, las curvas de eficiencia fueron paralelas entre sí con una eficiencia de amplificación prácticamente idénticas: $E=0,95$ y un $R^2=0.9998$ para *fads2*, $E=0,95$ y un $R^2=0.9999$ para *elovl4*, y $E=0.95$ con un $R^2=0.9996$ para β -actina. Para este trabajo se eligieron aquellos diseños en los que teniendo una eficiencia $\geq 95\%$, los valores de la eficiencia de amplificación fueron más similares entre sí.

6. RESULTADOS

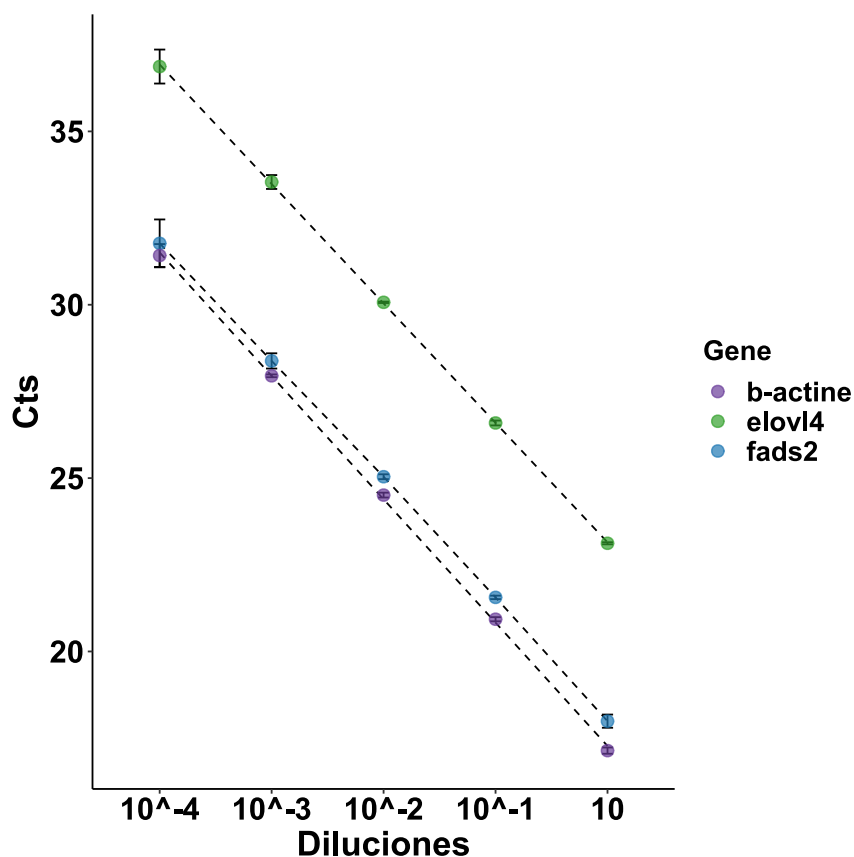


Fig. 21- Curvas de eficiencia de *fads2*, *elovl4* y β -actina. Se muestran las curvas de eficiencia con un rango dinámico de cinco puntos. Dado que la cuantificación de la expresión génica es relativa, las curvas de eficiencia se utilizan para validar la metodología.

6.4.2. Extracción de ARN total

El ARN total extraído de las muestras de tejido hepático procedentes de los juveniles de lenguado durante la experimentación animal, demostró que el procedimiento de extracción utilizado es robusto, obteniéndose ARN de muy alta calidad (Tabla 13).

6. RESULTADOS

Tabla 13 - Calidad del ARN extraído cuantificado por espectrofotometría con NanoDrop. En el tratamiento salinidad, se indica la calidad del ARN de las muestras secuenciadas por RNASeq

Salinidad	ID muestra	Conc. ARN (ng/μl)	260/280	260/230
NGS	PO10H	4041,9	2,05	2,05
2	PO11H	877,5	2,1	2,15
2	PO12H	895,9	2,12	2,12
2	PO13H	795,4	2,09	1,83
2	PO14H	1041,3	2,1	2,09
2	PO15H	1430,8	2,11	2,16
2	PO16H	954,1	2,09	1,96
2	PO17H	1258,9	2,11	2,06
2	PO18H	898,3	2,11	2,05
2	PO19H	598,6	2,13	2,09
10	PO20H	541,3	2,11	1,93
10	PO21H	994,9	2,12	2,05
10	PO22H	1038,8	2,07	1,83
10	PO23H	790,7	2,09	1,88
10	PO24H	1300,1	2,11	2,18
10	PO25H	529,0	2,17	2,05
10/NGS	PO26H	1539,3	2,08	2,09
10	PO27H	826,1	2,12	2,15
10	PO28H	840,0	2,11	2,00
18	PO29H	849,6	2,12	2,11
18	PO30H	1467,7	2,12	2,15
18	PO31H	868,7	2,11	2,07
18	PO32H	837,3	2,14	2,16
18	PO33H	1543,6	2,12	2,10
18	PO34H	834,2	2,07	1,80
18	PO35H	1155,4	2,13	2,19
18	PO36H	1589,0	2,11	2,21
18	PO37H	797,0	2,09	1,99
26	PO38H	1005,7	2,12	2,10
26	PO39H	1555,7	2,11	2,03
26	PO40H	971,6	2,03	1,85
26	PO41H	688,2	2,17	2,28
26	PO42H	623,3	2,19	2,24
26	PO43H	1428,1	2,11	2,13
26	PO44H	531,9	2,14	2,14
26	PO45H	694,6	2,10	1,98
26	PO46H	1522,2	2,07	1,97

Adicionalmente, el ARN extraído de cada una de las muestras se visualizó mediante electroforesis en agarosa mostrando las bandas ribosomales 28S y 18S, siendo la primera más intensa que la segunda (Fig. 22). En ningún caso, se observó degradación del ARN aparente por debajo de esas bandas.

6. RESULTADOS

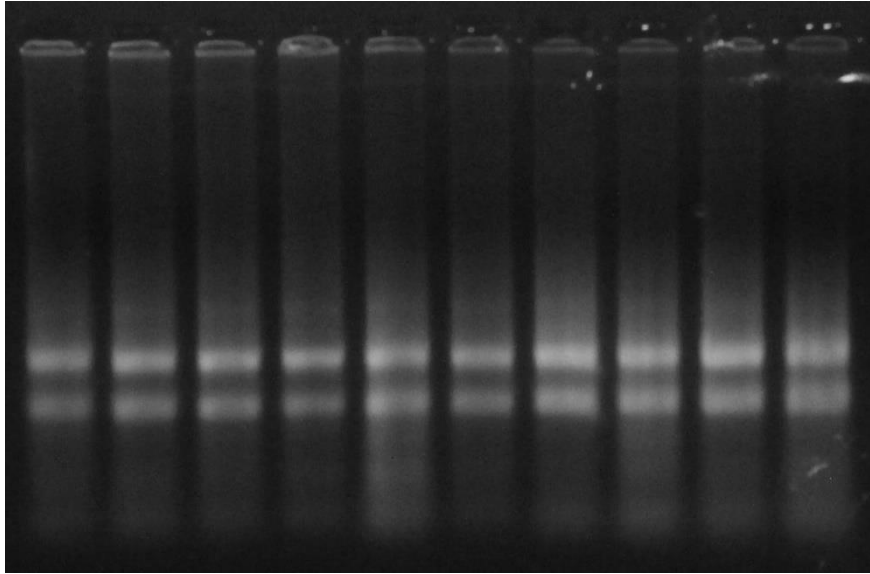


Fig. 22 – Visualización de muestras de ARN total extraído de tejido hepático de *P. orbignyanus* a partir de los ejemplares de la experimentación animal.

6.4.3. Cuantificación de la expresión génica

Los niveles de expresión de *fads2* y *elovl4* mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando juveniles de lenguado se cultivaron a diferentes salinidades (Fig. 23). Los mayores niveles de expresión se observaron en ambos casos en la salinidad 2ppt, aunque el efecto no fue estadísticamente significativo para la *elovl4*. Si bien se observó una tendencia de reducción de los niveles de expresión génica hacia la salinidad más alta en *elovl4*, 26ppt, no se pudo observar un efecto evidente entre los tratamientos de salinidad 10ppt, 18ppt y 26ppt.

6. RESULTADOS

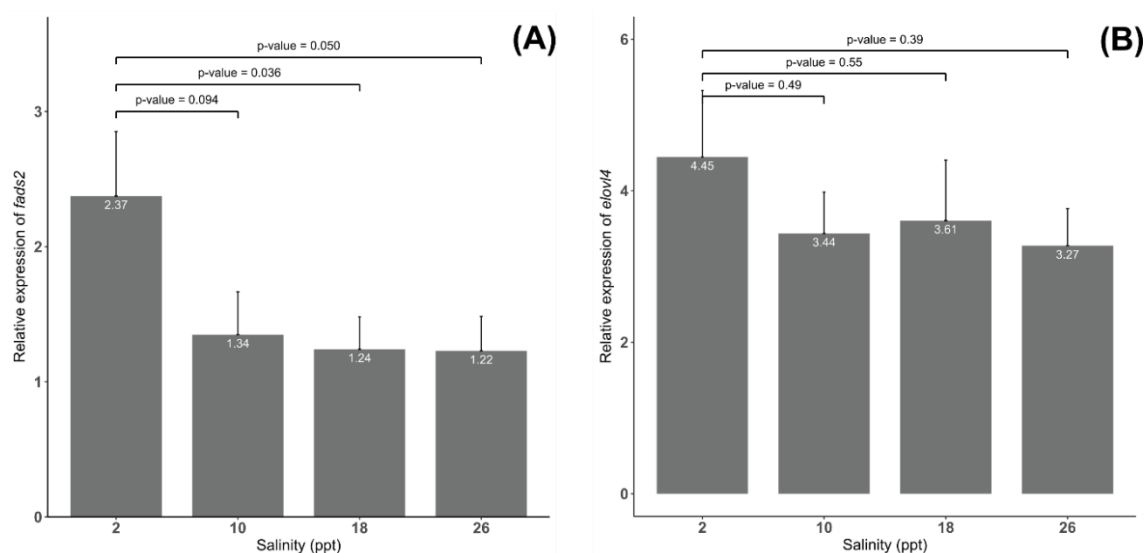


Fig. 23 - Expresión génica relativa de *fads2* y *elovl4* (Fold change). Se muestran los promedios obtenidos para las diferentes salinidades relativizados al menor valor del grupo con la menor expresión génica de *fads2* y *elovl4* (Fernandez-López *et al.*, 2024).

6.5. Lípidos y ácidos grasos en *P. orbignyanus* cultivados a diferentes salinidades

6.5.1. Contenido de lípidos

Los peces en cultivo, al finalizar el experimento, presentaron cambios en el contenido de lípidos totales del músculo (Tabla 14). A excepción del grupo en el tratamiento de salinidad 10ppt, donde el porcentaje de lípidos totales aumentó con respecto al inicio del experimento (6,49%), el resto de los tratamientos de salinidad experimentaron un descenso en el tenor lipídico (p-valor = 0,026) (Tabla 14).

Con respecto a las fracciones de LP y LN, el lenguado acumuló los lípidos preferentemente en la fracción de lípidos neutros (64,5-78,45%), presentando una alta correlación entre el tenor lipídico y el porcentaje de LN ($R^2= 0,76$ y p-valor= $1,52 \times 10^{-7}$). Los cambios observados en la proporción de LP y LN se asociaron con las diferentes salinidades de cultivo (p-valor=0,042).

Concretamente, el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de LN es el cultivado a la salinidad 10 ppt, reduciéndose hacia las salinidades extremas (2ppt y 26ppt). La concentración de LN en la muestra seca (% LN ps) varió de 2,04 a 5,85% y la concentración de lípidos polares en la muestra seca (% LP ps) fue de 1,02 a 1,40.

6. RESULTADOS

Tabla 14 – Composición del músculo de *P. orbignyanus* al final del experimento. Lípidos totales, humedad y lípidos polares (LP) y neutros (LN). Se muestra el promedio del porcentaje para cada tratamiento de salinidad junto con la desviación estándar entre paréntesis. Los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0,05).

Salinidad	LT(%ps)	Humedad (%)	LP (% deLT)	LN (% de LT)
S2	5,05 (3,17) ^{ab}	75,56 (2,70)	29,85 (11,03) ^{ab}	70,15 (11,03) ^{ab}
S10	6,95 (3,06) ^a	74,51 (2,09)	21,55 (7,12) ^a	78,45 (7,12) ^a
S18	4,13 (2,43) ^b	75,76 (1,64)	30,57 (11,76) ^{ab}	69,43 (11,76) ^{ab}
S26	3,29 (1,34) ^b	75,58 (1,78)	35,50 (5,31) ^b	64,50 (5,31) ^b

6.5.2. Ácidos grasos en lípidos totales

6.5.2.1. Perfil de ácidos grasos del músculo (% del total de AG)

Al analizar el perfil de AG de los lípidos totales se observó que los AG más abundantes fueron el ácido palmítico (16:0), el ácido oleico (18:1n-9), el ácido α -linolénico (18:3n-3), el EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3) (Tabla 15).

El perfil de AG de los peces al final del experimento presentó marcadas diferencias con respecto al inicio reflejando el perfil de la dieta. Esto se caracterizó por un aumento en los sustratos de biosíntesis, 18:2n-6 y 18:3n-3, mientras que los LC-PUFA experimentaron una reducción, especialmente en las proporciones del AA, EPA y DHA.

Sin embargo, las diferencias observadas en los perfiles para las distintas salinidades se explican por cambios en pocos AG. A excepción del 18:4n-3 y el 20:4n-3, los cuales presentaron una mayor proporción en la salinidad 10ppt, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de área ningún ácido graso involucrado en la biosíntesis de LC-PUFA C18-C22. Sin embargo, es destacable la tendencia del DHA y el AA para acumularse en las salinidades 18ppt y 26ppt y la alta desviación de estos AG particularmente del DHA en todas las salinidades.

6. RESULTADOS

Tabla 15- Perfil de ácidos grasos (% Área) de los LT del músculo de juveniles de *P. orbignyanus* cultivados a diferentes salinidades. (nd=no detectado)

Ácido graso	Inicial	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	4,39 (0,51)	2,05 (0,23)	2,64 (0,54)	2,20 (0,60)	2,18 (0,58)
15:1n-5	0,18 (0,04)	0,35 (0,35)	0,12 (0,19)	0,36 (0,46)	0,17 (0,43)
16:0	18,62 (1,10)	15,80 (2,03)	15,19 (1,39)	16,33 (2,01)	16,21 (1,93)
16:1n-9	0,73 (0,03)	0,28 (0,18) ^a	0,20 (0,17) ^a	0,36 (0,18) ^a	0,59 (0,14) ^b
16:1n-7	7,39 (0,31)	2,68 (0,56) ^b	4,16 (0,52) ^a	3,10 (1,00) ^b	3,02 (0,90) ^b
16:2n-3	0,11 (0,03)	0,05 (0,02) ^b	0,21 (0,17) ^a	0,07 (0,03) ^{ab}	0,08 (0,07) ^{ab}
16:2n-4	1,23 (0,07)	0,48 (0,13)	0,63 (0,20)	0,51 (0,16)	0,50 (0,11)
17:1n-7	0,73 (0,12)	0,21 (0,05)	0,27 (0,13)	0,17 (0,12)	0,25 (0,08)
16:3n-4	0,17 (0,10)	0,17 (0,13)	0,21 (0,11)	0,29 (0,22)	0,31 (0,20)
18:0	4,23 (0,16)	5,48 (0,93)	4,55 (0,62)	5,59 (1,33)	5,30 (1,41)
18:1n-9	13,01 (0,88)	15,57 (1,64) ^{ab}	16,39 (1,63) ^a	14,80 (1,24) ^{ab}	13,81 (1,97) ^b
18:1n-7	4,83 (0,27)	2,23 (0,15)	2,42 (0,20)	2,33 (0,23)	3,13 (1,36)
18:2n-6	2,22 (0,57)	8,94 (0,84)	7,87 (0,99)	7,94 (0,76)	8,02 (0,86)
18:3n-6	nd	0,21 (0,13)	0,12 (0,03)	0,16 (0,11)	0,22 (0,11)
18:3n-3	2,03 (1,26)	21,50 (4,40)	19,85 (4,11)	18,12 (4,48)	19,47 (4,70)
18:4n-3	1,29 (0,19)	0,59 (0,11) ^b	0,82 (0,14) ^a	0,65 (0,23) ^{ab}	0,61 (0,20) ^{ab}
20:1n-11	0,21 (0,02)	0,11 (0,03) ^b	0,17 (0,03) ^a	0,23 (0,22) ^{ab}	0,16 (0,10) ^b
20:1n-9	1,24 (0,16)	0,52 (0,09) ^b	0,81 (0,10) ^a	0,51 (0,25) ^b	0,62 (0,20) ^{ab}
20:1n-7	0,35 (0,18)	0,11 (0,03)	0,14 (0,02)	0,15 (0,09)	0,15 (0,10)
20:2n-6	0,24 (0,17)	0,24 (0,08)	0,26 (0,04)	0,26 (0,03)	0,26 (0,06)
20:3n-6	0,23 (0,06)	0,12 (0,06)	0,12 (0,04)	0,11 (0,08)	0,14 (0,09)
20:4n-6	1,86 (0,24)	1,07 (0,30)	1,00 (0,23)	1,28 (0,36)	1,14 (0,33)
20:3n-3	0,26 (0,06)	1,37 (0,22)	1,20 (0,16)	1,29 (0,21)	1,48 (0,39)
20:4n-3	0,63 (0,05)	0,32 (0,04) ^b	0,41 (0,05) ^a	0,35 (0,16) ^{ab}	0,31 (0,06) ^b
20:5n-3	7,58 (0,50)	3,69 (0,59)	4,43 (0,83)	4,21 (0,73)	4,05 (0,46)
22:1n-11	0,70 (0,01)	0,21 (0,08)	0,38 (0,10)	0,26 (0,11)	0,19 (0,10)
22:4n-6	0,27 (0,11)	0,20 (0,11)	0,19 (0,06)	0,21 (0,12)	0,21 (0,13)
22:5n-6	0,79 (0,14)	0,39 (0,18)	0,41 (0,09)	0,48 (0,14)	0,47 (0,15)
22:5n-3	3,65 (0,46)	1,90 (0,35)	2,27 (0,41)	2,28 (0,32)	2,12 (0,30)
24:1n-9	0,42 (0,03)	0,32 (0,09)	0,27 (0,12)	0,34 (0,09)	0,25 (0,15)
22:6n-3	16,33 (1,87)	10,46 (3,41)	10,06 (2,33)	12,58 (3,62)	12,00 (3,94)
SAFA	28,77 (0,90)	24,38 (2,95)	22,78 (2,48)	23,87 (2,34)	21,54 (1,93)
MUFA	31,51 (1,21)	23,21 (2,43) ^a	26,04 (1,56) ^{ab}	24,13 (2,29) ^{ab}	27,12 (2,62) ^b
PUFA	39,90 (1,99)	52,34 (2,54)	50,75 (2,36)	51,47 (1,92)	51,41 (2,42)
n-3 LC-PUFA	28,46 (2,48)	17,75 (4,21)	18,37 (3,49)	20,72 (3,83)	19,95 (4,54)
ALA/LNA	0,85 (0,39)	2,38 (0,31)	2,55 (0,26)	2,54 (0,27)	2,50 (0,43)
DHA/EPA	2,15 (0,17)	2,96 (0,54)	2,49 (0,56)	2,91 (0,77)	2,99 (0,80)
EPA/AA	4,10 (0,37)	3,46 (0,66)	4,33 (0,94)	4,07 (1,16)	3,78 (0,70)
DHA/ALA	12,91 (12,23)	0,61 (0,28)	0,52 (0,23)	0,57 (0,23)	0,63 (0,25)
n-3/n-6 PUFA	5,65 (0,77)	3,70 (0,19)	3,87 (0,27)	3,92 (0,29)	3,88 (0,32)

6. RESULTADOS

La proporción de SAFA se mantuvo constante, sin mostrar diferencias significativas en ningún tratamiento de salinidad (p -valor $> 0,05$). De forma contraria, la salinidad de cultivo se vio reflejada en la proporción de MUFA totales en los distintos tratamientos, presentando los valores más bajos en la salinidad 2ppt y los valores más altos en 26ppt, con valores intermedios en 10ppt y 18ppt. De forma individual, los MUFA, 16:1n-9, 18:1n-9, 16:1n-7, 20:1n-11 y 20:1n-9, se vieron afectados por la salinidad, aunque mostrando diferentes comportamientos a lo largo de las diferentes salinidades. En la fracción de AG correspondiente a los PUFA totales, aquellos de la serie n-3 se mantuvieron constantes en los diferentes tratamientos de salinidad a diferencia de los PUFA de la serie n-6 que presentaron una mayor proporción en la salinidad 2ppt, debido fundamentalmente a una mayor proporción del 18:2n-6 a esa salinidad.

6.5.2.2. Contenido de ácidos grasos del músculo (mg AG / g)

Se observó un efecto de la salinidad sobre el contenido de AG del músculo expresado en mg de AG / g de tejido en peso seco (Tabla 16). La mayoría de los AG presentó una mayor concentración en la salinidad 10ppt coincidiendo con un mayor tenor lipídico de las muestras en ese tratamiento. La concentración de estos AG se redujo hacia las salinidades 2ppt y 26ppt.

En comparación con el perfil de AG al inicio del experimento, en todos los tratamientos, se observó un aumento en el contenido de 18:2n-6 y 18:3n-3, reflejando el aporte dietario de estos ácidos grasos. A su vez, en consonancia con los perfiles de AG en porcentaje de área las concentraciones de AA, EPA y DHA, se redujeron al finalizar el experimento.

6. RESULTADOS

Tabla 16- Concentración de ácidos grasos (mg AG/g muestra en peso seco) de los LT del músculo de juveniles de *P. orbignyanus* cultivados a diferentes salinidades. (nd=no detectado)

AG	Inicial	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	2,59 (0,30)	0,84 (0,54) ^b	1,47 (0,56) ^a	0,95 (0,75) ^b	0,66 (0,40) ^b
14:1n-5	0,11 (0,02)	0,04 (0,03)	0,06 (0,03)	0,04 (0,04)	0,03 (0,03)
16:0	10,99 (0,54)	5,96 (2,29) ^b	9,14 (3,27) ^a	6,26 (3,45) ^b	4,56 (1,95) ^b
16:1n-9	0,43 (0,02)	0,16 (0,13)	0,14 (0,14)	0,14 (0,11)	0,15 (0,11)
16:1n-7	4,36 (0,18)	1,15 (0,83) ^b	2,34 (1,08) ^a	1,40 (1,14) ^{ab}	0,94 (0,61) ^b
16:2n-3	0,07 (0,02)	0,03 (0,02) ^b	0,10 (0,08) ^a	0,05 (0,09) ^b	0,03 (0,03) ^b
16:2n-4	0,72 (0,05)	0,21 (0,11)	0,37 (0,18)	0,20 (0,09)	0,15 (0,07)
17:1n-7	0,43 (0,07)	0,10 (0,08) ^b	0,16 (0,10) ^a	0,07 (0,06) ^{ab}	0,08 (0,05) ^b
16:3n-4	0,10 (0,06)	0,08 (0,05)	0,13 (0,05)	0,09 (0,07)	0,07 (0,03)
18:0	2,50 (0,13)	1,95 (0,57) ^{ab}	2,83 (1,11) ^a	2,08 (1,04) ^{ab}	1,26 (0,54) ^b
18:1n-9	7,68 (0,40)	5,74 (3,66)	9,18 (6,16)	6,03 (3,93)	3,91 (1,75)
18:1n-7	2,85 (0,18)	1,11 (0,87)	1,47 (1,08)	1,13 (0,70)	1,04 (0,82)
18:2n-6	1,31 (0,33)	3,50 (1,93) ^{ab}	5,09 (2,85) ^a	3,28 (2,10) ^{ab}	2,28 (1,00) ^b
18:2n-4	0,06 (NA)	0,07 (0,07)	0,09 (0,15)	0,09 (0,10)	0,06 (0,07)
18:3n-6	nd	0,08 (0,10)	0,07 (0,04)	0,06 (0,04)	0,06 (0,06)
18:3n-3	1,19 (0,74)	8,75 (5,82) ^b	13,09 (8,57) ^a	7,99 (5,95) ^{ab}	5,73 (3,27) ^b
18:4n-3	0,77 (0,12)	0,26 (0,19) ^b	0,46 (0,21) ^a	0,30 (0,26) ^{ab}	0,19 (0,12) ^{ab}
20:1n-11	0,12 (0,01)	0,04 (0,03)	0,10 (0,05)	0,09 (0,15)	0,03 (0,02)
20:1n-9	0,73 (0,08)	0,21 (0,15) ^b	0,46 (0,22) ^a	0,21 (0,17) ^b	0,17 (0,09) ^b
20:1n-7	0,21 (0,10)	0,06 (0,05) ^{ab}	0,09 (0,05) ^a	0,06 (0,03) ^{ab}	0,04 (0,02) ^b
20:2n-6	0,14 (0,10)	0,09 (0,04) ^{ab}	0,15 (0,09) ^a	0,10 (0,07) ^{ab}	0,08 (0,05) ^b
20:3n-6	0,14 (0,03)	0,05 (0,03)	0,11 (0,09)	0,05 (0,04)	0,05 (0,05)
20:4n-6	1,10 (0,16)	0,39 (0,10) ^b	0,59 (0,17) ^a	0,47 (0,28) ^{ab}	0,31 (0,12) ^b
20:3n-3	0,15 (0,03)	0,55 (0,32) ^{ab}	0,74 (0,35) ^a	0,54 (0,38) ^{ab}	0,39 (0,15) ^b
20:4n-3	0,37 (0,03)	0,13 (0,07) ^b	0,24 (0,10) ^a	0,14 (0,11) ^b	0,09 (0,04) ^b
20:5n-3	4,48 (0,36)	1,42 (0,59) ^b	2,55 (0,93) ^a	1,75 (1,29) ^b	1,15 (0,52) ^b
22:1n-11	0,41 (0,00)	0,10 (0,09) ^b	0,23 (0,12) ^a	0,11 (0,09) ^b	0,06 (0,04) ^b
22:4n-6	0,16 (0,06)	0,06 (0,03) ^b	0,11 (0,05) ^a	0,05 (0,04) ^b	0,07 (0,07) ^b
22:5n-6	0,47 (0,09)	0,16 (0,05) ^b	0,24 (0,07) ^a	0,18 (0,10) ^{ab}	0,13 (0,05) ^b
22:5n-3	2,16 (0,30)	0,74 (0,32) ^{ab}	1,37 (0,55) ^a	0,92 (0,63) ^{ab}	0,61 (0,27) ^b
24:1n-9	0,25 (0,02)	0,12 (0,05) ^b	0,19 (0,11) ^a	0,13 (0,07) ^{ab}	0,08 (0,05) ^b
22:6n-3	9,65 (1,23)	3,82 (0,95) ^b	6,05 (1,81) ^a	4,62 (2,46) ^{ab}	3,32 (1,42) ^b
SAFA	16,98 (0,28)	9,14 (3,35) ^b	14,05 (4,98) ^a	9,83 (5,53) ^{ab}	6,36 (2,60) ^b
MUFA	18,60 (0,51)	9,65 (5,62) ^{ab}	15,98 (7,68) ^a	9,90 (6,51) ^{ab}	6,85 (3,63) ^b
PUFA	23,57 (1,52)	20,56 (10,16)	31,88 (15,70)	21,18 (13,38)	15,52 (7,06)
LC_PUFAn3	16,82 (1,72)	6,66 (2,09) ^b	10,94 (3,63) ^a	7,96 (4,76) ^{ab}	5,55 (2,27) ^b
ALA/LNA	0,85 (0,39)	2,37 (0,30)	2,46 (0,25)	2,30 (0,35)	2,43 (0,44)
DHA/EPA	2,15 (0,17)	2,88 (0,57)	2,48 (0,49)	3,00 (0,83)	2,93 (0,81)
EPA/AA	4,10 (0,37)	3,56 (0,93)	4,25 (0,77)	3,62 (1,11)	3,77 (0,90)
DHA/ALA	12,91 (12,23)	0,57 (0,25)	0,57 (0,23)	0,73 (0,35)	0,67 (0,33)
n3/n6 PUFA	5,65 (0,77)	3,62 (0,26)	3,89 (0,26)	3,80 (0,21)	3,84 (0,29)

6. RESULTADOS

6.5.3. Ácidos grasos en lípidos polares y neutros

6.5.3.1. Ácidos grasos en lípidos polares

El perfil general de AG de la fracción de lípidos polares mostró poco efecto de la salinidad en las diferentes condiciones experimentales ensayadas (Tabla 17). Los ácidos grasos 22:6n-3 y el 16:0 representaron 38,1 - 39,92% del total de los ácidos grasos. Los siguientes ácidos grasos mayoritarios fueron 18:0, ALA, LA, EPA y AA. Los ácidos grasos 18:2n-6 y 18:3n-3 presentaron una mayor proporción en la salinidad más baja (2ppt).

La proporción de EPA fue más alta en 2ppt, 10ppt y 18ppt, reduciéndose significativamente en 26ppt. Por otro lado, el AA y el DHA compartieron un mismo patrón al presentar mayores proporciones en las salinidades intermedias, 10ppt y 18ppt (p-valor < 0,05). Como resultado, la proporción de los n-3 LC-PUFA, fue mayor en las salinidades 10ppt y 18ppt, aunque sin mostrar diferencias significativas.

El contenido en SAFA fue muy similar en todos los tratamientos de salinidad, mientras que los MUFA presentan un aumento en la proporción en la salinidad más alta (26ppt).

Entre los ácidos grasos monoinsaturados, el 18:1n-9 fue el más abundante y no presentó diferencias estadísticamente significativas a las distintas las salinidades.

6. RESULTADOS

Tabla 17- Perfil de ácidos grasos de los LP (% del total de ácidos grasos) del músculo de juveniles de *P. orbignyianus* cultivados a diferentes salinidades. Promedio y desviación estándar entre paréntesis.
nd = no detectado

AG	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	1,23 (0,15)	1,06 (0,43)	1,18 (0,22)	1,97 (2,05)
15:1n-5	2,69 (0,28) ^{ab}	3,24 (0,50) ^{ab}	2,65 (0,94) ^b	3,47 (0,42) ^a
16:0	21,19 (1,31)	19,80 (0,92)	19,29 (3,18)	19,63 (1,04)
16:1n-9	0,52 (0,05)	0,49 (0,05)	0,53 (0,05)	0,58 (0,12)
16:1n-7	1,21 (0,08)	1,15 (0,20)	1,16 (0,18)	1,16 (0,24)
16:2n-3	0,18 (0,17)	0,25 (0,27)	0,16 (0,18)	0,20 (0,23)
16:2n-4	0,58 (0,13)	0,64 (0,21)	0,62 (0,09)	0,58 (0,10)
17:1n-7	0,17 (0,07)	0,18 (0,04)	0,18 (0,06)	0,24 (0,09)
16:3n-4	0,05 (0,05)	0,04 (0,01)	0,03 (0,01)	0,05 (0,03)
18:0	9,39 (0,64) ^b	10,93 (1,39) ^a	10,56 (0,71) ^{ab}	10,69 (0,69) ^a
18:1n-9	13,34 (0,61)	13,01 (0,93)	13,11 (0,56)	13,47 (0,65)
18:1n-7	1,85 (0,10)	1,81 (0,13)	1,87 (0,15)	1,85 (0,13)
18:2n-6	7,09 (0,28) ^b	6,02 (0,83) ^a	6,27 (0,58) ^a	5,73 (0,54) ^a
18:3n-6	0,04 (0,02)	0,03 (0,02)	0,04 (0,02)	0,04 (0,03)
18:3n-3	8,38 (1,00) ^b	6,98 (1,04) ^a	7,32 (1,06) ^{ab}	7,08 (1,24) ^{ab}
18:4n-3	0,29 (0,09) ^a	0,33 (0,06) ^{ab}	0,35 (0,04) ^{ab}	0,39 (0,08) ^b
20:0	0,07 (0,11)	0,02 (0,02)	0,03 (0,00)	0,01 (0,01)
20:1n-11	0,07 (0,12)	0,05 (0,04)	0,05 (0,02)	0,03 (0,02)
20:1n-9	0,27 (0,11)	0,32 (0,06)	0,32 (0,05)	0,46 (0,33)
20:1n-7	0,04 (0,03)	0,05 (0,03)	0,05 (0,02)	0,05 (0,03)
20:2n-6	0,41 (0,15)	0,43 (0,25)	0,36 (0,16)	0,26 (0,23)
20:3n-6	0,10 (0,07)	0,12 (0,04)	0,09 (0,04)	0,11 (0,04)
20:4n-6	1,59 (0,14) ^b	1,89 (0,16) ^a	1,90 (0,23) ^a	1,56 (0,19) ^b
20:3n-3	0,93 (0,44)	0,94 (0,45)	1,02 (0,43)	1,35 (0,72)
20:4n-3	0,21 (0,16)	0,24 (0,17)	0,14 (0,05)	0,16 (0,12)
22:0	0,24 (0,03)	0,19 (0,06)	0,23 (0,03)	0,24 (0,15)
20:5n-3	2,98 (0,25) ^a	2,90 (0,47) ^a	2,99 (0,43) ^a	2,39 (0,29) ^b
22:1n-11	0,06 (0,03)	0,07 (0,04)	0,06 (0,04)	0,07 (0,06)
22:4n-6	0,18 (0,04)	0,17 (0,10)	0,23 (0,03)	0,28 (0,38)
22:5n-6	0,67 (0,29)	0,86 (0,32)	0,94 (0,20)	0,81 (0,12)
22:5n-3	1,95 (0,15)	2,10 (0,19)	2,16 (0,21)	2,00 (0,14)
24:1n-9	0,71 (0,08) ^b	0,67 (0,32) ^b	1,03 (0,27) ^{ab}	1,25 (0,47) ^a
22:6n-3	18,18 (1,31)	20,12 (1,64)	20,34 (2,60)	18,50 (3,20)
SAFA	33,66 (2,74)	33,03 (1,94)	32,30 (3,08)	33,68 (3,06)
MUFA	21,30 (0,73) ^b	21,48 (1,72) ^b	21,41 (1,42) ^b	23,25 (1,09) ^a
PUFA	45,03 (2,89)	45,50 (2,84)	46,28 (3,17)	43,07 (3,75)
n-3 LC-PUFA	24,26 (1,81)	26,30 (1,84)	26,64 (2,67)	24,40 (3,19)
ALA/LNA	1,18 (0,11)	1,16 (0,13)	1,17 (0,10)	1,24 (0,17)
DHA/EPA	6,11 (0,42) ^b	7,09 (1,21) ^{ab}	6,94 (1,47) ^{ab}	7,75 (1,02) ^a
EPA/AA	1,89 (0,26) ^b	1,55 (0,33) ^{ab}	1,59 (0,30) ^{ab}	1,54 (0,20) ^a
DHA/ALA	2,20 (0,30) ^a	2,96 (0,63) ^b	2,85 (0,67) ^{ab}	2,69 (0,66) ^{ab}
n-3/n-6	3,26 (0,15)	3,54 (0,33)	3,49 (0,20)	3,65 (0,32)

6. RESULTADOS

6.5.3.2. Ácidos grasos en lípidos neutros

Se observó un mayor efecto de la salinidad sobre el perfil de ácidos grasos de los lípidos neutros (LN) (Tabla 18) que sobre el de los lípidos polares (LP) y totales (LT). Los AG más abundantes en los LN fueron el 18:3n-3 y 18:2n-6 en concordancia con su elevado contenido en la dieta, además de algunos SAFA y MUFA, en particular 16:0 y 18:1n-9, respectivamente. En esta fracción también se observó una menor proporción de DHA, aunque en este caso diluido por la mayor representación de otros AG.

Globalmente, el perfil de AG de la fracción de LN reflejó el efecto de la salinidad a nivel de los SAFA donde se vio una tendencia de aumento hacia la salinidad más alta, aunque sin mostrar diferencias significativas.

Por otro lado, los MUFA mostraron una mayor proporción en la salinidad 10ppt, reduciéndose hacia las salinidades 2ppt y 26ppt, siguiendo el mismo patrón que el contenido de lípidos totales y de lípidos neutros. En general se observó una dicotomía en LN en la que la proporción de PUFA, concretamente 18:2n-6 y 18:3n-3, fue superior hacia la salinidad más baja, 2 ppt, mientras que los LC-PUFA, AA, EPA y DHA, presentaron mayores proporciones hacia la salinidad más alta, 26 ppt (Fig. 24).

6. RESULTADOS

Tabla 18- Perfil de ácidos grasos de los LN (% del total de ácidos grasos) del músculo de juveniles de *P. orbignyanus* cultivados a diferentes salinidades. Promedio y desviación estándar entre paréntesis.
nd = no detectado

AG	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	2,48 (0,24) ^b	3,14 (0,56) ^a	2,75 (0,69) ^{ab}	2,23 (0,41) ^b
15:1n-5	0,11 (0,06)	0,10 (0,04)	0,09 (0,05)	0,16 (0,09)
16:0	15,14 (1,77)	15,13 (1,44)	15,70 (1,83)	16,84 (1,66)
16:1n-9	1,06 (1,47)	0,85 (1,63)	0,39 (0,22)	0,31 (0,27)
16:1n-7	2,69 (1,70)	4,18 (1,75)	4,05 (1,19)	2,60 (1,51)
16:2n-3	0,07 (0,03)	0,08 (0,03)	0,07 (0,02)	0,11 (0,06)
16:2n-4	0,29 (0,09)	0,25 (0,12)	0,33 (0,10)	0,38 (0,10)
17:1n-7	0,26 (0,04)	0,33 (0,05)	0,27 (0,07)	0,31 (0,06)
16:3n-4	0,22 (0,06) ^{ab}	0,39 (0,16) ^b	0,38 (0,28) ^b	0,18 (0,10) ^a
18:0	4,77 (0,88) ^{ab}	4,08 (0,34) ^a	4,43 (0,74) ^{ab}	5,21 (0,87) ^b
18:1n-9	15,08 (5,59)	13,91 (6,65)	15,78 (1,27)	14,52 (2,19)
18:1n-7	1,81 (0,72) ^{ab}	2,42 (0,32) ^a	2,26 (0,33) ^{ab}	1,89 (0,68) ^b
18:2n-6	9,39 (0,53) ^a	8,19 (1,10) ^{ab}	8,24 (0,85) ^b	8,64 (0,77) ^{ab}
18:3n-6	0,06 (0,01)	0,07 (0,02)	0,07 (0,02)	0,07 (0,02)
18:3n-3	24,10 (3,50)	21,41 (4,34)	20,25 (3,58)	19,16 (3,24)
18:4n-3	0,68 (0,10) ^{ab}	0,85 (0,17) ^a	0,76 (0,22) ^{ab}	0,61 (0,19) ^b
20:0	0,28 (0,07)	0,25 (0,03)	0,25 (0,04)	0,26 (0,08)
20:1n-11	0,08 (0,02)	0,09 (0,05)	0,10 (0,04)	0,06 (0,04)
20:1n-9	0,58 (0,11) ^{bc}	0,86 (0,15) ^a	0,75 (0,20) ^{ab}	0,49 (0,23) ^c
20:1n-7	0,09 (0,02) ^b	0,13 (0,03) ^a	0,12 (0,03) ^{ab}	0,14 (0,14) ^{ab}
20:2n-6	0,20 (0,02) ^a	0,23 (0,03) ^{ab}	0,22 (0,02) ^a	0,26 (0,05) ^b
20:3n-6	0,07 (0,03) ^{ab}	0,09 (0,02) ^a	0,08 (0,02) ^{ab}	0,11 (0,04) ^b
20:4n-6	0,82 (0,27) ^a	0,79 (0,18) ^a	0,98 (0,23) ^{ab}	1,23 (0,29) ^b
20:3n-3	1,32 (0,18)	1,17 (0,13)	1,51 (0,87)	1,57 (0,38)
20:4n-3	0,31 (0,02) ^a	0,41 (0,06) ^b	0,37 (0,07) ^b	0,32 (0,12) ^{ab}
22:0	0,20 (0,07)	0,15 (0,03)	0,17 (0,06)	0,18 (0,09)
20:5n-3	3,70 (0,49)	4,18 (0,88)	4,19 (0,55)	4,51 (0,71)
22:1n-11	0,23 (0,10) ^b	0,40 (0,10) ^a	0,32 (0,13) ^{ab}	0,20 (0,12) ^b
22:4n-6	0,11 (0,04)	0,14 (0,04)	0,12 (0,07)	0,15 (0,08)
22:5n-6	0,19 (0,10) ^b	0,28 (0,11) ^{ab}	0,36 (0,10) ^a	0,41 (0,11) ^a
22:5n-3	1,72 (0,18)	1,86 (0,72)	1,91 (0,76)	2,11 (0,34)
24:1n-9	0,17 (0,03)	0,17 (0,07)	0,20 (0,08)	0,13 (0,08)
22:6n-3	7,26 (2,06) ^a	7,66 (1,52) ^a	9,40 (2,14) ^{ab}	11,29 (2,86) ^b
SAFA	23,52 (2,87)	23,38 (1,99)	24,08 (1,84)	25,45 (2,51)
MUFA	24,58 (2,69) ^b	27,13 (1,26) ^a	25,22 (2,48) ^{ab}	21,93 (2,89) ^b
PUFA	50,89 (2,41)	48,49 (2,85)	49,65 (3,13)	51,60 (2,16)
n-3 LC-PUFA	14,31 (2,79)	15,30 (3,02)	17,37 (2,78)	19,80 (3,86)
ALA/LNA	2,56 (0,26) ^{ab}	2,59 (0,19) ^a	2,46 (0,34) ^{ab}	2,22 (0,31) ^b
DHA/EPA	1,93 (0,34) ^b	1,84 (0,14) ^b	2,27 (0,54) ^{ab}	2,48 (0,43) ^a
EPA/AA	4,82 (1,14) ^{ab}	5,33 (0,54) ^a	4,46 (1,15) ^{ab}	3,80 (0,76) ^b
DHA/ALA	0,32 (0,13) ^b	0,38 (0,14) ^b	0,49 (0,17) ^{ab}	0,62 (0,23) ^a
n-3/n-6	3,61 (0,18)	3,84 (0,27)	3,83 (0,38)	3,65 (0,30)

6. RESULTADOS

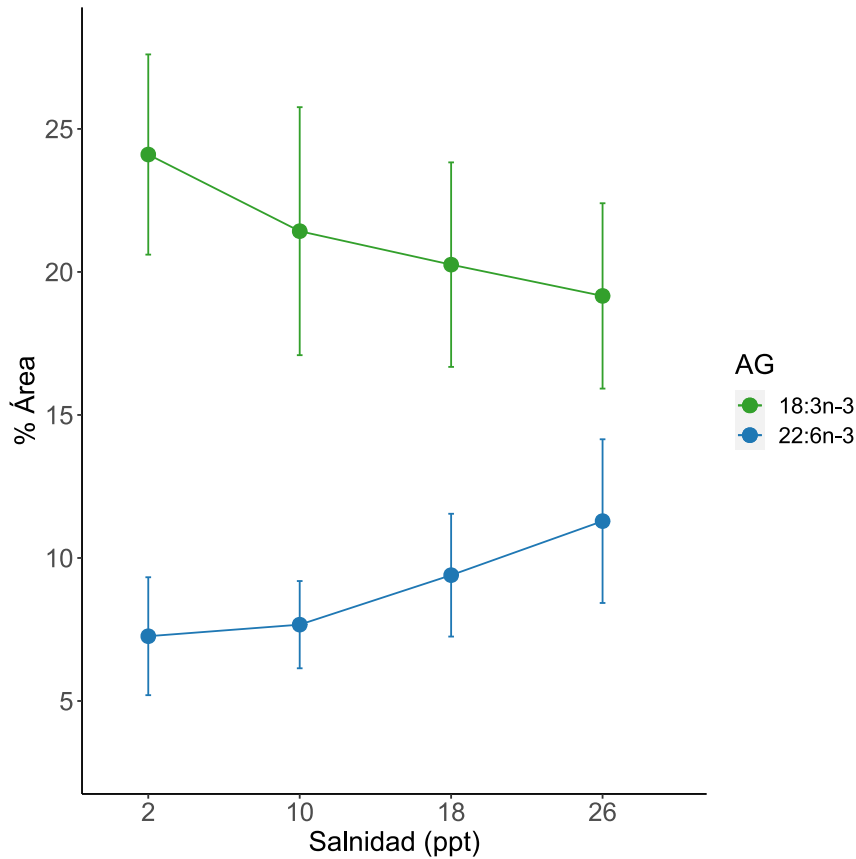


Fig. 24- Representación de la proporción de ALA y DHA en LN (% Área).

El análisis de componentes principales (PCA) perfil de LP y LN (Fig. 25) mostró la variación explicada entre los dos primeros componentes del modelo, 39,5% en LP y 79,2% en LN. Estos resultados demuestran que el efecto de la salinidad se ve reflejado fundamentalmente en los LN.

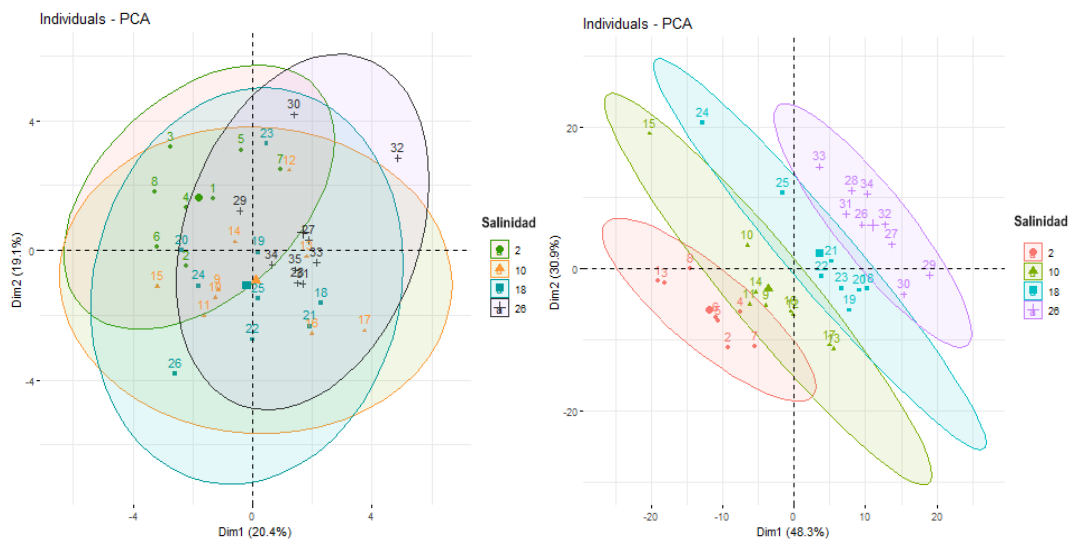


Fig. 25 – Análisis de componentes principales de LP (izqda.) y LN (dcha).

6. RESULTADOS

Los AG que mejor explican la variabilidad observada ($\cos^2$) en el modelo de componentes principales en la fracción de LP son 18:0 (0,57 Dim2), 18:2n-6 (0,57 Dim2), 18:3n-3 (0,77 Dim2), 20:5n-3 (0,47 Dim1), 22:5n-3 (0,47 Dim1) y 22:6n-3 (0,56 Dim1). Mientras que en el modelo de LN los AG que mejor explican la variabilidad del modelo son 18:0 (0,83 Dim1), 18:2n-6 (0,82 Dim2), 20:4n-6 (0,76 Dim1), 22:1n-11 (0,66 Dim1) y 22:6n-3 (0,70 Dim1) y en menor medida el 16:0 (0,63 Dim1) 18:1n-9 (0,60 Dim1), 18:4n-3 (0,57 Dim1), 20:5n-3 (0,44 Dim2).

6.6. Diseño de clonación de *fads2* y *elovl4* en *E. coli* para su expresión heteróloga en levaduras

Las secuencias en las regiones 5'-UTR y corriente abajo del codón *start* en ambos transcriptos, *fads2* y *elovl4*, se caracterizaron por ser ricas en GC. Contrariamente, las secuencias en las regiones 3'-UTR y corriente abajo del codón stop (hebra complementaria en dirección 5'-3') resultaron ser ricas en AT. Esto generó una mayor tendencia a tener temperaturas dispares entre los cebadores *forward* y *reverse*, a generar estructuras secundarias y dímeros de cebadores. Tras realizar varios diseños analizados *in silico* y varias pruebas de ciclado. El diseño de amplificación anidada de *fads2* y *elovl4* de *P. orbignyana* se llevó a cabo con los cebadores de la Tabla 19.

Tabla 19 – Cebadores utilizados en la PCR anidada para la amplificación del CDS de *fads2* y *elovl4* de *P. orbignyana*. Los cebadores que contienen HE en el nombre se usaron en la primera ronda de PCR para la amplificación específica, mientras que los HE2 se usaron en la segunda ronda de amplificación. En negrita se observan los codones *start* y *stop* que definen el inicio y el final de la traducción de la proteína. Las secuencias subrayadas resaltan los sitios de restricción correspondientes a KpnI y XbaI.

Cebador	Secuencia
FAD.HE.FW	5'- A GCAGTGGAGATGGGCGGT -3'
FAD.HE.RV	5'- GCAGTGTGGAGAACAGCATTTCTCATTATG -3'
FAD.HE2.FW	5'- AAAGGTACCGGAGATGGGCGGTG -3'
FAD.HE2.RV	5'- GCGTCTAGACAGCATTTCTCATTATGGAGATA -3'
ELO4.HE.FW	5'- GTGAGAGAGATGACTTCAGCCT-3'
ELO4.HE.RV	5'- ACCATTGCTTCTTATTTCTTCTTGT-3'
ELO4.HE2.FW	5'- AAAGGTACCGGAGATGACTTCAGCCTG-3'
ELO4.HE2.RV	5'- GGGTCTAGATCTTATTTCTTCTTGTGTTG -3'

6. RESULTADOS

La PCR en gradiente realizada con los cebadores definidos para la amplificación específica de *fads2* y *elovl4* determinó que las mejores temperaturas de hibridación eran 61°C para *fads2* y 64°C para *elovl4* (Tabla 20).

Tabla 20 – Condiciones de ciclado para la amplificación específica de *fads2* y *elovl4* de *P. orbignyana*.

	FAD.HE.FW FAD.HE.RV	ELO4.HE.FW ELO4.HE.RV	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	98	98	1	1 m
Desnaturalización	98	98	35	10 s
Hibridación	61	64		30 s
Extensión	72	72		45 s
Extensión final	72	72	1	10 m

A partir de los productos amplificados y purificados, se determinó que la PCR en gradiente para la segunda amplificación requería de dos ciclados en la misma reacción (Tabla 21). La temperatura de hibridación óptima para la región del cebador que hibrida específicamente con el producto de amplificación es de 65°C y 55°C para *fads2* y *elovl4*, respectivamente. Sin embargo, al agregar una secuencia sintética que contiene el sitio de restricción y algunos nucleótidos adicionales para balancear las características del cebador *forward* y *reverse*, se generan productos de amplificación secundarios. Dado que estos productos secundarios pueden llegar a ser muy predominantes, este defecto se minimizó agregando un segundo ciclado a mayor temperatura para aumentar la astringencia de los cebadores. De esta manera, se favoreció la amplificación sobre los amplicones generados en los tres primeros ciclos, los cuales incluyen la secuencia sintética adicional.

6. RESULTADOS

Tabla 21 – Condiciones de ciclado para la amplificación de *fads2* y *elovl4* incluyendo los sitios de restricción.

	FAD.HE2.FWc FAD.HE2.RVc	ELO4.HE2.FWb ELO4.HE2.RV	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	98	98	1	1min
Desnaturalización	98	98	3	10 seg
Hibridación	65	55		30 seg
Extensión	72	72		45 seg
Desnaturalización	98	98	32	10 seg
Hibridación	69	66		30 seg
Extensión	72	72		45 seg
Extensión final	72	72	1	10 min

Las condiciones de PCR desarrolladas permitieron generar los insertos necesarios para su recombinación con el plásmido vector de expresión PYES2. Tras la digestión de los amplicones y del plásmido circular, se obtuvieron bandas con el tamaño correspondiente a los productos amplificados (Fig. 26). Sin embargo, las diferencias en tamaño, de unos pocos pares de bases, entre los productos sin digerir y productos digeridos de los amplicones de *fads2* y *elovl4*, no permitieron observar diferencias en el tamaño de las bandas por electroforesis en agarosa. Sin embargo, el efecto de la digestión sí se observa en el plásmido digerido (PYES2 D) y sin digerir (PYES2 S/D) por la observación de bandas correspondientes a estructuras superenrolladas del plásmido (*supercoiled plasmid*).

6. RESULTADOS

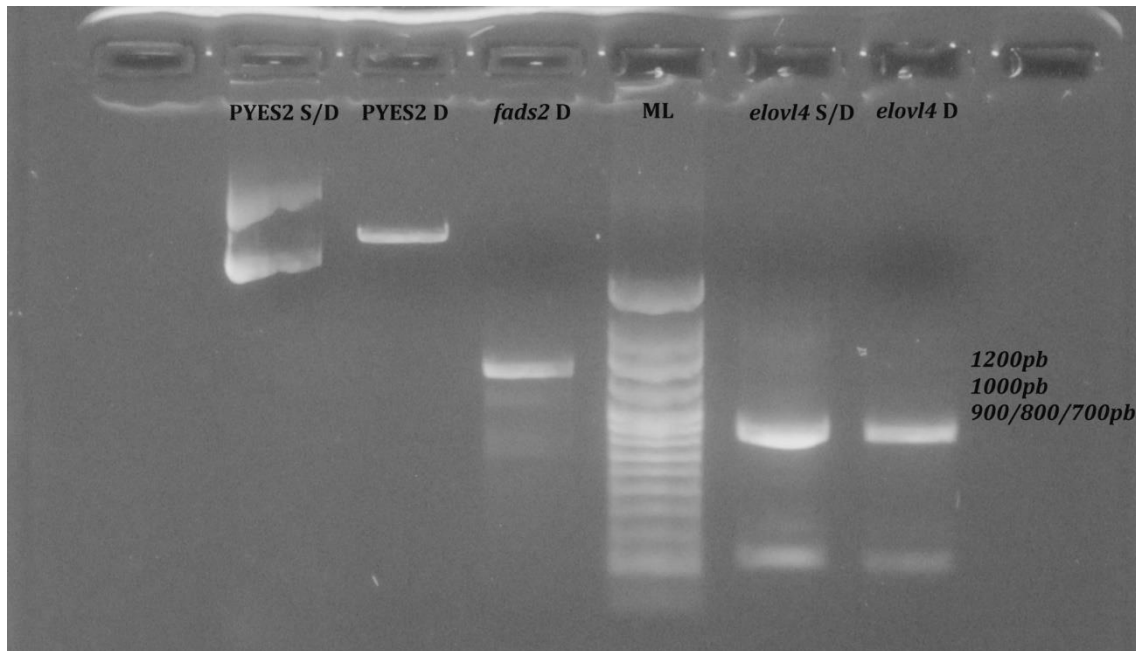


Fig. 26- Electroforesis en agarosa de los productos digeridos de *fads2*, *elovl4* y PYES2. Se observa el plásmido PYES2 sin digerir (S/D) en el segundo carril con diferentes niveles de superenrollamiento (*supercoiled*). El mismo plásmido digerido en el siguiente carril (PYES2 D) aparece con una única banda, resultado de la linealización del plásmido. En los dos últimos carriles con muestra, se observa la banda correspondiente a *elovl4* sin digerir, reflejando mayor concentración de ADN a igual volumen de muestra que en *elovl4* digerida. Esto se debe a la pérdida de material durante la digestión y posterior purificación de la muestra. ML: *Molecular Ladder*.

La transformación en *E. coli* con los plásmidos recombinantes generó crecimiento en placa a las 48 horas a pesar de que los protocolos indican crecimiento a las 24 horas. De las colonias transformadas y cultivadas, se obtuvo una secuencia *fads2* (Fig. 27) y una secuencia *elovl4* (Fig. 28). Dado que la PCR se llevó a cabo con el primer universal T7, corriente arriba de los sitios de restricción y del CDS, la secuencia demuestra la construcción correcta del plásmido.

6. RESULTADOS

```

5501  ATTAGTTTTT TAGCCTTATT TCTGGGGTAA TTAATCAGCG AAGCGATGAT TTTTGATCTA TTAACAGATA TATAAATGCA AAAACTGCAT AACCACTTTA
5601  ACTAATACTT TCAACATTTT CGGTTTGTAT TACTTCTTAT TCAAAATGTAA TAAAAGTATC AACAAAAAAT TGTTAATATA CCTCTATACT TTAACGTCAA
5701  GGAGAAAAAA CCCCAGGATCG GACTACTAGC AGCTGTAATA CGACTCACTA TAGGGAATAT TAAGCTTGGT ACCGAGATGA GGCCTGGAG GCCAGCTGAA
5801  GGAGCCAGGG GAGACAGGGA GAGCTGGACG TCTTTACACC TGGGAGGAGG TGCAGAGCCA CAGCAGCAGG AACGACCTGT GGCTGGTCAT AGATCGAAAA
5901  GTTTACAACA CCACACAGTG GGCCAAAAGA CATCCAGGAG GGTTCGTGT CATCAGCCAC TATGCTGGAC AGGACGCCAC GGAGGCATTC ATTGCTTTTC
6001  ATCCCGATCT TAAGTGTGTG CAAAAGTTTC TGAAGCCCTT GCTGATTGGA GAACTGGCTG CAACAGAGCC CAGCCAGGAC CACAACAAAA ATGCAGCACT
6101  CATACAGGAT TTCCGCATCT TACGTGTTCA GGCAGAGAGC GAGGGTCTGT TTCGAGCCCA GCCCTTGTTC TTCTGCCTCC AGCTGGGTCA CATCATGCTG
6201  CTGGAATCCC TCGCCTGGCT CATGATATGG CACTGGGGAA CTAAGTGGAT ATTGACGTGT CTCTGTGCAG TCATGATGGC AGTTGCTCAG TCACAGGCTG
6301  GCTGGCTGCA GCATGACTGT GGACACCTGT CTGCTTCTAA GAAGTCCAGC TGGAACTACT TGTTCACAAA GTTTGTCATT GGCCATTTAA AGGGATTTC
6401  TGCCAACCTG TGGAATCATC GACATTTTCA GCATCAGCT AAACCCAACA TCTTCAGAAA AGACCCCGAT GTCAACATGT TGAACCTCTT TGTAAATTGGT
6501  GCCACTCAAC CGGTAGAGTA CGGTATAAAA AAGATCAAA GCATGCCCTA TCACCGCCAA CACCACTACT TCTTTCTTGT GGGACCTCCA CTGCTCATTC
6601  CGGTTTATTT CCACATTCAG CAAATTCGCA CCATGCTCTC CCGCATGAGC TGGGTGGATC TGGTTGGTG CATGCTGATC TATCTACGCT ACTTCTGCTG
6701  TTACGTTCTT CTGTACGGTC TGTTTGGCTC AATGGCGCTC ATCAGCTTTG TCAGGTGTCT GGAGAGTCAC TGGTTCGTGT GGGTGACTCA GATGAATCAT
6801  CTGCCCCATG ACATCGACCA TGAGAGGCAC CAGGACTGGT TAACAATGCA GCTACAGGCC ACCTGCAATA TTGAGCAGTC CGTCTTCAAC GACTGGTCCA
6901  CAGGAACCT CAACTTTCA TCGAGCATC ATCTGTTTCC CAGCATGCC CGCCACAAC ACCACCTGGT AGCTGAGCGG GTCGCTGCC TCTGTGTAAA
7001  GTATGGGATT CCTTACCAGG TGAAACGAT GTGTCAAGGC CTCGGGGATG TCTTCAGGTC ACTGAAAAAC TCAGGAGACC TCTGGCTCGA TGCATATCTC
7101  CATAAATGAG AAATGCTGTC TAG

```

Fig. 27- Comparación de secuencia obtenida por método de Sanger con la secuencia del plásmido recombinante con *fads2*. ACTG: secuencia de referencia, ACTG: secuencia obtenida por Sanger, ACTG: bases verificadas manualmente de acuerdo a los picos observados en el electroferograma

```

5501  ATTAGTTTTT TAGCCTTATT TCTGGGGTAA TTAATCAGCG AAGCGATGAT TTTTGATCTA TTAACAGATA TATAAATGCA AAAACTGCAT AACCACTTTA
5601  ACTAATACTT TCAACATTTT CGGTTTGTAT TACTTCTTAT TCAAAATGTAA TAAAAGTATC AACAAAAAAT TGTTAATATA CCTCTATACT TTAACGTCAA
5701  GGAGAAAAAA CCCCAGGATCG GACTACTAGC AGCTGTAATA CGACTCACTA TAGGGAATAT TAAGCTTGGT ACCGAGATGA CTTACGCTG GGAAGTCTC
5801  CTCTCTACGT ACCAAAGCCA CCTGGACAAT GGAGACAAGC GCACAGACCC GTGGCTGCTG GTCTACTCCC CTGCTCCGGT GGCAATCATC TTCCTGCTCT
5901  ACCTCAGCAT GGTGTGGGCG GGCCCTCGTC TGATGAAACA CAGGGAACCC TTTGACCTCA GAGTCGCTCT CATAGTTTAC AATTTGCGCA TGGTCGGCCT
6001  GTCTGTCTAC ATGTTCTACG AGTTCTCTGT CACGTCGTTA CTTTCAAAC ACAGTTACCT GTGTCAGCCT GTAGATTACA GCAACAGCCC GCTGGCCATG
6101  AGAATGGCCA GAGTCTGCTG GTGGTTCTTC TTCTCCAAGG TCATAGAGCT CAGTGACACG CTCTTCTTCA TCCTGAGGAA GAAGAGCAGT CAGGTCACAT
6201  TTCTCCATGT GTACCAACC GGCACCATGA TCTTCAACTG GTGGTTGGGA ATCAAGTATG TGGCCGGGGG ACAGTCGTTT TTCAACGCCA TGGTGAACAG
6301  CTTGTTTCACT ATTGTCATGT ACTCGTACTA CGGCTGGCT GCCCTCGGCC CTCACATGCA GAAGTACCTG TGGTGGAAAC GTTACCTCAC GTCCCTGCAG
6401  CTGGTGCACT TTGGGATCTT CCTCGTGCAC ACGGGTCACA ACCTGTTAGC TGAGTGCGAC TTCCCAACG CCATGAACAT GCTTTTGTTC GGTACTGCA
6501  TCACCTTCAT CATCTCTTC AGTAACTTCT ATTATCAGAG CTACCTCAAC AACAAGAAGA AGAAATAAGA TCTTGGG GGCATGATGT AATTGTTAT
6601  TCAAGCTTA CATTCAGCC CTCGCTGCTA ACCGAAAGG AAGGATTAG ACACCTGAA TCTAG

```

Fig. 28 – Comparación de secuencia obtenida por método de Sanger con la secuencia del plásmido recombinante con *elovl4*. ACTG: secuencia de referencia, ACTG: secuencia obtenida por Sanger, ACTG: bases verificadas manualmente de acuerdo con los picos observados en el electroferograma

Los codones *start* y *stop* así como los sitios de restricción no se llegaron a identificar en la secuencia obtenida por Sanger debido a la inestabilidad de la señal en las primeras 150 bases secuenciadas. Lo mismo ocurre al final de la secuenciación Sanger. La baja calidad que ofrece esta tecnología de secuenciación al principio y al final del proceso de secuenciación, hace que no podamos obtener la secuencia completa del amplicón generado.

A su vez, el electroferograma mostró picos limpios a lo largo de toda la región informativa de la secuencia (Fig. 29). Esto refleja el correcto aislamiento de la colonia transformada con un único plásmido, descartando la presencia de otros plásmidos o productos secundarios.

6. RESULTADOS

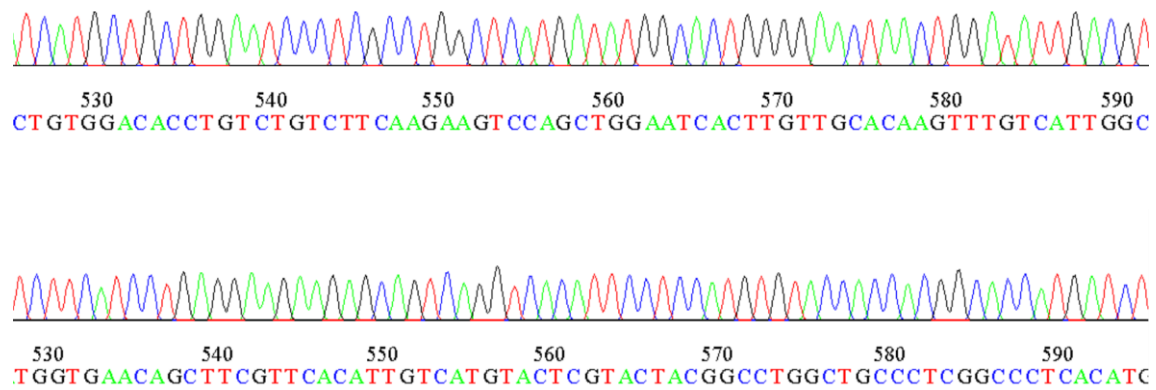


Fig. 29 – Muestra a modo de ejemplo del electroferograma obtenido para las secuencias *fads2* (arriba) y *elovl4* (abajo). Se muestra una región acotada del electroferograma obtenido de la secuenciación Sanger del plásmido obtenido.

7. DISCUSIÓN

El fuerte desarrollo del sector de la acuicultura ha llevado a la intensificación de sus actividades originando nuevos obstáculos que amenazan la sustentabilidad del sector. Uno de ellos, surge de la necesidad de obtener fuentes de ácidos grasos ricos en n-3 LC-PUFA para cubrir los requerimientos de AGE en los peces en cultivo (Miller *et al.*, 2008; Tocher *et al.*, 2019; Tocher, 2015). Por ello, el desarrollo del cultivo de especies con capacidad endógena de producir LC-PUFA a partir de PUFA, se presenta como una oportunidad para diversificar la producción en acuicultura cultivando especies con bajos requerimientos de AA, EPA y DHA (Galindo *et al.*, 2021).

Esto, si bien hace posible la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales ricos en PUFA, LA y ALA (Turchini *et al.*, 2009), también puede afectar el contenido en EPA y DHA en el pescado como producto final para consumo humano generando un impacto en el consumo final de estos AGEs en dietas humanas (Alhazzaa *et al.*, 2011b; Shepherd *et al.*, 2017). Las especies eurihalinas presentan un alto potencial para producir LC-PUFA cuando son cultivadas a bajas salinidades y con dietas ricas en LA y ALA (Wang *et al.*, 2014). En este trabajo se estudió el metabolismo lipídico de *Paralichthys orbignyanus* cultivado a diferentes salinidades para conocer de qué manera la salinidad modula la biosíntesis de LC-PUFA.

Para poder estudiar el efecto de la salinidad sobre la expresión génica de *fads2* y *elovl*, dada la carencia de recursos genéticos en las bases de datos internacionales, se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma (mRNA-Seq) hepático de *P. orbignyanus*. El uso de este tipo de tecnologías basadas en secuenciación masiva (NGS) se está extendiendo rápidamente, convirtiéndose en una herramienta fundamental para llevar a cabo estudios transcriptómicos. El uso de RNA-Seq ha sido aplicado en estudios diversos para evaluar el efecto de diferentes condiciones ambientales como la salinidad y la temperatura, sobre cambios complejos en la expresión de numerosos genes (Huggett *et al.*, 2015). A su vez, se presenta como una metodología costo-efectiva por el volumen de información que se puede llegar a obtener (Muir *et al.*, 2016). Es de gran utilidad en la generación de recursos genéticos y en la obtención de nuevos transcriptos, particularmente cuando no se

7. DISCUSIÓN

cuenta con transcriptomas o genomas de referencia para la especie objetivo (Carruthers *et al.*, 2018; Da Fonseca *et al.*, 2016; Rana *et al.*, 2016).

En este trabajo se combinó la técnica de RNASeq con el posterior análisis bioinformático de ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático de *P. orbignyanus* obteniendo secuencias completas de *fads2* y *elovl4*. El mismo procedimiento de análisis de ensamblado *de novo* se aplicó sobre datos crudos de secuenciación de transcriptoma hepático de *P. lethostigma* (SRR3737288), obteniendo los mismos resultados. Entre las secuencias obtenidas, en relación con la biosíntesis de LC-PUFA, se encontraron únicamente una *fads2* y una *elovl4*.

En *P. orbignyanus* además de estas secuencias, también se obtuvieron otras oxidoreductasas, como una esteroil-CoA desaturasa ($\Delta 9$ desaturasa) (OR616245) y una esfingolípido- $\Delta 4$ -desaturasa (OR616244), involucrada en el metabolismo de biosíntesis de esfingolípidos (Bieberich, 2018).

Adicionalmente, además de una *elovl4* también se obtuvieron otras *elovl* menos estudiadas en peces, como una *elovl1* (OR610671) y una *elovl6* (OR610664). Se considera que ambas están involucradas en la elongación de AG saturados y mono-insaturados en mamíferos (Deák *et al.*, 2019; Kihara, 2012). En el pez zebra (*Danio rerio*), se han identificado dos *elovl1*, *elovl1a* y *elovl1b*, para las que se ha demostrado que no solamente elongan SAFA y MUFA sino también PUFA (Bhandari y Choe, 2018).

El creciente número de secuencias *fads2* y *elovl* publicadas en peces ha permitido estudiar las relaciones evolutivas y funcionales de estos genes. De hecho, eventos de duplicación genómica (WGD, por sus siglas en inglés) son considerados motores evolutivos que, junto con procesos de sub-funcionalización y neo-funcionalización de genes, explicarían el repertorio de *fads2* y *elovl* conocidas hoy en día (Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2013).

Concretamente, se conocen varios eventos de duplicación genómica, entre los cuales destacamos la tercer WGD, conocida como la duplicación genómica específica de teleósteos (*Teleost-specific Genome Duplication*, TGD) y dos eventos WGD adicionales, en salmónidos y en cipriniformes, dando lugar a la poliploidización de especies y desencadenando procesos evolutivos divergentes (Ravi y Venkatesh,

7. DISCUSIÓN

2018). Se considera que estos eventos de duplicación génica y neo-funcionalización han tenido lugar en diversos momentos de la evolución de los peces (Castro *et al.*, 2016; McGrath y Lynch, 2012)

Dentro del grupo de los peces planos, conocidos como Pleuronectiformes, se incluyen representantes fundamentalmente marinos y eurihalinos con una menor proporción de especies de agua dulce (Bitencourt *et al.*, 2023; Gibson *et al.*, 2014). A pesar del origen marino de los pleuronectiformes (Munroe, 2015), la evidencia sugiere que la colonización de los ambientes de agua dulce fue posible por la neo-funcionalización genética de *fads2* y *elovl* en conjunto con la adaptación del sistema osmorregulador (Matsushita *et al.*, 2020). Cabe destacar que las secuencias de aminoácidos de Elov14 y Fads2 de *P. orbignyanus* identificadas en este trabajo conservan una relación filogenética con otros peces del orden Pleuronectiformes, en proximidad con *P. olivaceus* y *P. lethostigma*, Fig. 17 y Fig. 18, respectivamente.

La topología obtenida está en consonancia con otras topologías publicadas en diferentes trabajos (Agaba *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2004) respaldando la relación filogenética entre las secuencias descritas. La presencia de una *fads2* bifuncional con actividad $\Delta 6/\Delta 8$ en *Paralichthys olivaceus* caracterizada por Kabeya (2017) coincide con una copia única del gen *fads2* (XM_020078079.1) en su genoma (GCF_001970005.1). La alta identidad de la secuencia de aminoácidos entre la Fads2 de *P. orbignyanus* con su ortólogo de *P. olivaceus* y el motivo FHIQ entre el tercer y cuarto dominio transmembrana sugieren una actividad predominante $\Delta 6$ desaturasa. Sin embargo, la actividad enzimática en *P. orbignyanus* deberá ser verificada mediante estudios funcionales de expresión heteróloga en levaduras.

Contrariamente, los salmónidos se caracterizan por tener el repertorio completo de *fads2* y *elovl* pudiendo llevar a cabo una biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores de C18 (Hastings *et al.*, 2004; Monroig *et al.*, 2011). Se trata de una de las especies cultivadas en acuicultura donde se ha conseguido reducir de manera exitosa la inclusión de harinas y aceites de pescado por alternativas vegetales (Bell *et al.*, 1997; Betancor *et al.*, 2016). Esto podría ser como consecuencia de la duplicación genómica ocurrida en salmónidos, Ss4R (Gillard *et al.*, 2018). Este evento también explica el mayor número de proteínas descritas en los genomas publicados de salmónidos en comparación con especies no salmónidas.

7. DISCUSIÓN

La relación filogenética observada entre las secuencias *fads2* descritas en peces, sugiere que la neo-funcionalización de las acil-CoA desaturasas ocurrió en numerosas ocasiones a lo largo de la evolución (Gostinčar *et al.*, 2010).

En el transcriptoma hepático de *P. orbignyanus* obtenido en este trabajo, también se encontró un transcripto completo que codifica para *elovl4*. El análisis filogenético sitúa esta Elovl4 en el clado correspondiente a Elovl4b. Estos resultados están en consonancia con otros estudios que respaldan la capacidad de Elovl4 para la biosíntesis de DHA. En *Oncorhynchus mykiss*, se identificó una Elovl4b1 y una Elovl4b2 capaces de convertir 20:5n-3 y 22:5n-3 a 24:5n-3 (Zhao *et al.*, 2019). En otras especies, observaron que Elovl4 está involucrada en la elongación de AG >C24 como se describió en *Salmo salar* (Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2011), *Clarias gariepinus* (Raj *et al.*, 2017), *Sparus aurata* y *Solea senegalensis* (Morais *et al.*, 2020).

Aunque no hay una guía definitiva para estimar la cantidad de lecturas necesarias para obtener un transcriptoma completo (Li *et al.*, 2019), se sabe que diferencias en la profundidad de secuenciación en proyectos de RNA-Seq tienen un gran impacto en la cobertura final del transcriptoma (Patterson *et al.*, 2019). Los resultados del transcriptoma hepático obtenido en *P. orbignyanus* reflejan la baja representación de los transcriptos de *fads2* y *elovl*, a pesar de ser enzimas indispensables para la biosíntesis de LC-PUFA. Con una cobertura de al menos 100 millones de lecturas por muestra secuenciada, la imposibilidad de encontrar un transcripto lo suficientemente confiable que se identifique con una *elovl5* refleja la baja expresión de ese gen en el transcriptoma hepático de *P. orbignyanus*. Estos resultados sugieren que esta especie presenta niveles de expresión génica de *elovl5* naturalmente bajos, al menos en las salinidades, 0,1ppt y 10ppt, y en las condiciones dietarias de los peces analizados.

Adicionalmente, en el marco de este proyecto, el mismo procedimiento de ensamblado *de novo* realizado sobre *P. orbignyanus* fue aplicado sobre resultados de secuenciación (mRNA-Seq) de tejido hepático en *P. lethostigma* (SRR3737288). Entre los transcriptos *novel* obtenidos se encuentra la identificación, por primera vez en esta especie, de una *fads2* (WJY55134.1) y una *elovl4* (WJY55135.1) pero no se identificó ninguna *elovl5* (Fig. 18). Estos resultados han sido publicados en bases

7. DISCUSIÓN

de datos de Genbank y en un artículo, como producto de esta tesis (Fernandez-López *et al.*, 2024).

En general, los estudios de transcriptómica en acuicultura para evaluar cambios en los perfiles de expresión génica frente a diferentes condiciones ambientales son escasos. Si *et al.* (2018) demostró en *Cynoglossus semilaevis*, que la salinidad afecta la expresión génica relacionada con el metabolismo lipídico y con procesos de osmorregulación, aunque con una cobertura por muestra de 25 millones de lecturas, no hubo mención alguna a las enzimas involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA. De forma similar, el perfil transcriptómico de *Oreochromis niloticus* mostró que la adaptación a diferentes salinidades ambientales produjeron cambios en procesos involucrados en la síntesis de AG, digestión lipídica y absorción y biosíntesis de AG relacionados con el uso de energía metabólica para cubrir los requerimientos energéticos de los procesos de osmorregulación (Xu *et al.*, 2015) pero de nuevo sin hacer referencia a *fads2* y *elvol*.

Existe un caso particular, *Solea senegalensis* donde se ha identificado una *fads2* con actividad $\Delta 4$ desaturasa demostrada mediante caracterización funcional de la proteína (Morais *et al.*, 2015). Sin embargo, a la fecha no se ha conseguido identificar ninguna enzima *fads2* para la misma especie con actividad $\Delta 6$ desaturasa, aunque estudios indican que esta especie es capaz de completar la biosíntesis de LC-PUFA a partir de sus precursores C18 (Torres *et al.*, 2020). En el momento de presentar esta tesis, las secuencias *fads2* de *Solea senegalensis*, publicadas en las bases de datos de GenBank como resultado de estudios de mRNA-Seq (XM_044035194.1, XM_044035195.1) son idénticas a la secuencia caracterizada funcionalmente, AEQ92868.1 (Morais *et al.*, 2015). Además, dada la importancia de esta especie a nivel productivo en la acuicultura en Europa, contamos con un genoma completo (GCA_019176455.1) para la especie en el que tan sólo se ha descrito un único gen *fads2* en el cromosoma LG10 (NC_058030). A pesar de todo, en *Solea senegalensis* la presencia de una $\Delta 4$ desaturasa (*fads2*) y una *elovl4*, parece ser suficiente para biosintetizar LC-PUFA y VLC-PUFA, algo que se plantea como una nueva posibilidad para el desarrollo del cultivo de especies marinas/eurihalinas (Torres *et al.*, 2020).

7. DISCUSIÓN

Lo mismo se ha observado en *Pampus argenteus*, una especie marina con capacidad completa para la biosíntesis de LC-PUFA mediante la acción combinada tan sólo de *fads2* y *elovl4* (Luo *et al.*, 2021). Esto sugiere que con un perfil dietario adecuado algunas especies, sin llegar a tener el repertorio completo de *fads2* y *elovl*, podrían desaturar y elongar ciertos AG llegando a cubrir sus requerimientos de EPA y DHA.

En el proceso de adaptación de los peces eurihalinos a diferentes ambientes de salinidad, este parámetro actúa como desencadenante en la inducción de cambios en la expresión de numerosos genes relacionados con el metabolismo energético. Así, en *Hypomesus transpacificus*, se ha visto que el estrés osmótico estimula la modulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas en respuesta a un aumento en los requerimientos energéticos (Komoroske *et al.*, 2016). Resultados similares se encontraron en estudios transcriptómicos en *Chanos chanos* (Hu *et al.*, 2015) y en *Lateolabrax maculatus* (Zhang *et al.*, 2017). Particularmente, en este último trabajo, se observó un incremento en la expresión de acetyl-CoA acetyl transferasa2, involucrada en la β -oxidación de AG, en respuesta a un aumento en la salinidad de cultivo sugiriendo una mayor disponibilidad de energía metabólica para procesos de osmorregulación. De manera contraria, la expresión génica de acetyl-CoA acetyl transferasa2 aumentó en *Cynoglossus semilaevis* cuando fue cultivada a bajas salinidades (Si *et al.*, 2018).

Por otro lado, en salmón atlántico (*Salmo salar*) se observó que a bajas salinidades los genes sobre-expresados en hígado e intestino estaban relacionados con rutas metabólicas de biosíntesis lipídica, mientras que en salinidad marina los genes sobre expresados se relacionan con procesos de digestión y absorción de lípidos (Gillard *et al.*, 2018). La adaptación del salmón a diferentes ambientes de salinidad se ve reflejada en su perfil de ácidos grasos, lo que se relaciona no solamente con la adaptación a diferentes ambientes de salinidad sino también con un cambio en los requerimientos de ácidos grasos esenciales (AGEs) (Nemova *et al.*, 2015). Estos resultados podrían indicar que las diferencias en el patrón de expresión de algunos genes es especie-dependiente y está en función de las distintas capacidades de adaptación a ambientes de salinidad.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de estudios transcriptómicos en diferentes peces, como en *Cynoglossus semilaevis* (Si *et al.*, 2018), *Chanos chanos* (Hu *et al.*, 2015b) y *Lateolabrax maculatus* (Zhang *et al.*, 2017) demuestran que el metabolismo de biosíntesis de LC-PUFA presenta una baja representación en el transcriptoma hepático si lo comparamos con otros procesos del metabolismo lipídico.

Aunque las técnicas de secuenciación de transcriptoma con análisis de ensamblado *de novo* se postulan como una solución en la generación de recursos genéticos en organismos no modelo, la baja expresión de algunos genes como *fads2* y *elovl* puede dificultar su identificación, caracterización y el desarrollo de posteriores estudios en los que se requiera su secuencia para el diseño de procedimientos en biología molecular. Por este motivo, sería recomendable contar con recursos genómicos para las especies de interés acuícola que faciliten el análisis de transcriptomas.

Al finalizar la experimentación animal, la salinidad tuvo un efecto en la expresión génica de *fads2* y *elovl4* en *Paralichthys orbignyanus* cultivados en la salinidad más baja (2ppt). Por lo general, los cambios de expresión génica de *fads2* y *elovl* en peces cultivados a diferentes salinidades varía con la especie. El primer estudio que conocemos donde se aborda el estudio de la salinidad sobre la cuantificación de la expresión génica de *fads2* por qPCR se llevó a cabo en *Siganus canaliculatus*, demostrando el aumento de la expresión de esta enzima en 10ppt en comparación con la salinidad de cultivo a 32ppt (Li *et al.*, 2008). En este mismo trabajo, también se estudió la interacción de la salinidad con diferentes perfiles dietarios demostrando el efecto estimulante de la salinidad sobre la expresión génica de *fads2* con una dieta rica en sustratos de C18 (Li *et al.*, 2008). Estos resultados fueron confirmados nuevamente, en un estudio posterior en la misma especie (Xie. *et al.*, 2015b), al incluir el repertorio completo de enzimas, *fads2* ($\Delta 6/\Delta 5$ y $\Delta 4$) y *elovl5*.

Sin embargo, no todas las especies responden de la misma manera frente a cambios de la salinidad de cultivo. En *Lateolabrax japonicus* a pesar de experimentar un incremento en la expresión génica de *fads2* en ambientes de agua dulce, la expresión génica de *elovl5* aumentó en el ambiente de salinidad marina (Dong *et al.*, 2020). A su vez, en especies como *Pagrus major*, se observó un aumento en la expresión de *fads2* en 15ppt de salinidad en comparación con el mismo cultivo a 20 y 30ppt de salinidad, sin llegarse a observar cambios en la expresión génica de *elovl5* en ningún

7. DISCUSIÓN

tratamiento de salinidad, salvo cuando se utilizó una dieta rica en sustratos de C18 por una sustitución de aceite de pescado por aceite vegetal (Sarker *et al.*, 2011).

En el caso de *Solea senegalensis*, *fads2* experimentó un aumento en la expresión génica cuando fue cultivado con una dieta pobre en LC-PUFA y rica en PUFA, sin mostrar un efecto de la salinidad de cultivo, mientras que en *elovl5* se observó un incremento en la expresión génica por una reducción en la salinidad de cultivo, de 35ppt a 20ppt (Marrero *et al.*, 2021). Los resultados observados en *P. orbignyanus* podrían estar relacionados con el gran potencial eurihalino del lenguado para adaptarse a un amplio rango de salinidad. Los niveles de expresión génica de *fads2* y *elovl4* fueron más altos en la salinidad más baja, 2 ppt, mientras que los niveles más bajos se observaron en las salinidades 18 ppt y 26 ppt.

En algunas especies se ha visto que la expresión génica de *fads2* y *elovl*, a menudo guarda una relación con el tejido en el que se expresa. En *Chelon labrosus*, una especie marina/catádroma, se observó un aumento en la expresión génica de *fads2* y *elovl5* a nivel hepático cuando se redujo la salinidad de 35ppt a 20ppt, a diferencia del intestino donde tan sólo *elovl5* experimentó un aumento en la expresión génica en 20ppt (Marrero *et al.*, 2024). Un caso curioso es el observado en *Acanthopagrus schlegelii* donde los cambios en la expresión génica de *fads2*, *elovl4a* y *elovl4b* tuvieron lugar a partir de las 12 horas cuando los juveniles fueron trasladados desde sistemas de cultivo a 22psu a 4-5psu (Li *et al.*, 2022). Sin embargo, la respuesta fue diferente para los tres genes donde el nivel de expresión génica de *elovl4b* y *fads2* se mantuvieron altos mientras duró el estímulo, a diferencia de *elovl4a* que tras al aumentar su nivel de expresión génica, volvió a niveles basales. Estos resultados fueron complementados por Bao (2022) al cultivar juveniles de *Acanthopagrus schlegelii* a diferentes salinidades y niveles de colesterol dietario, observando un aumento en la expresión génica de *fads2* y *elovl5* al reducir la salinidad de cultivo de 23psu a 5psu.

Los estudios realizados hasta ahora sugieren que los peces cultivados a una salinidad diferente de la habitual para esa especie, podría estimular las capacidades de biosíntesis de LC-PUFA. Esto se podría explicar por el efecto desencadenante de eventos de estrés osmótico dentro del rango de tolerancia a la salinidad de cada especie.

7. DISCUSIÓN

Los trabajos que abordan el efecto de la salinidad sobre la expresión génica de *fads2* y *elovl* son escasos y además incluyen el efecto del perfil de AG de las dietas. Los AG procedentes de la dieta actúan como ligandos sobre receptores nucleares PPARs (Leaver *et al.*, 2007), Hnf4 α , Lxra y Srebp-1 (Xie *et al.*, 2021) y Sp1 (Li *et al.*, 2019) y, de ésta manera, son capaces de inducir cambios en los niveles de expresión génica de *fads2* y *elovl*. Por otro lado, la salinidad tiene un efecto sobre la regulación de la expresión génica de *fads2* y *elovl*, a través de mecanismos de respuesta hormonal (Arjona *et al.*, 2009). La diferencia en los mecanismos de regulación de la expresión génica de *fads2* y *elovl* debido al efecto de los AG y de la salinidad podría explicar el efecto evidente que tiene la dieta sobre la expresión génica de estas enzimas llegando a enmascarar el efecto de la salinidad de cultivo.

El potencial eurihalino de *P. orbignyanus* también se refleja en el desempeño del cultivo al finalizar el experimento, pues no se observan diferencias en el crecimiento en ninguno de los tratamientos de salinidad. Estos resultados están en consonancia con estudios previos de Sampaio (2007) donde demuestra la capacidad del lenguado para adaptarse a diferentes salinidades desde estadíos de desarrollo tempranos. Sin embargo, el mismo autor describe un mejor desempeño del cultivo del lenguado, por una tasa de crecimiento más alta, en salinidades marinas en comparación con su cultivo en salinidad de agua dulce, con periodos de cultivo de 90 días (Sampaio y Bianchini, 2002).

Otras especies eurihalinas, aunque con un perfil marcadamente marino, *S. canaliculatus* (Li *et al.*, 2008) y *Pagrus major* (Sarker *et al.*, 2011), tampoco muestran diferencias en la tasa de crecimiento cuando se cultivan a diferentes salinidades, mostrando un gran potencial eurihalino. Lo mismo ocurrió con *Lates calcarifer* donde, no se observaron diferencias en el crecimiento en cuando se cultivaron a ambientes de agua dulce y ambientes marinos (Alhazzaa *et al.*, 2011a, 2011b). Otras especies estenohalinas como *Perca fluviatilis* tampoco mostró diferencias en el crecimiento, aunque en este caso el ensayo se realizó en rangos menores de salinidad, de 0 a 10ppt (Overton *et al.*, 2008). De manera contraria, *Solea senegalensis*, un pez plano marino/eurihalino muestra mayores tasas de crecimiento en salinidades marinas, a 25ppt y 39ppt, rango de salinidad habitual de cultivo, en comparación con salinidades salobres a 15ppt (Arjona *et al.*, 2009).

7. DISCUSIÓN

Algunas especies eurihalinas muestran un mayor crecimiento en salinidades próximas al punto isoosmótico. Este es el caso de *Chirostoma estor* (Martínez-Palacios *et al.*, 2004), *Eleginops maclovinus* (Vargas-Chacoff *et al.*, 2016) y *Alosa sapidissima* (Liu *et al.*, 2017). A las salinidades cercanas al punto isosmótico, estas especies estarían derivando menor energía metabólica en procesos de osmorregulación, pudiendo destinarla a otros procesos vitales como el crecimiento y el desarrollo de la especie.

Las variaciones en los resultados de crecimiento observados en distintas especies parece estar relacionado con la tolerancia a cambios de la salinidad de cultivo, la cual es especie-dependiente, y con la respuesta hormonal desencadenada por un evento de estrés osmótico (Arjona *et al.*, 2009). Además del efecto que tiene la salinidad sobre el crecimiento, se postula que la salinidad también puede generar cambios comportamentales. Un ejemplo sería por una modulación de la tasa de ingesta de alimento pudiendo ser otro causante de las diferencias observadas en el crecimiento de algunas especies al variar la salinidad de cultivo (Bœuf y Payan, 2001).

Además de no encontrar diferencias en el crecimiento de *P. orbignyanus* en las condiciones ensayadas, la supervivencia al finalizar el experimento fue del 100% demostrando la capacidad del lenguado para adaptarse a diferentes salinidades de cultivo. Sin embargo, sería deseable poder llevar a cabo experimentos de mayor duración, superior a 60 días, para ver los efectos de la salinidad a largo plazo.

El contenido de LT en el músculo de *P. orbignyanus* mostró una correlación positiva con el contenido de LN. El mayor contenido de LT y LN se observó en la salinidad 10ppt, la salinidad de cultivo más próxima al punto isoosmótico determinada por Sampaio y Bianchini (2002) en 10,9 ppt para esta especie. El contenido de los LT y LN decrece a medida que nos alejamos de ese punto isoosmótico hacia las salinidades extremas, 2 ppt y 26 ppt. Estos resultados sugieren que habría una movilización de estos lípidos hacia la obtención de energía metabólica para cubrir los requerimientos energéticos de los procesos de osmorregulación. Variaciones en el contenido de lípidos totales estaría relacionado con variaciones en el contenido de LN debido a la función de almacenamiento de estos lípidos, mientras que los lípidos polares suelen presentar menos variabilidad debido a su rol principal en las

7. DISCUSIÓN

funciones estructurales y metabólicas en las membranas celulares (Sushchik *et al.*, 2020).

De igual forma, en *Acipenser brevirostrum* el contenido lipídico también varía con la salinidad, disminuyendo en la salinidad de cultivo más alta, 20ppt en comparación con su cultivo en agua dulce (Jarvis y Ballantyne, 2003). Estos resultados están en consonancia con algunos estudios como los de Tseng y Hwang (2008) donde consiguieron demostrar que la tasa metabólica en peces difiere con la salinidad ambiental, siendo menor en condiciones de salinidad isoosmótica, en este caso incrementándose en agua dulce y aún más en ambientes marinos.

En algunas especies, la movilización de lípidos no se relaciona tanto con la distancia al punto isoosmótico sino con la distancia de la salinidad de cultivo a la salinidad óptima de la especie en cuestión. Un ejemplo de esto es *Oreochromis niloticus*, una especie de agua dulce, donde el contenido de LT decreció a medida que la salinidad de cultivo se alejaba de la salinidad de cultivo habitual para esa especie, es decir con el aumento de la salinidad desde 0ppt a 24ppt (Gan *et al.*, 2016).

Generalmente, estos cambios en el contenido de LT suelen venir acompañados de cambios en el porcentaje de humedad, disminuyendo ésta al aumentar el contenido de lípidos (Sushchik *et al.*, 2020). Estas tendencias han sido observadas también en los resultados de este proyecto, en *P. orbignyanus* donde, el mayor contenido de lípidos coincide con la menor humedad de las muestras, aunque no haya diferencias estadísticamente significativas. En un estudio similar, en *Anguilla anguilla*, se encontró que a pesar de observarse cambios en el contenido de lípidos totales en diferentes salinidades de cultivo, éstos no se reflejaron en cambios en el porcentaje de humedad de la muestra (Ghazali *et al.*, 2013). Por otro lado, en un estudio realizado por Sushchik (2020) en el que se compara el perfil lipídico de 7 especies diferentes de salmónidos, procedentes de diferentes niveles tróficos y de salinidad, se observa que existe una correlación negativa entre el contenido de lípidos totales y el porcentaje de humedad, además de una correlación positiva entre el contenido de lípidos totales y la proporción de lípidos neutros.

7. DISCUSIÓN

En todos los tratamientos de salinidad la composición de ácidos grasos obtenida en *P. orbignyanus* es característica de un perfil de AG marino, presentando un alto contenido en LC-PUFA, DHA y EPA. Los AG más representados entre los AG saturados y MUFA fueron el 16:0 y el 18:1n-9. La alta representación de estos AG en el perfil de AG en las muestras de musculatura de *P. orbignyanus* ha sido observada comúnmente en otras especies marinas (*Rajella fyllae*, *Malacoraja senta*, *Alepocephalus bairdii*, *Borostomias antarcticus*, *Bathytroctes macrolepis*, *Lampanyctus spp.*, *Chaulidos sloani*, *Serrivomer beanii*) (Özdemir *et al.*, 2019). Por otro lado, es importante destacar que los AG 16:0 y 22:6n-3 suelen ser los más abundantes particularmente en las fracciones de lípidos polares (Sargent *et al.*, 2003; Özdemir *et al.*, 2019; Sushchik *et al.*, 2020; Tocher, 2003). De hecho, 16:0 y 22:6n-3 suelen encontrarse combinados en fosfolípidos, particularmente fosfoetanolamina y fosfatidilcolina, estando el 16:0 en posición sn1 y el DHA en sn2 (Sargent *et al.*, 2003).

Al finalizar el experimento, el perfil de ácidos grasos estudiado en *P. orbignyanus* reflejó el perfil de ácidos grasos de la dieta. Estos resultados se condicen con estudios similares donde usaron diferentes dietas como factor experimental (Bell *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2018; Magnone *et al.*, 2015b; Shepherd *et al.*, 2017; C J Shepherd and Jackson, 2013). Concretamente, en el perfil de AG de *P. orbignyanus* destaca la alta proporción de sustratos de biosíntesis de LC-PUFA, 18:2n-6 y 18:3n-3, por su elevado contenido en la dieta, así como una menor proporción de EPA y DHA. Otras especies como *Solea senegalensis* (Marrero *et al.*, 2021) y *Lates calcarifer* (Alhazzaa *et al.*, 2011b) demostraron efectos similares, donde cambios en el perfil de AG dietarios tuvieron un efecto sobre el perfil de AG en el músculo de los peces pero no debido a la salinidad de cultivo.

Las variaciones del contenido de PUFA y LC-PUFA en el perfil de ácidos grasos resultante en peces frente a diferentes tratamientos de alimentación se ha visto frecuentemente en estudios de sustitución de materias primas de origen marino, aceite y harina de pescado, por materias primeras de origen vegetal (Lund *et al.*, 2019; Shepherd *et al.*, 2017; Sissener *et al.*, 2020; TurchiniMal *et al.*, 2009).

7. DISCUSIÓN

El efecto de la salinidad puede verse fundamentalmente en los MUFA totales y en algunos AG de manera individual (16:1n-7, 18:1n-9, 18:4n-3, 20:1n-9 y 20:4n-3). Estos AG muestran su mayor proporción en la salinidad 10ppt reduciéndose a medida que nos alejamos del punto isoosmótico del lenguado, hacia las salinidades 2ppt y 26ppt. Este efecto es más pronunciado cuando expresamos la concentración de estos AG en mg de AG /mg peso seco de la muestra. De esta manera, los cambios en la concentración de los diferentes AG se ven influenciados por el contenido de lípidos totales de la muestra en los diferentes tratamientos de salinidad.

Por otro lado, el comportamiento de MUFA en las fracciones de LP y LN es diferente. Los MUFA en LP en *P. orbignyanus* se acumulan en la salinidad más alta sugiriendo que estos AG podrían tener un rol importante en ambientes de salinidad marina, posiblemente en el mantenimiento de la funcionalidad de las membranas. Mientras que en los LN el contenido de MUFA es superior en la salinidad 10 ppt y se reduce hacia las salinidades 2 ppt y 26 ppt. Estos resultados sugieren una adaptación a diferentes salinidades y reflejando la distancia de la salinidad de cultivo al punto isosmótico, situado en 10,9 ppt (Sampaio y Bianchini, 2002). De esta manera, habría una movilización predominante de MUFA en *P. orbignyanus* para la obtención de energía metabólica en LN para cubrir los requerimientos energéticos de osmorregulación en las salinidades 2 ppt, 18 ppt y 26 ppt.

Algunos de los AG afectados por la salinidad en LN (16:1n-7, 18:4n-3, 20:1n-9 y 20:4n-3), siguieron el mismo comportamiento que el contenido total de LN, mostrando mayores proporciones en la salinidad 10 ppt y, disminuyendo hacia las salinidades 2 ppt y 26 ppt. La preferencia sobre el uso de monoeno y polieno, en la obtención de energía metabólica, se ha podido demostrar en *A. brevirostrum*, donde los niveles de estos AG en sangre eran superiores en la salinidad de cultivo de 20ppt, lo que se relacionó con mayores requerimientos energéticos para procesos de osmorregulación (Jarvis y Ballantyne, 2003).

Cuando estudiamos los AG a nivel individual, algunos MUFA tienden a acumularse en 10ppt mientras que otros suelen hacerlo en 26ppt. Estos resultados podrían ser de utilidad para dilucidar el rol que cumple cada uno de ellos en los procesos de adaptación del lenguado a diferentes salinidades. En definitiva, los resultados

7. DISCUSIÓN

observados en *P. orbignyanus* reflejan la eurihalinidad de esta especie y su amplia capacidad de adaptarse a una amplia variedad de ambientes de salinidad.

En relación con la capacidad de biosíntesis de LC-PUFA, si bien se observó un aumento de la expresión génica de *fads2* y *elovl4* de *P. orbignyanus* en la salinidad más baja, el perfil de AG de la musculatura no refleja cambios evidentes en la biosíntesis de LC-PUFA. Este hecho es altamente relevante pues cambios en la composición de AG de la musculatura de los peces tienen un impacto directo en el contenido de EPA y DHA en el pescado como fuente de LC-PUFA en la dieta humana.

El efecto de la salinidad sobre el perfil de AG en relación con la biosíntesis de LC-PUFA presenta resultados dispares entre las diferentes especies estudiadas hasta el día de hoy. En el pez marino/eurihalino *Lates calcarifer*, el efecto de la salinidad fue similar al observado en *P. orbignyanus* debido a que, los cambios en la salinidad de cultivo no se vieron reflejados en el perfil de AG, a pesar de haberse observado un aumento en la expresión génica de *fads2* (Alhazzaa *et al.*, 2011b). Adicionalmente, en otro trabajo publicado por el mismo autor, encontraron que mediante la sustitución de aceite de pescado por aceite vegetal y a diferentes condiciones de salinidad, *Lates calcarifer* no era capaz de cubrir las demandas de EPA y DHA, demostrando su capacidad limitada para bio-convertir LC-PUFA (Alhazzaa *et al.*, 2011a).

Estos resultados contrastan con los observados en *Siganus canaliculatus*. Se trata de un pez marino/eurihalino y herbívoro que contiene el repertorio completo de enzimas *fads2* y *elovl*, en el que se observaron cambios en el perfil de AG por un aumento en la expresión de *fads2* y *elovl5* al reducir la salinidad de cultivo (Li *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2015a). *Pagrus major*, una especie marina que se alimenta fundamentalmente de invertebrados, también experimentó un aumento en la biosíntesis de LC-PUFA que se relacionó con un aumento en la expresión génica de *fads2*. Esto se debió a un efecto conjunto al reducir la salinidad de cultivo de 30ppt a 15ppt y con una sustitución de aceite de pescado por aceite vegetal en la dieta (Sarker *et al.*, 2011).

7. DISCUSIÓN

Sin embargo, los resultados discutidos hasta ahora difieren con los observados en *Chirostoma estor*, una especie de agua dulce y omnívora, donde el aumento de la capacidad de biosíntesis de LC-PUFA se observó al aumentar la salinidad de cultivo desde agua dulce y 5ppt a 15ppt (Fonseca-Madrigal *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en *P. orbignyanus* sugieren que el perfil de AG a nivel de la musculatura no refleja cambios en la biosíntesis de AA, EPA y DHA, en las diferentes condiciones ensayadas, pero sí una adaptación de los AG a los diferentes tratamientos de salinidad. La composición de AG en la musculatura de *P. orbignyanus*, en los peces cultivados a la salinidad 10ppt, mostraron mayores concentraciones de 18:1n-9, LA, ALA, AA, EPA, DHA, SAFA, MUFA y n3 LC-PUFA seguidos de los peces cultivados a 2ppt. Destaca, además una mayor proporción de PUFA C18, LA y ALA, de LT a bajas salinidades, mientras que a altas salinidades tienden a aumentar la proporción de LC-PUFA, EPA, AA y DHA.

Este efecto es más notorio cuando separamos las fracciones de LP y LN. En ambos casos, la proporción de los PUFA, 18:2n-6 y 18:3n-3 se acumulan en la salinidad más baja, 2ppt, aunque el efecto es más acusado en LN. Mientras que la proporción de LC-PUFA, AA, EPA y DHA es más alta hacia la salinidad 26ppt, y se reducen hacia la salinidad 2ppt, reflejando la clásica dicotomía entre ambientes marinos y ambientes de agua dulce. De esta manera, en ambientes de agua dulce *P. orbignyanus* estaría almacenando sustratos de biosíntesis, 18:2n-6 y 18:3n-3, mientras que, en ambientes de agua marina, *P. orbignyanus* acumularía LC-PUFA, EPA, AA y DHA.

Algunos autores, se refieren a esta dicotomía como una separación entre ambientes de agua dulce y marinos. En los ambientes de agua dulce, predomina la influencia de perfiles de ácidos grasos de ambientes terrestres, ricos en AG C18, LA y ALA, mientras que en el ambiente marino predominan los perfiles ricos en LC-PUFA (Colombo *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de separar LP y LN en trabajos donde se usa la salinidad como condición experimental. Esto se puede observar en el análisis de componentes principales (PCA) donde, la proporción de AG de los LN (Fig. 25 dcha) reflejan mejor los cambios de salinidad en los diferentes tratamientos. Mientras que la variabilidad observada en el análisis de PCA en los lípidos polares no se puede explicar por los cambios en la salinidad (Fig. 25 izda). Esto se debe a

7. DISCUSIÓN

que el perfil de AG de los lípidos polares tiende a ser más conservador para mantener la funcionalidad de las membranas. En cualquier caso, el conjunto AG que explican la variabilidad observada de los modelos de PCA tanto en LN como en LP difieren entre sí, sugiriendo que estos AG podrían tener diferentes roles en los LN y en los LP. Sin embargo, los resultados de este trabajo no permiten hacer hincapié en la importancia de estos AG en cada una de las fracciones lipídicas. Es importante tener en cuenta que el efecto del perfil de AG de los LP puede agregar una dispersión al perfil de AG de LT enmascarando el efecto real de la salinidad de cultivo.

Estos resultados sugieren que *P. orbignyanus* experimenta una adaptación a la salinidad posiblemente como producto de la coevolución entre los sistemas de osmorregulación y el perfil dietario. Esta idea ha sido planteada con anterioridad por Komoroske (2016) mediante estudios transcriptómicos. En ellos demuestra que los cambios en la salinidad ambiental en peces desencadenan procesos fisiológicos complejos, los cuales son necesarios en los peces para volver a un estado de homeostasis. Estos cambios tienen su origen a nivel transcriptómico y podrían ser el resultado de la coevolución no solamente de los sistemas de osmorregulación sino de otros procesos relacionados con la disponibilidad de alimentos.

De esta manera, el lenguado muestra una adaptación a ambientes de agua dulce mediante la acumulación de PUFA y el aumento de la expresión génica de *fads2* y *elovl4*, lo cual lo predispone a la biosíntesis de LC-PUFA, mientras que en ambientes marinos predominan los procesos de acumulación de LC-PUFA como resultado de una adaptación a un ambiente naturalmente rico en EPA, AA y DHA. A pesar de observar estos patrones, el efecto de la salinidad en estos AG en LT no es lo suficientemente fuerte como para llegar a observar diferencias estadísticamente significativas.

En *Lates calcarifer* se observaron resultados similares al no encontrarse un efecto evidente de la salinidad sobre el perfil de AG involucrados en la biosíntesis de LC-PUFA (Alhazzaa *et al.*, 2011b). Por otro lado, la salinidad tuvo un efecto en *Alosa sapidissima*, en donde a una salinidad de cultivo de 7 ppt, la acumulación de LA y ALA fue superior, mientras que a una salinidad de 28 ppt se acumularon LC-PUFA, EPA y DHA (Liu *et al.*, 2017). De forma similar, Parzanini (2021) demostró en la anguila, *Anguilla anguilla*, que LA y ALA se acumulaban cuando eran cultivadas en

7. DISCUSIÓN

agua dulce con comparación con aquellas cultivadas en aguas salobres donde se observaba una mayor acumulación de LC-PUFA.

En algunas especies, la acumulación de PUFA y LC-PUFA puede darse diferencialmente según sea el tejido estudiado. En *Pagrus major*, la salinidad no mostró un efecto sobre la biosíntesis de LC-PUFA a nivel del perfil de AG de la musculatura pero sí a nivel hepático mostrando además una interacción entre la salinidad y la dieta (Sarker *et al.*, 2011), llegando a acumular productos de biosíntesis EPA y DHA en salinidades salobres (15 y 20ppt) con valores superiores a los observados a 33ppt.

Por otro lado, los resultados obtenidos en *Lateolabrax japonicus* contrastan con lo visto anteriormente, pues esta especie alimentada con una dieta comercial, experimentó una acumulación de LA, ALA y LC-PUFA en la fracción de lípidos totales a nivel de la musculatura cuando fue cultivada en agua marina, mientras que en el hígado acumuló más LA y ALA cuando fue cultivada en agua dulce (Dong *et al.*, 2020). La alta expresión de *elov15* en la salinidad marina en comparación con el ambiente de agua dulce, podría explicar la acumulación selectiva de PUFA y LC-PUFA a esas salinidades.

Sin duda, la importancia de EPA y DHA se refleja en la perca, *Sander lucioperca*, por la alta capacidad de incorporación de LC-PUFA. Lund *et al.* (2019) demuestra que en esta especie, independientemente de las condiciones de salinidad y dieta, el EPA y ARA son los ácidos grasos que se acumulan en mayor medida con respecto a otros PUFA y LC-PUFA. En definitiva, los resultados observados en la perca sugieren que la salinidad no es un factor ambiental que estimule la conversión de LC-PUFA en esta especie (Lund *et al.*, 2019). El mismo autor también destacó que niveles altos de ácidos grasos dietarios C18 van en detrimento de la acumulación de LC-PUFA (Lund *et al.*, 2019) debido a que diferentes ácidos grasos compiten por las mismas enzimas.

En todos los trabajos mencionados, se estudió la capacidad de biosíntesis de LC-PUFA en diferentes salinidades y perfiles dietarios en base a la composición de AG en LT. En el momento de presentar esta tesis, no se han encontrado referencias bibliográficas en las que se haya estudiado el efecto de la salinidad en interacción con la dieta sobre las fracciones de LP y LN por separado. Precisamente, uno de los hallazgos de este trabajo es que en *P. orbignyanus* el efecto de la salinidad es más

7. DISCUSIÓN

notorio en las fracciones de LP y LN cuando se estudian por separado que en la fracción de LT. De manera que el efecto combinado en ambas fracciones puede llegar a enmascarar el efecto real de la salinidad sobre el perfil de ácidos grasos. El perfil de AG observado en *P. orbignyanus* no permite ver la biosíntesis de LC-PUFA sino una adaptación a diferentes ambientes de salinidad y a un perfil dietario. Por esta razón, con el objetivo de entender la capacidad de un pez para biosintetizar LC-PUFA, es necesario entender la respuesta fisiológica de cada especie a la salinidad de cultivo, el repertorio de genes *fads2* y *elovl*, su expresión y su actividad, además de conocer los patrones de expresión de otros procesos relacionados como la movilización y retención de AG en diferentes tejidos.

8. CONCLUSIONES FINALES

En este proyecto de doctorado se ha estudiado el efecto de la salinidad sobre la biosíntesis de LC-PUFA en *P. orbignyanus* desde un abordaje multidisciplinar. Las conclusiones finales de este trabajo se describen a continuación.

- *Paralichthys orbignyanus* presenta una notable capacidad de adaptación a amplios rangos de salinidad.
- El procedimiento utilizado para el ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático de *Paralichthys orbignyanus*, es útil para la generación de recursos genéticos cuando no se dispone de genoma o transcriptoma de referencia. Su uso es extensible a otras especies de interés.
- De las enzimas involucradas en la biosíntesis de LC-PUFA, el transcriptoma hepático *Paralichthys orbignyanus* reveló la presencia de las enzimas *fads2* y *elovl4*.
- El estudio evolutivo de *fads2* y *elovl4* en *Paralichthys orbignyanus* refleja una alta relación filogenética con *fads2* y *elovl4* de especies relacionadas, particularmente con especies del mismo género *Paralichthys* spp.
- La calidad de las secuencias obtenidas del ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático de *Paralichthys orbignyanus*, permitió diseñar diferentes procedimientos en biología molecular, como sistemas de cuantificación relativa de *fads2* y *elovl* por qPCR, y sistemas para la generación de plásmidos recombinantes con proteínas de interés.
- La expresión génica de *fads2* y *elovl4* en *P. orbignyanus* se ve modulada por la salinidad, aumentando su expresión en la salinidad de cultivo más baja.
- La salinidad de cultivo tiene un efecto sobre el perfil de ácidos grasos de la musculatura, reflejando la adaptación de *P. orbignyanus* a las diferentes condiciones de salinidad de cultivo.
- En las condiciones experimentales ensayadas, las diferencias en la expresión génica de *fads2* y *elovl4* no se ve reflejadas en el perfil de ácidos grasos de la musculatura.

8. CONCLUSIONES FINALES

- El estudio del efecto de la salinidad de cultivo sobre el perfil de AG en peces debe estudiarse en las fracciones de LP y LN por separado. De lo contrario, su efecto puede pasar desapercibido.
- Los lípidos en *P. orbignyanus* tienden a acumularse en el punto isoosmótico para esta especie. Esto se relacionaría con un menor gasto energético en procesos de osmorregulación.
- Los MUFA en *P. orbignyanus* podrían tener un rol importante en la funcionalidad de la membrana debido a su acumulación en LP en la salinidad más alta.
- *P. orbignyanus* presenta una adaptación dicotómica a ambientes de agua dulce y agua marina por cambios en el perfil de AG, particularmente sustratos de biosíntesis, LA y ALA, y LC-PUFA, así como por los patrones de expresión génica de *fads2* y *elovl4*.

9. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado, nos planteamos las siguientes perspectivas a futuro:

1. La generación de recursos genéticos en acuicultura es indispensable para el desarrollo del cultivo de especies nativas que permita diversificar el sector. Por ello, consideramos que es fundamental la obtención de un genoma completo bien anotado de *Paralichthys orbignyanus*.
2. *Paralichthys orbignyanus* es una de las pocas especies de peces eurihalinas conocidas con capacidad para vivir y adaptarse en rangos de salinidad tan amplios, desde agua dulce a agua marina. Se trata pues de una especie que nos puede aportar información de interés aplicable en el sector de la acuicultura, pero también desde un punto de vista fisiológico y nutricional.
3. *P. orbignyanus* posee unas características fisiológicas y bioquímicas que nos hacen replantearnos los requerimientos nutricionales de esta especie. Los resultados obtenidos además ponen de manifiesto la necesidad de estudiar lípidos polares y neutros por separado. Sobre todo, cuando se incluyen factores ambientales como variables de estudio como por ejemplo la salinidad de cultivo.
4. Es necesario poder replicar los estudios desarrollados en este proyecto, incluyendo el efecto de la dieta con diferentes niveles de sustitución de aceite de pescado. De esta manera, podríamos confirmar el efecto de la dieta y la interacción con factores ambientales en la modulación de la biosíntesis de LC-PUFA.
5. Sería necesario confirmar la actividad desaturasa y elongasa de Fads2 y Elovl4 descritas en esta especie mediante su expresión heteróloga en levaduras. En este trabajo ya se ha desarrollado buena parte del procedimiento desde la generación de los productos de PCR hasta la obtención de plásmidos recombinantes transformados en *E. coli*. En los resultados, demostramos la reproducibilidad de los procedimientos desarrollados los cuales serían aplicables en esta y otras especies de interés para el grupo de investigación.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de *P. orbignyanus* para ser producido en acuicultura y el interés que despierta desde un punto de vista de la investigación en áreas de fisiología y nutrición de peces.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M., 2014. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.003>
- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 142, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.08.005>
- Ahmed, N., Thompson, S., 2019. The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Sci. Total Environ.* 652, 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.163>
- Alam, M.S., Watanabe, W.O., Myers, A.R., Rezek, T.C., Carroll, P.M., Skrabal, S.A., 2015. Effects of dietary salt supplementation on growth, body composition, tissue electrolytes, and gill and intestinal Na⁺/K⁺ ATPase activities of black sea bass reared at low salinity. *Aquaculture* 446, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.001>
- Alexander, K.A., Angel, D., Freeman, S., Israel, D., Johansen, J., Kletou, D., Meland, M., Pecorino, D., Rebours, C., Rousou, M., Shorten, M., Potts, T., 2016. Improving sustainability of aquaculture in Europe: Stakeholder dialogues on Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA). *Environ. Sci. Policy* 55, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2015.09.006>
- Alhazzaa, R., Bridle, A.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2011a. Up-regulated desaturase and elongase gene expression promoted accumulation of polyunsaturated fatty acid (PUFA) but not long-chain PUFA in lates calcarifer, a tropical euryhaline fish, fed a stearidonic acid- and γ -linoleic acid-enriched diet. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8423–8434. <https://doi.org/10.1021/jf201871w>
- Alhazzaa, R., Bridle, A.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2011b. Replacing dietary fish oil with Echium oil enriched barramundi with C18 PUFA rather than long-chain PUFA. *Aquaculture* 312, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.023>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ansari, F.A., Guldhe, A., Gupta, S.K., Rawat, I., Bux, F., 2021. Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 43234–43257. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14989-x>
- AOAC, 2006. *Official Methods of Analysis*, 18th Editi. ed. Gaithersburgs, MD.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* 287, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.047>
- Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J., 2009. Lipids in aquatic ecosystems. *Lipids Aquat. Ecosyst.* xv–xx. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2>
- Aruna, A., Nagarajan, G., Chang, C.F., 2015. The acute salinity changes activate the dual pathways of endocrine responses in the brain and pituitary of tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 211, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.005>
- Bao, Y., Shen, Y., Li, X., Wu, Z., Jiao, L., Li, J., Zhou, Q., Jin, M., 2022. A New Insight Into the Underlying Adaptive Strategies of Euryhaline Marine Fish to Low Salinity Environment Through Cholesterol Nutrition to Regulate Physiological Responses. *Front. Nutr.* 9, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.855369>
- Barrington, K., Ridler, N., Chopin, T., Robinson, S., Robinson, B., 2010. Social aspects of the sustainability of integrated multi-trophic aquaculture. *Aquac. Int.* 18, 201–211. <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9236-0>
- Bell, J.G., Ashton, I., Secombes, C.J., Weitzel, B.R., Dick, J.R., Sargent, J.R., 1996. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 54, 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(96\)90013-7](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(96)90013-7)
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid

10. BIBLIOGRAFÍA

- Metabolism. J. Nutr. 131, 1535–1543.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W., Sargent, J.R., 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. *Lipids* 32, 515–525. <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0066-4>
- Belton, B., Little, D.C., Zhang, W., Edwards, P., Skladany, M., Thilsted, S.H., 2020. Farming fish in the sea will not nourish the world. *Nat. Commun.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19679-9>
- Bergé, J., Barnathan, G., 2005. *Marine Biotechnology* 1 96, 49–125. <https://doi.org/10.1007/b135780>
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00164-7)
- Bessonart, M., Salhi, M., 2018. Cultivo del lenguado *Paralichthys orbignyanus*, MGAP-DINARA. MGAP-DINARA, Montevideo.
- Betancor, M.B., Olsen, R.E., Solstorn, D., Skulstad, O.F., Tocher, D.R., 2016. Assessment of a land-locked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) population as a potential genetic resource with a focus on long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.015>
- Betancor, M.B., Ortega, A., de la Gándara, F., Tocher, D.R., Mourente, G., 2017. Lipid metabolism-related gene expression pattern of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) larvae fed on live prey. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 493–516. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0305-4>
- Bhandari, S., Choe, S.K., 2018. The role of a fatty acid chain elongase, *elovl1*, in zebrafish and its implications for kidney disease in humans, *The Molecular Nutrition of Fats*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00019-6>
- Bieberich, E., 2018. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of

10. BIBLIOGRAFÍA

- analysis. Chem. Phys. Lipids 216, 114–131.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003>
- Bitencourt, J.A., Affonso, P.R.A.M., Ramos, R.T.C., Schneider, H., Sampaio, I., 2023. Phylogenetic relationships and the origin of New World soles (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae): The role of estuarine habitats. Mol. Phylogenet. Evol. 178, 107631. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107631>
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O., McCormick, S.D., 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.003>
- Bobé, J., 2015. Egg quality in fish: Present and future challenges. Anim. Front. 5, 66–72. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0010>
- Bœuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 130, 411–423. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00268-X)
- Bolasina, S.N., 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. Aquaculture 313, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.011>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boyd, C.E., 2015. Overview of aquaculture feeds, Feed and Feeding Practices in Aquaculture. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100506-4.00001-5>
- Browdy, C.L., Hulata, G., Liu, Z.J., Allan, G.L., Sommerville, C., Andrade, T.P., Pereira, R., Yarish, C., Shpigel, M., Chopin, T., Robinson, S., Avnimelech, Y., Lovatelli, A., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Bartley, D.M., De Silva, S.S., Halwart, M., Hishamunda, N., Mohan, C. V, Sorgeloos, P., 2013. Novel and emerging technologies: can they contribute to improving aquaculture sustainability? Proc. Glob. Conf. Aquac. 2010. farming waters people food 1, 149–191.
- Burdge, G.C., Calder, P.C., 2005. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain

10. BIBLIOGRAFÍA

- polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 581–597.
<https://doi.org/10.1051/rnd:2005047>
- Calder, P.C., 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 39, 18S–32S.
<https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Calder, P.C., 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 75, 197–202.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.012>
- Calder, P.C., 1999. Dietary fatty acids and the immune system. *Lipids* 34.
<https://doi.org/10.1007/bf02562264>
- Carmona-Antoñanzas, G., Monroig, Ó., Dick, J.R., Davie, A., Tocher, D.R., 2011. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 159, 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.007>
- Carmona-Antoñanzas, G., Tocher, D.R., Taggart, J.B., Leaver, M.J., 2013. An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: Comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon. *BMC Evol. Biol.* 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-85>
- Carruthers, M., Yurchenko, A.A., Augley, J.J., Adams, C.E., Herzyk, P., Elmer, K.R., 2018. De novo transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species. *BMC Genomics* 19, 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4379-x>
- Carvalho, M., Peres, H., Saleh, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Oliva-Teles, A., Izquierdo, M., 2018. Dietary requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for fast growth of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fingerlings. *Aquaculture* 488, 105–113.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.028>
- Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., McQuillan, J.A., 2012. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput

10. BIBLIOGRAFÍA

- sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28, 464–469.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Castro, L.F.C., Monroig, Ó., Leaver, M.J., Wilson, J., Cunha, I., Tocher, D.R., 2012. Functional Desaturase Fads1 ($\Delta 5$) and Fads2 ($\Delta 6$) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates. *PLoS One* 7, e31950.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031950>
- Castro, L.F.C., Tocher, D.R., Monroig, O., 2016. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Prog. Lipid Res.* 62, 25–40.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001>
- Cavallo, A., Peck, L.S., 2020. Lipid storage patterns in marine copepods: environmental , ecological , and intrinsic drivers 77, 1589–1601.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa070>
- Cerqueira, V.R., 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 48, 459–465.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300016>
- Chapkin, R.S., McMurray, D.N., Davidson, L.A., Patil, B.S., Fan, Y.-Y., Lupton, J.R., 2008. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br. J. Nutr.* 100, 1152–1157. <https://doi.org/10.1017/S0007114508992576>
- Christie, William W., 2010. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis.*, Pergamon Press. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2003.00361.x>
- Christie, William W, 2010. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis.*, Pergamon Press. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2003.00361.x>
- Clarke, S.D., 2001. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A the Metabolic Syndrome 1 , 2. *J. Nutrition* 1129–1132.
<https://doi.org/10.3945/an.112.003608.277>
- Colombo, S.M., Wacker, A., Parrish, C.C., Kainz, M.J., Arts, M.T., 2017. A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and

10. BIBLIOGRAFÍA

- within marine and terrestrial ecosystems. *Environ. Rev.* 25, 163–174.
<https://doi.org/10.1139/er-2016-0062>
- Cormier, H., Rudkowska, I., Lemieux, S., Couture, P., Julien, P., Vohl, M.C., 2014. Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: Results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes Nutr.* 9.
<https://doi.org/10.1007/s12263-014-0437-z>
- Da Fonseca, R.R., Albrechtsen, A., Themudo, G.E., Ramos-Madrugal, J., Sibbesen, J.A., Maretty, L., Zepeda-Mendoza, M.L., Campos, P.F., Heller, R., Pereira, R.J., 2016. Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Mar. Genomics* 30, 3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.012>
- De Santis, C., Crampton, V.O., Bicskei, B., Tocher, D.R., 2015. Replacement of dietary soy- with air classified faba bean protein concentrate alters the hepatic transcriptome in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 16, 48–58.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2015.07.005>
- Deák, F., Anderson, R.E., Fessler, J.L., Sherry, D.M., 2019. Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Front. Cell. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00428>
- Denic, V., Weissman, J.S., 2007. A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acid Length. *Cell* 130, 663–677.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.031>
- DINARA, FAO, 2008. Política Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en la República Oriental del Uruguay.
- Dong, X., Tan, P., Cai, Z., Xu, Hanlin, Li, J., Ren, W., Xu, Houguo, Zuo, R., Zhou, J., Mai, K., Ai, Q., 2017. Regulation of FADS2 transcription by SREBP-1 and PPAR- α influences LC-PUFA biosynthesis in fish. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep40024>
- Dong, X., Wang, J., Ji, P., Sun, L., Miao, S., Lei, Y., Du, X., 2020. Seawater Culture Increases Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (N-3 LC-PUFA)

10. BIBLIOGRAFÍA

- Levels in Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*), Probably by Upregulating Elovl5. *Animals* 10, 1681. <https://doi.org/10.3390/ani10091681>
- Dowhan, W., Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., 2016. Functional Roles of Lipids in Membranes, Sixth Edit. ed, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00001-8>
- Escher, P., Wahli, W., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors: Insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 448, 121–138. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00231-6)
- Evans, T.G., Kültz, D., 2020. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* 333, 421–435. <https://doi.org/10.1002/jez.2350>
- FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022, The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. FAO, Rome. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome., Nature and Resources. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO, 2017. Planning for aquaculture diversification: the importance of climate change and other drivers. FAO Technical Workshop, 23–25 June 2016, FAO Rome., FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings No. 47. Rome, FAO.
- Fernandez-López, E., Panzera, Y., Bessonart, M., Marandino, A., Féola, F., Gadea, J., Magnone, L., Salhi, M., 2024. Effect of salinity on fads2 and elovl gene expression and fatty acid profile of the euryhaline flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Aquaculture* 583. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740585>
- Ferraz, R.B., Ozório, R., Salaro, A.L., Castro, L.F.C., Monroig, Ó., Lopes-Marques, M., Machado, A.M., Ribeiro, R.A., Kabeya, N., 2018. A complete enzymatic capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis is present in the Amazonian teleost tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 227, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.09.003>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Fonseca-Madrigal, J., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2006. Nutritional and environmental regulation of the synthesis of highly unsaturated fatty acids and of fatty-acid oxidation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) enterocytes and hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 32, 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9109-2>
- Fonseca-Madrigal, J., Pineda-Delgado, D., Martínez-Palacios, C., Rodríguez, C., Tocher, D.R., 2012. Effect of salinity on the biosynthesis of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in silverside *Chirostoma estor*. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1047–1057. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9589-6>
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Furuita, H., Konishi, K., Takeuchi, T., 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. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00386-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00386-X)
- Gadea, J., 2019. Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados en los juveniles de *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) en agua salobre. Udelar.
- Galindo, A., Garrido, D., Monroig, Pérez, J.A., Betancor, M.B., Acosta, N.G., Kabeya, N., Marrero, M.A., Bolaños, A., Rodríguez, C., 2021. Polyunsaturated fatty acid metabolism in three fish species with different trophic level. *Aquaculture* 530, 735761. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735761>
- Gan, L., Xu, Z.X., Ma, J.J., Xu, C., Wang, X.D., Chen, K., Chen, L.Q., Li, E.C., 2016. Effects of salinity on growth, body composition, muscle fatty acid composition, and antioxidant status of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *J. Appl. Ichthyol.* 32, 372–374. <https://doi.org/10.1111/jai.12997>
- Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M.B., Pérez, J.A., Acosta, N.G., Tocher, D.R., Rodríguez, C., Monroig, Ó., 2019. Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl desaturases occurs independently of the trophic level. *Sci. Rep.* 9, 11199. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47709-0>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Ghazali, N., Boussoufa, D., Navarro, J.C., El Cafsi, M., 2013. Lipid and fatty acid variations in muscle tissues of the “yellow” stage of the European eel (*Anguilla anguilla*) during short-term adaptation to freshwater and seawater under food deprivation. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 45, 385–395. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.774548>
- Gibson, R.N., Veer, R.D.M.N., Geffen, A.J., Der, H.W. Van, 2014. *Flatfishes: Biology and exploitation*. Wiley, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9781118501153>
- Gillard, G., Harvey, T.N., Gjuvsland, A., Jin, Y., Thomassen, M., Lien, S., Leaver, M., Torgersen, J.S., Hvidsten, T.R., Vik, J.O., Sandve, S.R., 2018. Life-stage-associated remodelling of lipid metabolism regulation in Atlantic salmon, *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.14533>
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., 2013. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.03.002>
- Glencross, B., Hawkins, W., Evans, D., Rutherford, N., McCafferty, P., Dods, K., Hauler, R., 2011. A comparison of the effect of diet extrusion or screw-press pelleting on the digestibility of grain protein products when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 312, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.025>
- Gong, Y., Wan, X., Jiang, M., Hu, C., Hu, H., Huang, F., 2014. Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 56, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.07.001>
- Gostinčar, C., Turk, M., Gunde-Cimerman, N., 2010. The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes. *J. Membr. Biol.* 233, 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9225-x>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Harmon, T.S., 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Rev. Aquac.* 1, 58–66. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R., Teale, A.J., 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14304–14309. <https://doi.org/10.1073/pnas.251516598>
- Hastings, N., Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from ??-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Biotechnol.* 6, 463–474. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3002-8>
- Hixson, S.M., 2014. Fish Nutrition and Current Issues in Aquaculture: The Balance in Providing Safe and Nutritious Seafood, in an Environmentally Sustainable Manner. *J. Aquac. Res. Dev.* 03. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000234>
- Hu, Y.C., Kang, C.K., Tang, C.H., Lee, T.H., 2015a. Transcriptomic analysis of metabolic pathways in milkfish that respond to salinity and temperature changes. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134959>
- Hu, Y.C., Kang, C.K., Tang, C.H., Lee, T.H., 2015b. Transcriptomic analysis of metabolic pathways in milkfish that respond to salinity and temperature changes. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134959>
- Huggett, J.F., O'Grady, J., Bustin, S., 2015. QPCR, dPCR, NGS - A journey. *Biomol. Detect. Quantif.* 3, A1–A5. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.001>
- Iverson, S.J., 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination, in: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 281–308. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_12
- Jarvis, P.L., Ballantyne, J.S., 2003. Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum*. *Aquaculture* 219, 891–909. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00063-2)

10. BIBLIOGRAFÍA

- Jastrzebska, B., Debinski, A., Filipek, S., Palczewski, K., 2011. Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function. *Prog. Lipid Res.* 50, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.03.002>
- Jeffries, K.M., Connon, R.E., Verhille, C.E., Dabruzzi, T.F., Britton, M.T., Durbin-Johnson, B.P., Fangue, N.A., 2019. Divergent transcriptomic signatures in response to salinity exposure in two populations of an estuarine fish. *Evol. Appl.* 12, 1212–1226. <https://doi.org/10.1111/eva.12799>
- Jobling, M., 2016. Fish nutrition research: past, present and future. *Aquac. Int.* 24, 767–786. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8, 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Juaneda, P., Rocquelin, G., 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20, 40–41. <https://doi.org/10.1007/BF02534360>
- Kabeya, N., Chiba, M., Haga, Y., Satoh, S., Yoshizaki, G., 2017. Cloning and functional characterization of fads2 desaturase and elovl5 elongase from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 214, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.002>
- Kabeya, N., Yevzelman, S., Oboh, A., Tocher, D.R., Monroig, O., 2018. Essential fatty acid metabolism and requirements of the cleaner fish, ballan wrasse *Labrus bergylta*: Defining pathways of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Aquaculture* 488, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.039>
- Kihara, A., 2012. Very long-chain fatty acids: Elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.* 152, 387–395. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>
- Kitessa, S.M., Abeywardena, M., Wijesundera, C., Nichols, P.D., 2014. DHA-containing oilseed: A timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. *Nutrients* 6, 2035–2058. <https://doi.org/10.3390/nu6052035>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Klug, L., Daum, G., 2014. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 14, 369–388. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>
- Komoroske, L.M., Jeffries, K.M., Connon, R.E., Dexter, J., Hasenbein, M., Verhille, C., Fangué, N.A., 2016. Sublethal salinity stress contributes to habitat limitation in an endangered estuarine fish. *Evol. Appl.* 9, 963–981. <https://doi.org/10.1111/eva.12385>
- Kuah, M.-K., Jaya-Ram, A., Shu-Chien, A.C., 2015. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: Functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa stri.* *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.012>
- Kültz, D., 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J. Exp. Biol.* 218, 1907–1914. <https://doi.org/10.1242/jeb.118695>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Lam, T.J., 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish, *Fish Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60302-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60302-7)
- Leaver, M.J., Ezaz, M.T., Fontagne, S., Tocher, D.R., Boukouvala, E., Krey, G., 2007. Multiple peroxisome proliferator-activated receptor beta subtypes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Mol. Endocrinol.* 38, 391–400. <https://doi.org/10.1677/JME-06-0043>
- Lee, A.G., 1998. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: The case of the calcium pump. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1376, 381–390. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(98\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00010-0)
- Letunic, I., Bork, P., 2021. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, F.D., Tong, W., Xia, E.H., Wei, C.L., 2019. Optimized sequencing depth and de novo

10. BIBLIOGRAFÍA

- assembler for deeply reconstructing the transcriptome of the tea plant, an economically important plant species. *BMC Bioinformatics* 20, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3166-x>
- Li, X., Shen, Y., Bao, Y., Wu, Z., Yang, B., Jiao, L., Zhang, C., Tocher, D.R., Zhou, Q., Jin, M., 2022. Physiological responses and adaptive strategies to acute low-salinity environmental stress of the euryhaline marine fish black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture* 554. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738117>
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J.R., You, C., Tocher, D.R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with Δ^4 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16840–16845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008429107>
- Li, Y. you, Hu, C. bo, Zheng, Y. jun, Xia, X. an, Xu, W. ju, Wang, S. qi, Chen, W. zhou, Sun, Z. wei, Huang, J. hui, bo Hu, C., jun Zheng, Y., an Xia, X., ju Xu, W., qi Wang, S., zhou Chen, W., wei Sun, Z., hui Huang, J., Li, Y. you, Hu, C. bo, Zheng, Y. jun, Xia, X. an, Xu, W. ju, Wang, S. qi, Chen, W. zhou, Sun, Z. wei, Huang, J. hui, 2008. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and Δ^6 -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 151, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.013>
- Li, Y., Zhao, J., Dong, Y., Yin, Z., Li, Yang, Liu, Y., You, C., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Wang, S., 2019. Sp1 is involved in vertebrate LC-PUFA biosynthesis by upregulating the expression of liver desaturase and elongase genes. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205066>
- Lim, Z.L., Senger, T., Vrinten, P., 2014. Four amino acid residues influence the substrate chain-length and regioselectivity of *Siganus canaliculatus* δ^4 and $\delta^5/6$ desaturases. *Lipids* 49, 357–367. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3880-0>
- Little, D.C., Newton, R.W., Beveridge, M.C.M., 2016. Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proc. Nutr. Soc.* 75, 274–286. <https://doi.org/10.1017/s0029665116000665>
- Liu, Z.F., Gao, X.Q., Yu, J.X., Qian, X.M., Xue, G.P., Zhang, Q.Y., Liu, B.L., Hong, L., 2017.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Effects of different salinities on growth performance, survival, digestive enzyme activity, immune response, and muscle fatty acid composition in juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish Physiol. Biochem.* 43, 761–773. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0330-3>
- Lopes-Marques, M., Ozório, R., Amaral, R., Tocher, D.R., Monroig, Ó., Castro, L.F.C., 2017. Molecular and functional characterization of a fads2 orthologue in the Amazonian teleost, *Arapaima gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 203, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.09.007>
- López Alonso, D., García-Maroto, F., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido, J.A., Vilches, M.A., 2003. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1111–1124. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00041-3)
- López, A. V, Müller, M.I., Radonić, M., Bambill, G.A., Boccanfuso, J.J., Bianca, F.A., 2009. Larval culture technique and quality control in juveniles of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes , 1839) in Argentina. *Water* 7, 75–82. <https://doi.org/10.5424/400>
- Lund, I., Rodríguez, C., Izquierdo, M.S., El Kertaoui, N., Kestemont, P., Reis, D.B., Dominguez, D., Pérez, J.A., 2019. Influence of salinity and linoleic or α -linolenic acid based diets on ontogenetic development and metabolism of unsaturated fatty acids in pike perch larvae (*Sander lucioperca*). *Aquaculture* 500, 550–561. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.061>
- Luo, J., Monroig, Ó., Liao, K., Ribes-Navarro, A., Navarro, J.C., Zhu, T., Li, J., Xue, L., Zhou, Q., Jin, M., 2021. Biosynthesis of LC-PUFAs and VLC-PUFAs in *Pampus argenteus*: Characterization of Elov14 Elongases and Regulation under Acute Salinity. *J. Agric. Food Chem.* 69, 932–944. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06277>
- Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* 12, 361–379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>
- Magnone, L., Bessonart, M., Gadea, J., Salhi, M., 2015a. Trophic relationships in an estuarine environment: A quantitative fatty acid analysis signature approach. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 166, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.033>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Magnone, L., Bessonart, M., Rocamora, M., Gadea, J., Salhi, M., 2015b. Diet estimation of *Paralichthys orbignyanus* in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 462, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.10.008>
- March, B.E., 1993. Essential fatty acids in fish physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 684–689. <https://doi.org/10.1139/y93-102>
- Marquardt, A., Stöhr, H., White, K., Weber, B.H.F., 2000. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* 66, 175–183. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6196>
- Marrero, M., Monroig, Ó., Betancor, M., Herrera, M., Pérez, J.A., Garrido, D., Galindo, A., Giráldez, I., Rodríguez, C., 2021. Influence of dietary lipids and environmental salinity on the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis capacity of the marine teleost solea senegalensis. *Mar. Drugs* 19. <https://doi.org/10.3390/md19050254>
- Marrero, M., Monroig, Ó., Pérez, J.A., Betancor, M.B., Galindo, A., Bolaños, A., Acosta, N.G., Rodríguez, C., 2024. Dietary LC-PUFA and environmental salinity modulate the fatty acid biosynthesis capacity of the euryhaline teleost thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 269. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110865>
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, J.C., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G., 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.032>
- Matsushita, Y., Miyoshi, K., Kabeya, N., Sanada, S., Yazawa, R., Haga, Y., Satoh, S., Yamamoto, Y., Strüssmann, C.A., Luckenbach, J.A., Yoshizaki, G., 2020. Flatfishes colonised freshwater environments by acquisition of various DHA biosynthetic pathways. *Commun. Biol.* 3, 4–5. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01242-3>
- McGrath, C.L., Lynch, M., 2012. Evolutionary significance of Whole-Genome

10. BIBLIOGRAFÍA

- Duplication, in: Polyploidy and Genome Evolution. pp. 1–415.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-31442-1>
- Meesapyodsuk, D., Qiu, X., 2012. The front-end desaturase: Structure, function, evolution and biotechnological use. *Lipids* 47, 227–237.
<https://doi.org/10.1007/s11745-011-3617-2>
- Miles, E.A., Childs, C.E., Calder, P.C., 2021. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and the developing immune system: A narrative review. *Nutrients* 13, 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu13010247>
- Miller, M.A., Schwartz, T., Pickett, B.E., He, S., Klem, E.B., Scheuermann, R.H., Passarotti, M., Kaufman, S., Oleary, M.A., 2015. A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. *Evol. Bioinforma.* 11, 43–48.
<https://doi.org/10.4137/EBO.S21501>
- Miller, M.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2008. N-3 Oil sources for use in aquaculture alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutr. Res. Rev.* 21, 85–96.
<https://doi.org/10.1017/S0954422408102414>
- Monroig, Ó., Li, Y., Tocher, D.R., 2011a. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: High activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 159, 206–213.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.04.007>
- Monroig, Ó., Lopes-Marques, M., Navarro, J.C., Hontoria, F., Ruivo, R., Santos, M.M., Venkatesh, B., Tocher, D.R., C. Castro, L.F., 2016. Evolutionary functional elaboration of the Elovl2/5 gene family in chordates. *Sci. Rep.* 6, 20510.
<https://doi.org/10.1038/srep20510>
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Tocher, D.R., 2011b. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Fish: Recent Advances on Desaturases and Elongases Involved in Their Biosynthesis. *Av. en Nutr. Acuícola XI - Memorias del Décimo Prim. Simp. Int. Nutr. Acuícola*, 23-25 Noviembre, San Nicolás los Garza, N. L., México. 257–283.
- Monroig, Ó., Zheng, X., Morais, S., Leaver, M.J., Taggart, J.B., Tocher, D.R., 2010. Multiple genes for functional 6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue

10. BIBLIOGRAFÍA

- distribution and nutritional regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.04.007>
- Morais, S., Mourente, G., Martínez, A., Gras, N.N., Tocher, D.R., Martínez, A., Gras, N.N., Tocher, D.R., 2015. Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.014>
- Morais, S., Torres, M., Hontoria, F., Monroig, Ó., Varó, I., Agulleiro, M.J., Navarro, J.C., 2020. Molecular and functional characterization of *elovl4* genes in *Sparus aurata* and *Solea senegalensis* pointing to a critical role in very long-chain (>C24) fatty acid synthesis during early neural development of fish. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21103514>
- Muir, P., Li, S., Lou, S., Wang, D., Spakowicz, D.J., Salichos, L., Zhang, J., Weinstock, G.M., Isaacs, F., Rozowsky, J., Gerstein, M., 2016. The real cost of sequencing: scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biol.* 17, 53. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0917-0>
- Munroe, T.A., 2015. Systematic diversity of the Pleuronectiformes, in: *Flatfishes: Biology and Exploitation*. pp. 13–51. <https://doi.org/10.1002/9781118501153.ch2>
- Na-Ranong, S., Laoteng, K., Kittakoop, P., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S., 2006. Targeted mutagenesis of a fatty acid $\Delta 6$ -desaturase from *Mucor rouxii*: Role of amino acid residues adjacent to histidine-rich motif II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1029–1034. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.115>
- Nelson, J. S., Terry C. G., M.V.H.W., 2016. *Fishes of The World, Systematic Zoology*.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2021. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th ed. W.H. Freeman.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger. Principles of Biochemistry*, Sixth. ed. W.H. Freeman and Company.
- Nemova, N.N., Nefedova, Z.A., Murzina, S.A., Veselov, A.E., Ripatti, P.O., Pavlov, D.S., 2015. The effect of environmental conditions on the dynamics of fatty acids in

10. BIBLIOGRAFÍA

- juveniles of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Russ. J. Ecol. 46, 267–271.
<https://doi.org/10.1134/S106741361503008X>
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S. a, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat. Protoc. 1, 1559–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Norbis, W., Galli, O., 2004. Feeding habits of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. Ciencias Mar. 30, 619–626.
- O'Shea, T.O., Jones, R., Waters, T., Scott, J., Markham, A., 2019. Towards a blue revolution: Catalyzing Private Investment in Sustainable Aquaculture Production Systems. The Nature Conservancy and Encourage Capital.
- Overton, J.L., Bayley, M., Paulsen, H., Wang, T., 2008. Salinity tolerance of cultured Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L.: Effects on growth and on survival as a function of temperature. Aquaculture 277, 282–286.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.029>
- Panserat, S., Marandel, L., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2018. New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts. Annu. Rev. Anim. Biosci. 7, 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115250>
- Parmentier, M., Al Sayed Mahmoud, C., Linder, M., Fanni, J., 2007. Polar lipids: n-3 PUFA carriers for membranes and brain: Nutritional interest and emerging processes. OCL - Ol. Corps Gras Lipides 14, 224–229.
<https://doi.org/10.1684/ocl.2007.0127>
- Parrish, C.C., Wacker, A., Colombo, S.M., Arts, M.T., Kainz, M.J., 2016. A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. Environ. Rev. 25, 163–174.
<https://doi.org/10.1139/er-2016-0062>
- Parzanini, C., Arts, M.T., Rohtla, M., Koprivnikar, J., Power, M., Skiftesvik, A.B., Browman, H.I., Milotic, D., Durif, C.M.F., 2021. Feeding habitat and silvering stage affect lipid content and fatty acid composition of European eel *Anguilla anguilla* tissues. J. Fish Biol. <https://doi.org/10.1111/jfb.14815>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Patterson, J., Carpenter, E.J., Zhu, Z., An, D., Liang, X., Geng, C., Drmanac, R., Wong, G.K.S., 2019. Impact of sequencing depth and technology on de novo RNA-Seq assembly. *BMC Genomics* 20, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5965-x>
- Peng, S., Yue, Y., Gao, Q., Shi, Z., Yin, F., Wang, J., 2014. Influence of dietary n-3 LC-PUFA on growth, nutritional composition and immune function in marine fish *Sebastiscus marmoratus*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 32, 1000–1008. <https://doi.org/10.1007/s00343-014-3312-2>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín Del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 176, 441–452. <https://doi.org/10.1007/s00360-006-0065-z>
- Price, E.R., Valencak, T.G., 2012. Changes in Fatty Acid Composition During Starvation in Vertebrates: Mechanisms and Questions, in: *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 237–255. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29056-5_15
- Querques, G., Forte, R., Souied, E.H., 2011. Retina and omega-3. *J. Nutr. Metab.* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/748361>
- Quinn, P.J., Joo, F., Vigh, L., 1989. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 53, 71–103. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(89\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0079-6107(89)90015-1)
- Rabosky, D.L., 2020. Speciation rate and the diversity of fishes in freshwaters and the oceans. *J. Biogeogr.* 47, 1207–1217. <https://doi.org/10.1111/jbi.13839>
- Rabosky, D.L., Chang, J., Title, P.O., Cowman, P.F., Sallan, L., Friedman, M., Kaschner, K., Garilao, C., Near, T.J., Coll, M., Alfaro, M.E., 2018. An inverse latitudinal gradient in speciation rate for marine fishes. *Nature* 559, 392–395.

10. BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0273-1>

- Raghunathan, K., Kenworthy, A.K., 2018. Dynamic pattern generation in cell membranes: Current insights into membrane organization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860, 2018–2031. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.002>
- Raj, A., van Oudenaarden, A., Batey, R.T., Zhang, Q., You, C., Liu, F., Zhu, W., Wang, S., Xie, D., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., Finotello, F., Di Camillo, B., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroja, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T.C., Vázquez-Martínez, R., González-García, I., Roa, J., Whittle, A.J., Gomez-Santos, B., Velagapudi, V., Tung, Y.C.L., Morgan, D.A., Voshol, P.J., Martínez de Morentin, P.B., López-González, T., Liñares-Pose, L., Gonzalez, F., Chatterjee, K., Sobrino, T., Medina-Gómez, G., Davis, R.J., Casals, N., Orešič, M., Coll, A.P., Vidal-Puig, A., Mittag, J., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., Diéguez, C., Martínez-Chantar, M.L., Aspichueta, P., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Sabio, G., Villarroja, F., López, M., Gregory, M.K., Collins, R.O., Tocher, D.R., James, M.J., Turchini, G.M., Haraldsson, G., Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D., Shepherd, C.J., Jackson, A.J., Jin, M., Monroig, Ó., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Zhou, Q.C., Oboh, A., Betancor, M.B., Tocher, D.R., Monroig, O., Carmona-Antoñanzas, G., Zheng, X., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Sprague, M., Betancor, M.B., Tocher, D.R., Shendure, J., Ji, H., Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., Nara, T.Y., He, W.S., Tang, C., Clarke, S.D., Nakamura, M.T., Ichihara, K., Fukubayashi, Y., Li, S.S., Monroig, Ó., Wang, T., Yuan, Y., Carlos Navarro, J., Hontoria, F., Liao, K., Tocher, D.R., Mai, K., Xu, W., Ai, Q., Sampaio, L.A., Bianchini, A., Invitrogen, Notice, C., Juan, S., Uemura, H., Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z.J.Z.J., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S., Qi, L.S., Head, S., Komori, K., LaMere, S., Whisenant, T., et al., Castellano, M., Silva-Álvarez, V., Fernández-López, E., Mauris, V., Conijeski, D., Villarino, A., Ferreira, A.M., de Kroon, A.I.P.M., Simon-Loriere, E., Holmes, E.C., Lazard, J., Rey-Valette, H., Aubin, J., Mathé, S.,

10. BIBLIOGRAFÍA

Chia, E., Caruso, D., Mikolasek, O., Blancheton, J.P., Legendre, M., René, F., Levang, P., Slembrouck, J., Morissens, P., Clément, O., Kabeya, N., Chiba, M., Haga, Y., Satoh, S., Yoshizaki, G., Ytrestøyl, T., Aas, T.S., Åsgård, T., Huang, Y., Lin, Z., Rong, H., Hao, M., Zou, W., Li, S.S., Wen, X., Promega, Newton, R., Telfer, T., Little, D., Browdy, C.L., Hulata, G., Liu, Z.J.Z.J., Allan, G.L., Sommerville, C., Andrade, T.P., Pereira, R., Yarish, C., Shpigel, M., Chopin, T., Robinson, S., Avnimelech, Y., Lovatelli, A., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Bartley, D.M., De Silva, S.S., Halwart, M., Hishamunda, N., Mohan, C. V, Sorgeloos, P., Laouar, L., Lowe, K.C., Mulligan, B.J., Sambrook, J., Russel, D.W., Houston, S.J.S., Karalazos, V., Tinsley, J., Betancor, M.B., Martin, S.A.M., Tocher, D.R., Monroig, O., Invitrogen, Clark, D.P., Pazdernik, N.J., Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Romarheim, O.H., Hatlen, B., Leeuwis, R., Venegas, C., Ruyter, B., Research Gate, Betancor, M.B., Ortega, A., de la Gándara, F., Tocher, D.R., Mourente, G., Primers, O., Zhang, Q., You, C., Wang, S., Dong, Y., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., Sampaio, L.A., Bianchini, A., Obermeyer, T., Fraisl, P., Dirusso, C.C., Black, P.N., Birol, I., Jackman, S.D., Nielsen, C.B., Qian, J.Q., Varhol, R., Stazyk, G., Morin, R.D., Zhao, Y., Hirst, M., Schein, J.E., Horsman, D.E., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., Jones, S.J.M., Grillitsch, K., Connerth, M., Köfeler, H., Arrey, T.N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M., Daum, G., Li, S.S., Mai, K., Xu, W., Yuan, Y., Zhang, Y.Y., Ai, Q., Dong, X., Tan, P., Cai, Z., Xu, H.H., Li, J., Ren, W., Xu, H.H., Zuo, R., Zhou, J., Mai, K., Ai, Q., Li, E., Mira De Orduña, R., Mueller, O., Schroeder, A., Garay, L.A., Sitepu, I.R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., German, J.B., Fiehn, O., Boundy-Mills, K.L., Oboh, A., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Monroig, O., Kaushik Troel, Max, S., Vanherle, B., Timmer, E., Wackers, P., Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A., Gelfand, M.S., Wang, S., Liu, X., Xu, S., Wu, Q., You, C., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., Hyde, D., Zhao, S., Zhang, B., Zhang, Y.Y., Gordon, W., Du, S., Paradis, T., Vincent, M., Von Schack, D., Kucuktas, H., Liu, Z.J.Z.J., Aranda, P.S., LaJoie, D.M., Jorcyk, C.L., Zou, Z., Tong, F., Færgeman, N.J., Børsting, C., Black, P.N., Dirusso, C.C., Cermak, S.C., Evangelista, R.L., Kenar, J. a, Eisenberg, T., B??ttner, S., Oboh, A., Kabeya, N., Carmona-Antoñanzas, G., Castro, L.F.C., Dick, J.R., Tocher, D.R., Monroig, O., Dong, Y., Zhao, J., Chen, J., Wang, S., Liu, Y., Zhang, Q., You, C., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Allan, G.L., El-Sayed, A.-F.M., Jackson, A.J., Kaushik, S.J., Ng, W.-K., Suresh, V., Viana, M.T., SI, G., D, M.,

10. BIBLIOGRAFÍA

- [illegible]

10. BIBLIOGRAFÍA

- in combination with *Artemia* nauplii. *Aquac. Res.* 44, 41–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03004.x>
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 269, 187–196. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00395-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00395-1)
- Sampaio, Luís A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R. V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.046>
- Sampaio, Luís A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R. V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.046>
- SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2003. The Lipids, in: *Fish Nutrition*. Elsevier, pp. 181–257. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50005-7>
- Sarker, M.A.A., Yamamoto, Y., Haga, Y., Sarker, M.S.A., Miwa, M., Yoshizaki, G., Satoh, S., 2011. Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 77, 385–396. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0342-y>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Scott, G.R., Brix, K. V., 2013. Evolution of salinity tolerance from transcriptome to physiological system. *Mol. Ecol.* 22, 3656–3658. <https://doi.org/10.1111/mec.12372>
- Şen Özdemir, N., Parrish, C.C., Parzanini, C., Mercier, A., 2019. Neutral and polar lipid fatty acids in five families of demersal and pelagic fish from the deep Northwest

10. BIBLIOGRAFÍA

- Atlantic. ICES J. Mar. Sci. 76, 1807–1815.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsz054>
- Shanklin, J., Cahoon, E.B., 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. Annu. Rev. Plant Biol. 49, 611–641.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.611>
- Shanklin, J., Guy, J.E., Mishra, G., Lindqvist, Y., 2009. Desaturases: Emerging models for understanding functional diversification of diiron-containing enzymes. J. Biol. Chem. 284, 18559–18563. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900009200>
- Shepherd, C. J., Jackson, A.J., 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: Inputs, outputs and marketsa. J. Fish Biol. 83, 1046–1066.
<https://doi.org/10.1111/jfb.12224>
- Shepherd, C J, Jackson, A.J., 2013. Global fishmeal and fish-oil supply : inputs , outputs and 2012, 1046–1066. <https://doi.org/10.1111/jfb.12224>
- Shepherd, C.J., Monroig, O., Tocher, D.R., 2017. Future availability of raw materials for salmon feeds and supply chain implications: The case of Scottish farmed salmon. Aquaculture 467, 49–62.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.021>
- Shi, H., Wu, R., Zheng, Y., Yue, X., 2018. Molecular mechanisms underlying catalytic activity of delta 6 desaturase from *Glossomastix chrysoplasta* and *Thalassiosira pseudonana*. J. Lipid Res. 59, 79–88. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079806>
- Si, Y., Wen, H., Li, Y., He, F., Li, J., Li, S., He, H., 2018. Liver transcriptome analysis reveals extensive transcriptional plasticity during acclimation to low salinity in *Cynoglossus semilaevis*. BMC Genomics 19, 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4825-4>
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed. Pharmacother. 56, 365–379.
[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Simopoulos, A.P., 2000. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. Poult. Sci. 79, 961–970. <https://doi.org/10.1093/ps/79.7.961>
- Sissener, N.H., Araujo, P., Sæle, Rosenlund, G., Stubhaug, I., Sanden, M., 2020. Dietary

10. BIBLIOGRAFÍA

- 18:2n-6 affects EPA (20:5n-3) and ARA (20:4n-6) content in cell membranes and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 522, 735098. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735098>
- Strüssmann, C.A., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 13–29. <https://doi.org/10.1023/A:1023343023556>
- Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., Rudchenko, A.E., Glushchenko, L.A., Shulepina, S.P., Kolmakova, A.A., Gladyshev, M.I., 2020. Comparison of fatty acid contents in major lipid classes of seven salmonid species from Siberian Arctic Lakes. *Biomolecules* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom10030419>
- Sylvia, G., 1997. Generating information for aquaculture development: The art and science of economic policy modelling. *Aquac. Econ. Manag.* 1, 87–98. <https://doi.org/10.1080/13657309709380205>
- Tacon, A.G.J., Lemos, D., Metian, M., 2020. Fish for Health: Improved Nutritional Quality of Cultured Fish for Human Consumption. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 0, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1762163>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2013. Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Rev. Fish. Sci.* 21, 22–38. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., McNevin, A.A., 2022. Future Feeds: Suggested Guidelines for Sustainable Development. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 30, 135–142. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1860474>
- Thanh, N.M., Jung, H., Lyons, R.E., Chand, V., Tuan, N.V., Thu, V.T.M., Mather, P., 2014. A transcriptomic analysis of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in response to salinity adaptation: De novo assembly, gene annotation and marker discovery. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 10, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.04.001>
- Tocher, D., Betancor, M., Sprague, M., Olsen, R., Napier, J., 2019. Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, EPA and DHA: Bridging the Gap between Supply and Demand. *Nutrients* 11, 89. <https://doi.org/10.3390/nu11010089>

10. BIBLIOGRAFÍA

- Tocher, Douglas R, 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>
- Tocher, Douglas R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 41, 717–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
- Toni, M., 2017. Variation in Environmental Parameters in Research and Aquaculture: Effects on Behaviour, Physiology and Cell Biology of Teleost Fish. *J. Aquac. Mar. Biol.* 5. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.05.00137>
- Torres, M., Navarro, J.C., Varó, I., Monroig, Hontoria, F., 2020. Nutritional regulation of genes responsible for long-chain (C20-24) and very long-chain (>C24) polyunsaturated fatty acid biosynthesis in post-larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 525, 735314. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735314>
- Tseng, Y.C., Hwang, P.P., 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 148, 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Turchini, G.M., Trushenski, J.T., Glencross, B.D., 2019. Thoughts for the Future of Aquaculture Nutrition: Realigning Perspectives to Reflect Contemporary Issues Related to Judicious Use of Marine Resources in Aquafeeds. *N. Am. J. Aquac.* 81, 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- TurchiniMal, G.M.G.M., Torstensen, B.E., Ng, W., d Wing-Keong, 2009. Fish oil

10. BIBLIOGRAFÍA

- replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–57.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vargas-Chacoff, L., Moneva, F., Oyarzún, R., Martínez, D., Saavedra, E., Ruiz-Jarabo, I., Muñoz, J.L.P., Bertrán, C., Mancera, J.M., 2016. Metabolic responses to salinity changes in the subantarctic notothenioid teleost *Eleginops maclovinus*. *Polar Biol.* 39, 1297–1308. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1854-1>
- Wang, H., Klein, M.G., Zou, H., Lane, W., Snell, G., Levin, I., Li, K., Sang, B.C., 2015. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 581–585. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3049>
- Wang, S., Monroig, Ó., Tang, G., Zhang, L., You, C., Tocher, D.R., Li, Y., 2014. Investigating long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish: Functional characterization of fatty acyl desaturase (Fads2) and Elovl5 elongase in the catadromous species, Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 434, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.016>
- White, C.A., Woodcock, S.H., Bannister, R.J., Nichols, P.D., 2019. Terrestrial fatty acids as tracers of finfish aquaculture waste in the marine environment. *Rev. Aquac.* 11, 133–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12230>
- Xie, D., Chen, C., Dong, Y., You, C., Wang, S., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., 2021. Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish. *Prog. Lipid Res.* 82. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101095>
- Xie, D., Chen, F., Lin, S., You, C., Wang, S., Zhang, Q., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., 2016. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the euryhaline herbivorous teleost *Scatophagus argus*: Functional characterization, tissue expression and nutritional regulation of two fatty acyl elongases. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 198, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.03.009>
- Xie, D., Liu, X., Wang, S., You, C., Li, Y., 2018. Effects of dietary LNA/LA ratios on

10. BIBLIOGRAFÍA

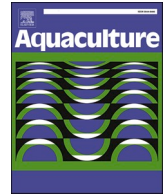
- growth performance, fatty acid composition and expression levels of *elovl5*, $\Delta 4$ fad and $\Delta 6/\Delta 5$ fad in the marine teleost *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture* 484, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.039>
- Xie, D., Wang, S., You, C., Chen, F., Tocher, D.R., Li, Y., 2015a. Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. *Aquac. Nutr.* 21, 541–551. <https://doi.org/10.1111/anu.12178>
- Xie, D., Wang, S., You, C., Chen, F., Tocher, D.R., Li, Y., 2015b. Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. *Aquac. Nutr.* 21, 541–551. <https://doi.org/10.1111/anu.12178>
- Xu, Z., Gan, L., Li, T., Xu, C., Chen, K., Wang, X., Qin, J.G., Chen, L., Li, E., 2015. Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *PLoS One* 10, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136506>
- Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodríguez, L., Blázquez, M., Ramos, J., Piferrer, F., 2001. Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 202, 187–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00771-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00771-2)
- Zárate, R., Vazdekis, J., Tejera, N., Pérez, J.A., Rodríguez, C., 2017. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>
- Zhang, L.-S., Liang, S., Zong, M.-H., Yang, J.-G., Lou, W.-Y., 2020. Microbial synthesis of functional odd-chain fatty acids: a review. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 35. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02814-5>
- Zhang, X., Wen, H., Wang, H., Ren, Y., Zhao, J., Li, Y., 2017. RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *PLoS One* 12, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173238>
- Zhao, N., Monroig, Ó., Navarro, J.C., Xiang, X., Li, Y., Du, J., Li, J., Xu, W., Mai, K., Ai, Q.,

10. BIBLIOGRAFÍA

2019. Molecular cloning, functional characterization and nutritional regulation of two elovl4b elongases from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 511, 734221. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734221>
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Delta6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 269–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.08.003>

ANEXO

Artículo científico publicado en revista arbitrada



Effect of salinity on *fads2* and *elovl* gene expression and fatty acid profile of the euryhaline flatfish *Paralichthys orbignyanus*

E. Fernandez-López^{a,*}, Y. Panzera^b, M. Bessonart^{a,*}, A. Marandino^b, F. Féola^a, J. Gadea^a, L. Magnone^a, M. Salhi^a

^a Laboratorio de Recursos Naturales, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:
Eurihalinity
Flatfish
LC-PUFA
fads2
elovl
RNA-Seq

ABSTRACT

Paralichthys orbignyanus, a commercially important flatfish, presents in its natural environment, significant variations in salinity and fatty acid composition of its diet. In this work, we aimed to study the impact of salinity on the genetic expression of *fads2* and *elovl* and its reflection in the muscle fatty acid profile of the fish. Since genetic resources for this species are absent, we performed hepatic transcriptome sequencing (mRNA-Seq) and conducted *de novo* assembly to obtain the novel transcripts of *fads2* and *elovl*. The sequences obtained were used to analyze possible changes in the genetic expression of these enzymes in juvenile *P. orbignyanus* when cultured at four salinities (2, 10, 18 and 26 ppt) fed on a diet rich in 18:3n-3 and 18:2n-6 but poor in LC-PUFA. Results showed that salinity has a significant modulatory effect on *fads2* gene expression, with an increase at 2 ppt salinity. Total lipid content in fish muscle decreased when moving away from the isosmotic point (10.9 ppt) suggesting higher energetic demands at 2, 18 and 26 ppt. This effect was also evident for specific fatty acids, such as 16:1n-7, 16:2n-3, 18:4n-3, 20:1n-9, 20:4n-3 and 20:5n-3. Interestingly, some fatty acids, particularly total MUFA, 18:2n-6 and 22:6n-3 presented a dichotomous profile between lower and higher salinities, suggesting the adaptation of *P. orbignyanus* to different environmental salinities. This study highlights the remarkable ability of *P. orbignyanus* to adapt to a wide range of salinities demonstrating the strong euryhalinity of this species. The observed salinity effects hold potential significance for its application in aquaculture.

1. Introduction

Fish are the primary food source of n-3 series long-chain ($\geq C_{20}$) polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) for human consumption. These fatty acids are well-known for their beneficial effect on human health (Calder, 2015). As for other vertebrates, n-3 LC-PUFA are essential nutrients for fish growth and development. The content of these fatty acids in fish usually reflects the diet composition and ability to biosynthesize LC-PUFA from the shorter essential n-3 PUFA, alpha-linolenic acid (ALA, 18:3n-3). However, LC-PUFA production varies among species depending upon the presence and expression of *fads2* and *elovl* genes (Tocher, 2003; Monroig et al., 2018). In general, freshwater fish have a higher ability than marine fish species to biosynthesize LC-PUFA (Sargent et al., 1989). As terrestrial environments are naturally rich in C₁₈-PUFA but poor in LC-PUFA compared to the marine

environment (Parrish et al., 2016), it has been suggested that these environmental conditions may have driven the selection of fish with the ability to produce LC-PUFA endogenously in freshwater environments (Tocher, 2003; Castro et al., 2012; Monroig et al., 2016). However, recent findings have challenged simplistic generalizations regarding the high and low LC-PUFA biosynthetic capacity of freshwater and marine fish species. Findings on gene expression and the functions of enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis, as well as the mechanisms regulating their activity, have revealed a more complex picture (Fonseca-Madrighal et al., 2012; Izquierdo et al., 2015; Turkmen et al., 2019; Wang et al., 2014; Xie et al., 2021).

The aquaculture industry, marked by a remarkable expansion in the last decades, is considered an alternative to declining fisheries to face the increasing demand of fish for human consumption (Little et al., 2016). However, the reliance on the inclusion of fish oil, the main source of n-3 LC-PUFA, in fish feed production to fulfill the essential fatty acid

* Corresponding authors.

E-mail addresses: efernandez@fcien.edu.uy (E. Fernandez-López), martinb@fcien.edu.uy (M. Bessonart).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740585>

Received 7 July 2023; Received in revised form 2 December 2023; Accepted 15 January 2024

Available online 17 January 2024

0044-8486/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

requirements (EFA) without compromising fish health and fish nutritional quality (Tocher, 2010) has emerged as a significant challenge in aquaculture. This reliance poses concern for the competitiveness and sustainability of the aquaculture industry (Tacon et al., 2013). Finding alternative sources of EFA, such as vegetal-based oils or microbial oils, has become a key focus in aquaculture research to reduce the reliance on fish oil and mitigate its impact on the industry. Several studies have shown that the replacement of fish oils by n-3 LC-PUFA rich vegetable sources in fish feeds may allow the sustainable growth of some widely produced species (Mulligan and Trushenski, 2013; Shepherd and Jackson, 2013; Hixson, 2014; Betancor et al., 2016). Thus, the level of vegetable oils, naturally devoid of LC-PUFA, to be included in fish feeds, will vary for every fish species (Zheng et al., 2009; Tocher et al., 2019). Additionally, the possibility to modulate LC-PUFA biosynthesis capability by changing nutritional and environmental parameters such as salinity, has also been explored (Fonseca-Madrigal et al., 2006; Alhazzaa et al., 2011a, 2011b).

P. orbignyanus is a euryhaline flatfish inhabiting coastal and estuarine waters of Brazil, Uruguay and Argentina (Rivera Prisco et al., 2001). Because of its important commercial value, efforts have been made to develop culture techniques for its aquaculture production (Bianchini et al., 2010; Bessonart and Salhi, 2018). Important areas of research in this species include larval development (López et al., 2009), growth (Frayse and Petrarola, 2013), stress (Bolasina, 2011) and feeding habits (Norbis, 2004; Norbis and Galli, 2004). Studies on the effect of salinity on growth of *P. orbignyanus* suggest that this species can be cultivated in estuarine and marine environments (Sampaio and Bianchini, 2008). In nature, *P. orbignyanus* make use of brackish water habitats, such as coastal lagoons, as nursery and growing areas. Studies conducted in Mar Chiquita (Argentina) have observed that *P. orbignyanus* primarily feed on crustaceans and polychaetes (Rivera Prisco et al., 2001). Similarly, in the Rocha Lagoon (Uruguay), *P. orbignyanus* has been observed to feed also on fish in addition to crustaceans (Magnone et al., 2015a, 2015b). These findings highlight the species adaptability to different prey sources and its ability to thrive in diverse brackish water ecosystems (Magnone et al., 2015a, 2015b). Marine fish species moving into the

freshwater environment face a nutritional barrier based on the physiological demand and dietary supply of DHA (Matsushita et al., 2020). According to this, these authors have highlighted the need of acquiring the ability for DHA biosynthesis, for marine fish successfully colonize freshwater environments. Several studies on diadromous and euryhaline fish, have demonstrated uneven capabilities to produce LC-PUFA when reared at different salinities and/or diets (Marrero et al., 2021). However, no information was found for *P. orbignyanus* about its LC-PUFA biosynthetic ability.

P. orbignyanus can live for long periods in brackish water ecosystems such as the Rocha Lagoon, (Norbis and Galli, 2004; Magnone et al., 2015a). The potential capacity to modulate LC-PUFA biosynthesis in response to varying salinities presents an opportunity to improve its production by reducing the dependence on fish oil in the diet. This would enhance the competitiveness and sustainability of *P. orbignyanus* aquaculture.

Accordingly, we aimed to study *fads2* and *elovl* gene expression and the lipid and fatty acid profile in *P. orbignyanus* when cultured at four salinities and fed on a low LC-PUFA diet. As a non-model organism and due to the scarcity of genetic resources for this species, we sequenced the liver transcriptome to obtain the coding sequences of the enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis.

2. Materials and methods

2.1. Transcriptome sequencing

To obtain full hepatic transcriptome, *P. orbignyanus* wild juveniles were sampled (body weight BW = 18 g) captured in the Valizas stream (Arroyo Valizas, Rocha, Uruguay), at 0.1 ppt water salinity. Fish hepatic tissue was sampled and conserved in RNAlater (Thermo Scientific™) at -80 °C for further analysis.

2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted by liquid nitrogen hepatic homogenization with Quick RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Inc.) according to manufacturer's instructions. The integrity of the samples was assessed by agarose gel electrophoresis. Quantification and purity were determined with Qubit and NanoDrop (Thermo Scientific™), respectively. Based on this information, two of the samples were chosen to continue with the subsequent processes.

To obtain *P. orbignyanus* transcriptome (RNA-Seq), dscDNA of mRNA was synthesized with Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) using poly-d(T)₁₈ primers. The dscDNA obtained was purified with 1.8× AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc).

To study the gene expression of *fads2* and *elovl* of *P. orbignyanus*, cDNA was synthesized with a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) using poly-d(T)₁₈ primers.

Table 1
Formulation and composition of the experimental diet.

Ingredients (g/kg diet)	(g/kg)	Main fatty acids	%dw
Fishmeal	820.80	14:0	0.12
Krillmeal	30.00	16:0	0.82
CMC	50.00	18:1n-9	1.27
Vitamin mixture	7.75	18:1n-7	0.19
Mineral mixture	7.75	18:2n-6 (LA)	0.88
Fish oil	5.00	18:3n-6	nd
Linseed oil	78.70	18:3n-3 (ALA)	2.8
		18:4n-3	0.03
		20:1n-9	0.04
Composition (% dry weight)		20:2n-6	0.01
Dry matter	89.81 ± 0.04	20:3n-6	nd
Crude protein	58.8 ± 0.78	20:3n-3	0.01
Crude lipid	9.43 ± 0.35	20:4n-6 (AA)	0.03
Ash content	14.36 ± 0.02	20:4n-3	0.01
CMC: carboxymethyl cellulose. Vitamin mixture (mg/kg diet dw): retinol acetate (9.06), colecalciferol, D3 (2), tocopherol acetate, E (200), menadione, K3 (79.83), thiamine mononitrate, B1 (40.18), riboflavin, B2 (40), pyridoxine-HCl, B6 (39.6), calcium D-pantothenate (98), niacin (148.5), folic acid (5), cyanocobalamin, B12 (0.02), ascorbic acid, C (1980), choline chloride (3500). Mineral mixture (mg/kg diet dw): NaCl (581.4), CoCO ₃ (0.24), Ca (IO ₃) ₂ (7.80), ZnO (49.79), NaSeO ₃ (0.01), MnO (3.8), Fe(CO ₃) ₂ (29.08), CuSO ₄ (10.05).		20:5n-3 (EPA)	0.26
		22:4n-6	nd
		22:5n-3	0.03
		22:6n-3 (DHA)	0.3
		SAFA	2.09
		MUFA	1.76
		n-3 PUFA	3.44
		n-6 PUFA	0.94
		n-3 LC-PUFA	0.61
		LA/ALA	3.18
		DHA/EPA	1.20
		DHA/AA	11.46
		n-3/n-6	3.68
		nd: not detected.	

Table 2
Primers and probes designed to study *fads2* and *elovl4* gene expression.

Primers and probes	Sequences
FADS2.PROBE	5'- FAM T+TT+C+CA+CATTGACAAATTC IBFQ -3'
FADS2.RV	5'- CGTAGATAGTACGACATGCACC -3'
FADS2.FW	5'- TTCTTTCTTGTGGGACCTCC -3'
ELOVL4.PROBE	5'- FAM CTCAGTGACACGCTCTTCTTCATCCT IBFQ -3'
ELOVL4.FW	5'- CAGAGTCTGCTGGTGTTTC -3'
ELOVL4.RV	5'- ACCAGTTGAAGATCATGGTGC -3'
BA.PROBE	5'- FAM TCCTCGGTATGGAGTCCTGTGAAT IBFQ -3'
BA.FW	5'- AATGAGAGGTTCCGTTTGCC -3'
BA.RV	5'- ACAGTGTGGCGTACAGATC -3'

+ = LNA modified nucleotides.

2.2.1. High-throughput mRNA sequencing

The dscDNA proceeded with TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) according to manufacturer's instructions and paired end (PE) sequencing was performed in a NovaSeq 6000 S4 System at Macrogen Inc. (Korea).

Raw reads sequences were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) of GenBank under SRA accession number SRR25109571 and SRR25109572.

2.2.2. Bioinformatics analysis

For *de novo* assembly of RNA-Seq output, fastq files were analyzed with FastQC and trimmed with Trimmomatic with a Phred score cut off value >30. *De novo* assembly was performed using TransAbyss 2.0.1 by ten multiple independent assemblies from 21 to 57 k-mers range (Robertson et al., 2010). Independent assemblies were further merged with Transabyss-merge to construct longer transcripts based on partial sequences with ≥99% identity. Individual and final assemblies were assessed using TransRate (Hibberd et al., 2016) and RSEM (Li and Dewey, 2011). Identification of transcripts was obtained using BLASTX against Swissprot (Uniprot) (Agarwala et al., 2018) and custom nr NCBI databases (Agarwala et al., 2018).

Additionally, Blast outputs were merged, and best hits were selected in order to proceed with complete functional annotation. For this purpose, functional annotation based on orthologous relationships was performed using eggNOG-mapper (Huerta-cepas et al., 2017; Huerta-Cepas et al., 2019).

Consensus nucleotide sequences of complete *fads2* and *elovl* described were submitted to GenBank.

Identity and assembly correctness of amino acid sequence was confirmed by alignment using ClustalW (Thompson et al., 1994) against a custom database of fish Fads and Elovl retrieved from NCBI. Phylogenetic analysis was performed using MrBayes (Ronquist et al., 2012) on CIPRES (Miller et al., 2015) using four heated chains and stopped at a split frequencies standard deviation <0.1.

2.3. Animals and experimental design

To study the effect of salinity on *fads2* and *elovl* gene expressions and fish lipid composition, a feeding trial was conducted at four environmental salinities (treatments) - 2 ppt, 10 ppt, 18 ppt and 26 ppt - in four recirculating aquaculture systems (RAS) at the *Estación Experimental de Investigaciones Marinas y Acuicultura* (EIMA, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos - DINARA) in Rocha (Uruguay). All juveniles were at an initial salinity of 29–31 ppt. *P. orbignyanus* juveniles used in the trial were obtained from a natural spawning of fish broodstock maintained at the EIMA (Bessonart and Salhi, 2018). Juveniles were reared for 285 days after hatching and then distributed in experimental tanks. Three 100 L fiber glass tanks were used per treatment. Fish ($n = 120$, body weight, BW = 20–50 g) were classified into three body weight groups (24.15 ± 2.82 , 33.20 ± 2.58 and 44.10 ± 3.92 g) to reduce intra-group variability and, randomly distributed in the experimental units (10 fish/tank, three BW groups per treatment).

A single experimental diet (Table 1) was formulated with a low LC-PUFA content and a high level of ALA as substrate for n-3 LC-PUFA biosynthesis. Defatted fishmeal (lipid extracted 3 times with

chloroform) was the main protein source. A reduced amount of fish oil was added to maintain a basal EPA and DHA content and krill meal was added to increase EPA content. Linseed oil was used as a source of ALA and, to a lesser extent, of linoleic acid (LA, 18:2n-6). All ingredients were mixed, pelleted to adequate size and dried at 45 °C to obtain dry pellets. For 60 days, fish were fed the experimental diet six times a day at a daily feeding rate of 2% of body weight. To adjust food amount, fish were weighted at days 14 and 28. Tanks were supplied with constant aeration and 10% water renewal rate. The environmental temperature was kept at 23 ± 1 °C. Tanks were cleaned once a day by siphoning of the bottom surface.

At the end of the feeding trial, nine fish per salinity treatment (three fish per tank) were sacrificed with an overdose of benzocaine (0.5 g/L), individually weighted and dissected to obtain samples of muscle (fillet with skin) and liver. Samples for lipid and fatty acid analysis were frozen and kept at −20 °C. Liver samples for gene expression analysis were conserved in RNAlater (Thermo) at 4 °C throughout the night and at −80 °C hereinafter until further analysis.

All procedures were conducted under safety animal protocols regulations (CEUA DINARA 001/2016).

2.4. Proximate and lipid analysis

Diet was analyzed for proximate composition and fatty acid profile (Table 1). Moisture was determined by drying in an oven at 110 °C to constant weight and ash content by burning in a furnace oven at 450 °C to constant weight (AOAC, 2006). Crude protein content was calculated from total nitrogen content analyzed by the Kjeldahl method (AOAC, 2006). Diet and fish muscle samples were lipid extracted with chloroform:methanol (2:1) according to Folch et al. (1957). Fatty acid methyl esters (FAMES) obtained by transesterification with methanol in sulfuric acid (Christie, 2010) were separated by gas chromatography (HP 5890) and identified by comparing the retention times with methyl esters standards (37 Component FAME Mix, Supelco CRM47885, Bellefonte, USA) and by reference to a well characterized fish oil (Salhi and Bessonart, 2012). Nonadecanoic acid was used as internal standard to express dietary fatty acid content as % dry weight. Fatty acid composition of fish muscle was expressed as percentage of area and as mg g^{−1} estimated assuming that 100% of lipids were FA.

2.5. Gene expression analysis of *fads2* and *elovl*

To quantify the gene expression of the enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis from *P. orbignyanus* through different salinity treatments, *fads2* and *elovl* sequences as well as those for constitutively expressed genes, β -actin (OR604282), were retrieved by *de novo* assembly of RNA-Seq liver transcriptome dataset. For every ORF, gene-specific primers set and double-quenched hydrolysis probes (TaqMan) were design with the use of IDT's Oligo Analyzer 3.1 online software and synthesized by IDT DNA (Coralville, IA, 116 USA) (Table 2). All qPCR assays were validated by the achievement of amplification efficiencies >95% (Broeders et al., 2014). Real Time qPCR was carried out in a two-step PCR. Reverse transcriptase reaction was performed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific). Subsequently, all PCR products were used in Real Time PCR quantification by mixing them in a 20 μ L reaction volume, containing 1 $\times$ Hot Rox Master Mix (Bioron, Ludwigshafen, Germany). Thermocycling conditions started with a 2 min hold stage, followed by an initial denaturation at 95 °C for 10 min and, subsequent 40 PCR cycles with a 15 s denaturation step at 95 °C and a synthesis step for one minute at 60 °C. The qPCR ended with an additional final step at 60 °C for 1 min. All PCR were carried out on an ABI Prism 7500 (Applied Biosystems).

Finally, relative gene expression levels of *fads2*, *elovl* and β -actine were measured simultaneously in three separate tubes with a final 20 μ L volume reaction mixture. Cts of *fads2* and *elovl* were normalized with β -actine Ct values (Li et al., 2008; Purohit et al., 2016; Zheng and Sun,

Table 3

Completeness of transcriptome assembly analysis after merging the different k-mer assemblies and further clustering of the output multi-fasta.

BUSCO (%)	Merged	Clustered
Complete	62.9	63
Single-copy	21.3	35.3
Duplicated	41.6	27.7
Fragmented	11.9	11.8
Missing	25.2	25.2

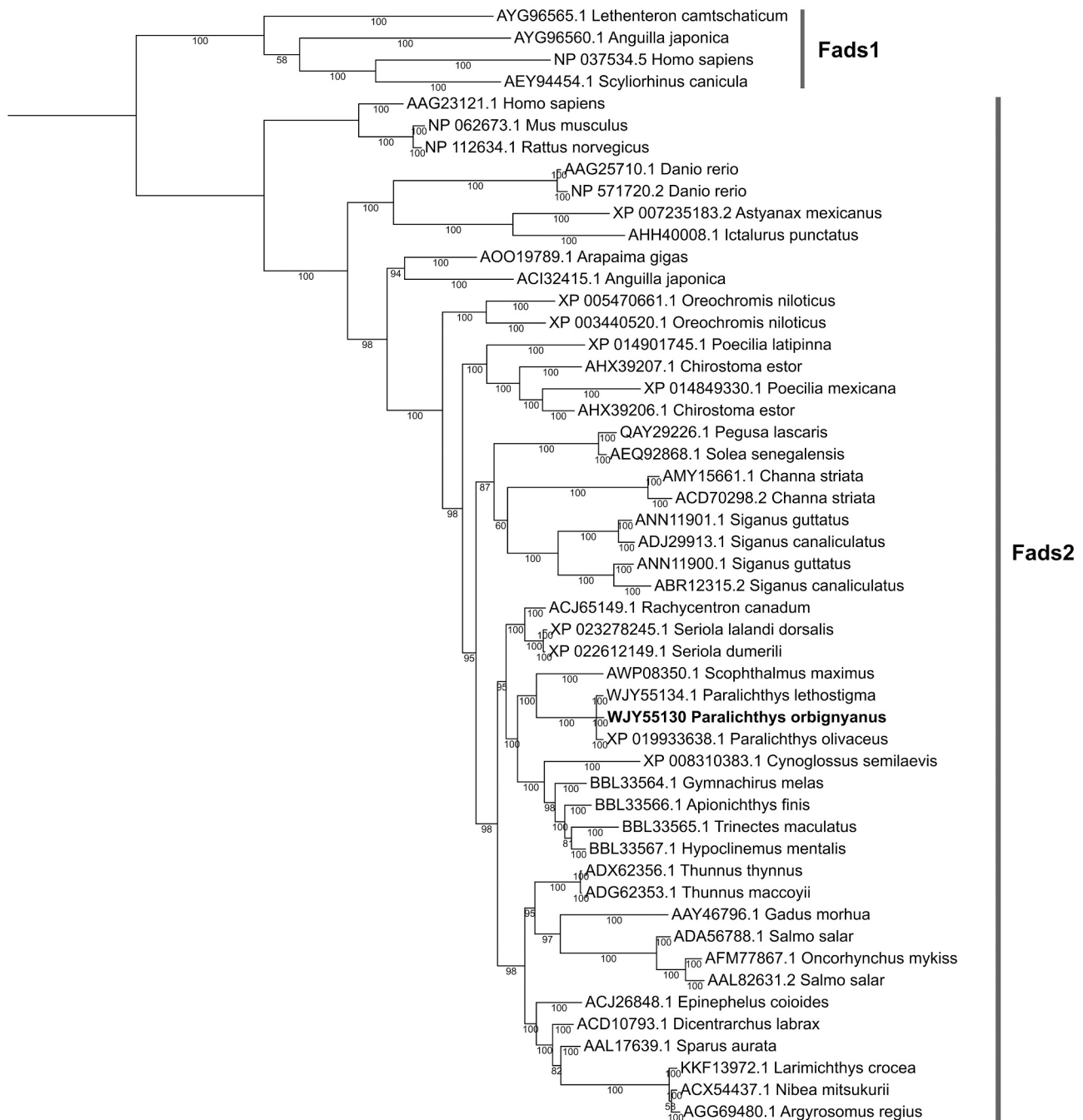


Fig. 1. Phylogenetic tree comparing amino acid Fads2 sequence from *P. orbignyanus* and other Fads2 and Fads1 obtained from GenBank database. Fads1 sequences form a separate clade grouping Fads2 sequences. MrBayes was used to perform the phylogenetic analysis with four heated chains and stopped when standard deviation reached 0.1.

2011). Gene expression levels for each gene of interest were compared to those at 26 ppt group (Pfaffl, 2001). All samples were analyzed by triplicate in inter and intra-assays.

2.6. Data analysis

Parametric tests, one-way ANOVA and Tukey HSD for multiple comparisons, were used except in the absence of normal distribution, where Kruskal–Wallis non-parametric tests were applied instead. For all tests, a significance level of 5% was considered. All data analysis was performed using R version 4.0.3.

3. Results

3.1. De novo assembly of *P. orbignyanus* hepatic transcriptome

RNA-Seq sequencing produced 114.6 and 126.3 million raw reads and after trimming, 98.19% excellent quality reads were conserved. A total of 1,263,743 contigs were retrieved from the *de novo* assembled transcriptome. After CD-HIT-EST clustering (Li and Godzik, 2006), unigenes accounted for 1,221,188 sequences in the hepatic transcriptome increasing the complete contig proportion at the expense of the fragmented ones based on BUSCO analysis results. Similarly, redundancy of the transcriptome was reduced increasing single-copy

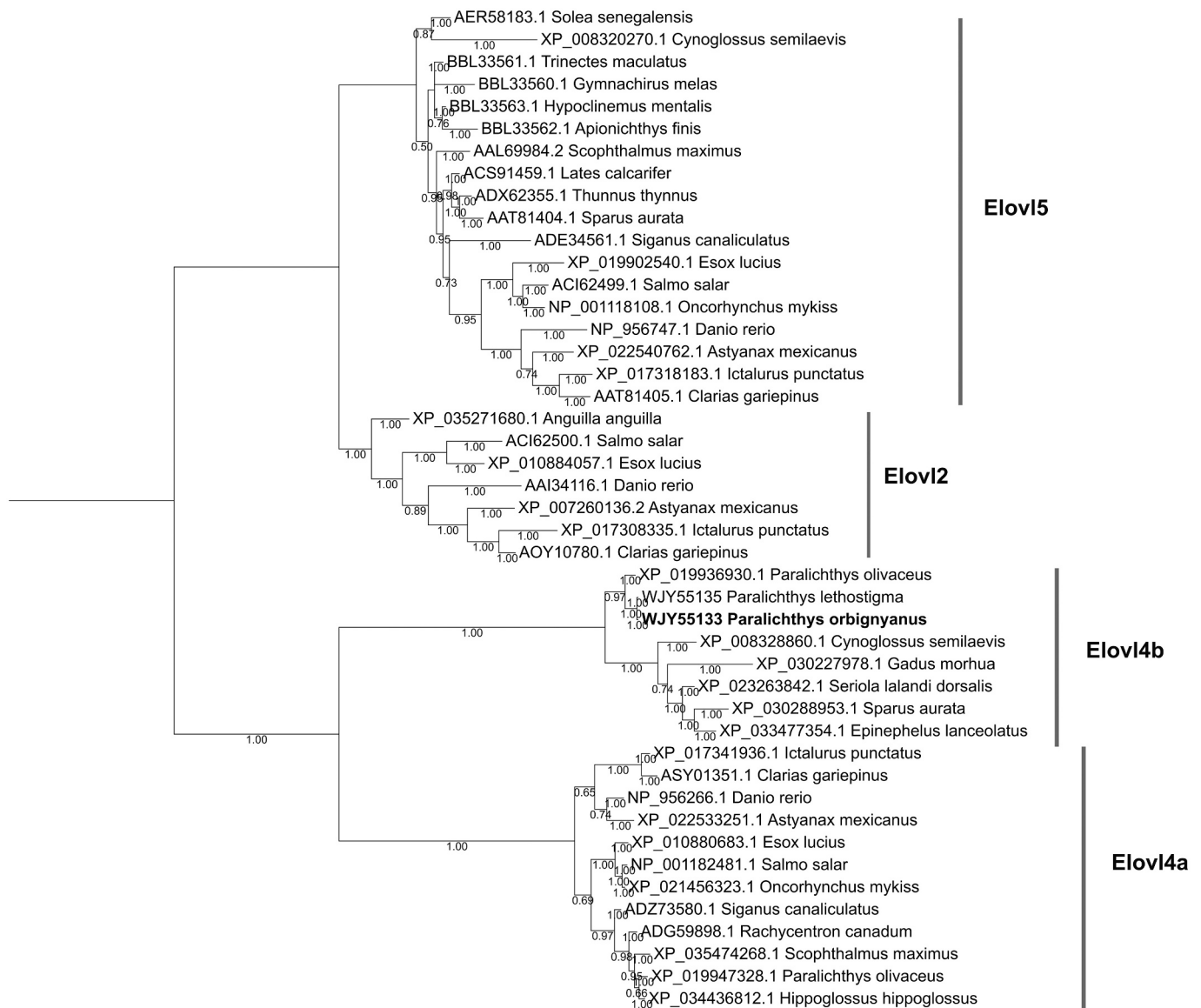


Fig. 2. Phylogenetic tree comparing amino acid Elov14 sequence from *P. orbignyanus* and other Elov1 obtained from GenBank database. MrBayes was used to perform the phylogenetic analysis with four heated chains and stopped when standard deviation reached 0.1. The tree topology defines four clades corresponding to Elov15, Elov12, Elov14b and Elov14a.

contig percentage (Table 3).

At the end of the transcriptome assembly, the overall read alignment rate was 86.57% and after complete analysis with BUSCO, using Actinopterygii orthologs database as a reference, 74.8% of the orthologs were identified in *P. orbignyanus* hepatic transcriptome.

Complete *fads2* (OR232171) was identified and has 2,069 pb length that included a CDS with 443 amino acids. *P. orbignyanus fads2* showed 98.8% identity with an orthologous *fads2* from *P. olivaceus* (AJG36440.1), 86.68% from *Rachycentron canadum* (ACJ65149.1). *fads2* features included a b5-like cytochrome with a heme binding motif and a desaturase domain with four transmembrane domains and three conserved histidine boxes HXXXH, HXXHH and QXXHH. Phylogenetic analysis showed that *Fads2* protein sequence found in *P. orbignyanus* clustered together with other pleuronectiforms representatives in close proximity to *P. olivaceus* (Fig. 1).

elovl4 was the main elongase identified in the *P. orbignyanus* transcriptome in addition to an *elovl1* (OR610671) and an *elovl6* (OR610664). Putative partial *elovl5* was obtained and *elovl2* was not identified. Complete *elovl4* (OR232180) transcript included a full 1,746

bp length mRNA with a CDS codifying for 263 amino acids protein which presented 96.20% identity with its orthologous Elov14 from *P. olivaceus* (XM_020091769.1), 88.21% with Atlantic halibut (XP_034437921.1) and 82.13% with *Lates calcarifer* (XP_018522864.1). Hydrophobicity test predicted 5 transmembrane domains (Gasteiger et al., 2005). Histidine box was identified based on an HXXHH conserved motif which was found in all fish Elov14. Phylogenetic analysis showed that Elov14 found in *P. orbignyanus* clustered with other Elov14b in close proximity to pleuronectiforms orthologs (Fig. 2).

3.2. Gene expression levels

Salinity showed an effect on *fads2* and *elovl4* gene expressions (Fig. 3). *fads2* gene expression was higher ($p \leq 0.050$) at 2 ppt compared to the values observed at 18 and 26 ppt salinities (Fig. 3A). Gene expression levels of *elovl4* showed the same tendency albeit there was no statistical significance (Fig. 3B).

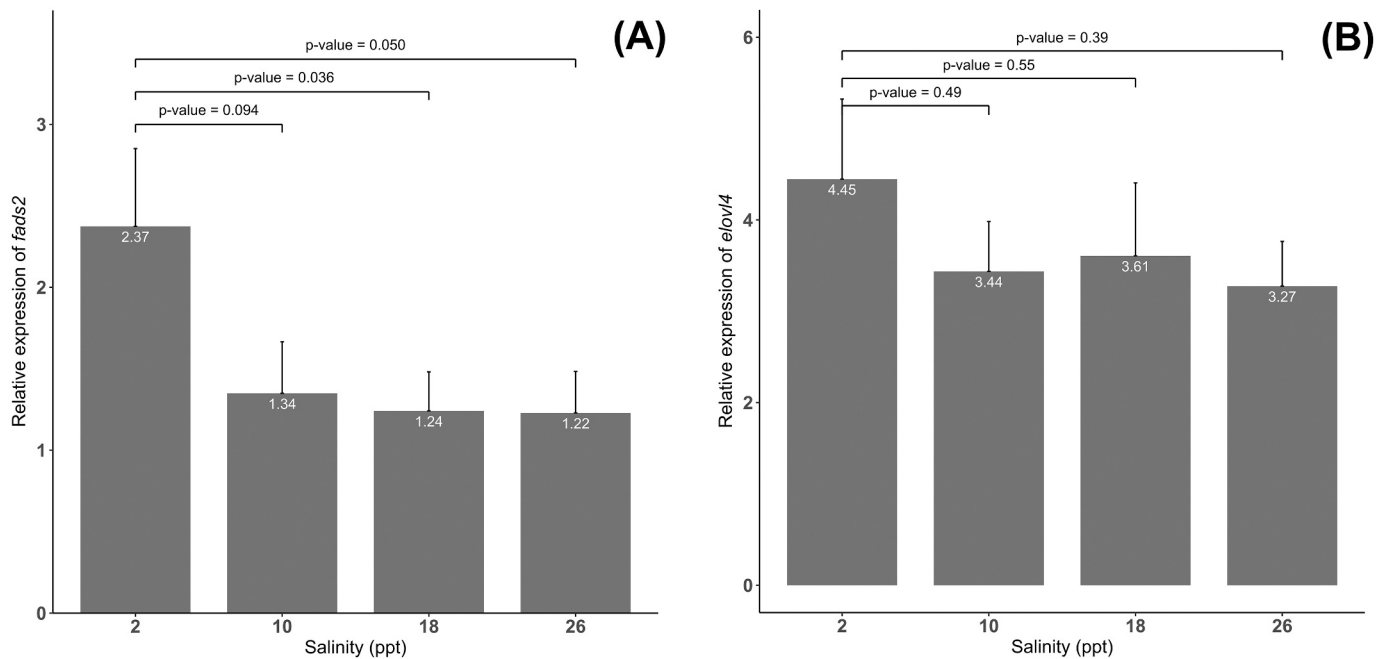


Fig. 3. Gene expression (Fold change) of *fads2* (A) and *elovl4* (B) from *P. orbignyanus* juveniles reared at different salinities.

3.3. Fish growth and survival

Fish survival was 100%. At the end of the experiment fish duplicated their weight, but neither the length nor the final weight was affected by environmental salinity at the tested range (2–26 ppt) (Table 4). Feed conversion rate ranged from 1.50 to 1.96 (Table 4).

3.4. Fish lipid and fatty acid compositions

The total, neutral and polar lipid contents of fish muscle are shown in Table 5. The total lipid content of fish muscle was affected by salinity. The highest lipid content was found at salinity 10 ppt ($P < 0.05$) in contrast with the lowest value found at 26S; values for S2 and S18 were intermediate. Increased values of total lipid (TL) were related to a higher proportion of neutral lipids (NL) and the opposite was observed for polar lipid (PL) proportions (data not shown). Nonetheless, muscle PL content expressed as percentage of muscle dry weight, was not significantly different among treatments. Moisture and lipid contents of muscle samples of fish at the beginning of the experiment were $77.01 \pm 0.98\%$ and $6.49 \pm 0.13\%$ dw, respectively.

Fatty acid compositions of the muscle are shown in Table 6. The overall fatty acid profile remained invariable throughout all salinity treatments. The most abundant fatty acids in muscle total lipids of fish at the end of the trial were 18:3n-3, 16:0, 18:1n-9, 22:6n-3, 18:2n-6, 18:0 and 20:5n-3. Relative content of 18:3n-3 and 18:2n-6 in muscle of initial fish were lower than those found in fish from the different treatments, while those of 22:6n-3 and 20:5n-3 were higher. DHA/EPA ratios did not decrease compared to the initial value. Salinity had a significant effect on total MUFA, 16:1n-9, 16:1n-7, 20:1n-11 and 20:1n-9, on total n-6 PUFA and on certain n-3 PUFA (16:2n-3, 18:4n-3 and 20:4n-3). Total MUFA proportion was lowest at 2 ppt and highest at 26 ppt, with intermediate levels at 10 ppt and 18 ppt. However, 16:1n-7 and 20:1n-9 proportions were highest at 10 ppt. Total n-6 PUFA proportion was higher at 2 ppt than in the rest of treatments, mainly due to the higher 18:2n-6 content. 16:2n-3 and 18:4n-3 proportions were lower at 2 than at 10 ppt, being intermediate at the other salinity values, while 20:4n-3 was lower at 2 and 26 ppt than at 10 ppt (Table 6).

Fish fatty acid composition expressed as mg g⁻¹ dw is shown in Table 7. A higher amount of fatty acids was observed at salinity 10 ppt

and lower at salinities 2 ppt, 18 ppt and 26 ppt, reflecting the muscle total lipid content (Table 7). Compared to initial fish, all treatments at the end of the trial showed an increased concentration of 18:2n-6 and 18:3n-3, and a lower concentration of AA, EPA and DHA. Although some fatty acids experienced changes through the different salinity treatments, the muscle total fatty acid profiles did not reflect the observed changes in *fads2* and *elovl4* gene expression.

4. Discussion

In order to study the impact of salinity on the gene expression of *fads2* and *elovl* and considering the limited availability of genetic resources for *P. orbignyanus*, we applied massive parallel sequencing to obtain the complete hepatic transcriptome. The high throughput sequencing has become an important tool, commonly used to evaluate the effect of environmental conditions such as temperature and salinity in different transcriptome profiles (Huggett et al., 2015). RNA-Seq is also a cost-effective methodology (Muir et al., 2016) applied in seek of novel transcripts and it is of particular interest with non-model organisms whose genome or transcriptome have never been sequenced before (da Fonseca et al., 2016; Rana et al., 2016; Carruthers et al., 2018). In this work, mRNA-Seq and *de novo* assembly were used to obtain complete novel transcripts from hepatic transcriptome of *P. orbignyanus*, where a full-length $\Delta 6$ fatty acid desaturase and an *elovl4* transcripts were retrieved. Similarly, in addition to acyl-CoA desaturases ($\Delta 6$ desaturase), a stearoyl-CoA desaturase ($\Delta 9$ desaturase) (OR616245) was identified in *P. orbignyanus* as well as other oxidoreductase representatives such as sphingolipid- $\Delta 4$ -desaturases (OR616244), involved in sphingolipid biosynthesis metabolism (Bieberich, 2018). It is noteworthy the presence of a lesser-studied fish elongase *elovl1* (OR610671) and *elovl6* (OR610664), responsible for the elongation of saturated and monounsaturated fatty acids in mammals (Kihara, 2012; Deák et al., 2019). *elovl1* genes (*elovl1a* and *elovl1b*) have also been found in zebrafish, being involved not only in the elongation of SAFA and MUFA, but also in the elongation of PUFA (Bhandari et al., 2016).

The increasing number of identified *fads2* and *elovl* sequences has led to evolutive studies. Events such as Whole Genome Duplication (WGD) are considered a triggering factor for subsequent neofunctionalization of *fads2* and *elovl* (Carmona-Antoñanzas et al., 2013). After the third WGD,

Table 4
Growth parameters and feed utilization of juvenile *Paralichthys orbignyanus* of the different size groups (S: small, M: medium and L: large) reared at different salinities.

	2 ppt			10 ppt			18 ppt			26 ppt		
	S	M	L	S	M	L	S	M	L	S	M	L
Wi (g)	24.10 (3.00)	32.80 (2.66)	43.80 (5.05)	24.00 (2.79)	33.30 (2.79)	44.20 (3.65)	23.90 (2.73)	33.30 (2.67)	44.10 (3.84)	24.50 (3.03)	33.40 (2.59)	44.30 (3.59)
Wf (g)	48.34 (10.28)	69.66 (17.78)	94.02 (11.97)	52.19 (8.20)	68.22 (11.19)	79.07 (8.53)	53.63 (8.64)	65.32 (8.21)	82.62 (9.14)	53.93 (6.54)	73.37 (6.23)	89.96 (11.98)
TL _r (cm)	15.62 (1.06)	17.58 (1.55)	19.58 (0.74)	16.15 (0.77)	17.75 (0.92)	18.70 (0.55)	16.20 (0.62)	17.33 (0.72)	18.95 (0.72)	16.45 (0.78)	18.07 (0.38)	19.48 (0.86)
CF	1.25 (0.06)	1.25 (0.04)	1.25 (0.04)	1.23 (0.04)	1.21 (0.06)	1.21 (0.05)	1.22 (0.05)	1.25 (0.03)	1.22 (0.04)	1.21 (0.05)	1.24 (0.06)	1.25 (0.04)
WGR (%)	103.85	114.74	113.78	121.72	109.97	74.77	115.68	97.48	84.00	128.52	113.71	102.52
SGR (%)	2.92	3.25	1.55	2.58	2.34	1.64	2.63	2.24	1.73	2.59	2.12	1.70
FCR	1.54	1.57	1.58	1.56	1.67	1.89	1.58	1.79	1.96	1.50	1.57	1.71

Values shown as mean (SD), Wi: Initial body weight, Wf: Final body weight, TL_r: Final total length, CF (Condition factor) = $Wf(g)/TLf(cm)^3 \times 100$, WGR (Weight gain rate) = $(Wf - Wi)/(Wi \times 100)$, SGR (Specific growth rate) = $[ln(Wf) - ln(Wi)]/n^\circ$ feeding days, FCR (Feed conversion ratio) = feed intake/fish weight gain.

Table 5
Muscle total and polar lipid contents (TL and PL, % dw), and neutral lipids NL (as % of TL) of fish reared at different salinity treatments.

Treatment	Moisture (%)	TL (% dw)	PL (% dw)	NL (% of TL)
2 ppt	75.56 (2.70) ^a	5.05 (3.17) ^{ab}	1.23 (0.33) ^a	70.15 (11.03) ^{ab}
10 ppt	74.51 (2.09) ^a	6.95 (3.06) ^a	1.40 (0.20) ^a	78.45 (7.12) ^a
18 ppt	75.76 (1.64) ^a	4.13 (2.43) ^b	1.04 (0.27) ^a	69.43 (11.76) ^{ab}
26 ppt	75.58 (1.78) ^a	3.29 (1.34) ^b	1.11 (0.53) ^a	64.50 (5.31) ^b

Values, mean (SD), with different letter superscript within each column were significantly different (P < 0.05).

known as Teleost-specific Genome Duplication (TGD) other genome duplications occurred in salmonids and Cypriniformes leading to the polyploidization of species and enabling divergent resolution, sub-functionalization and neofunctionalization processes (Ravi and Venkatesh, 2018). Flatfishes include mainly marine and estuarine representatives with a lesser proportion of freshwater species (Gibson et al., 2014; Bitencourt et al., 2023). Despite the marine origin of Pleuronectiformes (Munroe, 2015), evidence suggests that colonization of freshwater environments was achieved through gene neo-functionalization of *fads2* and *elovl*, in addition to an adaptation of the osmoregulatory system to cope with lower salinities (Matsushita et al., 2020). Thus, the evolutionary history of each species is relevant to the repertoire of *fads* and *elovl* enzymes. This is in agreement with the presence of $\Delta 4$ desaturase in Pleuronectiforms such as *Solea senegalensis* and *Pegusa lascaris* which is determined by their taxonomic position as Soleidae members rather than by their trophic level (Garrido et al., 2019). Amino acid sequences of *Elov14* and *Fads2* form *P. orbignyanus* conserve a tight phylogenetic relationship between fish species clustering together with marine Pleuronectiforms, such as *P. olivaceus*, *P. lethostigma* and *Scophthalmus maximus* (Figs. 1 and 2). The topology obtained is in accordance with similar phylogenetic analysis performed in several studies (Zheng et al., 2004; Agaba et al., 2005; Nelson et al., 2016). The presence of a bifunctional $\Delta 6/\Delta 8$ *fads2* in *Paralichthys olivaceus* is coincident with a single copy of *fads2* described in its genome (Kabeya et al., 2017). The high sequence identity observed in *P. orbignyanus* *Fads2* with *P. olivaceus* *Fads2* orthologue and the FHIQ motif between the third and fourth transmembrane domains suggest a predominant $\Delta 6$ desaturase activity, although the enzymatic activity will have to be verified by cloning and functional characterization studies.

Conversely, salmonids are characterized by having a complete set of *fads2* and *elovl* enzymes allowing the biosynthesis of LC-PUFA from their C₁₈ precursors (Hastings et al., 2004; Monroig et al., 2011) as a consequence of the Ss4R genomic duplication event (Gillard et al., 2018). It also explains the higher number of proteins coded in salmonid genomes compared to other non-salmonid fish species. In *P. orbignyanus* we found that *Elov14* clustered together with *Elov14b*. Results obtained in several studies are consistent in that *Elov14* can support DHA production. In *Oncorhynchus mykiss*, *Elov14b1* and *elov14b2* can convert 20:5n-3 and 22:5n-3 to 24:5n-3 (Zhao et al., 2019) but, in other fish species, *Elov14* was involved in biosynthesis of >24C fatty acids as described in *Salmo salar* (Carmona-Antoñanzas et al., 2011), *Clarias gariepinus* (Obloh et al., 2017), *Sparus aurata* and *Solea senegalensis* (Morais et al., 2020).

Although, there is no definite guide to estimate the amount of reads needed to obtain a complete full coverage transcriptome (Li et al., 2019), it is of common knowledge that sequencing depth in RNA-Seq studies has a strong impact on sequencing coverage (Patterson et al., 2019). Our RNA-Seq study reflects the low representation of *fads2* and *elovl* even though they are key enzymes in LC-PUFA biosynthesis. With a 100 million read sequencing coverage, the impossibility of finding a complete sequence of *elovl5* in *P. orbignyanus* transcriptome could be due to a low expression level. These results suggest that *P. orbignyanus* has naturally low levels of *elovl5* gene expression, at least in the environmental salinity (0.1 and 10 ppt) and the dietary conditions of the

Table 6Fatty acid profile (% area) of total lipids in muscle tissue (with skin) from *P. orbignyanus* juveniles reared at different salinities.

Fatty acids	Initial	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	4.39 (0.51)	2.05 (0.23)	2.64 (0.54)	2.20 (0.60)	2.18 (0.58)
15:1n-5	0.18 (0.04)	0.35 (0.35)	0.12 (0.19)	0.36 (0.46)	0.17 (0.43)
16:0	18.62 (1.10)	15.80 (2.03)	15.19 (1.39)	16.33 (2.01)	16.21 (1.93)
16:1n-9	0.73 (0.03)	0.28 (0.18) ^a	0.20 (0.17) ^a	0.36 (0.18) ^a	0.59 (0.14) ^b
16:1n-7	7.39 (0.31)	2.68 (0.56) ^b	4.16 (0.52) ^a	3.10 (1.00) ^b	3.02 (0.90) ^b
16:2n-3	0.11 (0.03)	0.05 (0.02) ^b	0.21 (0.17) ^a	0.07 (0.03) ^{ab}	0.08 (0.07) ^{ab}
16:2n-4	1.23 (0.07)	0.48 (0.13)	0.63 (0.20)	0.51 (0.16)	0.50 (0.11)
17:1n-7	0.73 (0.12)	0.21 (0.05)	0.27 (0.13)	0.17 (0.12)	0.25 (0.08)
16:3n-4	0.17 (0.10)	0.17 (0.13)	0.21 (0.11)	0.29 (0.22)	0.31 (0.20)
18:0	4.23 (0.16)	5.48 (0.93)	4.55 (0.62)	5.59 (1.33)	5.30 (1.41)
18:1n-9	13.01 (0.88)	12.04 (6.15)	13.62 (6.52)	14.80 (1.24)	13.81 (1.97)
18:1n-7	4.83 (0.27)	1.66 (0.97)	1.91 (1.05)	2.33 (0.23)	3.13 (1.36)
18:2n-6	2.22 (0.57)	8.94 (0.84)	7.87 (0.99)	7.94 (0.76)	8.02 (0.86)
18:3n-6	nd	0.21 (0.13)	0.12 (0.03)	0.16 (0.11)	0.22 (0.11)
18:3n-3	2.03 (1.26)	21.50 (4.40)	19.85 (4.11)	18.12 (4.48)	19.47 (4.70)
18:4n-3	1.29 (0.19)	0.59 (0.11) ^b	0.82 (0.14) ^a	0.65 (0.23) ^{ab}	0.61 (0.20) ^{ab}
20:1n-11	0.21 (0.02)	0.11 (0.03) ^b	0.17 (0.03) ^a	0.23 (0.22) ^{ab}	0.16 (0.10) ^b
20:1n-9	1.24 (0.16)	0.52 (0.09) ^b	0.81 (0.10) ^a	0.51 (0.25) ^b	0.62 (0.20) ^{ab}
20:1n-7	0.35 (0.18)	0.11 (0.03)	0.14 (0.02)	0.15 (0.09)	0.15 (0.10)
20:2n-6	0.24 (0.17)	0.24 (0.08)	0.26 (0.04)	0.26 (0.03)	0.26 (0.06)
20:3n-6	0.23 (0.06)	0.12 (0.06)	0.12 (0.04)	0.11 (0.08)	0.14 (0.09)
20:4n-6	1.86 (0.24)	1.07 (0.30)	1.00 (0.23)	1.28 (0.36)	1.14 (0.33)
20:3n-3	0.26 (0.06)	1.37 (0.22)	1.20 (0.16)	1.29 (0.21)	1.48 (0.39)
20:4n-3	0.63 (0.05)	0.32 (0.04) ^b	0.41 (0.05) ^a	0.35 (0.16) ^{ab}	0.31 (0.06) ^b
20:5n-3	7.58 (0.50)	3.69 (0.59)	4.43 (0.83)	4.21 (0.73)	4.05 (0.46)
22:1n-11	0.70 (0.01)	0.21 (0.08)	0.38 (0.10)	0.26 (0.11)	0.19 (0.10)
22:4n-6	0.27 (0.11)	0.20 (0.11)	0.19 (0.06)	0.21 (0.12)	0.21 (0.13)
22:5n-6	0.79 (0.14)	0.39 (0.18)	0.41 (0.09)	0.48 (0.14)	0.47 (0.15)
22:5n-3	3.65 (0.46)	1.90 (0.35)	2.27 (0.41)	2.28 (0.32)	2.12 (0.30)
24:1n-9	0.42 (0.03)	0.32 (0.09)	0.27 (0.12)	0.34 (0.09)	0.25 (0.15)
22:6n-3	16.33 (1.87)	10.46 (3.41)	10.06 (2.33)	12.58 (3.62)	12.00 (3.94)
SAFA	28.77 (0.90)	24.38 (2.95)	22.78 (2.48)	23.87 (2.34)	21.54 (1.93)
MUFA	31.51 (1.21)	22.75 (2.35) ^a	25.99 (1.96) ^{ab}	24.13 (2.29) ^{ab}	27.12 (2.62) ^b
n-3 PUFA	31.89 (1.79)	40.70 (1.34)	39.66 (1.55)	40.34 (1.61)	39.84 (1.62)
n-6 PUFA	5.69 (0.64)	11.02 (0.58) ^a	10.28 (0.73) ^b	10.32 (0.53) ^b	10.30 (0.72) ^b
n-3 LC-PUFA	28.46 (2.48)	17.75 (4.21)	18.37 (3.49)	20.72 (3.83)	19.95 (4.54)
ALA/LNA	0.85 (0.39)	2.38 (0.31)	2.55 (0.26)	2.54 (0.27)	2.50 (0.43)
DHA/EPA	2.15 (0.17)	2.96 (0.54)	2.49 (0.56)	2.91 (0.77)	2.99 (0.80)
EPA/AA	4.10 (0.37)	3.46 (0.66)	4.33 (0.94)	4.07 (1.16)	3.78 (0.70)
DHA/ALA	12.91 (12.23)	0.61 (0.28)	0.52 (0.23)	0.57 (0.23)	0.63 (0.25)
n-3/n-6	5.65 (0.77)	3.70 (0.19)	3.87 (0.27)	3.92 (0.29)	3.88 (0.32)

Values, mean (SD), with different letter superscript within each row were significantly different ($P < 0.05$).nd = not detected; SAFA = sum of saturated fatty acids, MUFA = sum of monounsaturated fatty acids, PUFA = sum of polyunsaturated fatty acids; LC-PUFA = sum of long chain ($\geq C_{20}$) polyunsaturated fatty acids.

analyzed individuals. We performed the same bioinformatic analysis for *de novo* assembly in RNA-Seq raw data from *Paralichthys lethostigma* hepatic transcriptome (SRR3737288) obtaining complete *fads2* (WJY55134.1) and *elovl4* (WJY55135.1) transcripts but no *elovl5* found (Fig. 3). In general, studies using transcriptomics to assess changes in gene expression levels in response to environmental salinities in fish are scarce. Si et al. (2018) demonstrated that environmental salinity strongly modulates hepatic transcriptome profiles in the euryhaline flatfish *Cynoglossus semilaevis*, especially in lipid metabolism and osmoregulation pathways, albeit with a coverage of 25 million reads per sample, there was no mention to any of the enzymes involved in LC-PUFA biosynthesis. Similarly, transcriptomic profile of *Oreochromis niloticus* showed that adaptation to environmental salinity induced changes in metabolic pathways involved in fatty acid synthesis, lipid digestion and unsaturated fatty acid absorption and synthesis related to energy use (Xu et al., 2015). Osmotic stress plays a key role in euryhaline fishes where an adaptation to changes in environmental salinity showed a modulation of genes related to carbohydrate and protein metabolism in a compensatory manner to an increase in energy demand in *Hypomesus transpacificus* (Komoroske et al., 2016), *Chanos chanos* (Hu et al., 2015) and *Lateolabrax maculatus* (Zhang et al., 2017). Transcriptomic studies in liver and intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar*, showed that genes differentially expressed in low salinity conditions, were involved

in metabolic pathways of lipid biosynthesis, while in marine salinity, differential expression of genes related to lipid digestion and absorption were predominant (Gillard et al., 2018). This data demonstrates that LC-PUFA biosynthesis metabolism is poorly represented in liver transcriptome compared to other metabolisms. These results support the difficulties found to obtain *elovl5* in *P. orbignyanus* hepatic transcriptome. Whole genome sequencing of *P. orbignyanus* in combination with high coverage hepatic transcriptome sequencing would ease the identification and the study of *fads2* and *elovl* enzymes.

Environmental salinity influenced gene expression of *fads2* and *elovl4* in *P. orbignyanus*, showing an increase in the relative expression of *fads2* and *elovl4* at the lowest salinity treatment (2 ppt). Increase in *fads2* expression could be related to an environmental adaptation to a natural diet low in LC-PUFA but rich in PUFA substrates when in lowest salinities, although this was not seen at intermediate salinities. Gene expression patterns in response to environmental salinity differ among fish species. Salinity effect on LC-PUFA metabolism was first reported by Li et al. (2008) in a euryhaline fish, *Siganus canaliculatus*, where a higher relative expression of mRNA $\Delta 6$ desaturase was obtained at a lower salinity (10 ppt vs. 32 ppt). In addition to salinity, dietary fatty acid profile was also shown to exert a modulating effect on the gene expression of *fads2* in this species, leading to an interaction between diet and environmental salinity (Li et al., 2008). Different results were seen

Table 7Fatty acid composition of total lipids (mg g⁻¹ dw) in muscle tissue (with skin) from *P. orbignyanus* juveniles reared at different salinities.

Fatty acids	Initial	2 ppt	10 ppt	18 ppt	26 ppt
14:0	2.02 (0.23)	0.69 (0.58) ^{ab}	1.13 (0.39) ^a	0.60 (0.51) ^b	0.50 (0.31) ^b
15:1n-5	0.02 (0.01)	0.09 (0.09)	0.06 (0.09)	0.07 (0.09)	0.02 (0.05)
16:0	8.57 (0.77)	4.63 (2.91) ^{ab}	6.59 (2.40) ^a	3.84 (1.76) ^b	3.49 (1.58) ^b
16:1n-9	0.34 (0.02)	0.09 (0.10)	0.07 (0.05)	0.07 (0.04)	0.13 (0.07)
16:1n-7	3.40 (0.23)	0.92 (0.82) ^{ab}	1.84 (0.79) ^a	0.85 (0.69) ^b	0.69 (0.44) ^b
16:2n-3	0.05 (0.01)	0.02 (0.01) ^b	0.07 (0.04) ^a	0.02 (0.02) ^b	0.02 (0.02) ^b
16:2n-4	0.56 (0.02)	0.15 (0.11) ^b	0.27 (0.14) ^a	0.14 (0.12) ^b	0.11 (0.06) ^b
17:1n-7	0.34 (0.04)	0.08 (0.07)	0.13 (0.08)	0.05 (0.07)	0.06 (0.03)
16:3n-4	0.08 (0.05)	0.05 (0.04)	0.08 (0.03)	0.06 (0.04)	0.06 (0.04)
18:0	1.94 (0.04)	1.55 (0.87)	1.97 (0.74)	1.25 (0.42)	0.93 (0.45)
18:1n-9	5.99 (0.60)	3.69 (4.29)	6.87 (4.98)	3.77 (2.43)	3.05 (1.57)
18:1n-7	2.22 (0.14)	0.47 (0.54)	0.94 (0.63)	0.58 (0.33)	0.75 (0.57)
18:2n-6	1.02 (0.26)	3.03 (2.55) ^{ab}	3.71 (2.19) ^a	1.98 (1.19) ^{a,b}	1.76 (0.90) ^b
18:3n-6	nd	0.09 (0.12)	0.05 (0.03)	0.04 (0.03)	0.05 (0.05)
18:3n-3	0.93 (0.58)	7.87 (7.41)	9.68 (6.57)	4.81 (3.59)	4.45 (2.87)
18:4n-3	0.59 (0.07)	0.21 (0.18) ^{ab}	0.37 (0.17) ^a	0.18 (0.15) ^b	0.14 (0.10) ^b
20:1n-11	0.10 (0.01)	0.04 (0.03) ^{ab}	0.08 (0.04) ^a	0.05 (0.05) ^{ab}	0.03 (0.02) ^b
20:1n-9	0.57 (0.09)	0.17 (0.15) ^{ab}	0.36 (0.16) ^a	0.14 (0.14) ^b	0.13 (0.07) ^b
20:1n-7	0.16 (0.09)	0.04 (0.03)	0.07 (0.04)	0.04 (0.02)	0.03 (0.02)
20:2n-6	0.11 (0.08)	0.07 (0.05)	0.12 (0.07)	0.06 (0.04)	0.06 (0.04)
20:3n-6	0.11 (0.03)	0.04 (0.03)	0.07 (0.05)	0.03 (0.03)	0.04 (0.03)
20:4n-6	0.85 (0.10)	0.29 (0.13)	0.41 (0.10)	0.29 (0.10)	0.24 (0.11)
20:3n-3	0.12 (0.02)	0.45 (0.39)	0.54 (0.28)	0.32 (0.20)	0.31 (0.15)
20:4n-3	0.29 (0.03)	0.10 (0.08) ^{ab}	0.18 (0.08) ^a	0.08 (0.06) ^b	0.07 (0.03) ^b
20:5n-3	3.48 (0.13)	1.10 (0.66) ^{ab}	1.89 (0.67) ^a	1.03 (0.55) ^b	0.87 (0.39) ^b
22:1n-11	0.32 (0.01)	0.08 (0.08) ^{ab}	0.08 (0.09) ^a	0.08 (0.08) ^b	0.04 (0.04) ^b
22:4n-6	0.12 (0.06)	0.08 (0.09)	0.08 (0.04)	0.05 (0.03)	0.05 (0.04)
22:5n-6	0.36 (0.06)	0.10 (0.06) ^b	0.17 (0.05) ^a	0.11 (0.05) ^b	0.10 (0.05) ^b
22:5n-3	1.67 (0.16)	0.56 (0.31) ^{ab}	0.55 (0.41) ^a	0.55 (0.28) ^b	0.45 (0.20) ^b
24:1n-9	0.19 (0.01)	0.08 (0.04)	0.12 (0.07)	0.08 (0.04)	0.05 (0.03)
22:6n-3	7.50 (0.76)	2.73 (0.95) ^b	4.18 (1.21) ^a	2.80 (0.95) ^b	2.52 (1.26) ^b
SAFA	13.38 (0.75)	7.19 (4.52) ^{ab}	10.08 (3.57) ^a	5.97 (2.73) ^b	4.75 (2.08) ^b
MUFA	15.31 (1.85)	7.81 (6.55) ^{ab}	11.88 (5.88) ^a	5.96 (3.90) ^b	5.20 (2.83) ^b
n-3 PUFA	19.58 (9.90)	13.03 (9.82)	17.90 (9.15)	9.80 (5.41)	8.84 (4.44)
n-6 PUFA	4.30 (3.38)	3.71 (2.96)	4.63 (2.52) ^a	2.58 (1.40)	2.29 (1.14) ^b
n-3 LC-PUFA	11.33 (3.54)	4.94 (2.32) ^b	7.78 (2.59) ^a	4.79 (1.86) ^b	4.22 (1.89) ^b

Values, mean (SD), with different letter superscript within each row were significantly different ($P < 0.05$).nd = not detected; SAFA = sum of saturated fatty acids, MUFA = sum of monounsaturated fatty acids, PUFA = sum of polyunsaturated fatty acids; LC-PUFA = sum of long chain ($\geq C_{20}$) polyunsaturated fatty acids.

in the euryhaline Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*), where, although *fads2* gene expression was higher when reared in freshwater, gene expression of *elovl5* was found to be increased in seawater (Dong et al., 2020). Similarly, in *Pagrus major* (Sarker et al., 2011), *fads2* gene expression in liver experienced an increase when salinity was decreased from 20 and 30 ppt to 15 ppt, but only when dietary fish oil was replaced by vegetable oil. However, regarding *elovl5* gene expression in this marine fish species, similar levels were observed at all salinity and dietary treatments (Sarker et al., 2011). Similarly, *Solea senegalensis* showed an increase in *fads2* and *elovl5* gene expression when cultured at 20 ppt compared to 30 ppt (Marrero et al., 2021). In *P. orbignyanus*, the lack of differences in *fads2* and *elovl4* expression at intermediate salinities could be related to the ability of this species to adapt to very low environmental salinities (2 ppt) showing a dichotomy between a freshwater and marine environments gene expression pattern.

Our results for growth performance of *P. orbignyanus* at different salinities support previous findings that demonstrate the strong euryhalinity of this species from early life stages (Sampaio et al., 2007). Other species, such as *S. canaliculatus* (Li et al., 2008) and *P. major* (Sarker et al., 2011), also showed no effect of salinity on growth performance. However, Sampaio and Bianchini (2002) reported a higher SGR for *P. orbignyanus* juveniles reared for 90 days in seawater compared to those reared in freshwater. Although some euryhaline fish species showed better growth rates at salinities close to the isosmotic point (Martínez-Palacios et al., 2004; Vargas-Chacoff et al., 2016; Liu et al., 2017), other species such as *Solea senegalensis* showed higher growth rates at higher salinities 25 ppt and 39 ppt but not at 15 ppt

(Arjona et al., 2009).

The highest total lipid content in *P. orbignyanus* muscle, associated to the highest proportion of neutral lipids, was found at salinity 10 ppt and decreased towards 2 ppt and 26 ppt. These results suggest a higher fatty acid mobilization at 2 ppt, 18 ppt and 26 ppt to cope with energetic requirements for osmoregulation when salinities move away from the isosmotic point, determined by Sampaio and Bianchini (2002) at 10.9 ppt.

The fatty acid profile of *P. orbignyanus* at the conclusion of the experiment closely resembled the dietary fatty acid profile of the diet, consistent with previous findings reported in several studies (Bell et al., 2001; Shepherd et al., 2017; Carvalho et al., 2018). It is noticeable the high proportions of 18:2n-6 and 18:3n-3 due to their high dietary content and the decrease in EPA and DHA proportions in accordance with the low LC-PUFA levels in diet. This pattern is commonly observed in feeding trials with fish meal and fish oil replacement in fish feeds by vegetable protein and lipid sources (Lund et al., 2019; Shepherd et al., 2017; Turchini et al., 2009).

In contrast, the impact of environmental salinity on overall fatty acid profile had very little effect or was minimal. However, certain fatty acids (16:1n-7, 18:4n-3, 20:1n-9 and 20:4n-3) displayed higher proportions at 10 ppt salinity, decreasing towards 2 ppt and 26 ppt salinities in a similar pattern described earlier with total lipid content, probably due to their mobilization to cope with energetic demands at 2 ppt, 18 ppt and 26 ppt. These results reflect the strong euryhalinity of *P. orbignyanus* and the ability to cope with a wide range of environmental salinities. Similar results were observed in *Solea senegalensis* (Marrero et al., 2021) and in

Lates calcarifer (Alhazzaa et al., 2011a) where fatty acid profiles showed an adaptation to dietary changes but not to salinity.

The results observed in LC-PUFA biosynthesis capability in response to salinity are disparate among the different species studied. Changes in the resulting fatty acid profile in *P. orbignyanus* do not appear to reflect changes in LC-PUFA biosynthesis, even though an increase in *fads2* gene expression was observed due to the effect of salinity. Similar results were found in *Lates calcarifer* a euryhaline fish where no changes were observed in the fatty acid profile due to the effect of environmental salinity, despite an increase in gene expression of $\Delta 6$ *fads2* (Alhazzaa et al., 2011a). Further results demonstrated that *L. calcarifer* biosynthesis capabilities are limited, not being able to cover EPA and DHA requirements when dietary fish oil is replaced by C18 PUFA rich vegetable in freshwater and marine water conditions (Alhazzaa et al., 2011b). In contrast, *Siganus canaliculatus*, an herbivorous marine fish, showed evident differences in fatty acid profiles due to an increase in gene level expression of *fads2* and *elovl* upon a decrease in salinity (Li et al., 2008; Xie et al., 2015). *Chirostoma estor*, a carnivorous freshwater fish, showed an increase in bioconversion activity towards LC-PUFA when cultured at 15 ppt compared to 0 ppt and 5 ppt (Fonseca-Madrugal et al., 2012). *Pagrus major*, a marine fish species, showed a significant increase in DHA and EPA proportions on liver total lipids at 15 ppt and 20 ppt compared to 33 ppt, suggesting biosynthetic capabilities of LC-PUFA (Sarker et al., 2011). In our study, when considering muscle lipid contents of *P. orbignyanus*, fish reared at 10 ppt showed the highest content of most fatty acids affected by salinity (OA, LA, ALA, AA, EPA, DHA, SAFA, MUFA and n-3 LC-PUFA) followed by those reared at 2 ppt. Other fish species accumulate C₁₈-PUFA at low salinities while at high salinities they accumulate LC-PUFA. As an example, the euryhaline fish *Alosa sapidissima* showed the highest LA and ALA percentage in muscle tissue at 7 ppt while the highest EPA and DHA contents were observed at 28 ppt (Liu et al., 2017). In *Anguilla anguilla*, LA and ALA were also more abundant in fish muscle and liver when reared at freshwater salinities while LC-PUFA accumulated at seawater and brackish water (Parzanini et al., 2021). However, in *Lateolabrax japonicus* fed a commercial diet, LA, ALA and LC-PUFA were higher in muscle lipids in marine cages than in freshwater ponds, although in liver lipids LA and ALA were higher in freshwater than in marine cages (Dong et al., 2020). In order to fully understand fish physiology in response to salinity and LC-PUFA metabolism, the gene repertoire of *fads2* and *elovl*, gene expression patterns and enzymatic activity must be fully characterized along with fatty acid mobilization and retention across several tissues.

5. Conclusions

P. orbignyanus exhibited a remarkable capability to adapt to different salinities which is of interest in diversification of aquaculture. The effect of salinity on *fads2* and *elovl4* gene expression suggests that a lower salinity may enhance LC-PUFA biosynthesis. Nevertheless, it is important to highlight that the fatty acid profile of the fish does not necessarily reflect this activity, which underscores how unreliable it can be to make direct inferences from the fatty acid profile. However, future studies should address the extent to which *P. orbignyanus* can be able to produce LC-PUFA by determining the desaturase and elongase activity and their substrate specificity. Additionally, the application of massive parallel sequencing may accelerate research in aquaculture, where whole genome sequencing in conjunction with RNA-Seq play a key role in future studies, specially in non-model fish species.

CRedit authorship contribution statement

E. Fernandez-López: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Y. Panzera:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision,

Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **M. Bessonart:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **A. Marandino:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology. **F. Féola:** Investigation, Resources, Validation. **J. Gadea:** Methodology, Resources, Validation. **L. Magnone:** Methodology, Resources, Validation. **M. Salhi:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Elena Fernandez Lopez reports financial support was provided by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) Uruguay.

Data availability

Data accessible through genbank accession numbers

Acknowledgements

This work was supported by a PhD grant from *Agencia Nacional de Investigación e Innovación* (ANII, Uruguay) with grant number POS-NAC_2017_1_140114. We would like to thank the Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) for providing the facilities for the animal experimentation.

References

- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 142, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.08.005>.
- Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D.A., Bollin, C., Bolton, E., Bourexis, D., Brister, J.R., Bryant, S.H., Canese, K., Cavanaugh, M., Charowhas, C., Clark, K., Dondoshansky, I., Feolo, M., Fitzpatrick, L., Funk, K., Geer, L.Y., Gorenlenkov, V., Graeff, A., Hlavina, W., Holmes, B., Johnson, M., Kattman, B., Khotomlianski, V., Kimchi, A., Kimelman, M., Kimura, M., Kitts, P., Klimke, W., Kotliarov, A., Krasnov, S., Kuznetsov, A., Landrum, M.J., Landsman, D., Lathrop, S., Lee, J.M., Leubsdorf, C., Lu, Z., Madden, T.L., Marchler-Bauer, A., Malheiro, A., Meric, P., Karsch-Mizrachi, I., Mnev, A., Murphy, T., Orris, R., Ostell, J., O'Sullivan, C., Palanigobu, V., Panchenko, A.R., Phan, L., Pierov, B., Pruitt, K.D., Rodarmer, K., Sayers, E.W., Schneider, V., Schoch, C.L., Schuler, G.D., Sherry, S.T., Siyan, K., Soboleva, A., Sousoff, V., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Thibaud-Nissen, F., Todorov, K., Trawick, B.W., Vakarov, D., Ward, M., Yaschenko, E., Zasyrkin, A., Zbic, K., 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 46, D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>.
- Alhazzaa, R., Bridle, A.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2011a. Up-regulated desaturase and elongase gene expression promoted accumulation of polyunsaturated fatty acid (PUFA) but not long-chain PUFA in lates calcarifer, a tropical euryhaline fish, fed a stearidonic acid- and γ -linoleic acid-enriched diet. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8423–8434. <https://doi.org/10.1021/jf201871w>.
- Alhazzaa, R., Bridle, A.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2011b. Replacing dietary fish oil with Echium oil enriched barramundi with C18 PUFA rather than long-chain PUFA. *Aquaculture* 312, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.023>.
- AOAC, 2006. *Official Methods of Analysis*, 18th ed. Gaithersburgs, MD.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* 287, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.047>.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131, 1535–1543.
- Bessonart, M., Salhi, M., 2018. Cultivo del lenguado *Paralichthys orbignyanus*, MGAP-DINARA. MGAP-DINARA, Montevideo.
- Betancor, M.B., Sprague, M., Montero, D., Usher, S., Sayanova, O., Campbell, P.J., Napier, J.A., Caballero, M.J., Izquierdo, M., Tocher, D.R., 2016. Replacement of marine fish oil with de novo Omega-3 oils from transgenic *Camelina sativa* in feeds for Gilthead Sea bream (*Sparus aurata* L.). *Lipids* 51, 1171–1191. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4191-4>.

- Bhandari, S., Lee, J.N., Kim, Y. Il, Nam, I.K., Jung, Kim, Su, Kim, Se Jin, Kwak, S.A., Oh, G.S., Kim, H.J., Yoo, H.J., So, H.S., Choe, S.K., Park, R., 2016. The fatty acid chain elongase, Elovl1, is required for kidney and swim bladder development during zebrafish embryogenesis. *Organogenesis* 12, 78–93. <https://doi.org/10.1080/15476278.2016.1172164>.
- Bianchini, A., Robaldo, R., Sampaio, L.A., 2010. Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*), in: *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. Editora UFSM, p. 29.
- Bieberich, E., 2018. Sphingolipids and lipid rafts: novel concepts and methods of analysis. *Chem. Phys. Lipids* 216, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003>.
- Bitencourt, J.A., Affonso, P.R.A.M., Ramos, R.T.C., Schneider, H., Sampaio, I., 2023. Phylogenetic relationships and the origin of New World soles (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae): the role of estuarine habitats. *Mol. Phylogenet. Evol.* 178, 107631 <https://doi.org/10.1016/j.jmpev.2022.107631>.
- Bolasina, S.N., 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. *Aquaculture* 313, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.011>.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosen, N., Morisset, D., 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci. Technol.* 37, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>.
- Calder, P.C., 2015. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 39, 18S–32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115559580>.
- Carmona-Antoñanzas, G., Monroig, Ó., Dick, J.R., Davie, A., Tocher, D.R., 2011. Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.007>.
- Carmona-Antoñanzas, G., Tocher, D.R., Taggart, J.B., Leaver, M.J., 2013. An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon. *BMC Evol. Biol.* 13 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-85>.
- Carruthers, M., Yurchenko, A.A., Augley, J.J., Adams, C.E., Herzyk, P., Elmer, K.R., 2018. De novo transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species. *BMC Genomics* 19, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4379-x>.
- Carvalho, M., Peres, H., Saleh, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Oliva-Teles, A., Izquierdo, M., 2018. Dietary requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for fast growth of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fingerlings. *Aquaculture* 488, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.028>.
- Castro, L.F.C., Monroig, Ó., Leaver, M.J., Wilson, J., Cunha, I., Tocher, D.R., 2012. Functional desaturase Fads1 ($\Delta 5$) and Fads2 ($\Delta 6$) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. *PLoS One* 7, e31950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031950>.
- Christie, W.W., 2010. Lipid Analysis – Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. Pergamon Press. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2003.00361.x>.
- da Fonseca, R.R., Albrechtsen, A., Themudo, G.E., Ramos-Madrugal, J., Sibbesen, J.A., Maretty, L., Zepeda-Mendoza, M.L., Campos, P.F., Heller, R., Pereira, R.J., 2016. Next-generation biology: sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Mar. Genomics* 30, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.012>.
- Deák, F., Anderson, R.E., Fessler, J.L., Sherry, D.M., 2019. Novel cellular functions of very long chain-fatty acids: insight from ELOVL4 mutations. *Front. Cell. Neurosci.* 13 <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00428>.
- Dong, X., Wang, J., Ji, P., Sun, L., Miao, S., Lei, Y., Du, X., 2020. Seawater culture increases Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (N-3 LC-PUFA) levels in Japanese Sea bass (*Lateolabrax japonicus*), probably by upregulating Elovl5. *Animals* 10, 1681. <https://doi.org/10.3390/ani10091681>.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fonseca-Madrugal, J., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2006. Nutritional and environmental regulation of the synthesis of highly unsaturated fatty acids and of fatty-acid oxidation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) enterocytes and hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 32, 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9109-2>.
- Fonseca-Madrugal, J., Pineda-Delgado, D., Martínez-Palacios, C., Rodríguez, C., Tocher, D.R., 2012. Effect of salinity on the biosynthesis of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in silverside *Chirostoma estor*. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1047–1057. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9589-6>.
- Frayse, C., Petrarola, A., 2013. Crecimiento del linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) en condiciones de cultivo.
- Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M.B., Pérez, J.A., Acosta, N.G., Tocher, D.R., Rodríguez, C., Monroig, Ó., 2019. Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl desaturases occurs independently of the trophic level. *Sci. Rep.* 9, 11199. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47709-0>.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- Gibson, R.N., Veer, R.D.M.N., Geffen, A.J., Van Der, H.W., 2014. Flatfishes: Biology and Exploitation. Wiley, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9781118501153>.
- Gillard, G., Harvey, T.N., Gjuvsland, A., Jin, Y., Thomassen, M., Lien, S., Leaver, M., Torgersen, J.S., Hvidsten, T.R., Vik, J.O., Sandve, S.R., 2018. Life-stage-associated remodelling of lipid metabolism regulation in Atlantic salmon. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.14533>.
- Hastings, N., Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from ??-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Biotechnol.* 6, 463–474. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3002-8>.
- Hibberd, J.M., Patro, R., Kelly, S., Boursnell, C., Smith-Unna, R., 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res.* 26, 1134–1144. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>.
- Hixson, S.M., 2014. Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner. *J. Aquac. Res. Dev.* 03 <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000234>.
- Hu, Y.C., Kang, C.K., Tang, C.H., Lee, T.H., 2015. Transcriptomic analysis of metabolic pathways in milkfish that respond to salinity and temperature changes. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134959>.
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L.P., Szklarczyk, D., Jensen, L.J., Von Mering, C., Bork, P., Delbru, M., 2017. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S.K., Cook, H., Mende, D.R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2019. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 47, D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>.
- Huggett, J.F., O'Grady, J., Bustin, S., 2015. qPCR, dPCR, NGS – a journey. *Biomol. Detect. Quantif.* 3, A1–A5. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.001>.
- Izquierdo, M.S., Turkmen, S., Montero, D., Zamorano, M.J., Afonso, J.M., Karalazos, V., Fernández-Palacios, H., 2015. Nutritional programming through broodstock diets to improve utilization of very low fishmeal and fish oil diets in gilthead sea bream. *Aquaculture* 449, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.032>.
- Kabeya, N., Chiba, M., Haga, Y., Satoh, S., Yoshizaki, G., 2017. Cloning and functional characterization of fads2 desaturase and elovl5 elongase from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 214, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.09.002>.
- Kihara, A., 2012. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.* 152, 387–395. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>.
- Komoroske, L.M., Jeffries, K.M., Connor, R.E., Dexter, J., Hasenbein, M., Verhille, C., Fangue, N.A., 2016. Sublethal salinity stress contributes to habitat limitation in an endangered estuarine fish. *Evol. Appl.* 9, 963–981. <https://doi.org/10.1111/eva.12385>.
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.
- Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>.
- Li, Y., Hu, C., Zheng, Y., Xia, X., Xu, W., Wang, S., Chen, W., Sun, Z., Huang, J., 2008. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.013>.
- Li, F.D., Tong, W., Xia, E.H., Wei, C.L., 2019. Optimized sequencing depth and de novo assembler for deeply reconstructing the transcriptome of the tea plant, an economically important plant species. *BMC Bioinformatics* 20, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3166-x>.
- Little, D.C., Newton, R.W., Beveridge, M.C.M., 2016. Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proc. Nutr. Soc.* 75, 274–286. <https://doi.org/10.1017/s0029665116000665>.
- Liu, Z.F., Gao, X.Q., Yu, J.X., Qian, X.M., Xue, G.P., Zhang, Q.Y., Liu, B.L., Hong, L., 2017. Effects of different salinities on growth performance, survival, digestive enzyme activity, immune response, and muscle fatty acid composition in juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish Physiol. Biochem.* 43, 761–773. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0330-3>.
- López, A.V., Müller, M.I., Radonić, M., Bambill, G.A., Boccanfuso, J.J., Bianca, F.A., 2009. Larval culture technique and quality control in juveniles of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) in Argentina. *Water* 7, 75–82. <https://doi.org/10.5424/400>.
- Lund, I., Rodríguez, C., Izquierdo, M.S., El Kertaoui, N., Kestemont, P., Reis, D.B., Dominguez, D., Pérez, J.A., 2019. Influence of dietary lipids and α -linolenic acid based diets on ontogenetic development and metabolism of unsaturated fatty acids in pike perch larvae (*Sander lucioperca*). *Aquaculture* 500, 550–561. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.061>.
- Magnone, L., Bessonart, M., Gadea, J., Salhi, M., 2015a. Trophic relationships in an estuarine environment: a quantitative fatty acid analysis signature approach. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 166, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.033>.
- Magnone, L., Bessonart, M., Rocamora, M., Gadea, J., Salhi, M., 2015b. Diet estimation of *Paralichthys orbignyanus* in a coastal lagoon via quantitative fatty acid signature analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 462, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.10.008>.
- Marrero, M., Monroig, Ó., Betancor, M., Herrera, M., Pérez, J.A., Garrido, D., Galindo, A., Giraldez, I., Rodríguez, C., 2021. Influence of dietary lipids and environmental salinity on the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis capacity of the marine teleost *Solea senegalensis*. *Mar. Drugs* 19. <https://doi.org/10.3390/md19050254>.
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, J.C., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G., 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.032>.

- Matsushita, Y., Miyoshi, K., Kabeya, N., Sanada, S., Yazawa, R., Haga, Y., Satoh, S., Yamamoto, Y., Strüßmann, C.A., Luckenbach, J.A., Yoshizaki, G., 2020. Flatfishes colonised freshwater environments by acquisition of various DHA biosynthetic pathways. *Commun. Biol.* 3, 4–5. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01242-3>.
- Miller, M.A., Schwartz, T., Pickett, B.E., He, S., Klem, E.B., Scheuermann, R.H., Passarotti, M., Kaufman, S., Oleary, M.A., 2015. A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. *Evol. Bioinforma.* 11, 43–48. <https://doi.org/10.4137/EBO.S21501>.
- Monroig, Ó., Navarro, J.C., Tocher, D.R., 2011. Long-chain polyunsaturated fatty acids in fish: recent advances on desaturases and elongases involved in their biosynthesis. In: *Av. en Nutr. Acuicola XI - Memorias del Décimo Prim. Simp. Int. Nutr. Acuicola*, 23–25 Noviembre, San Nicolás los Garza, N. L., México, pp. 257–283.
- Monroig, Ó., Lopes-Marques, M., Navarro, J.C., Hontoria, F., Ruivo, R., Santos, M.M., Venkatesh, B., Tocher, D.R., Castro, C., 2016. Evolutionary functional elaboration of the Elovl2/5 gene family in chordates. *Sci. Rep.* 6, 20510. <https://doi.org/10.1038/srep20510>.
- Monroig, Ó., Tocher, D.R., Castro, L.F.C., 2018. Polyunsaturated Fatty acid biosynthesis and metabolism in fish. In: *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811230-4.00003-X>.
- Morais, S., Torres, M., Hontoria, F., Monroig, Ó., Varó, I., Agulleiro, M.J., Navarro, J.C., 2020. Molecular and functional characterization of elovl4 genes in *Sparus aurata* and *Solea senegalensis* pointing to a critical role in very long-chain (>C24) fatty acid synthesis during early neural development of fish. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21103514>.
- Muir, P., Li, S., Lou, S., Wang, D., Spakowicz, D.J., Salichos, L., Zhang, J., Weinstock, G. M., Isaacs, F., Rozowsky, J., Gerstein, M., 2016. The real cost of sequencing: scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biol.* 17, 53. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0917-0>.
- Mulligan, B., Trushenski, J., 2013. Use of standard or modified plant-derived lipids as alternatives to fish oil in feeds for juvenile Nile tilapia. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 22, 47–57. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.623336>.
- Munroe, T.A., 2015. Systematic diversity of the Pleuronectiformes. In: *Flatfishes: Biology and Exploitation*, pp. 13–51. <https://doi.org/10.1002/9781118501153.ch2>.
- Nelson, J.S., Terry, C.G., M.V.H.W., 2016. *Fishes of the World*, Systematic Zoology.
- Norbis, W., 2004. Feeding habits of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. *Cienc. Mar.* 30, 619–626.
- Norbis, W., Galli, O., 2004. Feeding habits of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) in a shallow coastal lagoon of the southern Atlantic Ocean: Rocha, Uruguay. *Cienc. Mar.* 30, 619–626.
- Oboh, A., Navarro, J.C., Tocher, D.R., Monroig, Ó., 2017. Elongation of very long-chain (>C24) fatty acids in *Clarias gariepinus*: cloning, functional characterization and tissue expression of elovl4 Elongases. *Lipids* 52, 837–848. <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4289-3>.
- Parrish, C.C., Wacker, A., Colombo, S.M., Arts, M.T., Kainz, M.J., 2016. A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. *Environ. Rev.* 25, 163–174. <https://doi.org/10.1139/er-2016-0062>.
- Parzanini, C., Arts, M.T., Rohla, M., Koprivnikar, J., Power, M., Skiftesvik, A.B., Browman, H.I., Milotic, D., Durif, C.M.F., 2021. Feeding habitat and silvering stage affect lipid content and fatty acid composition of European eel *Anguilla anguilla* tissues. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.14815>.
- Patterson, J., Carpenter, E.J., Zhu, Z., An, D., Liang, X., Geng, C., Drmanac, R., Wong, G. K.S., 2019. Impact of sequencing depth and technology on de novo RNA-Seq assembly. *BMC Genomics* 20, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5965-x>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Purohit, G.K., Mahanty, A., Mahanty, B.P., Mahanty, S., 2016. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in the murrell *Channa striata* under high-temperature stress. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0123-0>.
- Rana, S.B., Zadlock, F.J., Zhang, Z., Murphy, W.R., Bentivegna, C.S., 2016. Comparison of de novo transcriptome assemblers and k-mer strategies using the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *PLoS One* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153104>.
- Ravi, V., Venkatesh, B., 2018. The divergent genomes of Teleosts. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 6, 47–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014821>.
- Rivera Prisco, A., García de la Rosa, S.B., Díaz de Astarloa, J.M., 2001. Feeding ecology of flatfish juveniles (Pleuronectiformes) in mar Chiquita lagoon (Buenos Aires Argentina). *Estuaries* 24, 917–925. <https://doi.org/10.2307/1353182>.
- Robertson, G., Schein, J., Chiu, R., Corbett, R., Field, M., Jackman, S.D., Mungall, K., Lee, S., Okada, H.M., Qian, J.Q., Griffith, M., Raymond, A., Thiessen, N., Cezard, T., Butterfield, Y.S., Newsome, R., Chan, S.K., She, R., Varhol, R., Kamoh, B., Prabhu, A. L., Tam, A., Zhao, Y., Moore, R.A., Hirst, M., Marra, M.A., Jones, S.J.M., Hoodless, P. A., Birol, I., 2010. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nat. Methods* 7, 909–912. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1517>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., John, P., Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. *Society of systematic biologists MrBayes 3. 2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space* Huelsenbeck Source. *Syst. Biol.* 61 (3), 539–542. May 2012. Published by: Oxford University.
- Salhi, M., Bessonart, M., 2012. Growth, survival and fatty acid composition of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) larvae fed on artificial diet alone or in combination with *Artemia nauplii*. *Aquac. Res.* 44, 41–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03004.x>.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187–196. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00395-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00395-1).
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2008. Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities, 11, 67–75. https://doi.org/10.1300/J028v11n01_06.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo, R. B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.046>.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. *Fish Nutr.* 153–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12319652-1/50005-7>.
- Sarker, M.A.-A., Yamamoto, Y., Haga, Y., Sarker, M.S.A., Miwa, M., Yoshizaki, G., Satoh, S., 2011. Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 77, 385–396. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0342-y>.
- Shepherd, C.J., Jackson, A.J., 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *J. Fish Biol.* 83, 1046–1066. <https://doi.org/10.1111/jfb.12224>.
- Shepherd, C.J., Monroig, Ó., Tocher, D.R., 2017. Future availability of raw materials for salmon feeds and supply chain implications: the case of Scottish farmed salmon. *Aquaculture* 467, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.021>.
- Si, Y., Wen, H., Li, Y., He, F., Li, J., Li, S., He, H., 2018. Liver transcriptome analysis reveals extensive transcriptional plasticity during acclimation to low salinity in *Cynoglossus semilaevis*. *BMC Genomics* 19, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4825-4>.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Allan, G., El-Sayed, A.-F.M., Jackson, A., Kaushik, S.J., Ng, W.-K., Suresh, V., Viana, M.T., 2013. *Aquaculture feeds: addressing the long-term sustainability of the sector*. In: *Proc. Glob. Conf. Aquac.* 2010. Farming Waters People Food, Vol. 1, pp. 193–231.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 41, 717–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>.
- Tocher, D., Betancor, M., Sprague, M., Olsen, R., Napier, J., 2019. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand. *Nutrients* 11, 89. <https://doi.org/10.3390/nu11010089>.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Wing-Keong, d., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–57. doi:10.1186.
- Turkmen, S., Hernández-Cruz, C.M., Zamorano, M.J., Fernández-Palacios, H., Montero, D., Afonso, J.M., Izquierdo, M., 2019. Long-chain PUFA profiles in parental diets induce long-term effects on growth, fatty acid profiles, expression of fatty acid desaturase 2 and selected immune system-related genes in the offspring of gilthead seabream. *Br. J. Nutr.* 122, 25–38. <https://doi.org/10.1017/S0007114519000977>.
- Vargas-Chacoff, L., Moneva, F., Oyarzún, R., Martínez, D., Saavedra, E., Ruiz-Jarabo, I., Muñoz, J.L.P., Bertrán, C., Mancera, J.M., 2016. Metabolic responses to salinity changes in the subantarctic notothenioid teleost *Eleginops maclovinus*. *Polar Biol.* 39, 1297–1308. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1854-1>.
- Wang, S., Monroig, Ó., Tang, G., Zhang, L., You, C., Tocher, D.R., Li, Y., 2014. Investigating long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish: functional characterization of fatty acyl desaturase (Fads2) and Elovl5 elongase in the catadromous species, Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 434, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.016>.
- Xie, D., Wang, S., You, C., Chen, F., Tocher, D.R., Li, Y., 2015. Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. *Aquac. Nutr.* 21, 541–551. <https://doi.org/10.1111/anu.12178>.
- Xie, D., Chen, C., Dong, Y., You, C., Wang, S., Monroig, Ó., Tocher, D.R., Li, Y., 2021. Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish. *Prog. Lipid Res.* 82. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101095>.
- Xu, Z., Gan, L., Li, T., Xu, C., Chen, K., Wang, X., Qin, J.G., Chen, L., Li, E., 2015. Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *PLoS One* 10, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136506>.
- Zhang, X., Wen, H., Wang, H., Ren, Y., Zhao, J., Li, Y., 2017. RNA-Seq analysis of salinity stress-responsive transcriptome in the liver of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *PLoS One* 12, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173238>.
- Zhao, N., Monroig, Ó., Navarro, J.C., Xiang, X., Li, Y., Du, J., Li, J., Xu, W., Mai, K., Ai, Q., 2019. Molecular cloning, functional characterization and nutritional regulation of two elovl4b elongases from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 511, 734221. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734221>.
- Zheng, W.J., Sun, L., 2011. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 30, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.014>.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl Delta6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.08.003>.
- Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, Ó., Morais, S., Tocher, D.R., 2009. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: characterisation of cDNAs of fatty acyl ?6 desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 290, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.010>.