

Resumen

El rápido crecimiento de la acuicultura en las últimas décadas, ha planteado una serie de problemas relacionados con la disponibilidad de ingredientes de origen marino como son las harinas y los aceites de pescado ("FM" y "FO" por sus siglas en inglés), utilizados en la elaboración de piensos. Estos ingredientes son de gran importancia en la formulación de piensos debido, entre otros factores, a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (C₂₀₋₂₄, "LC-PUFAs" del inglés) de la serie omega-3, nutrientes esenciales para vertebrados como los peces. Una estrategia altamente innovadora para la obtención de nuevos ingredientes ricos en LC-PUFAs, incluidos los omega-3, consiste en el cultivo intensivo de organismos capaces de producirlos cuando son alimentados con materiales que no los contienen, especialmente si estos son subproductos de otras industrias ampliamente disponibles y de bajo coste económico. La puesta en práctica de esta estrategia exige conocer, en primer lugar, la capacidad de producción endógena (biosíntesis) de LC-PUFAs en el organismo en cuestión y, en segundo lugar, cómo esta capacidad biosintética puede modularse para favorecer la acumulación de estos compuestos esenciales en la biomasa obtenida. Esta Tesis Doctoral plantea una serie de estudios dirigidos a esclarecer el potencial de los gamáridos para aplicar esta estrategia.

La biosíntesis de LC-PUFAs en animales requiere de la acción coordinada de enzimas elongasas y desaturasas, implicadas en la conversión de ácidos grasos relativamente cortos y poco insaturados de escaso valor nutricional, en LC-PUFAs de alto valor nutricional como los omega-3. Así pues, esta Tesis Doctoral ha investigado, por un lado, la presencia y la actividad de genes involucrados en la biosíntesis de LC-PUFAs en gamáridos tanto marinos como dulceacuícolas (Capítulos 2 y 3). Por otro lado, ha estudiado cómo diferentes dietas y temperaturas afectan al metabolismo de ácidos grasos, crecimiento y supervivencia en el gamárido marino *Gammarus locusta*, tanto a nivel fisiológico y composicional (Capítulo 4), como a nivel molecular (Capítulo 5). En este último caso, se ha generado un transcriptoma de referencia a partir de muestras de *G. locusta* cultivados y alimentados en diferentes condiciones, y que ha permitido el estudio de patrones de expresión de los genes involucrados en las rutas metabólicas de interés (Capítulo 5).

Respecto a la primera parte de esta Tesis Doctoral (Capítulos 2 y 3), los resultados han demostrado que los gamáridos tienen varias elongasas (*elovl*) que participan en las rutas de biosíntesis de LC-PUFAs, pero carecen de desaturasas, necesarias para completar tales rutas metabólicas. Utilizando como modelo la especie de gamárido marino *Echinogammarus marinus*, se ha identificado un total de tres tipos de elongasas denominadas "*elovl4*", "*elovl6*" y "*elovl1/7-like*" según la relación filogenética con sus correspondientes ortólogos de vertebrados. Estas elongasas, particularmente *elovl4* y *elovl1/7-like*, han demostrado tener la capacidad de elongación de ácidos grasos poliinsaturados necesaria para la biosíntesis de LC-PUFAs (Capítulo 2). Aunque no se han obtenido evidencias directas sobre las funciones que estas mismas enzimas tienen en gamáridos dulceacuícolas, las búsquedas de secuencias homólogas sí han permitido demostrar que la existencia de estos genes se conserva en todos los gamáridos. Sin embargo, un resultado interesante ha sido la identificación de secuencias de elongasas del tipo "*Elov12/5*" en gamáridos dulceacuícolas, pero no en especies marinas. Las elongasas *Elov12/5* son enzimas muy importantes en la biosíntesis de LC-PUFAs en invertebrados como los moluscos, pero nunca antes habían sido descritas en crustáceos (Capítulo 2). Para esclarecer el origen de estas secuencias, se ha realizado una búsqueda sistemática de este tipo de elongasas en todos los transcriptomas de gamáridos disponibles en bases de datos públicas. Las búsquedas no sólo han confirmado los resultados preliminares sobre la presencia de *Elov12/5* en gamáridos de agua dulce y su ausencia en gamáridos marinos, sino que también han puesto de manifiesto el mismo patrón de distribución para las desaturasas (Capítulo 3). Concretamente, los transcriptomas de gamáridos dulceacuícolas tienen cuatro secuencias diferentes correspondientes a desaturasas "*front-end*" (*fed*) y dos correspondientes a desaturasas "*methyl-end*" (*wx-des*), secuencias estas, ausentes en

transcriptomas de gamáridos marinos, como se ha descrito anteriormente en los resultados del Capítulo 2. Análisis más profundos han permitido establecer que las secuencias de *elovl2/5*, *fed* y *ωx*-des sólo se encuentran presentes en transcriptomas de gamáridos dulceacuícolas construidos a partir de muestras consistentes en individuos completos y obtenidos del medio natural. El estudio a nivel molecular y filogenético ha permitido aclarar que las secuencias de *elovl2/5*, *fed* y *ωx*-des detectadas de forma sistemática y exclusiva en transcriptomas de gamáridos dulceacuícolas pertenecen en realidad a rotíferos bdeloideos, y no a gamáridos como cabría esperar (Capítulo 3). Este hallazgo, más allá de poner al descubierto un problema metodológico asociado a la presencia de secuencias “contaminantes” en muchas bases de datos transcriptómicas disponibles para muchos organismos, incluidos los gamáridos, ha permitido comprobar que la relación entre gamáridos de agua dulce y rotíferos bdeloideos es una constante, independientemente de la localización geográfica del ecosistema dulceacuícola considerado (Capítulo 3). Este estudio ha permitido demostrar que la dotación enzimática de los rotíferos bdeloideos, que son generalmente epibiontes de gamáridos dulceacuícolas, los capacita para biosintetizar LC-PUFAs, incluidos los omega-3, en un ambiente (ecosistemas de agua dulce) en el que estos compuestos esenciales tienen una escasa abundancia en comparación con los ecosistemas marinos.

La segunda parte de esta Tesis Doctoral (Capítulos 4 y 5) ha investigado el efecto modulador de la dieta y de la temperatura sobre el metabolismo de ácidos grasos, y sobre procesos implicados en el crecimiento tales como la muda. Estos estudios se han realizado utilizando como modelo de estudio el gamárido marino *Gammarus locusta*, y aplicando abordajes metodológicos diferentes pero complementarios. El Capítulo 4 recoge los estudios sobre los efectos fisiológicos y composicionales de *G. locusta* alimentados con tres dietas con un contenido variable de LC-PUFAs, y cultivados a cuatro temperaturas (5 °C, 10 °C, 15 °C y 20 °C). Los resultados han mostrado que *G. locusta* experimenta un mayor crecimiento, aunque también mayores tasas de mortalidad, cuando se cultiva a temperaturas elevadas (20 °C). Respecto a los efectos de la dieta, los análisis han mostrado que la mortalidad también aumenta cuando *G. locusta* se alimenta con la dieta denominada “Coco”, consistente en la pulpa de este fruto, y caracterizada por un alto contenido en ácidos grasos saturados (“SFAs”, del inglés) y ausencia de LC-PUFAs (Capítulo 4). En cuanto a los efectos a nivel composicional, los resultados han evidenciado que los perfiles de ácidos grasos de los gamáridos son muy parecidos a los de las dietas con las que han sido alimentados, independientemente de la temperatura de cultivo. Por tanto, el efecto modulador de la dieta sobre la composición corporal de *G. locusta* es tal que llega a enmascarar incluso cualquier efecto derivado de la temperatura (Capítulo 4). Este efecto se refleja también en el contenido de LC-PUFAs omega-3, pero cabe destacar también, que incluso los gamáridos alimentados con dietas carentes en LC-PUFAs omega-3 conservan niveles apreciables de estos compuestos en sus lípidos corporales (Capítulo 4). Considerando que estos organismos no tienen las desaturasas necesarias para la biosíntesis de LC-PUFAs (Capítulos 2 y 3), la presencia de LC-PUFAs omega-3 en *G. locusta* alimentados con dietas carentes en estos compuestos indica una alta eficacia de retención de LC-PUFAs omega-3, aunque tampoco puede descartarse la adquisición de éstos a través de, por ejemplo, la microbiota del tracto digestivo.

Para determinar los mecanismos subyacentes a los efectos de la dieta y de la temperatura observados en el Capítulo 4, se ha llevado a cabo el análisis de expresión diferencial de genes (mediante secuenciación de ARN), en individuos de *G. locusta* de todos los tratamientos probados (Capítulo 5). Por un lado, se observa que una dieta carente de LC-PUFAs y rica en SFAs (la dieta “Coco”) lleva asociada una disminución en el catabolismo de ácidos grasos, y promueve la acumulación de estos compuestos al influir en la expresión tanto de genes como de factores de transcripción involucrados en estos procesos metabólicos como pueden ser *cpt1a* y *srebp1*, entre otros. Además, una dieta carente de LC-PUFAs y rica en SFAs, afecta negativamente al desarrollo y a la supervivencia de *G. locusta* según se desprende de los datos biométricos y de expresión de los genes involucrados en el ciclo de muda (p.ej., *mih* y *jheh*), proceso ligado al crecimiento y supervivencia (Capítulo 5). Respecto a los efectos de la temperatura, los resultados de expresión

génica sugieren que, temperaturas bajas, están relacionadas con un mayor metabolismo de ácidos grasos en *G. locusta*, lo que les permite adaptarse a ambientes fríos. Esta mayor activación metabólica a temperaturas bajas está evidenciada por un incremento en la expresión tanto de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos (p. ej., *elovl3/6* y *d9d*), como de otros responsables de su catabolismo (p.ej., *cpt1a*). El aumento en la expresión de estos genes se atenúa a medida que la temperatura aumenta. Los gamáridos cultivados a 20 °C (alta temperatura) muestran unos patrones de expresión génica que indican una aceleración en el desarrollo, particularmente en el ciclo de muda debida a una baja expresión de *mih* y *jheh*, que resulta en un mayor crecimiento y tasas de mortalidad más elevadas que a temperaturas más bajas. Según los resultados obtenidos en los Capítulos 4 y 5, puede concluirse que las temperaturas elevadas y las dietas pobres en LC-PUFAs no son adecuadas para el cultivo de *G. locusta* cuando el objetivo final es la obtención de biomasa rica en estos compuestos, ya que dichas condiciones afectan negativamente al perfil nutricional del animal y a su supervivencia.