

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SÍNTESIS Y  
ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN JUVENILES DE ERIZO  
MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* Y ERIZO NEGRO *Arbacia  
incisa***

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**JAIME HUMBERTO GARCÍA CHÁVEZ**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. SEPTIEMBRE DEL 2012**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DE SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN  
DE ÁCIDOS GRASOS EN JUVENILES DE ERIZO MORADO *Strongylocentrotus*  
*purpuratus* Y ERIZO NEGRO *Arbacia incisa*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JAIME HUMBERTO GARCÍA CHÁVEZ

Aprobada por:



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes

**Director de Tesis**



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte

**Sinodal**



Dra. María Teresa Viana Castrillón

**Sinodal**

**RESUMEN** de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias que presenta **Jaime Humberto García Chávez** como requisito para su titulación al posgrado de **ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**, con orientación en **NUTRICIÓN Y FISIOLOGÍA**. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2012

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DE SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN JUVENILES DE ERIZO MORADO *Strongylocentrotus purpuratus* Y ERIZO NEGRO *Arbacia incisa***

Resumen aprobado por:



**Dr. Juan Gabriel Correa Reyes**

Los efectos generales que tiene la temperatura sobre los organismos es un tema que se ha venido estudiando desde hace mucho tiempo. Sin embargo, es muy poca la información que se ha generado del efecto de esta sobre el metabolismo de ácidos grasos (AG) en los organismos marinos. Se cree que la temperatura pudiera llegar a ser un disparador de los procesos de elongación y desaturación de AG al encontrarse el organismo en un estado de estrés por la carencia de estos en su dieta. De ahí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la síntesis y acumulación de AG en juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y erizo negro *Arbacia incisa*. Para ello se realizaron un par de bioensayos de crecimiento con juveniles de 4.6 y 6.6 mm, respectivamente. Se elaboraron dos dietas las cuales fueron isoproteicas, isolipídicas y se basaron en los requerimientos de las especies de erizo. La primer dieta se formuló con una concentración estándar de AG del tipo PUFAs y LC-PUFAs (DC), mientras que en la segunda dieta (DE) fueron restringidos los AG del tipo LC-PUFAs. Los bioensayos se realizaron en dos sistemas de recirculación de agua de mar independientes, uno a 16°C y otro a 20°C. Se realizaron cinco muestreos (Día 0; 29; 51; 71 y 100), en donde se registro el crecimiento en peso y longitud (mm) de los organismos y se obtuvieron muestras para realizar los análisis de lípidos; AG y biología molecular. En erizo morado después de 100 días de experimentación se registro un incremento en peso del 360%; una tasa de crecimiento específico de 1.52 con una sobrevivencia del 100% con la dieta experimental y a 16°C. En el erizo negro se registro un crecimiento máximo de 113 %; una tasa de crecimiento específico de 0.79 con una sobrevivencia del 100%, con la dieta experimental y 20°C. En lo referente a los AG encontramos una correspondencia en concentración de los porcentajes obtenidos en las dietas con respecto al musculo del organismo. Para el caso del cambio neto encontramos un aumento importante de los AG C18:1n9 (169.49  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), C18:2n6 (673.52  $\mu\text{g org}^{-1}$ )

y C18:3n3 (1,046.00  $\mu\text{g org}^{-1}$ ); los cuales indirectamente nos hablan de un proceso de desaturación por la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa del C18:3n3 al C18:4n3 y una elongación al C20:4n3 y por ultimo una desaturación de este AG para llegar al C20:5n3 con un cambio neto de 644.57  $\mu\text{g org}^{-1}$ . Mientras que para el caso de la ruta de elongación y desaturación de los omega 6 encontramos un aumento importante del C20:4n6 de 1,271.20  $\mu\text{g org}^{-1}$ . En el caso del erizo negro encontramos un cambio neto en los AG precursores como el C18:2n6 (1,408.52  $\mu\text{g org}^{-1}$ ); C18:3n3 (2,267.06  $\mu\text{g org}^{-1}$ ) y el C20:4n3 (160.42  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), sin embargo no es muy evidente si este proceso de desaturación y elongación se lleva a cabo y que tan efectivo pudo llegar a ser ya que solo obtuvimos un cambio neto del AG C20:4n6 de 303.89  $\mu\text{g org}^{-1}$  y de 2.31  $\mu\text{g org}^{-1}$  para el caso del C22:6n3. Se requiere hacer análisis de biología molecular para poder determinar la actividad y expresión de estas enzimas y para poder concluir el grado de actividad que tuvieron en el metabolismo de los organismos.

**ABSTRACT** of thesis for the degree of Master of Science presents **Jaime Humberto García Chávez** as a prerequisite for the graduate degree **MOLECULAR ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, with specialization in **NUTRITION AND PHYSIOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2012

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE SYNTHESIS AND ACCUMULATION OF FATTY ACIDS IN YOUTH PURPLE SEA URCHIN *Strongylocentrotus purpuratus* and BLACK SEA URCHIN *Arbacia incisa*

ABSTRACT APPROVED BY:



**Dr. Juan Gabriel Correa Reyes**

The overall effect temperature has on organisms is an issue that has been studied for a long time. However, little information has been generated from this effect on the metabolism of fatty acids (FA) in marine organisms. It is believed that the temperature could become a trigger processes of elongation and desaturation of FA to would find the body in a state of stress due to the lack of these in your diet. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of temperature on the synthesis and accumulation of FA in juvenile urchin *Strongylocentrotus purpuratus* purple and black urchin *Arbacia incisa*. This is performed a couple of bioassays with juvenile of 4.6 and 6.6 mm, respectively. Two diets were developed which were isoprotein, isolipid and were based on the requirements of the species of sea urchin. The first diet was formulated with a standard concentration of the type PUFAs and LC-PUFAs (DC), while in the second diet (DE) were restricted the type LC-PUFAs. Bioassays were conducted in two independent recirculating seawater, one at 16°C and another at 20°C. Five samplings (Day 0, 29, 51, 71 and 100), where record growth in weight and length (mm) of organisms and samples were obtained for analysis of lipids, FA and molecular biology assays. In purple sea urchin after 100 days of experimentation was an increase of 360% by weight, specific growth rate of 1.52 with a 100% survival of the experimental diet and 16°C. The black sea urchin was recorded maximum growth of 113%, a specific growth rate of 0.79 with a 100% survival with the experimental diet and 20°C. With regard to the FA concentration found in correspondence of the percentages obtained in the diet relative to the muscle of the body. In the case of the net change found a significant increase in C18:1n9 (169.49  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), C18:2n6 (673.52  $\mu\text{g org}^{-1}$ ) and C18:3n3 (1046.00  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), which we indirectly speak of a desaturation process for the  $\Delta 6$ -desaturase enzyme C18:3n3 to C18:4n3 and an elongation at C20:4n3 and desaturation finally to reach this FA C20:5n3 with a net change of 644.57  $\mu\text{g org}^{-1}$ . While in the case of path elongation and

desaturation of the omega 6 we find a significant increase C20:4n6 1,271.20  $\mu\text{g of org}^{-1}$ . For the black sea urchin found a net change in the FA precursors as C18:2n6 (1408.52  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), C18:3n3 (2267.06  $\mu\text{g org}^{-1}$ ) and C20:4n3 (160.42  $\mu\text{g org}^{-1}$ ), however it is not very clear whether this process of desaturation and elongation takes place and how effective might become as only got a net change of C20:4n6 of 303.89  $\mu\text{g org}^{-1}$  and 2.31  $\mu\text{g org}^{-1}$  in the case of C22:6n3. Analysis is requerid to do molecular biological analysis to determine the activity and expression of these enzymes and to conclude the activity level they had in the metabolism of organisms.

## DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a **mi familia** que gracias a sus consejos y palabras de aliento crecí como persona.

A mi madre **Irma de la Asunción Chávez Ponce**

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, pero más que nada, por su amor.

A mi padre **Arturo García Limón**

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos **Irma Lizabeth, Claudia Gabriela, Arturo Alejandro y Gerardo Omar García Chávez**

Por su apoyo, amistad, confianza y amor que han depositado en mí durante mi vida personal.

¡Gracias!

A mis **abuelos** por su cariño y **tíos** que me apoyaron siempre.

A mi cuñis **Nashbli** y mis sobrinos **Osmar e Isay**

A mis **maestros**

Gracias por su tiempo, apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por la beca otorgada (329396/236540) para realizar mis estudios de Maestría en Ecología Molecular y Biotecnología. Al proyecto del Dr. **Juan Gabriel Correa Reyes** SEP-CONACYT: Ciencia Básica 2007/80541. Así mismo, al proyecto de investigación de la **Dra. María Teresa Viana Castrillón** SEP-CONACYT: Ciencia Básica CB-2009/130776.

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara por la beca complementaria (Dictamen CC/CCB 09-10/050/2009) en apoyo para realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. **Juan Gabriel Correa Reyes** por brindarme la oportunidad de conocer y aprender dentro del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), por la confianza, sugerencias, apoyo, esfuerzo, paciencia y amistad durante la realización de este trabajo.

A la **Dra. María Teresa Viana Castrillón** por la oportunidad, recomendaciones, conocimiento y apoyo brindado en el transcurso del presente trabajo en el laboratorio de Nutrición y Fisiología.

Al Dr. **Eugenio Carpizo Ituarte** por todo el apoyo brindado, atinadas observaciones y la gentileza de compartir sus conocimientos especializados durante

la realización de la fase experimental de este proyecto, la cual muy amablemente me permitió realizar en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo.

A la Dra. Tatiana Olivares Bañuelos por guiarme durante la realización de los análisis moleculares, por su apoyo, paciencia y entrega, pero sobre todo por mostrarme su amistad dentro y fuera del laboratorio y ese lado apasionante de la biología molecular que pocos llegan a sentir.

Al técnico del Laboratorio de Nutrición y Fisiología (IIO) Griselda Pares Sierra por el apoyo en el conocimiento en el desove y mantenimiento de erizos.

A mis compañeros y amigos por el apoyo, amistad y confianza brindado durante mi estancia. Jorge, Ariana, Servando, Daniel, Selene, Fernando, Ceres, Ivette, Martha, Emmanuel, Isaura, Paola, Victoria, Edith, Meño, Chuy, Dora, Luvia, Lina, Sharon y Karla.

A mis carnales Renne Jaír Cazares Simental y Marco Antonio Ponce Márquez por que una vez más me alentaron a seguir esta vez con la maestría en Ecología Molecular y Biotecnología, por su apoyo, amistad.

¡GRACIAS!

Por último pero no menos importante quiero agradecer a todos los laboratorios que me facilitaron su acceso pero especialmente al laboratorio de microalgas y preparación de medios del IIO y al laboratorio de Ecología molecular “Jorge de la Rosa Vélez” de la Facultad de Ciencias Marinas.

*“No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso”  
Albert Einstein*

CONTENIDO		Pagina
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	1
	Lípidos	1
	Ácidos grasos	2
	Procesos de elongación y desaturación de ácidos grasos	3
	Integridad de las membranas celulares	5
	Regulación de la desaturación	6
<b>1.1.</b>	<b>Antecedentes</b>	6
<b>1.2.</b>	<b>Hipótesis</b>	10
<b>1.3.</b>	<b>Objetivos</b>	10
	1.3.1. Objetivo general	10
	1.3.2. Objetivos Particulares	10
<b>II.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	12
	II.1. Obtención de reproductores	12
	II.2. Aclimatación de los organismos	12
	II.3. Inducción al desove	13
	II.4. Dieta control y experimental	14
	II.5. Bioensayo de crecimiento	14
	II.6. Índices Biológicos	16
	II.6.1. Crecimiento en peso (g) y longitud (mm)	16
	II.6.2. Consumo de alimento	17
	II.6.3. Ganancia en peso (%)	17
	II.6.4. Tasa de crecimiento específica (TCE)	18
	II.6.5. Cambio neto	18
	II.6.6. Análisis proximales	18
	II.6.7. Extracción de lípidos totales en juveniles de erizo	19
	II.6.8. Determinación de ácidos grasos	19
	II.6.9. Análisis de expresión de genes	20
	II.6.9.1. Diseño de oligos	20
	II.6.9.2. Extracción de RNA	21
	II.6.9.3. Síntesis de cDNA	21
	II.6.9.4. Ensayos PCR	22
	II.7. Análisis estadístico	22
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	23
	III.1. Dieta control y experimental	23
	III.2. Erizo morado ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )	25
	III.2.1. Índices biológicos	25

<b>CONTENIDO (Continuación):</b>		<b>Pagina</b>
III.2.2.	Perfil de ácidos grasos erizo morado	29
III.2.3.	Cambio neto de ácidos grasos en erizo morado	33
III.2.	Erizo negro ( <i>Arbacia incisa</i> )	35
III.3.1.	Índices biológicos	35
III.3.2.	Perfil de ácidos grasos erizo negro	38
III.3.3.	Cambio neto de ácidos grasos en erizo negro	42
III.4.	Diseño de oligos	45
III.4.1.	Estandarización de las condiciones de reacción de PCR	45
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>59</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla I.	Composición de dietas experimentales.	15
Tabla II.	Composición proximal de las dietas experimentales formuladas para juveniles de erizo de mar.	23
Tabla III.	Composición de ácidos grasos en dietas e ingredientes experimentales.	24
Tabla IV.	Índices biológicos de juveniles de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	28
Tabla V.	Perfil ácidos grasos de juveniles de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	32
Tabla VI.	Contenidos de ácidos grasos ( $\mu\text{g}^{-1}$ organismo) y cambio neto (ácido graso/organismo) en juveniles de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	34
Tabla VII.	Índices biológicos de juveniles de erizo negro <i>Arbacia incisa</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	37
Tabla VIII.	Perfil ácidos grasos de juveniles de erizo negro <i>Arbacia incisa</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	41
Tabla IX.	Contenidos de ácidos grasos ( $\mu\text{g}^{-1}$ organismo) y cambio neto (ácido graso/organismo) en juveniles de erizo negro <i>Arbacia incisa</i> mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.	44
Tabla X.	Relación del diseño de Oligos obtenidos de las enzimas elongasas y desaturasas del erizo Morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en donde se muestra el tipo de gen, tamaño, la secuencia, la temperatura de alineamiento y las concentraciones usadas en el PCR.	45
Tabla XI.	Composición de reacción para control positivo R18S.	46
Tabla XII.	Composición de reacción para $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa.	47
Tabla XIII.	Composición de reacción para la elongasa.	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

		Página
<b>Figura 1.</b>	Esquema generalizado del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados de los precursores ácido oleico y ácido linoleico.	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b>	Sistema experimental de juveniles de erizo.	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b>	Crecimiento en peso de juveniles de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b>	Tasa de crecimiento específico en juveniles de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b>	Crecimiento en peso de juveniles de erizo negro <i>Arbacia incisa</i> .	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b>	Tasa de crecimiento específico en juveniles de erizo negro <i>Arbacia incisa</i> .	<b>36</b>
<b>Figura 7.</b>	Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos ribosomal 18S diseñados para erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	<b>46</b>
<b>Figura 8.</b>	Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa diseñados para erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	<b>47</b>
<b>Figura 9.</b>	Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos de elongasa diseñados para erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	<b>48</b>

---

## I. INTRODUCCIÓN

Los lípidos son moléculas hidrofóbicas por su baja capacidad de mezclarse con el agua, la mayoría de ellos contienen o se derivan de ácidos grasos y tienen muchas funciones biológicas importantes. Al unirse tres ácidos grasos junto con glicerol a través de un enlace éster forman los triacilgliceroles los cuales constituyen el depósito de combustible más importante en los organismos animales. Otros lípidos, incluyendo fosfolípidos, glicolípidos y colesterol son constituyentes clave de las membranas biológicas. Mientras que la menor parte constituyen importantes moléculas de señalización entre y dentro de las células, como es el caso de las hormonas esteroides y los eicosanoides (Devlin, 2011).

Los lípidos juegan un papel fundamental en la dieta debido a que éstos no son sintetizados en cantidad y tipo como son necesarios, además de que desempeñan una serie de funciones importantes en los organismos vivos. Estas moléculas se pueden dividir en dos grandes grupos: lípidos no polares (acil glicéridos, esteroides, ácidos grasos libres (no esterificados), ceras, y ésteres) y lípidos polares (fosfo glicéridos, glicosil glicéridos). Los lípidos polares y esteroides son importantes componentes de la membrana celular actuando como una barrera selectiva permeable de células y organelos. Mantienen funciones específicas en la membrana proporcionando gran variedad de procesos metabólicos y participan directamente en los eventos de difusión de la membrana. En cuanto a los lípidos no polares, los triacilgliceroles son importantes ya que son abundantes productos de almacenamiento y pueden ser fácilmente catabolizados para proporcionar energía metabólica (Gurr *et al.* 2002).

En los organismos vivos, tal es el caso de los erizos de mar, los lípidos juegan un papel importante en el crecimiento debido a que son fuente importante de energía, están involucrados en importantes funciones fisiológicas (Berdanier, 1992; Bruckner, 1992; Chapkin, 1992; Hwang, 1992), de reserva energética (Montero Torreiro *et al.*, 1998), como componentes estructurales de las membranas celulares (Takagi *et al.*, 1980;.

Voogt, 1982; Ebert, 2001; Marsh y Watts, 2001), precursores de hormonas, vitaminas y pigmentos (Hwang, 1992; Castell *et al.*, 2004); sustancias esenciales como los eicosanoides (Hwang, 1992). Los lípidos están formados por ácidos grasos y algunos de ellos son esenciales, como el linolénico (n-3) y el linoleico (omega 6).

Los lípidos se pueden clasificar en simples y compuestos dependiendo de si los ácidos grasos se encuentran solos (simples) como ácidos grasos o triglicéridos, o combinados con otras moléculas (compuestos) como los fosfolípidos, lipoproteínas, glucolípidos, etc.

### **Ácidos grasos**

Las propiedades físicas de los ácidos grasos (AG), son en gran medida determinadas por la longitud y el grado de insaturación. La longitud de la cadena no polar va a determinar la hidrosolubilidad del AG, siendo mayor en los de cadena corta y disminuyendo con el aumento de átomos de carbono en la molécula. Por su grado de insaturación, los AG presentan enlaces simples entre los carbonos, los AG monoinsaturados tienen un doble enlace, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés) presentan dos o más dobles enlaces. El aumento del número de dobles enlaces en los AG permite disminuir su punto de fusión y aumentar la susceptibilidad a la oxidación (Nelson y Cox, 2005).

Los AG cumplen una serie de funciones fisiológicas importantes. Pueden ser almacenados como triglicéridos en los tejidos adiposos y producir energía cuando se degradan a través del proceso de  $\beta$ -oxidación. También pueden ser esterificados en fosfolípidos y glicolípidos que son importantes componentes estructurales de las biomembranas. Por otra parte, en algunas especies los PUFA's de 18 carbonos pueden ser elongados y desaturados en cadenas de 20 y 22 carbonos, que pueden ser convertidos en metabolitos biológicamente activos llamados eicosanoides (Stryer, 1995).

Se consideran ácidos grasos esenciales porque tienen que ser incorporados al metabolismo mediante la ingesta de alimentos que los contienen (Burr y Burr, 1929; Lenhinger, 1993; Uauy *et al.*, 1992; García Muriana, 2002). Los ácidos grasos esenciales se utilizan para la síntesis de otros PUFA's de cadena larga. De esta forma, el ácido linoleico (biológicamente inactivo) es el precursor de los ácidos grasos de la serie n-6; se transforma en ácido  $\gamma$ -linolenico mediante la enzima  $\Delta 6$  desaturasa y éste último se elonga para formar el ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, que puede sufrir otra desaturación y convertirse en el ácido araquidónico gracias a la  $\Delta 5$  desaturasa (Brenner, 1987; Linscheer y Vergroesen, 1994; Tolonen, 1995). De manera similar, el ácido  $\alpha$ -linolénico es el precursor de los ácidos grasos de la serie n-3, a partir de él se forman, entre otros, los ácidos eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico. (Burdge y Wootton, 2002).

### **Procesos de elongación y desaturación de ácidos grasos**

Estos procesos consisten en la adición de átomos de carbono y en la formación de dobles enlaces en la cadena carbonada del ácido graso. La elongación se lleva a cabo por enzimas elongasas y es más eficaz en el caso de los AG insaturados, mientras que el proceso de desaturación se realiza por enzimas desaturasas. En tejidos animales existen las enzimas desaturasas  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 9$  capaces de incorporar dobles enlaces en las posiciones 5, 6 y 9 de la cadena carbonada a partir del extremo carboxilo. Por tanto, en los tejidos animales, al no poder formarse dobles enlaces más allá del carbono 9, a partir del extremo carboxilo de los AG, y al ser el sustrato más corto de la enzima desaturasa  $\Delta 9$  el ácido palmítico (C16:0), solo podrán formarse, mediante el proceso de desaturación, AG con un número mínimo de 7 carbonos después del último doble enlace. Es por ello, que todos los ácidos grasos con menos de 7 carbonos después del último doble enlace a partir del extremo carboxilo (n3 y n6) se hacen esenciales en el organismo animal y, por tanto, deberán obtenerse a partir de la dieta. En los tejidos vegetales, sin embargo, existen enzimas desaturasas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ , pueden desaturar más allá del carbono 9 por lo que pueden ser fuente de ácidos grasos esenciales para los animales (Cook y McMaster, 2002). Mediante el proceso de elongación y desaturación

las enzimas convierten el ácido linoleico en ácido araquidónico (ARA), mientras que el ácido linolénico es convertido en ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Sin embargo, estos ácidos grasos compiten por las mismas enzimas, con el resultado de que el exceso relativo de ácido linoleico promoverá la formación de ácido ARA a expensas de la formación de ácido EPA y ácido DHA (Figura 1). De manera parecida, un exceso relativo de ácido linolénico conduce a la producción más alta de EPA y DHA sobre el ARA (Bell *et al.* 1995a, b).

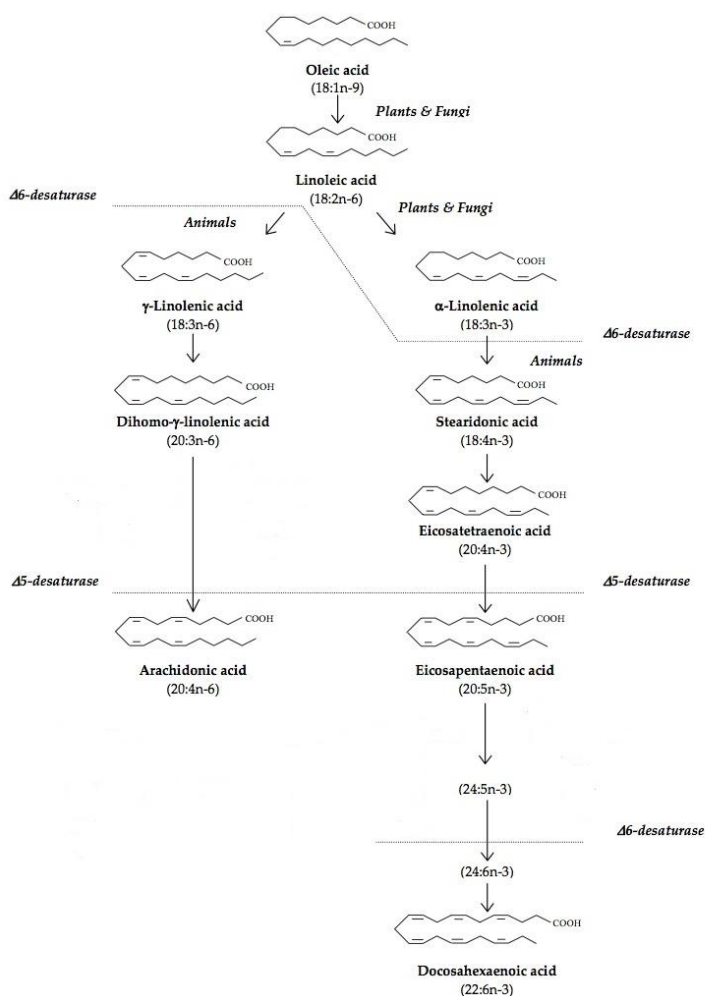


Figura 1. Esquema generalizado del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados de los precursores ácido oleico y ácido linoleico (Modificado de Tapiero *et al.*, 2002, Smith., 1989 y Ziboh *et al.*, 2000).

Estudios sugieren que los erizos de mar parecen tener la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos. Esta habilidad para sintetizar ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFA's por sus siglas en inglés) a partir de 18:3n3 y 18:2n6 se asocia a la existencia de la  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas y elongasa. Enzimas que pueden biosintetizar LC-PUFA's como EPA (20:5n3), DHA (22:6n3), ARA (20:4n6) (Takagi *et al.*, 1980; Bell *et al.*, 2001; Castell *et al.* 2004).

### **Integridad de las membranas celulares**

Las membranas biológicas juegan un papel importante en la organización estructural en los organismos vivos. Cambios fisicoquímicos, como la temperatura, pueden cambiar la fluidez de las membranas. Las células y organismos pueden remodelar los lípidos de membrana para compensar por cambios perjudiciales en la fluidez. Los ácidos grasos como integrantes de los fosfolípidos, forman la mayor parte de los compuestos lipídicos constituyentes de las membranas por lo que la naturaleza de estos AG determinará las propiedades de estas membranas. Las cadenas de AG proporcionan el carácter apolar de las membranas y, dependiendo de su longitud de cadena y de la presencia, el número y la posición de dobles enlaces, proporcionarán una determinada fluidez, permeabilidad y estabilidad a las mismas (Moyes, 2011).

Entre las diferentes cadenas de AG que forman las membranas celulares existen uniones; por tanto, al aumentar la longitud de las cadenas aumenta el número de uniones entre éstas, proporcionando una mayor estabilidad a la membrana, manteniendo su estructura pero, al mismo tiempo, aumentando la rigidez y disminuyendo su solubilidad. Este aumento de rigidez y disminución de solubilidad producida por el aumento de la longitud de los AG es contrarrestado por la presencia de dobles enlaces en su cadena. Éstos generan una carga electrónica que hace aumentar la solubilidad y producen un giro en las cadenas que hace disminuir la interacción entre éstas, aumentando así la fluidez de membrana. Por tanto, la presencia en las membranas celulares de LC-PUFA's disminuye

marcadamente su rigidez y permite una adecuada interrelación de la célula con el medio que le rodea (Moyes, 2011).

### **Regulación de la desaturación**

La mayoría de los ácidos grasos que se encuentran en las membranas biológicas son desaturados con uno a más dobles enlaces. Las propiedades físicas de los lípidos de membrana dependen del número de dobles enlaces en los ácidos grasos que la constituyen. Los ácidos grasos se sintetizan a partir de ácidos grasos saturados por desaturasas de ácidos grasos que convierten enlaces simples a dobles enlaces. El grado de desaturación está regulado genética y ambientalmente, siendo la temperatura un crítico factor ambiental que regula el grado de desaturación. En respuesta a un decremento en la temperatura, casi todos los organismos poiquiloterms, incluyendo bacterias, incrementan el nivel de insaturación manteniendo una apropiada fluidez de los lípidos de membrana independientemente de la temperatura ambiental (Sakamoto y Murata, 2002).

#### **1.1. Antecedentes**

Las especies de erizos son probablemente los equinodermos más conocidos y estudiados en el mundo, ya que son organismos que se establecen en comunidades cercanas a la costa rocosa y con una base importante en las pesquerías (Rogers-Bennett, 2007).

Particularmente la especie de *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857), es recolectado extensamente para realizar un sinnúmero de investigaciones entre las que se encuentran las relacionadas con la biología de la fertilización, embriología y análisis del genoma (Rogers-Bennett, 2007). Su distribución a lo largo del océano Pacífico va desde la Isla de Cedros en Baja California, México; hasta el norte de Cook Inlet, Alaska (Tegner 2001; Rogers-Bennett, 2007); se distribuyen en estratos rocosos de las zonas

intermareal y submareal hasta 160 metros de profundidad (Morris *et al.* 1980; Rogers-Bennett, 2007), condición los hace estar expuestos a un amplio rango de temperatura, el cual puede ir desde los 5 hasta los 20 °C (Osovitz y Hofmann, 2005). Su alimentación se basa principalmente de macroalgas del género *Macrocystis*, denominadas “Kelp” (Tegner y Dayton, 1981).

Por su parte, el erizo negro *Arbacia incisa* (Agassiz, 1863), es una especie epibentónica de hábitos gregarios, formando colonias muy numerosas que se encuentran en fondos rocosos en zonas submareales a profundidades de 0 hasta 92 m. (Alvarado y Cortez, 2009). Se distribuye también a lo largo del Océano Pacífico desde las costas de Baja California, México hasta el sur de Chile (Herrero-Pérezrul, 2007).

Se reconoce ampliamente que la biogeografía marina está determinada en gran medida por los efectos de la temperatura (Murawsky, 1993) y ésta influye en los patrones de biodiversidad en diversas latitudes (Astorga *et al.* 2003). Efectos que pueden ser directos, o indirectos a través de los cambios inducidos térmicamente en la composición de la cadena alimenticia o por influencia en la disponibilidad de los alimentos (Pörtner *et al.* 2007).

Los erizos de mar, así como la mayor parte de los organismos marinos presentan un rango térmico que está relacionado con su fenología (relación entre los factores climáticos y ciclos de los seres vivos) y fisiología (Lorente, *et al.* 2004), en donde es de gran importancia los componentes estructurales de la membrana celular. Eddin y Session (1984) y Hazel (1995) mencionan que la composición de lípidos en la membrana celular de estos organismos cambia en respuesta a la temperatura del medio, en donde la presencia del tipo de los ácidos grasos en la membrana celular, (Ac. grasos poliinsaturados de la familia n-3), son muy importantes ya que estos influyen en la modulación de la fluidez de membrana a bajas temperaturas en combinación con otros componentes de membrana (Glémet *et al.* 1997; Farkas *et al.* 2001).

En teoría, una reducción en la temperatura debería reducir la fluidez de la membrana, al provocar la rigidez de los ácidos grasos, lo cual puede llevar a una disfunción de la misma. Los lípidos de una membrana biológica no sólo requieren de un cierto grado de rigidez estructural, sino que también deben de ser lo suficientemente fluidos para permitir el movimiento lateral de los lípidos y proteínas que la constituyen. Los organismos ectotermos como los erizos de mar, pueden contrarrestar los efectos de las bajas temperaturas al cambiar la estructura de sus membranas, proceso conocido como adaptación homeoviscosa, a través de cambios en grupos de cabeza de fosfolípidos, la composición de ácidos grasos y el contenido de colesterol (Sinensky, 1974; Hazel, 1995). Estos mecanismos implican cambios en el grado de insaturación de ácidos grasos y longitud de la cadena, la proporción de las clases de fosfolípidos o glicolípidos, la distribución de lípidos y en la relación esterol-fosfolípido (Thompson, 1983).

Por efecto de la temperatura, los organismos pueden mantener la fluidez de la membrana celular regulando el número de dobles enlaces en los ácidos grasos de estos lípidos (Russel, 1984). Cuando la fluidez de los lípidos de membrana se reduce por un decremento en la temperatura, en organismos como las plantas y las cianobacterias, éstas responden introduciendo dobles enlaces en los ácidos grasos de los lípidos ocasionando que la membrana regrese a un estado más fluido. En este sentido, las desaturasas son responsables de introducir estos dobles enlaces específicos (Jaworski, 1987; Harwood, 1988).

Dentro de la gran variedad de lípidos se encuentran algunos ácidos grasos que son esenciales y necesarios para la estructura y fisiología de los organismos, como los PUFA's, linoleico, 18:2n-6, linolénico, 18:3n-3 y ARA, 20:4n-6. La biosíntesis de los PUFA en invertebrados ha sido estudiada y no se encuentra información cuantitativa en sus tasas de formación. Los PUFA son abundantes en ambientes marinos con ácidos grasos de 16, 18, 20 y 22 carbonos, todos encontrados en diferentes clases de fitoplancton, mientras que los consumidores primarios y secundarios, como

invertebrados y vertebrados, retienen y concentran los ácidos grasos de 20 y 22 carbonos (Sargent *et al.* 1995). Así, la abundancia de estos ácidos grasos puede enmascarar la capacidad de biosíntesis en los consumidores.

Estudios en algunos invertebrados sugieren que los organismos tienen la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos esenciales Durazo-Beltrán *et al.*, (2003) mencionan que juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* tienen la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos de 18:2n6 hasta 22:4n6. Bell *et al.* (2001) y Castell *et al.* (2004), mostraron que juveniles de erizo *Psammechinus miliaris* y *Strongylocentrotus droebachiensis* tienen la habilidad de elongar y desaturar PUFA's de las familias n-3 y n-6 a LC-PUFA's. Como se mencionó anteriormente, la habilidad para la síntesis *de novo* de ácidos grasos esenciales de cadena larga a partir de los ácidos grasos linolénico y linoleico está asociada con las enzimas delta 5 y delta 6, responsables de biosintetizar LC-PUFA's tales como el EPA (20:5n3) ácido eicosapentaenoico, DHA (22:6n3) ácido docosahexaenoico y ARA (20:4n6) ácido araquídico (González-Duran, 2005). Sin embargo, no se ha descrito el mecanismo que promueve o dispara el proceso de acumulación y/o síntesis de los ácidos grasos y se desconoce el tiempo que tardan dichos organismos en dar una respuesta a los cambios de temperatura. Aunado a esto, los organismos que se encuentran en el intermareal suelen soportar variaciones de temperatura de 20 a 30°C y son capaces de regular la fluidez de la membrana en respuesta de estos cambios de temperatura (Pernet *et al.* 2007). Así mismo, estudios realizados con huevos de erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) la composición de AG en la membrana varió con la temperatura del océano en eventos como el niño (Weaver *et al.*, 2008). En este sentido, surge la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre los aspectos nutricionales y fisiológicos de los organismos y determinar si la temperatura favorece la síntesis y/o acumulación de los ácidos grasos en la membrana celular.

Con base en lo anterior, el presente estudio ha sido diseñado con la siguiente hipótesis y objetivos:

## **1.2. Hipótesis**

Si los juveniles de erizo son sometidos a diferentes temperaturas y estos son alimentados con una dieta restringida en LC-PUFA's, pero ricos en ácidos grasos precursores de LC-PUFA's. Entonces estos organismos presentarán mayor o igual concentración de LC-PUFA's en la membrana producto de la síntesis y la conversión de ácidos grasos esenciales.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. General**

Evaluar el efecto de la temperatura en la síntesis y acumulación de ácidos grasos en juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y erizo negro *Arbacia incisa* alimentados con bajo porcentaje de PUFA's pero con los precursores para su síntesis.

### **1.3.2. Particulares**

1. Elaborar una dieta formulada restringiendo la presencia de PUFA's y una dieta control con LC-PUFA's.
2. Conocer el efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos en los juveniles de erizo de mar.
3. Determinar la tasa de crecimiento y sobrevivencia de juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y erizo negro *Arbacia incisa* mantenidos a diferentes temperaturas.

4. Evaluar la expresión diferencial de las enzimas involucradas en la síntesis de LC-PUFA's al exponer a los juveniles de erizo de mar a diferentes temperaturas y al restringir los LC-PUFA's en el alimento.

## II. METODOLOGÍA

Para la realización del presente estudio se utilizaron juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y erizo negro *Arbacia incisa* procedentes de un desove realizado en el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, México.

### II.1. Obtención de reproductores

Se obtuvieron cerca de 300 organismos adultos de erizo Morado *Strongylocentrotus purpuratus* y 50 organismos adultos de erizo negro *Arbacia incisa* de aproximadamente 5 a 7 cm los cuales fueron colectados directamente de la zona intermareal de Punta Banda, Baja California, México. Una vez recolectados los organismos estos fueron trasladados al laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO en hieleras plásticas que contenían un tercio de volumen de agua del medio y un poco de macroalgas, esto con la finalidad de disminuir el estrés de los organismos.

### II.2. Aclimatación de los organismos

Una vez en el laboratorio los organismos fueron colocados en camas de fibra de vidrio con un flujo constante de agua de mar y aireación. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones por un periodo de 15 días, con la finalidad de reducir el estrés y poder verificar la tasa de mortalidad debida a ese factor. Durante este periodo de tiempo los organismos fueron alimentados *ad libitum* con macroalgas frescas de la especie *Macrocystis pyrifera*, hasta ser inducidos al desove.

### II.3. Inducción al desove

Una vez acondicionados los organismos, estos fueron inducidos al desove siguiendo la metodología propuesta por Strathmann (1987), esta técnica consiste en inyectar de 2 a 3 mL de una solución de KCl (0.55M) en la parte oral del organismo. Los organismos se colocaron con el extremo oral hacia arriba sobre frascos de vidrio de 250 mL con agua de mar filtrada y esterilizada con UV. Una vez obtenidos los cigotos estos fueron enjuagados con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV y posteriormente se mantuvieron en recipientes plásticos circulares de 20 L (18 L de volumen útil) de agua hasta alcanzar el estadio prisma (cerca de 48 h de ser fertilizados). La temperatura del agua se mantuvo entre los  $16 \pm 1$  °C y hasta el momento de la aparición del estadio de gástrula. Una vez que alcanzaron el estadio prisma, las larvas se extrajeron cuidadosamente por medio de sifoneo, se cuantificaron y se sembraron a una densidad de  $4 \text{ larvas} \cdot \text{mL}^{-1}$  en estanques circulares cónicos de fibra de vidrio de 50 litros de volumen de agua y aireación continua. El agua utilizada en estos sistemas fue agua de mar filtrada hasta  $1 \mu\text{m}$ , con una salinidad de 35‰, una temperatura promedio de  $16 \pm 1$  °C y aireación constante. Diariamente se realizaron recambios de agua que variaban entre el 50 y el 100 %. Durante 25 días los organismos fueron alimentados con la microalga *Rhodomonas sp.* (la cual fue proporcionada por el personal del Laboratorio de Producción de Microalgas del IIO). Al inicio de este periodo se agregó el alimento a cada uno de los sistemas donde se tenían las larvas, para mantener una densidad de cultivo de microalgas de aproximadamente 6,000 cel/mL la primer semana, 9,000 cel/mL la segunda semana y 14,000 cel/mL la tercer semana. Una vez que los organismos llegaron a estadio de competencia, estos fueron inducidos a la metamorfosis con KCl 100 mM durante 15 minutos (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002) y fueron transferidos a una tina plástica de 37 L (22 L de volumen útil). Estos sistemas se mantuvieron con las mismas condiciones de temperatura, salinidad y aireación que las mencionadas en el sistema anterior. La única diferencia es que ya metamorfasadas las post-larvas de erizo estas se alimentaron manteniendo un biofilm constante de la diatomea bentónica *Navícula incerta*. Una vez que los juveniles de erizo llegaron a una talla promedio de

56.04 mg en juveniles de erizo morado y 185.54 mg en juveniles de erizo negro, se realizó un cambio de alimentación a alimento balanceado el cual duró 15 días. Una vez que los organismos se adaptaron a la nueva alimentación se procedió a dar inicio a la etapa experimental.

#### **II.4. Dieta control y experimental**

Para este experimento, se elaboraron dos dietas isoproteicas e isolipídicas basadas en los requerimientos del erizo morado (Tabla I). La primera dieta control (DC) se mantuvo con una concentración estándar de ácidos grasos del tipo PUFA's y LC-PUFA's, específicamente los ácidos docohexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y araquidónico (ARA). Mientras que para la segunda dieta experimental (DE) se restringieron los ácidos grasos del tipo LC-PUFA's, manteniendo una proporción adecuada de ácidos grasos del tipo PUFA's, como oleico (18:1 n-9), linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3). Ambas dietas se elaboraron en el Laboratorio de Formulación de Alimentos del IIO, de la UABC siguiendo las recomendaciones propuestas por la Dra. María Teresa Viana Castrillón.

#### **II.5. Bioensayos de crecimiento**

La duración de estos bioensayos fue de 100 días. Se trabajó con dos sistemas de recirculación de agua de mar independientes, cada uno a una temperatura diferente (16 y 20 °C), con dos tratamientos: la dieta Control elaborada con aceite de hígado de Bacalao y la dieta Experimental elaborada con aceite de linaza y maíz y por triplicado. Cada sistema de recirculación estuvo compuesto de 6 recipientes plásticos rectangulares de 1L con capacidad de 600 mL de volumen útil y este se definió como la unidad experimental (Figura 2). En cada unidad experimental se colocaron 10 juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* e independientemente en otra unidad experimental 5 juveniles de erizo negro *Arbacia incisa*. Cada unidad experimental fue provista de un desagüe con un cedazo para evitar el escape de los organismos. El agua de cada unidad

se colectó en un contenedor con un desagüe central conectado a una línea de recepción de agua, la cual se descargaba en un estanque de compensación. El agua contenida en el estanque de compensación fue impulsada por una bomba sumergible (Quiet One Modelo 4000) que impulsaba un flujo de agua a través de un filtro biológico del tipo Bead Filter de ¼ ft<sup>3</sup> de capacidad. Una vez que el agua pasó por el biofiltro ésta fue irradiada con un filtro de luz ultra-violeta (Turbo-Twist 3x, UV Sterilizer). Cada sistema experimental se abasteció con agua de mar filtrada hasta 1 µm. Se mantuvo un flujo de aire constante y un fotoperiodo de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad. Los juveniles se alimentaron a saciedad una vez por día con las dietas formuladas.

**Tabla I.** Relación y porcentaje de ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta control (DC) y la dieta experimental (DE), así como su composición bioquímica teórica.

Ingredientes	% en las Dietas	
	Control	Experimental
Harina de pescado desengrasada	24.5	24.5
Harina de Soya	6.5	6.5
Harina de Macrocystis	4	4
Aceite de Hígado de Bacalao	9.3	---
Aceite de Maíz/Linaza	---	9.3
*Premezcla de vitaminas y minerales	4	4
**Minerales extra	2	2
Gelatina	6	6
Tocoferol	0.9	0.9
BHT	0.1	0.1
Colesterol	1	1
Maizena	41.7	41.78
<b>Proteínas</b>	32.05	32.05
<b>Lípidos</b>	9.94	9.94
<b>Carbohidratos</b>	37.08	37.08
<b>***Requerimientos de erizo</b>	<b>%</b>	
Proteínas	32	
Lípidos	9.82	
Carbohidratos	37.5	
*Premezcla de vitaminas y minerales para peces tropicales de engorda DSM		
**Mezcla 2:1 de Carbonato de Calcio y Fosfato de Sodio por cada 1,000 g de dieta: 33.33g CaCO <sub>3</sub> ; 16.66g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
***Dieta para erizo de mar Wenger International, Kansas City, Missouri, USA. Hofer 2002.		

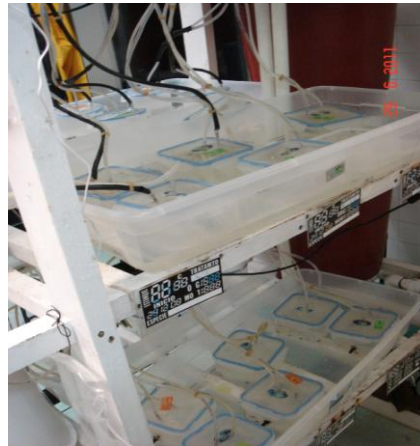


Figura 2. Sistema experimental de juveniles de erizo.

Diariamente se limpiaron cada una de las unidades experimentales retirando los restos de alimento y las heces. Para cada unidad experimental, diariamente se registró la sobrevivencia, la temperatura del agua, el oxígeno disuelto y la salinidad. Semanalmente se llevó un monitoreo del pH, la concentración de amonio, nitritos, nitratos y la alcalinidad. A lo largo del tiempo que duró el bioensayo de crecimiento se realizaron cinco muestreos iniciando el día 0 (25-Marzo); 29 (22-Abril); 51 (14-Mayo); 71 (3-Junio) y 100 (2-Julio del 2011). En cada uno de los muestreos se registró el crecimiento en peso y longitud (mm) de cada uno de los organismos. En cada una de las biometrías se colectaron dos juveniles de erizo morado y dos juveniles de erizo negro al inicio y al final del experimento de cada una de las unidades experimentales; los cuales fueron colocados individualmente en un tubo Eppendorf de 1.9 mL previamente etiquetado y se almacenaron en un criocongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis en laboratorio.

## II.6. Índices Biológicos

### II.6.1. Crecimiento en peso (g) y longitud (mm)

Los juveniles de erizo se colocaron en papel secante con el fin de retirar el exceso de agua y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (0.1 mg de

precisión) Sartorius CP224S. La medición de talla (mm) se realizó con un vernier ULTRA-CAL MARK IV de 0.01 mm de precisión.

### II.6.2. Consumo de alimento

El consumo de alimento de los juveniles de erizo fue estimado durante 7 días antes de cada una de las fechas de muestreo, con el fin de evitar que el estrés en los organismos provocado por la misma biometría diera un consumo menor al observado. Los cálculos de consumo se realizaron de acuerdo a lo reportado por Guzmán y Viana (1998) siguiendo la siguiente ecuación:

$$F = [(G/100) - R] - \%P \dots\dots\dots \text{ecuación (1)}$$

En donde:

- F representa el consumo,
- G la cantidad del alimento ofrecido,
- P la pérdida de materia orgánica en dietas formuladas, después 24 horas de estar sumergidas en el agua
- R es la cantidad de dieta remanente después del consumo.

### II.6.3. Ganancia en peso (porcentaje)

Para determinar la ganancia de peso diaria, todos los juveniles de erizo de cada unidad experimental se pesaron al inicio y al final de cada fecha de muestreo y se calculó de la siguiente manera:

$$GP = [(PF - PI) / PI] \times 100 \dots\dots\dots \text{(ecuación 2)}$$

En donde:

- GP = Ganancia en peso
- PF = Peso Final,
- PI = Peso inicial,

#### II.6.4. Tasa de crecimiento específica (TCE)

La tasa de crecimiento específica (TCE; % día) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TCE} = [(\ln \text{PF} - \ln \text{PI}) / T] \times 100 \dots\dots\dots (\text{ecuación 3})$$

En donde:

TCE = Tasa de crecimiento específica,

ln PF = Logaritmo natural de peso final,

ln PI = Logaritmo natural del peso inicial,

T = Número de días

#### II.6.5. Cambio neto

Se realizaron los cálculos del cambio neto para conocer la acumulación o reducción por individuo de cada AG siguiendo la metodología descrita por Viana *et al.*, (2007a). El cambio neto ( $\mu\text{g}^{-1}$  de AG / organismo) se obtuvo al calcular la diferencia entre la cantidad de cada ácido graso (mg AG/erizo) en el peso total al final del experimento menos la cantidad total por individuo de este mismo ácido graso al inicio del experimento. El cálculo consistió en multiplicar el contenido en porcentaje por el peso promedio de tejido por individuo.

#### II.6.6. Análisis proximales

Los análisis proximales de las dietas control y experimental se realizaron siguiendo el protocolo estándar propuesto por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos AOAC; por sus siglas en inglés (1990). El porcentaje de humedad se determinó por medio de gravimetría con el secado de una cantidad dada de muestra por triplicado en estufa a 60°C por un periodo de 24 horas (idealmente más de dos gramos). El contenido de ceniza se estimó al calcinar las muestras de alimento a 550°C por un periodo de 4 horas. La proteína cruda se llevó a cabo con la determinación del nitrógeno

total por el método micro-Kjeldhal (AOAC, 1995) y la proteína cruda total se calculó como %N multiplicado por el factor 6.25. El extracto etéreo o grasa cruda se determinó por el método Soxhlet utilizando éter de petróleo como disolvente durante un periodo de 5 horas.

### **II.6.7. Extracción de lípidos totales en juveniles de erizo**

Se colocó un erizo en vial ámbar previamente pesado y se agregó 1.5 mL de solución de extracción 2:1 de diclorometano-metanol, 50  $\mu$ L de BHT al 1% y se maceró con un homogeneizador de tejidos Tissue•Tearor™ Digital Readout/Variable Speed Biospec Products, Inc. Ya homogenizado, se dejó en reposo durante la noche. Al día siguiente el homogenizado se agitó y centrifugó a 3,000 rpm por 10 min a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se recuperó en otro vial ámbar previamente pesado. A la solución de extracción se le adicionó 1 mL de agua desionizada y una gota de ácido clorhídrico 0.6N, nuevamente se centrifugó a 3,000 rpm por periodo de 2 min a 4 °C de temperatura. Esto con el fin de retirar el sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante es evaporado con nitrógeno, dejando los lípidos presentes en la muestra. Se determinó el peso del vial con los lípidos y se calculó el contenido de lípidos totales por diferencia de peso con respecto al peso inicial de acuerdo con el método descrito por Folch *et al.* (1957).

### **II.6.8. Determinación de ácidos grasos**

Una vez que se extrajeron los lípidos totales, se inició con el proceso de saponificación el cual consistió en agregar una solución de 0.3N de KOH metanólica al 90% a la muestra seca obtenida en la extracción de lípidos totales. Solución metanólica se dejó en un baño María a 80 °C por 1 hora. Posteriormente se eliminó la capa de hexano y se acidificó con HCl al 6N. La metilación se realizó agregando 300  $\mu$ L de Trifluoruro de Boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol (Sigma B1252) en baño maría a 60 °C por 15 min. Posteriormente las muestras se lavaron con hexano y agua destilada, se descartó

la fase de agua y se dejó la fase con hexano que contenía los ácidos grasos. La muestra se seco nuevamente con nitrógeno y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases. Los metil esterres de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía capilar de gases (Agilent GC6850) con una columna (DB-23, Model No. Agilent 122-2362E, 60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 25.0  $\mu\text{m}$  nominal). Como gas transportador se utilizó nitrógeno a un flujo de (0.7 mL/min), se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección, con un Split de 50:1. La temperatura inicial fue de  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, después se llevó a  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $6.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta llegar a  $215\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $2.75\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y se mantuvo así por 12 min posteriormente se aumentó a  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Los ácidos grasos se identificaron y cuantificaron por comparación con estándares de aceites como el FAME mix 37 (*Supelco*®, Sigma-Aldrich Co.). Los cálculos se efectuaron mediante el software HP Chemstation Data Analysis Application Model G1701EA E.02.00.493 para Windows. Se utilizó el porcentaje de cada ácido graso presente en el cromatograma.

## **II.6.9. Análisis de expresión de genes**

### **II.6.9.1. Diseño de oligos**

El diseño de los oligos para la cuantificación con SYBR<sup>®</sup> Green se realizó utilizando la plataforma informática Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Se utilizó el programa ClustalW2 2.1- Multiple Sequence Alignment para cada uno de los genes de interés, se alinearon independientemente las secuencias de las regiones  $\Delta 6$  desaturasa (Número de acceso: LOC581114),  $\Delta 5$  desaturasa (Número de acceso: LOC57833) y de la elongasa (Número de acceso: LOC584065) todas éstas obtenidas para el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* del GenBank por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se comparó la secuencia de cada gen se comparó entre diversas especies, de esta forma se identificaron regiones conservadas entre ellas, sobre las cuales se diseñaron los oligos.

### II.6.9.2. Extracción de RNA

Por cada muestreo se tomó un erizo por unidad experimental y se colocó dentro de un tubo de 1.5 mL libre de RNAsas, DNAsa y pirógenos. Para cada muestra se utilizó 1mL de TRI Reagent® Solution (Applied Biosystem) por cada 50-100 mg de tejido, el cual fue homogeneizado con un pistilo esterilizado. Una vez homogeneizado se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C para recuperar el sobrenadante en otro tubo de 1.6 mL libre de RNAsas, DNAsa y pirógenos este sobrenadante se incubó por 5 min. Posteriormente se agregó 0.2 mL de cloroformo por mL de TRI Reagent® Solution utilizado previamente, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Nuevamente se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C, se recupero el sobrenadante conteniendo el RNA y se colocó en otro tubo de 1.6 mL libre de RNAsas, DNAsa y pirógenos. Se precipitó el RNA con 0.5mL de alcohol isopropílico por mL de TRI Reagent® Solution, se agitó levemente y se incubó la muestra a temperatura ambiente por 10 min. La muestra se centrifugó a 12,000 x g por 10 min y se extrajo a 4 °C el sobrenadante sin retirar la pastilla formada (RNA) en el fondo para lavar con 1mL de Etanol al 75% por mL de solución TRI Reagent®. Una vez lavada la pastilla de ARN se centrifugó nuevamente a 7,500 x g por 5 min a 4 °C, para después remover el Etanol y se dejó húmedo el RNA. Por último se disolvió el RNA en 30 µL de agua inyectable. Una vez extraído el RNA de las muestras, la cantidad (ng/µL) se determinó a 260 nanómetros (nm) con ayuda de un espectofotómetro Nanodrop® y considerando la pureza con la relación  $A_{260}/A_{280}$ , considerando un rango óptimo de este índice entre 1.8 y 2.2.

### II.6.9.3. Síntesis de cDNA

Se realizó la transcripción reversa (cDNA) con el kit High Capacity RNA a cDNA™ Master Mix (Applied Biosystems) calculando el volumen por reacción total a 20 µL. Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 2 min seguido por 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C x 30 seg, la

reincorporación y extensión a 60 °C x 30 seg, y 72 °C x 1 min con una extensión final a 72 °C x 7 min.

#### **II.6.9.4. Ensayos de PCR**

La reacción se realizó con el kit Taq PCR Core de QIAGEN. Se utilizó un volumen final de 25 µL, conteniendo: Taq DNA polimerasa 5 U/ µL, Amortiguador de carga PCR Coral 10X, dNTP Mix 10mM, MgCl<sub>2</sub>, oligonucleótidos 10 µM, 1µg de cDNA y agua inyectable. Esta reacción fue sometida al siguiente programa en un termociclador ESCO modelo SWT-MIP-0.2-2: desnaturalización 92°C por 4 min seguido por 35 ciclos con desnaturalización a 92°C por 20 s, para el alineamiento se probaron diferentes temperaturas (60°C, 50°C 53°C y 55°C) y para la extensión a 60°C por 30 s, extensión 72°C por 20 s con una extensión final a 72°C por 10 min. Como control negativo se utilizó la misma reacción pero con la adición de agua inyectable en reemplazo del cDNA. Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota de 10 µL de la reacción de PCR fue visualizada en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR<sup>®</sup> Gold nucleic acid gel stain.

#### **II.7. Análisis estadístico**

Se aplicó un análisis de una vía para determinar las diferencias entre los índices biológicos de cada tratamiento (Diámetro, Peso, TEC, etc.) y un análisis dos vías para determinar las diferencias e interacción entre los porcentajes de ácidos grasos entre los distintos tratamientos (ANOVA). Se empleó la prueba de rangos múltiples de “Tukey” para ponderar las diferencias entre los tratamientos experimentales. Se consideró un 95% de confianza para determinar diferencias significativas (P<0.05) (Zar, 2010). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SIGMA STAT<sup>®</sup> versión 3.5.

### III. RESULTADOS

#### III.1. Dieta control y experimental

La composición proximal de las dietas formuladas, indicó que fueron similares en contenidos de lípidos y proteínas con valores aproximados de 9.9% y 36%, respectivamente (Tabla II). El perfil de ácidos grasos en la dieta control, reflejó la inclusión del aceite de pescado con un mayor porcentaje de PUFA's del tipo EPA, DPA y DHA con valores de 1.4, 2.9 y 9.1%, respectivamente. Mientras que en la dieta experimental, esta reflejó la inclusión de los aceites vegetales en la dietas con una mayor porcentaje de ácidos grasos de tipo oleico, linoleico y  $\alpha$ -linolenico con valores de 20.2, 25.1 y 37.3% respectivamente (Tabla III).

Tabla II. Valores promedio y desviación estándar ( $\pm$  DE) de la composición proximal de las dietas experimentales formuladas para juveniles de erizo de mar.

	Tratamientos	
	Control	Experimental
* Lípidos totales (%)	9.98 $\pm$ 0.80	9.91 $\pm$ 0.25
* Proteína cruda (%)	36.63 $\pm$ 0.89	36.96 $\pm$ 0.80
* Cenizas (%)	7.90 $\pm$ 0.03	7.77 $\pm$ 0.05
* Humedad	2.29 $\pm$ 0.06	1.85 $\pm$ 0.06
* ELN	43.20 $\pm$ 0.74	43.51 $\pm$ 0.13
** Estabilidad en el agua	69.00 $\pm$ 3.70	71.73 $\pm$ 7.62

\* Cálculos en base a peso seco

\*\*Después de 24 horas de inmersión en el agua

Tabla III. Valores en porcentaje total de los ácidos grasos encontrados en las dietas e ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas experimentales.

Ácidos grasos	Dieta		Ingredientes				
	Control	Experimental	HTD	H. Soya	AHB	AL	AM
<b>C14:0</b>	3.43	0.17	0.52		6.33	0.10	
<b>C15:0</b>	0.28				0.39		
<b>C16:0</b>	18.17	8.26	15.11	11.00	13.47	4.86	11.36
<b>C16:1n7</b>	4.41	0.35	1.98		7.33	0.13	0.15
<b>C18:0</b>	6.51	3.68	11.67	4.10	2.11		
<b>C18:1n9</b>	16.28	20.15	9.30	22.00	18.66	16.08	0.46
<b>C18:2n6</b>	11.60	25.06	0.75	54.00	4.33		59.15
<b>C18:3n6</b>				7.50			
<b>C18:3n3</b>	1.42	37.33	0.24		1.94	58.85	1.15
<b>C18:4n3</b>	0.34				2.20		
<b>C20:2n6</b>							
<b>C20:3n6</b>							
<b>C20:4n6</b>	1.40	0.38	4.56		0.51		
<b>C20:3n3</b>	0.31		0.25		1.36		
<b>C20:5n3</b>	2.91	0.36	4.03		8.70		
<b>22:5n3</b>	2.76	0.42	4.96		2.15		
<b>C22:6n3</b>	9.11	1.32	17.47		11.89		
$\Sigma$ Saturados	31.26	12.10	27.29	15.10	22.30	4.96	11.36
$\Sigma$ insaturados	50.04	85.40	43.53	83.50	59.06	75.06	60.91
$\Sigma$ MUFAs	22.09	20.50	11.28	22.00	25.99	16.22	0.61
$\Sigma$ PUFAs	27.95	64.90	32.25	61.50	33.08	58.85	60.30
$\Sigma$ EPA y DHA	10.16	1.72	21.50	0.00	20.59	0.00	0.00
<b>n-3/n-6</b>	1.14	1.55	5.08	0.00	5.84	0.00	0.02

HTD: harina de tiburón desengrasada

AHB: aceite hígado de Bacalao

AL: aceite de Linaza

AM: aceite de Maíz

### III.2. Erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*)

#### III.2.1. Índices Biológicos

La longitud de los juveniles de erizo morado fue similar al inicio del experimento ( $P>0.05$ ). El promedio inicial fue de  $4.5 \pm 1.2$  mm de diámetro de la testa. Cien días después, el mayor crecimiento observado fue de  $8.2 \pm 1.2$  mm en los organismos mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  y alimentados con las dietas experimental (DE) y  $7.9 \pm 1.3$  mm para los alimentados con la dieta control (DC) ( $P<0.05$ ) en comparación con los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  y alimentados con la dieta control  $6.7 \pm 2.1$  mm y  $6.6 \pm 1.5$  mm para los alimentados con la dieta DE (Tabla IV).

El peso húmedo en todos los tratamientos fue similar ( $P>0.05$ ) al inicio del experimento (Figura 3). Al final del bioensayo la mayor incorporación de biomasa se presentó en los organismos mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  y alimentados con la DE y DC ( $235.5 \pm 78.0$  y  $214.5 \pm 60.6$  mg) en comparación con los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $143.4 \pm 82.0$  y  $137.0 \pm 80.6$  mg;  $P<0.05$ ) (Tabla IV).

El incremento total en peso fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en los organismos mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  y alimentados con la DE y DC ( $183.6 \pm 93.9$  y  $162.3 \pm 81.9$  mg) comparado con los mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $83.9 \pm 44.7$  y  $76.1 \pm 38.11$  mg;  $P<0.05$ ) (Tabla IV).

Los erizos mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  y alimentados tanto con la DE y la DC presentaron una mayor ganancia de peso ( $359.6 \pm 92.9$  y  $315.9 \pm 62.00\%$ ) en comparación a los mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $138.3 \pm 38.1$  y  $125.9 \pm 7.5\%$ ;  $P<0.05$ ) (Tabla IV).

No se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en el consumo de alimento. Los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  con un peso de  $1.3 \pm 0.7$  mg para la dieta DE y  $1.2 \pm$

0.9 para la dieta DC mientras que en juveniles de erizo morado a 16°C fue de  $1.2 \pm 0.7$  para la dieta DE y  $1.2 \pm 0.5$  mg para la dieta DC (Tabla IV).

Las tasas de crecimiento específica (TCE) (Figura 4) en organismos alimentados con las dietas DE y DC a 16°C ( $1.5 \pm 0.8$  y  $1.4 \pm 0.7\%$ ) fueron significativamente mayores a la obtenida con los organismos mantenidos a 20°C ( $0.9 \pm 0.5$  y  $0.8 \pm 0.4\%$ ;  $P < 0.05$ ) (Tabla IV).

La sobrevivencia alcanzó valores de  $94.4 \pm 9.6$  y  $100.0 \pm 0.0\%$  para todos los tratamientos y no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla IV).

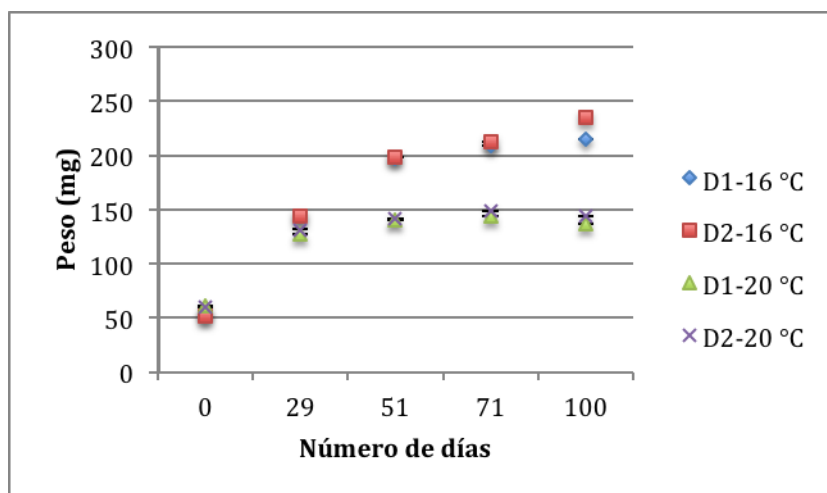


Figura 3. Crecimiento en peso de juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*

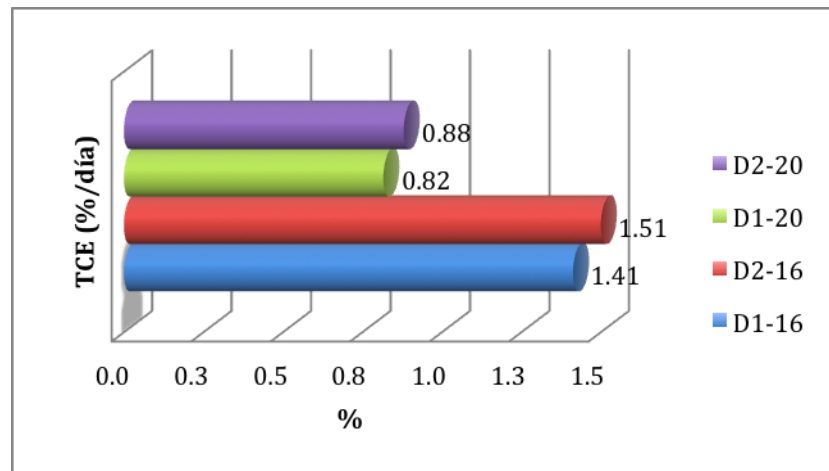


Figura 4. Tasa de crecimiento específica en juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.

Tabla IV. Índices biológicos de juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

	Tratamientos				Anova P		
	DC-20°C	DE-20°C	DC-16°C	DE-16°C	D	T	D x T
<b>Diámetro inicial (mm)</b>	4.67 ± 1.28	4.62 ± 1.30	4.41 ± 1.23	4.38 ± 1.18	0.875	0.283	0.949
<b>Diámetro final (mm)</b>	6.65 ± 2.06 <sup>a</sup>	6.60 ± 1.49 <sup>a</sup>	7.90 ± 1.31 <sup>b</sup>	8.21 ± 1.17 <sup>b</sup>	0.746	<0.001	0.660
<b>Peso inicial (mg)</b>	60.59 ± 48.06	59.45 ± 46.21	52.23 ± 37.31	51.89 ± 40.31	0.926	0.315	0.960
<b>Peso final (mg)</b>	137.02 ± 80.55 <sup>a</sup>	143.37 ± 82.03 <sup>a</sup>	214.52 ± 60.64 <sup>b</sup>	235.50 ± 77.98 <sup>b</sup>	0.450	<0.001	0.685
<b>Incremento total (mg)</b>	76.09 ± 38.11 <sup>a</sup>	83.92 ± 44.73 <sup>a</sup>	162.30 ± 81.93 <sup>b</sup>	183.61 ± 93.93 <sup>b</sup>	0.175	<0.001	0.511
<b>Peso ganado (%)</b>	125.87 ± 7.46 <sup>a</sup>	138.26 ± 38.09 <sup>a</sup>	315.88 ± 61.97 <sup>b</sup>	359.60 ± 92.94 <sup>b</sup>	0.435	<0.001	0.659
<b>Consumo de alimento</b>	1.23 ± 0.87	1.28 ± 0.70	1.22 ± 0.50	1.23 ± 0.70	0.876	0.86	0.929
<b>TCE (%)</b>	0.81 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.72 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.78 <sup>b</sup>	0.388	<0.001	0.086
<b>Sobrevivencia (%)</b>	94.44	100	100	100			

Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05). Valores dados como promedio ± D. E.

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linolénico).

### III.2.2. Perfil de ácidos grasos erizo morado

En cuanto al perfil de ácidos grasos en los organismos juveniles de erizo morado al final de los 100 días experimentales, el ácido oleico (C18:1n9) presentó un porcentaje inicial de  $14.0 \pm 0.8\%$ , mostrando diferencias significativas entre las dietas, temperatura ( $P < 0.005$ ) y su interacción ( $P < 0.010$ ). Los organismos mantenidos con DC-16°C presentaron mayor porcentaje ( $7.7 \pm 0.4\%$ ) comparado con todos los tratamientos. Los erizos mantenidos a 16 y 20°C y alimentados con la dieta experimental (DE) presentaron menor porcentaje ( $4.8 \pm 0.8$  y  $4.7 \pm 0.3\%$ ) que los organismos alimentados con la DC pero tuvieron mayor porcentaje que los mantenidos a 20 °C y alimentados con la DC ( $4.6 \pm 0.3\%$ ) (Tabla V).

Al inicio, los organismos presentaron  $6.3 \pm 0.5\%$  de ácido linoleico (C18:2n6), al final del experimento los organismos alimentados con la DE y mantenidos a 16°C y 20 °C presentaron mayor porcentaje ( $6.6 \pm 0.1$  y  $6.6 \pm 0.8$ ;  $P < 0.05$ ) que los organismos alimentados con la DC ( $3.5 \pm 0.6$  y  $2.8 \pm 1.0\%$ ) y mantenidos a 16 y 20 °C respectivamente (Tabla V).

No se encontró el ácido  $\gamma$ -linolenico (C18:3n6) en los organismos al inicio y en organismos alimentados con la DE al final de los 100 días experimentales. En cambio en los organismos alimentados con la DC y mantenidos a 16 y 20 °C se presentó un porcentaje de  $0.1 \pm 0.0$  y  $0.1 \pm 0.0\%$ , respectivamente (Tabla V).

El ácido eicosadienoico (C20:2n6) no se detectó en erizos al inicio del experimento, sin embargo, al final del experimento los organismos presentaron un porcentaje de  $4.8 \pm 1.4\%$  en la DC a 20°C,  $4.7 \pm 0.8\%$  en la DE a 16°C,  $4.5 \pm 0.1$  en la DE a 20°C y  $4.1 \pm 0.4\%$  en la DE a 16°C, sin existir diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Tabla V).

El ácido dihomo- $\gamma$ -linolenico (C20:3n6) presentó un porcentaje inicial de  $0.6 \pm 0.0$  y al termino del experimento los organismos alimentados con la DE a 20 y 16°C presentaron un porcentaje significativamente mayor ( $1.0 \pm 0.2$  y  $0.9 \pm 0.2\%$ ;  $P < 0.05$  respectivamente) que los alimentados con la DC y mantenidos a 16 y 20°C ( $0.6 \pm 0.1$  y  $0.5 \pm 0.0\%$ , respectivamente) (Tabla V).

El ácido araquidónico (C20:4n6) al inicio del periodo experimental se detectó un contenido de  $6.1 \pm 1.3$  %, mientras que al final del experimento los erizos alimentados con la DE y mantenidos a 20 y 16°C presentaron un porcentaje significativamente mayor ( $13.6 \pm 1.8$  y  $12.6 \pm 1.9\%$ ;  $P < 0.05$  respectivamente) que los organismos alimentados con la DC y mantenidos a 16 y 20°C ( $9.3 \pm 1.0$  y  $7.9 \pm 0.6\%$ , respectivamente) (Tabla V).

En cuanto al ácido  $\alpha$ -linolenico (C18:3n3), al inicio del experimento los erizos presentaron un porcentaje de  $1.2 \pm 0.5$ . Sin embargo, al final de los 100 días experimentales, los organismos alimentados con la DC y mantenidos a 16 y 20°C presentaron un porcentaje significativamente menor ( $1.1 \pm 0.4$  y  $0.8 \pm 0.3\%$ ;  $P < 0.05$ ) que los alimentados con la DE y mantenidos a 16 y 20°C ( $9.4 \pm 1.8$  y  $8.4 \pm 0.2\%$ , respectivamente) (Tabla V).

El ácido estearidónico (C18:4n3) presentó  $0.3 \pm 0.1$  % al inicio del experimento, mientras que al final del experimento solo se detectó en los erizos alimentados con la dieta DC-16°C ( $0.3 \pm 0.1\%$ ) y DC-20°C ( $0.3 \pm 0.1\%$ ) (Tabla V).

En cuanto al ácido eicosatrienoico (C20:3n3), no se detectó al inicio del experimento. Sin embargo, en los organismos alimentados con la dieta DC mantenidos a 16°C ( $0.6 \pm 0.1\%$ ) y 20°C ( $0.6 \pm 0.1\%$ ) se detectó un menor porcentaje ( $P < 0.05$ ) que los organismos alimentados con la dieta experimental (DE) a 20 ( $2.45 \pm 0.4\%$ ) y 16°C ( $2.4 \pm 0.2\%$ ) (Tabla V).

Al inicio del experimento no se encontró el ácido eicosatetraenoico (ETA) C20:4n3 pero al final del experimento soló se encontró en los juveniles alimentados con la DE-20°C ( $0.5 \pm 0.1\%$ ) y DE-16°C ( $0.6 \pm 0.1\%$ ) (Tabla V).

El ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n3) se detectó en  $4.2 \pm 0.5\%$  al inicio del experimento, mientras que al final se presentaron diferencias entre los tratamientos de dietas ( $<0.001$ ) y temperatura ( $P<0.05$ ). Los erizos alimentados con la DC-16°C ( $9.0 \pm 0.3\%$ ) y DC-20°C ( $8.1 \pm 0.6\%$ ) con respecto a los organismos alimentados con la dieta DE-16°C ( $7.1 \pm 0.6\%$ ) y DE-20°C ( $6.4 \pm 0.2\%$ ) (Tabla V).

En los organismos iniciales se registró un nivel de  $0.5 \pm 0.3\%$  del ácido docosapentaenoico (DPA; C22:5n3), mientras que al final se registraron diferencias entre los organismos alimentados con la DC ( $1.4 \pm 0.1\%$ ) a 16°C y ( $1.1 \pm 0.4\%$ ) a 20°C un mayor porcentaje ( $P<0.05$ ) que los organismos alimentados con la DE ( $0.5 \pm 0.2\%$ ) a 20°C y ( $0.4 \pm 0.0\%$ ) a 16°C (Tabla V).

Al inicio del experimento se detectó  $2.5 \pm 0.7\%$  del ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6n3), mientras que al final los organismos alimentados con la DE se presentó un menor porcentaje ( $P<0.05$ ) ( $1.6 \pm 0.4\%$ ) a 20°C y ( $1.5 \pm 0.1\%$ ) a 16°C que los organismos alimentados con la DC-20°C ( $3.7 \pm 0.9\%$ ) y DC-16°C ( $4.5 \pm 0.2\%$ ) (Tabla V).

Tabla V. Perfil de ácidos grasos de juveniles de erizo morado *Stroglyocentrotus purpuratus* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

Ácidos grasos	Inicial	Final				Anova P		
		DC-20°C	DE-20°C	DC-16°C	DE-16°C	D	T	D x
<b>C14:0</b>	2.59 ± 0.31	6.37 ± 0.51 <sup>c</sup>	4.52 ± 0.34 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.18 <sup>bc</sup>	6.21 ± 0.51 <sup>b</sup>	0.010	0.023	0.007
<b>C15:0</b>	0.60 ± 0.18	0.37 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.017	0.006	0.864
<b>C16:0</b>	17.30 ± 1.01	10.92 ± 0.94 <sup>b</sup>	9.63 ± 0.70 <sup>a</sup>	10.11 ± 0.21 <sup>b</sup>	8.68 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.005	0.041	0.847
<b>C16:1n7</b>	3.65 ± 0.76	2.20 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.05 <sup>a</sup>	<0.001	0.472	0.128
<b>C18:0</b>	3.55 ± 1.03	3.50 ± 0.22 <sup>bc</sup>	3.75 ± 0.26 <sup>c</sup>	3.16 ± 0.15 <sup>ab</sup>	3.32 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.104	0.009	0.722
<b>C18:1n9</b>	13.97 ± 0.81	4.58 ± 0.26 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.26 <sup>ab</sup>	7.65 ± 0.38 <sup>c</sup>	4.76 ± 0.79 <sup>b</sup>	0.012	0.008	0.010
<b>C18:2n6</b>	6.29 ± 0.47	2.75 ± 0.95 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.82 <sup>b</sup>	3.54 ± 0.60 <sup>a</sup>	6.61 ± 0.13 <sup>b</sup>	<0.001	0.398	0.425
<b>C18:3n6</b>		0.12 ± 0.03		0.13 ± 0.01		0.908	0.908	0.908
<b>C18:3n3</b>	1.19 ± 0.47	0.75 ± 0.33 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.40 <sup>a</sup>	9.38 ± 1.76 <sup>b</sup>	<0.001	0.258	0.588
<b>C18:4n3</b>	0.29 ± 0.06	0.29 ± 0.13		0.32 ± 0.05		0.656	0.656	0.656
<b>C20:2n6</b>		4.82 ± 1.37	4.51 ± 0.09	4.74 ± 0.76	4.14 ± 0.40	0.360	0.638	0.766
<b>C20:3n6</b>	0.64 ± 0.04	0.56 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.15 <sup>b</sup>	<0.001	0.704	0.298
<b>C20:4n6</b>	6.09 ± 1.25	9.25 ± 1.04 <sup>a</sup>	13.55 ± 1.75 <sup>b</sup>	7.94 ± 0.55 <sup>a</sup>	12.61 ± 1.93 <sup>b</sup>	<0.001	0.210	0.827
<b>C20:3n3</b>		0.55 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.45 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.17 <sup>b</sup>	<0.001	0.903	0.685
<b>C20:4n3</b>			0.47 ± 0.08		0.64 ± 0.08		0.051	
<b>C20:5n3</b>	4.24 ± 0.54	8.13 ± 0.57 <sup>bd</sup>	6.36 ± 0.22 <sup>ac</sup>	8.95 ± 0.34 <sup>b</sup>	7.11 ± 0.57 <sup>a</sup>	<0.001	0.016	0.901
<b>C22:5n3</b>	0.53 ± 0.29	1.13 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.01 <sup>a</sup>	<0.001	0.366	0.293
<b>C22:6n3</b>	2.45 ± 0.72	3.66 ± 0.89 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.08 <sup>a</sup>	<0.001	0.224	0.135
<b>∑ Saturados</b>	21.96 ± 5.13	21.16 ± 0.66	18.87 ± 1.61	19.73 ± 0.11	18.46 ± 0.74			
<b>∑ Insaturados</b>	35.84 ± 10.73	39.78 ± 3.41	51.21 ± 2.14	43.29 ± 2.09	51.47 ± 1.53			
<b>∑ MUFAs</b>	14.71 ± 5.79	7.91 ± 2.24	6.25 ± 1.09	9.49 ± 1.38	5.70 ± 0.84			
<b>∑ PUFAs</b>	21.14 ± 5.39	31.87 ± 1.19	44.96 ± 1.63	33.80 ± 1.24	45.77 ± 0.98			
<b>∑ EPA y DHA</b>	7.95 ± 2.82	11.79 ± 1.46	7.96 ± 0.14	13.46 ± 0.48	8.62 ± 0.58			
<b>n-3/n-6</b>	0.83 ± 0.13	0.84 ± 0.20	0.75 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.84 ± 0.09			

Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05). Valores dados como promedio ± D. E.

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linolénico).

### III.2.3. Cambio neto de ácidos grasos en erizo morado

El cambio neto (final-inicial) en cantidad de microgramos de ácidos grasos por juvenil de erizo morado se presentan en la tabla VI. El cambio neto en el AG C18:1n9, C18:2n6 y C18:3n3 en los juveniles alimentados con los tratamientos DC y DE mostraron acumulación. El C18:1n9 en la DC-16°C y DE-16°C (362.4 y 169.5 µg, respectivamente) mostraron una mayor acumulación con respecto a los tratamientos DC-20°C y DE-20°C (34.9 y 16.5 µg, respectivamente). La mayor acumulación del AG C18:2n6 y C18:3n3 se presentó en la DE-16°C (673.5 y 1046.1 µg, respectivamente) mientras que en DE-20°C se registraron 334.1 y 601.2 µg, respectivamente, en DC-16°C 207.4 y 76.0 µg, respectivamente y en DC-20°C 30.2 y 13.4 µg, respectivamente. Se encontró una mayor acumulación del AG C20:4n6 en DE-16°C (1271.2 µg) mientras que en DE-20°C (814.7 µg), DC-16°C (641.1 µg) y DC-20°C (471.9 µg) fue menor. En cuanto a los n-3 LC-PUFA's, el EPA (C20:5n3) en todos los tratamientos se presentó una mayor acumulación que en DHA, con los tratamientos DC-16°C (767.8 µg) y DE-16°C (644.6 µg), mientras que se registró una menor acumulación para los tratamientos DC-20°C (407.7 µg) y DE-20°C (292.1 µg). En cuanto al DHA (C22:6n3) la mayor acumulación fue en los tratamientos DC-16°C (396.8 µg) y DC-20°C (183.6 µg) y menor en DE-16°C y DE-20°C (91.5 y 39.1 µg, respectivamente).

Dentro de los AG de la familia n6 están los C18:3n6, C20:2n6 y C20:3n6 que no estaban presentes en las dietas ni en el tejido de los organismos al inicio del experimento, y mostraron una acumulación al final. El C18:3n6 se acumuló en los tratamientos DC-16°C y DC-20°C (13.5 µg y 6.0 µg, respectivamente). El C20:2n6 se acumuló en todos los tratamientos con valores desde 342.9 µg en la DE-20°C, hasta 3,356.3 µg DC-20°C. También el C20:3n6 presentó valores desde 26.7 µg en DC-20°C hasta 95.2 µg en DE-16°C.

Tabla VI. Contenido de ácidos grasos ( $\mu\text{g}^{-1}$  organismo) y cambio neto (ácido graso/organismo) en juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

Ácidos grasos	Tratamientos								
	Inicial $\mu\text{g}$	DC-20°C		DE-20°C		DC-16°C		DE-16°C	
		Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto
<b>C14:0</b>	89.63	470.24	+380.61	393.42	+303.79	659.93	+570.30	727.31	+637.69
<b>C15:0</b>	20.71	26.90	+6.19	23.44	+2.73	31.69	+10.98	28.57	+7.86
<b>C16:0</b>	527.18	803.39	+276.21	733.44	+206.26	1081.37	+554.19	1015.32	+488.14
<b>C16:1n7</b>	126.44	161.44	+35.00	81.53	-44.91	266.29	+139.85	109.93	-16.51
<b>C18:0</b>	123.06	258.18	+135.12	284.66	+161.61	338.99	+215.93	389.32	+266.26
<b>C18:1n9</b>	382.79	417.65	+34.86	399.25	+16.46	745.14	+362.35	552.28	+169.49
<b>C18:2n6</b>	170.77	200.98	+30.20	504.92	+334.14	378.22	+207.44	844.30	+673.52
<b>C18:3n6</b>	0.00	6.04	+6.04	0.00	0.00	13.47	+13.47	0.00	0.00
<b>C18:3n3</b>	41.17	54.57	+13.40	642.39	+601.22	117.15	+75.98	1087.23	+1046.06
<b>C18:4n3</b>	9.87	20.84	+10.23	0.00	-9.87	34.71	+24.84	0.00	-9.87
<b>C20:2n6</b>	0.00	356.33	+356.33	342.88	+342.88	509.43	+509.43	486.07	+486.07
<b>C20:3n6</b>	14.71	41.41	+26.70	79.15	+64.45	65.57	+50.87	109.93	+95.22
<b>C20:4n6</b>	211.00	682.88	+471.87	1025.72	+814.72	852.10	+641.10	1482.25	+1271.24
<b>C20:3n3</b>	0.00	40.47	+40.47	185.14	+185.14	62.55	+62.55	279.59	+279.59
<b>C20:4n3</b>	0.00	0.00	0.00	35.52	+35.52	0.00	0.00	75.02	+75.02
<b>C20:5n3</b>	190.66	598.38	+407.72	482.74	+292.08	958.48	+767.82	835.24	+644.57
<b>C22:5n3</b>	12.27	82.83	+70.56	35.58	+23.31	147.14	+134.88	51.31	+39.04
<b>C22:6n3</b>	84.71	268.35	+183.64	123.82	+39.11	481.48	+396.76	176.22	+91.51

Valores dados como promedio

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linoléico).

### III.3. Erizo negro (*Arbacia incisa*)

#### III.3.1. Índices Biológicos

Al inicio del bioensayo no se presentaron diferencias significativas en la longitud de los juveniles de erizo negro ( $P > 0.05$ ). El promedio inicial del diámetro de la testa fue de  $6.8 \pm 1.3$  mm. El mayor crecimiento se observó en los organismos de DE y DC a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $8.8 \pm 0.8$  mm y  $8.2 \pm 0.8$  mm, respectivamente). Los juveniles a  $16^{\circ}\text{C}$  presentaron menor longitud ( $P < 0.05$ ) con valores de  $7.1 \pm 1.1$  y  $6.80 \pm 0.95$  mm para DE y DC, respectivamente (Tabla VII).

Los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  de la DE presentaron un mayor crecimiento ( $P < 0.05$ ;  $410.8 \pm 103.1$  mg) en comparación con los otros tratamientos, mientras que los erizos alimentados con DC ( $312.7 \pm 89.8$  mg) fueron menores a los de DE pero mayores ( $P < 0.05$ ) a los de  $16^{\circ}\text{C}$  alimentados con ambas dietas (DE  $208.2 \pm 111.9$  mg y DC  $184.7 \pm 94.2$  mg) (Tabla VII, Figura 5).

Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con dietas, temperatura y su interacción ( $P < 0.05$ ) en incremento total de los juveniles de erizo negro. Los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  presentaron incremento final de  $222.1 \pm 13.4$  y  $116.6 \pm 33.5$  mg, respectivamente ( $P < 0.05$ ), en comparación con los mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  con la DE y DC que presentaron  $31.3 \pm 46.1$  y  $19.5 \pm 8.4$  mg, respectivamente ( $P > 0.05$ ) (Tabla VII).

Los organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$  presentaron mayor ganancia de peso (DE  $113.2 \pm 39.6$  y DC  $62.16 \pm 24.9\%$ ;  $P < 0.05$ ) con respecto a los mantenidos a  $16^{\circ}\text{C}$  con DE y DC ( $19.9 \pm 29.7$  y  $11.4 \pm 4.5\%$ , respectivamente. (Tabla VII).

El consumo de alimento fue similar en todos los tratamientos ( $P > 0.05$ ) en organismos mantenidos a  $20^{\circ}\text{C}$ , alimentados con la dieta DE fue de  $1.86 \pm 1.4$  y  $1.7 \pm$

1.2 mg para la dieta DC mientras que los mantenidos a 16°C con la dieta DE presentaron  $1.8 \pm 2.2$  y  $1.5 \pm 1.7$  mg para la dieta DC (Tabla VII).

La tasa de crecimiento específica (TCE) (Figura 6) en organismos alimentados con las dietas DE y DC a 16°C ( $0.16 \pm 0.24$  y  $0.11 \pm 0.04\%$ ) fueron significativamente menores a los juveniles mantenidos a 20°C con las dietas DC y DE ( $0.48 \pm 0.16$  y  $0.79 \pm 0.10\%$ ;  $P < 0.05$ ) (Tabla VII).

Al término del experimento se registro una sobrevivencia del 100% en todos los tratamientos.

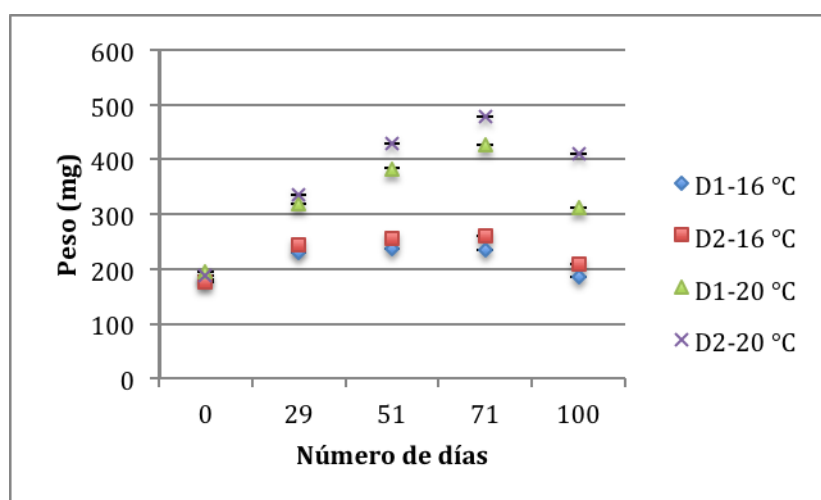


Figura 5. Crecimiento en peso de juveniles de erizo negro *Arbacia incisa*

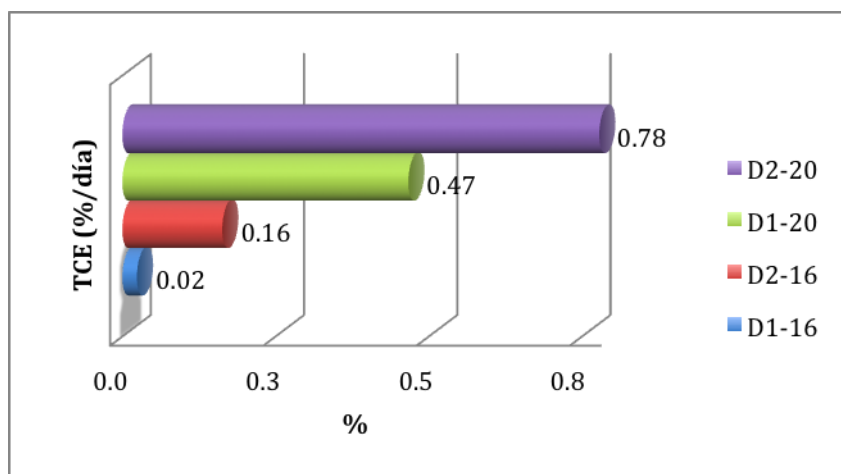


Figura 6. Tasa de crecimiento específica en juveniles de erizo negro *Arbacia incisa*.

Tabla VII. Índices biológicos de juveniles de erizo negro *Arbacia incisa* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

	Tratamientos				Anova P		
	DC-20°C	DE-20°C	DC-16°C	DE-16°C	D	T	D x T
<b>Diámetro inicial (mm)</b>	6.87 ± 1.40	6.91 ± 1.36	6.70 ± 1.20	6.63 ± 1.38			
<b>Diámetro final (mm)</b>	8.21 ± 0.83 <sup>a</sup>	8.76 ± 0.81 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.95 <sup>b</sup>	7.09 ± 1.10 <sup>b</sup>	0.124	<0.001	0.634
<b>Peso inicial (mg)</b>	196.14 ± 133.32	188.71 ± 130.12	180.42 ± 107.85	176.90 ± 111.77	0.862	0.662	0.950
<b>Peso final (mg)</b>	312.77 ± 89.82 <sup>b</sup>	410.82 ±	184.74 ± 94.21 <sup>a</sup>	208.19 ±	0.041	<0.001	0.204
<b>Incremento total (mg)</b>	116.63 ± 33.45 <sup>b</sup>	222.11 ± 13.41 <sup>c</sup>	19.54 ± 8.39 <sup>a</sup>	31.29 ± 46.12 <sup>a</sup>	0.019	<0.001	0.045
<b>Peso ganado (%)</b>	62.16 ± 24.91 <sup>b</sup>	113.22 ± 39.57 <sup>b</sup>	11.37 ± 4.46 <sup>a</sup>	19.85 ± 29.66 <sup>a</sup>	0.145	0.005	0.279
<b>Consumo de alimento</b>	1.73 ± 1.21	1.86 ± 1.42	1.52 ± 1.67	1.83 ± 2.16	0.987	0.616	0.410
<b>TCE (%)</b>	0.48 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.109	0.002	0.239
<b>Sobrevivencia (%)</b>	100	100	100	100			

Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05). Valores dados como promedio ± D. E.

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linolénico).

### III.3.2. Perfil de ácidos grasos erizo negro

Al inicio del experimento, la concentración de ácido oleico (C18:1n9) fue de  $9.5 \pm 0.3\%$ . Mientras que al final de los 100 días experimentales, se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las dietas y temperatura. Los juveniles de la DE-16°C ( $6.4 \pm 0.6\%$ ) presentaron menor porcentaje que los juveniles de la DC-16°C ( $9.1 \pm 0.1\%$ ), DE-20°C ( $9.2 \pm 0.9\%$ ) y DC-20°C ( $10.5 \pm 0.3\%$ ) (Tabla VIII).

El porcentaje de ácido linoleico (C18:2n6) al inicio del experimento fue de  $4.1 \pm 0.6\%$ . Al final de los 10 días experimentales mostró diferencias significativas entre dietas, temperatura y su interacción ( $P < 0.05$ ). Los organismos mantenidos con DC-16°C ( $4.3 \pm 0.3\%$ ) y DC-20°C ( $5.0 \pm 0.1\%$ ) presentaron menor porcentaje ( $P > 0.05$ ). Los juveniles de erizo mantenidos con DE-20°C ( $12.7 \pm 0.5\%$ ) presentaron mayor porcentaje en comparación a todos los tratamientos. Los organismos de la DE-16°C ( $10.9 \pm 0.0\%$ ) presentaron significativamente menor porcentaje que los erizos DE-20°C pero mayor que los juveniles de los tratamientos DC-16°C y DC-20°C (Tabla VIII).

En juveniles de erizo negro el ácido  $\gamma$ -linolenico (C18:3n6) no se encontró al inicio y en erizos alimentados con DE al final de los 100 días experimentales. En cambio en los organismos mantenidos con DC-20°C y DC-16°C se presentó un porcentaje de  $0.2 \pm 0.0\%$  y  $0.1 \pm 0.0\%$ , respectivamente (Tabla VIII).

El ácido eicosadienoico (C20:2n6) no se detectó en los organismos al inicio del experimento, sin embargo, al final del experimento se presentó diferencias significativas por efecto de la temperatura ( $P < 0.05$ ). Los organismos mantenidos con la DE-16°C ( $5.7 \pm 0.9\%$ ) y DC-16°C ( $5.4 \pm 1.0\%$ ) tuvieron un mayor porcentaje que los erizos de los tratamientos DE-20°C ( $4.0 \pm 0.2\%$ ) y DC-20°C ( $3.5 \pm 0.1\%$ ) (Tabla VIII).

No se encontró el ácido dihomo- $\gamma$ -linolenico (C20:3n6) al inicio del experimento, mientras que al final del experimento, el porcentaje de este ácido graso fue diferente

entre los tratamientos de dietas, temperatura y su interacción ( $P < 0.05$ ). Los juveniles de erizo negro del tratamiento DE-16°C ( $0.7 \pm 0.0\%$ ) presentaron un porcentaje significativamente mayor en comparación con los tratamientos DC-16°C ( $0.3 \pm 0.0\%$ ), DE-20°C ( $0.3 \pm 0.1\%$ ) y DC-20°C ( $0.3 \pm 0.0\%$ ) (Tabla VIII).

El ácido araquidónico (C20:4n6) al inicio experimental presentó un porcentaje de  $5.9 \pm 0.5\%$ , mientras que al final del experimento los erizos alimentados con la DE y mantenidos a 20 y 16°C presentaron un porcentaje mayor ( $7.1 \pm 0.1$  y  $6.1 \pm 0.1\%$ ;  $P < 0.05$  respectivamente) que los organismos alimentados con la dieta DC mantenidos a 16 y 20°C ( $5.1 \pm 0.8$  y  $4.8 \pm 0.6\%$ ) (Tabla VIII).

Con respecto al ácido  $\alpha$ -linolenico (C18:3n3), al inicio del experimento los organismos presentaron  $1.3 \pm 0.7\%$ . Sin embargo, al final de los 100 días experimentales los organismos alimentados con la DE y mantenidos a 20 y 16°C ( $16.3 \pm 0.9$  y  $15.6 \pm 0.4\%$ ) presentaron significativamente mayor porcentaje ( $P < 0.05$ ) que los erizos alimentados con la DC a 16°C ( $2.0 \pm 0.6\%$ ) y 20°C ( $1.8 \pm 0.0\%$ ) (Tabla VIII).

No se detectó el ácido estearidónico (C18:4n3) en los juveniles de erizo negro al inicio del periodo experimental, mientras que al final de los 100 días experimentales solo se detectó en los erizos alimentados con la dieta DC-20°C ( $0.5 \pm 0.1\%$ ) y DC-16°C ( $0.4 \pm 0.0\%$ ) (Tabla VIII).

El ácido eicosatrienoico (C20:3n3) no se detectó al inicio del experimento. Sin embargo, en los organismos alimentados con la dieta DE mantenidos 20 y 16°C ( $2.2 \pm 0.9$  y  $1.9 \pm 0.5\%$ ) presentaron una mayor porcentaje ( $P < 0.05$ ) que los organismos de la dieta DC-20°C ( $0.6 \pm 0.3\%$ ) y DC-16°C ( $0.3 \pm 0.1\%$ ) (Tabla VIII).

Al inicio del experimento no se encontró el ácido eicosatetraenoico (C20:4n3) y en la dieta DC-20°C. En la dieta DC-16°C se detectó ( $0.1 \pm 0.0\%$ ); mientras que en la

DE-20°C y DE-16°C se presentaron porcentajes de  $1.1 \pm 0.2$  y  $0.9 \pm 0.1\%$ , respectivamente (Tabla VIII).

Al inicio del experimento el ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n3) presentó  $5.1 \pm 0.3\%$ . No se presentaron diferencias significativas entre temperatura ( $P > 0.005$ ), sin embargo, entre dietas y su interacción se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los erizos mantenidos con la dieta DC y mantenidos a 20 °C ( $5.7 \pm 0.5\%$ ) y 16°C ( $5.6 \pm 0.1\%$ ) presentaron mayor porcentaje con respecto a los erizos con la dieta DE a 16°C ( $3.5 \pm 0.1\%$ ) y 20°C ( $2.5 \pm 0.5\%$ ) (Tabla VIII).

No se encontró el ácido docosapentaenoico (DPA; C22:5n3) en juveniles de erizo al inicio del experimento. Sin embargo, al terminar el experimento se presentó un porcentaje mayor ( $P < 0.05$ ) en los organismos de la dieta DC mantenidos a 20°C ( $1.8 \pm 0.2\%$ ) y 16°C ( $1.7 \pm 0.0\%$ ) en comparación con los organismo alimentados con la dieta DE mantenidos a 20°C ( $0.6 \pm 0.2\%$ ) y 16°C ( $0.4 \pm 0.0\%$ ) (Tabla VIII).

Al inicio del experimento se detectó  $2.45 \pm 0.28\%$  del ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6n3), mientras que al final los organismos alimentados con la dieta DE se presentó un menor porcentaje ( $P < 0.05$ ) ( $1.5 \pm 0.1\%$ ) a 16°C y ( $1.9 \pm 0.6\%$ ) a 20°C que los organismos alimentados con la dieta DC ( $5.4 \pm 0.6\%$ ) a 20°C y ( $5.0 \pm 0.1\%$ ) a 16°C (Tabla VIII).

Tabla VIII. Perfil ácidos grasos de juveniles de erizo negro *Arbacia incisa* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

Ácidos grasos	Inicial	Final				Anova P		
		DC-20°C	DE-20°C	DC-16°C	DE-16°C	D	T	D x T
<b>C14:0</b>	1.92 ± 0.09	3.76 ± 0.31 <sup>ae</sup>	2.33 ± 0.34 <sup>ae</sup>	9.13 ± 1.18 <sup>df</sup>	5.97 ± 1.13 <sup>cf</sup>	0.007	<0.001	0.149
<b>C15:0</b>	0.60 ± 0.03	0.69 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.12 <sup>a</sup>	<0.001	0.561	0.472
<b>C16:0</b>	10.86 ± 0.55	11.51 ± 0.73 <sup>bc</sup>	8.72 ± 1.11 <sup>ac</sup>	12.71 ± 0.66 <sup>bf</sup>	10.53 ± 0.62 <sup>ad</sup>	<0.001	0.012	0.533
<b>C16:1n7</b>	3.04 ± 0.14	3.55 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.49 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.33 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.28 <sup>a</sup>	<0.001	0.971	0.425
<b>C18:0</b>	3.83 ± 0.32	3.30 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.74 ± 0.38 <sup>b</sup>	2.87 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.163	0.002	0.160
<b>C18:1n9</b>	9.53 ± 0.26	10.53 ± 0.26 <sup>df</sup>	9.16 ± 0.93 <sup>cf</sup>	9.09 ± 0.10 <sup>be</sup>	6.35 ± 0.63 <sup>ae</sup>	<0.001	<0.001	0.065
<b>C18:2n6</b>	4.13 ± 0.59	5.00 ± 0.08 <sup>a</sup>	12.65 ± 0.47 <sup>c</sup>	4.33 ± 0.33 <sup>a</sup>	10.85 ± 0.04 <sup>b</sup>	<0.001	0.001	0.039
<b>C18:3n6</b>		0.17 ± 0.03		0.13 ± 0.00		0.160	0.160	
<b>C18:3n3</b>	1.29 ± 0.67	1.81 ± 0.00 <sup>a</sup>	16.28 ± 0.92 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.58 <sup>a</sup>	15.59 ± 0.42 <sup>b</sup>	<0.001	0.555	0.349
<b>C18:4n3</b>		0.48 ± 0.06		0.40 ± 0.03				
<b>C20:2n6</b>		3.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.01 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.42 ± 0.99 <sup>b</sup>	5.71 ± 0.90 <sup>b</sup>	0.312	0.002	0.745
<b>C20:3n6</b>		0.30 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.03 <sup>c</sup>	<0.001	<0.001	<0.001
<b>C20:4n6</b>	5.85 ± 0.47	4.81 ± 0.60 <sup>a</sup>	7.11 ± 0.11 <sup>b</sup>	5.09 ± 0.75 <sup>a</sup>	6.14 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.002	0.296	0.088
<b>C20:3n3</b>		0.58 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.94 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.53 <sup>b</sup>	0.001	0.414	0.998
<b>C20:4n3</b>			1.09 ± 0.21	0.13 ± 0.02	0.93 ± 0.14			
<b>C20:5n3</b>	5.13 ± 0.26	5.73 ± 0.52 <sup>c</sup>	2.46 ± 0.47 <sup>a</sup>	5.56 ± 0.14 <sup>c</sup>	3.54 ± 0.14 <sup>b</sup>	<0.001	0.067	0.021
<b>C22:5n3</b>		1.84 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	<0.001	0.134	0.873
<b>C22:6n3</b>	2.45 ± 0.28	5.36 ± 0.59 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.56 <sup>a</sup>	4.99 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.08 <sup>a</sup>	<0.001	0.136	0.936
<b>∑ Saturados</b>	17.21 ± 0.87	19.96 ± 2.23	15.25 ± 1.16	24.26 ± 2.61	19.14 ± 2.21			
<b>∑ insaturados</b>	31.41 ± 1.49	44.95 ± 2.57	55.51 ± 1.82	41.22 ± 1.53	51.44 ± 3.54			
<b>∑ MUFAs</b>	12.57 ± 0.39	14.08 ± 0.19	9.35 ± 1.70	12.46 ± 0.22	7.31 ± 0.40			
<b>∑ PUFAs</b>	18.85 ± 1.39	30.87 ± 2.66	46.16 ± 1.65	28.77 ± 1.75	44.13 ± 3.25			
<b>∑ EPA y DHA</b>	7.58 ± 0.23	11.10 ± 1.11	3.62 ± 1.70	10.55 ± 0.22	5.03 ± 0.10			
<b>n-3/n-6</b>	0.89 ± 0.03	1.15 ± 0.06	0.97 ± 0.05	0.95 ± 0.14	0.95 ± 0.13			

Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05). Valores dados como promedio ± D. E.

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linolénico).

### III.3.3. Cambio neto de ácidos grasos en erizo negro

El cambio neto (final-inicial) en cantidad de microgramos de ácidos grasos por juvenil de erizo negro se presentan en la tabla IX. El cambio neto en los AG C18:1n9, C18:2n6 y C18:3n3 en juveniles alimentados con las DC y DE mostraron acumulación. El AG C18:1n9 en los organismos mantenidos a 20°C y alimentados con la dieta DC y DE (239.17 y 190.80 µg) se mostró acumulación con respecto a los organismos mantenidos a 16°C alimentados con la dieta DE y DC que presentaron consumo de este AG (-563.02 y -415.92 µg).

La mayor acumulación del AG C18:2n6 y C18:3n3 se presentó en la dieta DE-20°C (1,408.52 y 2,267.06 µg; respectivamente) mientras que en la DE-16°C (323.63 y 935.56 µg; respectivamente) y DC-20°C (235.90 y 227.84 µg; respectivamente) por el contrario en la DC-16°C se presentó el consumo de C18:2n6 y C18:3n3 (-153.47 y -4.21 µg; respectivamente). El AG C20:4n6, se presentó acumulación en la dieta DE-20°C (303.89 µg), mientras que en DC-16°C (-320.11 µg), DE-16°C (-142.26 µg) y DC-20°C (-59.92 µg) se consumió. En cuanto a los n-3 LC-PUFA's, el EPA (C20:5n3) de la dieta DC-20°C (136.82 µg) presentó acumulación, mientras que en los tratamientos DE-20°C (-331.25 µg), DE-16°C (291.75 µg) y DC-16°C (174.84 µg) se consumió. El DHA (C22:6n3) la mayor acumulación se registró para la dieta DC mantenidos a 20°C y 16°C (393.79 y 86.45 µg, respectivamente) y para la dieta DE mantenidos a 20°C (2.31 µg), sin embargo, a 16°C (-149.48 µg) presentó consumo.

Dentro de los AG de la familia n6 están los C18:3n6, C20:2n6 y C20:3n6 que no estaban presentes en las dietas ni en el tejido de los organismos al inicio del experimento, y presentaron una acumulación al final. El C18:3n6 presentó acumulación en los organismos alimentados con la dieta DC mantenidos a 20°C y 16°C (20.94 y 6.43 µg, respectivamente). El C20:2n6 se acumuló en todos los tratamientos con valores desde 398.22 µg en la DC-16°C, hasta 592.60 µg en DE-20°C. Así mismo, el C20:3n6

se acumuló en todos los tratamientos, con valores desde 24.28 µg en DC-16°C hasta 54.55 µg en DE-16°C.

Tabla IX. Contenidos de ácidos grasos ( $\mu\text{g}^{-1}$  organismo) y cambio neto (ácido graso/organismo) en juveniles de erizo negro *Arbacia incisa* mantenidos a dos diferentes temperaturas y alimentados con dos diferentes dietas formuladas.

Ácidos grasos	Inicial $\mu\text{g}$	Tratamientos							
		DC-20°C		DE-20°C		DC-16°C		DE-16°C	
		Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto	Final $\mu\text{g}$	Cambio neto
<b>C14:0</b>	217.50	559.26	+341.76	342.36	+124.86	570.66	+353.16	514.12	+296.62
<b>C15:0</b>	67.65	86.71	+19.06	68.21	+0.56	55.01	-12.64	43.97	-23.68
<b>C16:0</b>	1229.81	1440.44	+210.63	1285.83	+56.02	924.18	-305.63	911.80	-318.01
<b>C16:1n7</b>	344.53	444.27	+99.73	116.81	-227.73	244.49	-100.04	91.40	-253.13
<b>C18:0</b>	434.24	413.22	-21.02	553.20	+118.97	209.53	-224.71	242.77	-191.47
<b>C18:1n9</b>	1078.76	1317.93	+239.17	1269.55	+190.80	662.84	-415.92	515.74	-563.02
<b>C18:2n6</b>	467.72	703.62	+235.90	1876.24	+1408.52	314.25	-153.47	791.36	+323.63
<b>C18:3n6</b>	0.00	20.94	+20.94	0.00	0.00	6.43	+6.43	0.00	0.00
<b>C18:3n3</b>	146.07	373.91	+227.84	2413.12	+2267.06	141.86	-4.21	1081.63	+935.56
<b>C18:4n3</b>	0.00	59.65	+59.65	0.00	0.00	398.22	+398.22	0.00	0.00
<b>C20:2n6</b>	0.00	432.80	+432.80	592.60	+592.60	398.22	+398.22	520.11	+520.11
<b>C20:3n6</b>	0.00	37.47	+37.47	45.80	+45.80	24.28	+24.28	54.55	+54.55
<b>C20:4n6</b>	662.19	602.27	-59.92	966.08	+303.89	342.08	-320.11	519.93	-142.26
<b>C20:3n3</b>	0.00	72.68	+72.68	319.18	+319.18	21.91	+21.91	131.79	+131.79
<b>C20:4n3</b>	0.00	0.00	0.00	160.42	+160.42	10.03	+10.03	77.00	+77.00
<b>C20:5n3</b>	580.83	717.66	+136.82	249.59	-331.25	405.99	-174.84	289.09	-291.75
<b>C22:5n3</b>	0.00	230.43	+230.43	87.02	+87.02	83.58	+83.58	32.72	+32.72
<b>C22:6n3</b>	277.64	671.42	+393.79	279.95	+2.31	364.09	+86.45	128.16	-149.48

Valores dados como promedio

DC= Dieta control con concentración estándar de ácidos grasos PUFA's y LC-PUFA's.

DE= Dieta experimental restringida en ácidos grasos del tipo LC-PUFA's manteniendo una proporción de ácidos grasos del tipo PUFA's (oleico, linoleico y linolénico).

### III.4. Diseño de oligos

Las secuencias de los oligos, tamaño y la temperatura de alineamiento se muestran en la tabla X.

Tabla X. Relación del diseño de oligos obtenidos de las enzimas elongasas y desaturasas del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* en donde se muestra el tipo de gen, tamaño, la secuencia, la temperatura de alineamiento.

Gen (longitud)	Tamaño	Organismo	Secuencia de Oligos (5' - 3')	Temperatura de alineamiento
<b>Delta 6</b> 436 pb	61 pb	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	For: CGGCACACTTCAGGCTCAG Rev: AAGACAGGTGACCAAGA	56 °C
<b>Delta 5</b> 1092 pb	60 pb	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	For: GATTTGGCGGTGTGATT Rev: CGTATTGACGGTCTCGAT	52 °C
<b>Elongasa</b> 660 pb	72 pb	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	For: CAGTCGTTCCCTGTCAT Rev: TTCTTTGGTAGAGTGGTGAGA	52 °C
<b>*Ribosomal</b> <b>18S</b>	65 pb	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	For: CGTACACTGGCGGAATCA Rev: GTTTAGCGGATTACCCAGACCTT	60 °C

\* Previamente diseñado y probado para erizo morado por la Dra. Tatiana Olivares Bañuelos del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

#### III.4.1. Estandarización de las condiciones de reacción de PCR

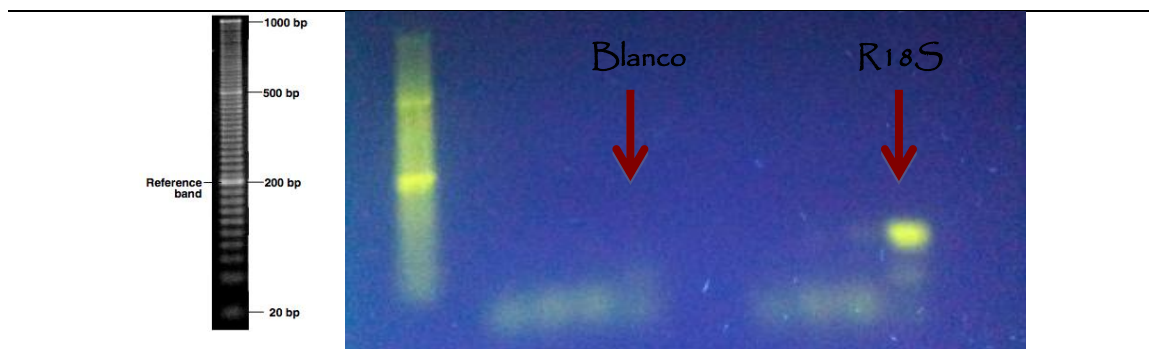
Luego de estandarizar la reacción (Tabla XI, XII y XIII) se encontró que en varias muestras elegidas al azar de juveniles de erizo mantenidos a diferentes temperaturas y alimentados con dietas experimentales se amplificó la banda esperada de 61 pb para la  $\Delta 6$  desaturasa, 60 pb para la  $\Delta 5$ , 72 pb para la elongasa y el control positivo 65 pb para el ribosomal 18S, mientras que el control negativo, no se observó banda de amplificación. Figura 7, 8 y 9.

Tabla XI. Composición de reacción para control positivo R18S

Componente	$\mu\text{l}$ Reacción	Concentración final
*CoralLoad PCR Buffer	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 mM
dNTP Mix	1	0.6 mM
Primer F	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
Primer R	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
Taq DNA Polymerase	0.25	2.5 units/ $\mu\text{l}$
cDNA	1	1 $\mu\text{g}$ / reacción
Agua inyetable	17.75	
Total $\mu\text{l}$	25	

Kit Taq PCR Core de QIAGEN  
\* Contiene 15 mM MgCl<sub>2</sub>

Figura 7. Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos ribosomal 18S diseñados para erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.



Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñidos con SYBR<sup>®</sup> Gold nucleic acid gel stain conteniendo 10 $\mu\text{L}$  del producto de PCR obtenido del cDNA de juveniles de erizo. 20 pb Molecular Ruler 20-1000bp (BIORAD) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

Tabla XII. Composición de reacción para  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa

Componente	$\mu\text{l}$ Reacción	Concentración final
*CoralLoad PCR Buffer	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 mM
dNTP Mix	1	0.6 mM
Primer F	1.25	0.2 $\mu\text{M}$
Primer R	1.25	0.2 $\mu\text{M}$
Taq DNA Polymerase	0.25	2.5 units/ $\mu\text{l}$
cDNA	1	1 $\mu\text{g}$ / reacción
Agua inyectable	16.25	
Total $\mu\text{l}$	25	

Kit Taq PCR Core de QIAGEN  
\* Contiene 15 mM MgCl<sub>2</sub>

Figura 8. Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa diseñados para erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.



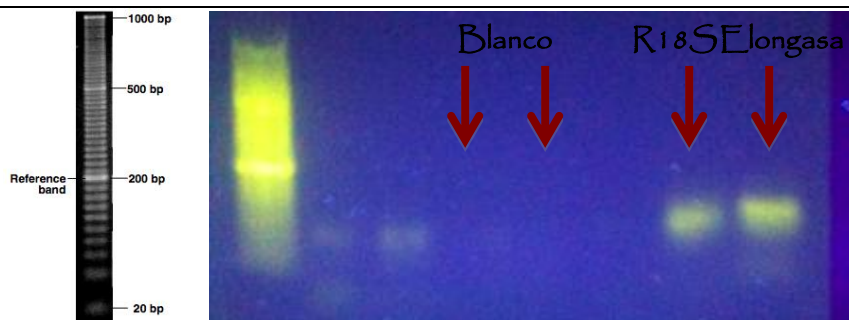
Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñidos con SYBR<sup>®</sup> Gold nucleic acid gel stain conteniendo 10 $\mu\text{L}$  del producto de PCR obtenido del cDNA de juveniles de erizo. 20 pb Molecular Ruler 20-1000bp (BIORAD) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

Tabla XIII. Composición de reacción para Elongasa

Componente	$\mu\text{l}$ Reacción	Concentración final
*CoralLoad PCR Buffer	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 mM
dNTP Mix	1	0.6 mM
Primer F	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
Primer R	0.3	0.2 $\mu\text{M}$
Taq DNA Polymerase	0.25	2.5 units/ $\mu\text{l}$
cDNA	1	1 $\mu\text{g}$ / reacción
Agua inyectable	17.95	
Total $\mu\text{l}$	25	

Kit Taq PCR Core de QIAGEN  
\* Contiene 15 mM MgCl<sub>2</sub>

Figura 9. Reacción de amplificación a 60°C utilizando oligonucleótidos de Elongasa diseñados para erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*.



Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñidos con SYBR<sup>®</sup> Gold nucleic acid gel stain conteniendo 10 $\mu\text{L}$  del producto de PCR obtenido del cDNA de juveniles de erizo. 20 pb Molecular Ruler 20-1000bp (BIORAD) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

#### IV. DISCUSIÓN

Al igual que muchos invertebrados, el erizo de mar presenta un crecimiento variable tanto en condiciones de laboratorio como en el medio silvestre (Russell 1987; Pearse y Cameron 1991). En el presente estudio la alta variación que se presentó afectó el coeficiente de variación entre tratamientos, lo cual pudo dar lugar a no distinguir algunas diferencias significativas en donde la desviación estándar representa hasta en un 50% de la media. Sin embargo, los crecimientos promedios fueron, en algunos casos, lo suficientemente distintos que aun considerando este coeficiente de variación se registraron diferencias significativas con el factor temperatura para el erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*). En este erizo, el máximo crecimiento se registró en los organismos del tratamiento a 16°C con las dietas DC y DE. En contraste, con los juveniles de erizo negro *Arbacia incisa*, el mejor crecimiento se presentó en los juveniles mantenidos a 20°C y alimentados con la dieta DE. Estos resultados sugieren que los juveniles de erizo *Strongylocentrotus purpuratus* y *Arbacia incisa* puede mantener su crecimiento sin afectar la sobrevivencia a 16 y 20°C, respectivamente.

Las dietas utilizadas en el presente experimento fueron isolipídicas e isoproteicas. La composición de ácidos grasos para cada una de las dietas utilizadas para este estudio se vio reflejada por la incorporación de ingredientes utilizados para su elaboración. En la dieta DC se utilizó como principal componente de LC-PUFA's el aceite de hígado de bacalao, la dieta contenía los AG como C16:0, C18:2n6, C18n1n9 y los AG característicos del aceite de pescado con un 8.7% de C20:5n3 (EPA) y un 11.9% de C22:6n3 (DHA). La dieta DE contenía aceite de maíz como fuente de ácido linoleico C18:2n6 (59.2%) y aceite de Linaza como principal fuente de ácido alfa linolénico C18:3n3 (58.9%). La harina de Soya y la harina de tiburón desengrasada aportaron a las dietas AG C18:2n6 y C22:6n3 principalmente sin afectar la composición determinada.

El contenido de C18:2n6 (25.1%) y C18:3n3 (37.3%) como principales ácidos grasos esenciales en la dieta experimental reflejaron el contenido de estos ácidos grasos

incorporados en los aceites de Maíz y Linaza respectivamente. Así mismo, en los juveniles de erizo alimentados con una fuente de origen vegetal se observó un porcentaje alto en la concentración de los PUFA's C18:2n6 y C18:3n3 incorporados de la dieta, mientras que en los organismos alimentados con aceite de pescado, se vio reflejado un mayor porcentaje en LC-PUFA's tales como C20:5n3 y C22:6n3. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones en organismos como el abulón y erizo en donde ellos también encuentran un reflejo de los ingredientes de la dieta en el músculo de estos organismos (Durazo-Beltrán *et al.* 2003; Castell *et al.* 2004; Gonzales-Duran *et al.* 2008).

Lim *et al.* 1997), Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000 mencionan que las fuentes de aceite marino juega un importante papel en la promoción del crecimiento por encima de los aceites vegetales. En el medio natural, los erizos se alimentan principalmente de macroalgas denominadas "Kelp" (Tegner y Dayton, 1981) lo que sugiere que éstas proveen a los organismos herbívoros los AG considerados esenciales como el C18:2n6 y C18:3n3. Además, algunos investigadores sugieren que los erizos tienen la capacidad de elongar y desaturar estos ácidos grasos debido a que cuentan con enzimas que son capaces de biosintetizar LC-PUFA's (Takagi *et al.*, 1980; Bell *et al.*, 2001; Castell *et al.*, 2004). Por esta razón es importante mantener una relación similar entre n3/n6 en las dietas, ya que ambas familias comparten las mismas enzimas para elongar y desaturar, por lo que es importante mantener una relación homogénea. Diversos autores han establecido que debe de guardarse una relación de más de 1 entre n3/n6 (Sargent *et al.*, 2002; Bergé and Barnathan, 2005). En este trabajo ambas dietas fueron relativamente similares (1.4 y 1.6 para la dieta DC y DE, respectivamente).

Con las dietas proporcionadas en este estudio se obtuvieron resultados de crecimiento y sobrevivencia que señalan que los juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y erizo negro *Arbacia incisa* pueden utilizar lípidos de origen vegetal para su crecimiento sin afectar su sobrevivencia. Estos resultados son similares a los reportados por Pantazis *et al.* (2000) Castell *et al.* (2004) con los erizos

de mar *P. Miliaris* y *S. Droebachiensis*, lo que sugiere que los ácidos grasos C18:2n6 y C18:3n3 cumplen los requerimientos de ácidos grasos esenciales en erizo de mar mostrando que estos organismos no requieren la adición de AG como C20:4n6, C20:5n3 y C22:6n3 en la dieta como ocurre en los peces marinos. Por lo anterior, se considera que en el presente trabajo los organismos alimentados con la dieta experimental elaborada con aceites vegetales, no presentaron deficiencias por la ausencia de los ácidos grasos esenciales para cubrir sus necesidades de crecimiento, debido muy probablemente a que presentan la capacidad de elongación y desaturación de los mismos o bien, que sus requerimientos son tan bajos que se llegaron a cubrir con la mínima cantidad contenida en la dieta DE (1.72 de  $\Sigma$  EPA y DHA). Sin embargo, en el erizo negro *Arbacia incisa*, a pesar de no presentar mortalidad, el mejor crecimiento obtenido solo se presentó en los organismos mantenidos en el tratamiento DE-20°C como se mencionó anteriormente. Con relación a la acumulación de AG en tejido, los erizos alimentados con dieta DE que contenía mayor porcentaje de C18:2n6 presentaron mayor acumulación de C20:4n6 que los organismos alimentados con la dieta DC, lo que sugiere que los organismos tienen capacidad para sintetizar el C20:4n6 a partir de su precursor C18:2n6; aparentemente la temperatura no influyó en el proceso de síntesis en el caso de los juveniles de erizo morado.

Por otro lado, a pesar de no estar siendo suministrados en la dieta los AG C18:3n6, C20:2n6 y C20:3n6, en los organismos alimentados con la dieta DC se presentó un 0.1% de C18:3n6, así mismo Castell, *et al.* (2004) reportaron resultados similares con juveniles de erizo verde *Strongylocentrotus droebachiensis* (<0.1% de C18:3n6) por desaturación de la  $\Delta 6$  desaturasa como primer paso en la biosíntesis de la familia n6. Sin embargo, en los organismos alimentados con la DE no se presentó el AG C18:3n6, pero sí un porcentaje de los AG C20:2n6 y C20:3n6 en los organismos alimentados con la DC y DE. De acuerdo a las posibles rutas metabólicas descritas para los organismos marinos (Bell y Tocher, 2009; Monroig, *et al.*, 2011 b), esto sugiere que la enzima  $\Delta 6$  desaturasa no desaturó y por consiguiente se da una elongación directa del C18:2n6 (6.6%) al C20:2n6 (4.14%) para una posterior desaturación por la  $\Delta 5$

desaturasa a C20:3n6 (0.9%). Estos resultados pueden apoyarse por análisis de cambio neto que nos muestra la acumulación del C18:3n6 en los juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y negro *Arbacia incisa* alimentados con la DC así como de valores de cero en los juveniles alimentados con la DE. Así mismo, los AG C20:2n6 y C20:3n6 presentaron valores positivos lo que sugiere una acumulación debido a la síntesis que se debió haber llevado a cabo en los juveniles de erizo morado y negro.

Existen varios reportes que describen la biosíntesis de LC-PUFA en peces (Sargent *et al.*, 2002; Nakamura y Nara, 2004) que apuntan a que el primer paso de la biosíntesis de PUFA's es la producción de C18:4n3 a partir del C18:3n3 gracias a la intervención de la enzima  $\Delta 6$  desaturasa. En este sentido, la ausencia en el perfil de AG de C18:4n3 en los juveniles de erizo alimentados con la DE que no contenía este AG pero sí un alto porcentaje del precursor C18:3n3 (37.33%), presentó significativamente mayor porcentaje de los C20:3n3 y C20:4n3 que los organismos alimentados con la dieta DC en donde sí se mostró un bajo porcentaje de C18:4n3. Este resultado podría indicar que la elongación se da preferentemente cuando se tiene un mayor porcentaje de AG C18:3n3 y con ello se reduce la disponibilidad del sustrato para la  $\Delta 6$  desaturasa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bell, *et al.*, 2001 y coincide con la sugerencia de Castell *et al.* 2004 con erizo verde *Psammechinus miliaris* y *S. Droebachiensis*, respectivamente. Estos resultados se pueden apoyar por los análisis del cambio neto que muestra una mayor acumulación de los C20:3n3 y C20:4n3 en los juveniles de erizo morado y negro alimentados con la dieta DE. Por otro lado, se obtuvieron valores negativos en C18:4n3 al calcular el cambio neto en juveniles de erizo morado alimentados con la dieta DE que no contenía este AG C18:4n3, lo cual podría estar relacionado con la elongación del C18:4n3 a C20:4n3.

En el presente estudio, se observó que en juveniles de erizo morado del tratamiento DE-16°C, el EPA (C20:5n3) sufrió una acumulación en el cálculo de cambio neto, lo cual podría indicar que estos organismos sintetizan este ácido graso, mientras que los organismos bajo las mismas condiciones pero con dieta DC presentaron una

mayor acumulación, que si bien sugiere un exceso de este ácido graso en la dieta, es de llamar la atención que este patrón no se observe en los juveniles de erizo negro en los tratamientos DE-16°C, DE-20°C y DC-16°C. En este sentido, los valores negativos del cambio neto presentados en el AG C20:5n3 en los tratamientos anteriores, puede deberse a que este AG fue utilizado para producción de eicosanoides probablemente debido a una situación de estrés. Estudios muestran que algunos AG de la familia n3 y n6 sirven como principales componentes de los fosfolípidos de membrana y como precursores de eicosanoides (Sargent, 1995), asociados de manera muy amplia con situaciones de estrés (Sargent *et al.*, 2002). Así mismo, valores negativos del cambio neto presentados en los tratamientos DC-16°C y DE-16°C y en los AG's 15:0, 16:0, 16:1n7, 18:0 y 18:1n9; indicó un consumo de estos AG's. Además, el bajo porcentaje de peso ganado registrado para los juveniles de erizo negro, durante los 100 días experimentales, podría ser debido a que los organismos en ocasiones no ingirieron adecuadamente el alimento suministrado, provocando así, que los organismos hayan podido estar en proceso de inanición, ocasionando con ello a su vez una movilización de AG a partir de los depósitos. Estudios realizados por Navarro y Gutiérrez (1995) mencionan que los principales AG movilizados para satisfacer la necesidad energética son los AG saturados y mono-insaturados en lugar de los LC-PUFA.

González-Duran *et al.* (2008) reportan una baja presencia de ARA (C20:4n6) al alimentar erizos con aceite de Maíz/Linaza en la dieta mientras que al alimentar con aceite de Maíz como única fuente de aceite, se registró un alto contenido de ARA. Dichos autores sugieren, que hay una competencia del C18:3n3 y C18:2n6 por actividad de la  $\Delta 5$  e indica que se podría presentarse una inhibición de la desaturasa  $\Delta 5$  por el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3) debido a que la misma enzima  $\Delta 5$  que desaturó el AG de C20:3n6 a C20:4n6 interviene en el proceso C20:4n3 a C20:5n3.

La proporción del C18:3n3 con relación al resto de AG encontrada en los juveniles de erizo morado y erizo negro fue relativamente baja en los organismos alimentados con la dieta DE, ya que a pesar de tener un alto porcentaje de este precursor

en la dieta (37.33%), no se registró en los organismos un porcentaje mayor a 9.3% en erizo morado y de 16% en erizo negro. Este resultado sugiere que los juveniles de erizo a pesar de tener la capacidad para convertir este ácido graso a PUFA's de cadena larga como el C20:3n3 y el C20:5n3, su síntesis se limita a una cierta cantidad para satisfacer sus requerimientos, registrando un porcentaje menor al 2.4% y menor a 7.1% de estos AG respectivamente. Los procesos de síntesis responden por lo regular, a satisfacer las necesidades fisiológicas, que si bien esto no se vio reflejado con relación a la temperatura ni al crecimiento para cada temperatura, entonces pudiera indicar que el requerimiento de estos AG es bajo, por lo que no es necesario el acumularlos para lograr un adecuado desempeño. En juveniles de erizo negro se observó una concentración aún menor, encontrando 2.1 y 3.5% del C20:3n3 y el C20:5n3 respectivamente. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Durazo-Beltrán *et al.* (2003) quienes sugieren que el abulón (*H. fulgens*) tiene una capacidad limitada de convertir el C18:3n3 a LC-PUFA's. Bell *et al.* (2001) sugieren que el erizo de mar *Psammechinus miliaris* es capaz de sintetizar EPA a partir del C18:3n3 mientras que la capacidad de conversión del EPA al DHA es limitada o casi nula. En este estudio al hacer los cálculos del cambio neto para ambas dietas (DC y DE) se mostró una acumulación del AG C20:3n3, siendo que en la DC se presentó en una mínima cantidad y en la DE estaba ausente. Lo anterior sugiere que este AG encontrado en los juveniles de erizo morado y negro tuvo que ser sintetizado por una elongasa. Así mismo, los valores encontrados en la acumulación del EPA en la DE sugiere que los organismos tuvieron la capacidad de sintetizar este ácido graso y que esta cantidad resultó ser adecuada o suficiente para mantener la supervivencia y crecimiento.

En estudios realizados con *Strongylocentrotus purpuratus* expuestos a cambios de temperatura, han demostrado que la alta temperatura influye en la reducción de ácidos grasos insaturados y colesterol de la membrana celular (Weaver *et al.*, 2008). En este trabajo, al comparar el perfil de los LC-PUFAs se observó que sólo el EPA mostró diferencias significativas entre temperaturas, lo que sugiere que a las temperaturas aquí utilizadas no influyen en la síntesis ni en la acumulación. Esto se puede deber a que la

temperatura de 16°C en la que se mantuvieron los juveniles de erizo morado en el presente experimento no fue lo suficientemente baja como para observar un efecto en la acumulación. No obstante, en los juveniles de erizo negro *Arbacia incisa* alimentados con la dieta DE-16°C, se observó un porcentaje mayor ( $P < 0.05$ ) de AG de la familia n6 con relación a los alimentados con la misma dieta pero a 20°C. Lo anterior sugiere que en este erizo si se observó un efecto en la acumulación de C20:2n6 y C20:3n6 por temperatura en los juveniles de erizo negro. En este sentido, al realizar los cálculos de cambio neto, en juveniles de erizo morado mantenidos a 16°C y alimentados con la dieta DE muestran aproximadamente 50% más de acumulación que los mantenidos a 20°C. Mientras que en los juveniles de erizo negro no se presentó esta diferencia en la acumulación en cambio neto.

El porcentaje de DHA encontrado en los juveniles de erizo de este estudio, está relacionado con la presencia de este ácido graso en su respectiva dieta. En este sentido, los resultados obtenidos podrían indicar que los juveniles de erizo de mar tengan un bajo requerimiento por este DHA y concuerdan con lo reportado por Castell *et al.* (2004) con el erizo *S. droebachiensis* alimentados con niveles altos y bajos de DHA, y concluyen que estos organismos no tienen un alto requerimiento por este ácido graso altamente insaturado. Esto se confirma con los cálculos de cambio neto en donde se observó una acumulación mayor en juveniles de erizo morado alimentados con la DC, que los alimentados con la DE. Lo anterior coincide con diversos autores (Durazo-Beltrán *et al.* 2003; Wei *et al.* 2004; Gonzales-Duran *et al.* 2008 y Mateos *et al.* 2011) quienes estudiando diversas especies de abulón sugieren que la elongación y desaturación de EPA y DHA no se produce en forma importante.

En el presente experimento se observó una mayor acumulación de PUFA's en juveniles de erizo morado mantenidos a 16°C. Mientras que en juveniles de erizo negro solo se observó a 16 y 20°C. Estudios con peces de agua dulce ( Hagar and Hazel,, 1985 a, b; Hazel, 1995; Bowden *et al.*, en 1996; Tiku *et al.*, en 1996 y Trueman *et al.*, 2000) mencionan una estrategia a la respuesta a bajas temperaturas consiste en aumentar la

proporción de poliinsaturados en la membrana. Por lo que la desaturación de los ácidos grasos de membrana, es ampliamente considerada como un importante mecanismo de adaptación al estrés térmico en los organismos (Wodtke y Cossins, 1991). En este sentido, se han descrito la biosíntesis de los LC-PUFAs a partir de los PUFAs a través de elongasas (Elovl) y desaturasas (Fad) como las enzimas clave implicadas en la conversión de los ácidos grasos esenciales por elongación de los AG preexistentes (Jakobsson *et al.*, 2006) o desaturación al introducir dobles enlaces en cadenas de C6 ( $\Delta 6$  Fad) o C5 ( $\Delta 5$  Fad) desde el grupo carboxilo (Monroig *et al.*, 2011). Además, estudios recientes con pulpo *Octopus vulgaris* demostraron que este organismo expresa una  $\Delta 5$  desaturasa con la habilidad de introducir dobles enlaces en ácidos grasos saturados y PUFA's (Monroig *et al.*, 2011). En este sentido, sería conveniente conocer si los juveniles de erizo son capaces de elongar y desaturar a partir de los C18 a LC-PUFAs utilizando las enzimas descritas como las  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y elongasa y corroborar si a menores temperaturas afectan la síntesis.

Resultados mostrados en el presente estudio sugieren que los juveniles de erizo tienen la capacidad de sintetizar LC-PUFAs a partir de los C18. Sin embargo, solo se pudo corroborar esta síntesis en relación al crecimiento y acumulación neta. Uno de los objetivos del presente trabajo fue medir la expresión de varias enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de los LC-PUFAs ( $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y elongasa) con el fin de saber si la temperatura afecta la expresión de los genes involucrados en la síntesis de dichas enzimas. En este sentido, se analizó la expresión de los genes  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y elongasa mediante PCR punto final en muestras de juveniles de erizo. Como parte del estudio, se realizaron varios análisis con el fin de encontrar las condiciones de reacción adecuadas para la amplificación de las enzimas de interés. Se logró así la amplificación de todos los genes en estudio. Sin embargo, no fue posible realizar los análisis de PCR en tiempo real para cuantificar los genes y conocer los resultados de expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de AG que avalen los resultados observados en el presente estudio.

## V. CONCLUSIONES

- El crecimiento y sobrevivencia de los juveniles de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* y negro *Arbacia incisa* no se vieron afectados significativamente por la incorporación de aceites vegetales en la dieta.
- Los ácidos grasos presentes en el tejido de juveniles de erizo morado están relacionados con la composición de estos en su dieta.
- Los juveniles de erizo de mar presentan un bajo requerimiento (aprox. al 1%) del ácido graso C22:6n3 (DHA).
- La presencia de AG en el tejido de juveniles de erizo alimentados con una dieta deficientes en estos ácidos grasos sugieren que los juveniles de erizo tienen las enzimas capaces de elongar y desaturar ácidos grasos PUFA's a LC-PUFA's.
- La temperatura afectó la acumulación del AG EPA (C20:5n3) en los juveniles de erizo morado.
- La temperatura afectó en la acumulación del AG C20:2n6 y C20:3n6 en los juveniles de erizo negro.
- Se establecieron las condiciones para la amplificación de los genes  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y elongasa en juveniles de erizo de mar.
- Se logró la amplificación de los genes  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y elongasa en juveniles de erizo de mar aún cuando éstos no fueron cuantificados.

## VI. RECOMENDACIONES

- Buscar un método de desengrasado más eficiente con el fin de eliminar al 100% los LC-PUFAs.
- Realizar el bioensayo con mayor intervalos de temperaturas.
- Realizar el bioensayo con mayor número de organismos con el fin de realizar más análisis.
- Utilizar un menor porcentaje de lípidos totales para forzar a los organismos a ser más eficientes.
- Realizar los análisis de PCR en tiempo real para determinar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de LC-PUFAs.

## VII. LITERATURA CITADA

- Alvarado, J.J. and J. Cortés 2009 Echinoderms. pp. 421-434. In I.S. Wehrtmann, J. Cortés (eds.) Marine biodiversity of Costa Rica, Central America. Springer 538 p.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC International. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. 2 vols. 16th edition. Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities.
- Barrera S. H. A., Ortiz, L. R., Rojas, M. A., Resendez, P. D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo, (Conacyt) 18 (108): 50-60.
- Bell, M.V., and Tocher, D.R. 2009. Lipids in Aquatic Ecosystems. M. T. Arts et al. (eds.) p 211-236.
- Bell, M.V., Dick, J.R., Kelly, M.S., 2001. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in sea urchin *Psammechinus miliaris*. Lipids 36, 79–92.
- Bergé, J.P., Barnathan, G. 2005. Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 96:49-125
- Bowden, L.A., Restall, C.J., Rowley, A.F., 1996. The influence on environmental temperature on membrane fluidity, fatty acid composition and lipoxygenase product generation in head kidney leucocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. 115B, 375-382.
- Castell, J.D., Kennedy, E.J., Robinson, S.M.C., Parson, G.J., Blair, T.J., Gonzales Durán, E., 2004. Effect of dietary lipids on the fatty acid composition and metabolism in juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Aquaculture 242, 417-435.
- Cook, H.W. & McMaster, C.R. 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. En Vance, D.E. & Vance, J.E. (Eds). Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes 4th Edn. Elsevier Science.
- Devlin, TM, 2011. Textbook of Biochemistry: with clinical correlation. 7th ed. Ed Wiley. USA. 674 pp

- Durazo-Beltrán, E., D'Abramo, L. R., Toro-Vázquez, J. F., Vásquez-Peláez, C., & Viana, M. T. (2003). Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*, 224, 257–270.
- Ebert, T.A., 2001. Growth and survival of post-settlement sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 79–102.
- E. Carpizo Ituarte, A. Salas Garza, G. Parés Sierra. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas*, junio, año/vol. 28, número 002. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México pp.157-166
- Eddin, M., Sessions, A.V.V, 1984. Heterogeneity in the plasma membrane lipids of eukaryotic cells. *N.Y. Acad. Sci.* 414, 8-18.
- Farkas, T., Fodor., E., Kitajka, K., Halver, J.E., 2001. Response of fish membrane to environmental temperature. *Aquaculture Research* 32, 645-655.
- Folch, J., Less, M., Sloane, G., Stanley, H. 1957. A simplified method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509
- González-Duran, E. 2005. Universidad Autónoma de Campeche. *Biología y Metabolismo de Erizos de Mar. JAINA Boletín Informativo*, Vol 15 (1).
- Gonzales-Duran, E., Castell, J.D., Robinson, S.M.C., Blair, J.T., 2008. Effect of dietary lipids on the fatty acid composition and lipid metabolism of the green sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 276 120-129
- Gurr, M.I., HARwood, J.L., and Frayn, K.N. 2002. *Lipid Biochemistry. An Introduction*, 5th ed. Blackwell, Oxford, 320 pp
- Glémet, H.C., Gerrets, M.F., Ballantyne, 1997. Membrane lipids of red muscle mitochondria from land-locked and sea-run Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Marine Biology* 129, 673-679.
- Hagar, A.F., Hazel, J.R., 1985a. Changes in desaturase activity and the fatty acid composition of microsomal membranes from liver tissues of thermally-acclimating rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 156B, 35-42.

- Hagar, A.F., Hazel, J.R., 1985b. The influence of thermal acclimation on the microsomal fatty acid composition and desaturase activity of rainbow trout liver. *Mol. Physiol.* 7, 107-118.
- Harwood, J. L. (1988) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 101-138.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
- Herrero Perezrul María Dinorah, Reyes Bonilla H., Gonzalez Azcarraga A., Cintra Buenrostro C.E., Rojas Sierra A.. 2008. *Equinodermos. Bahía de los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad. Línea base 2007. SEMARNAT-INE-PRONATURA NOROESTE, SAN DIEGO NATURAL HISTORY MUSEUM.* 12. 339-361.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000. *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds.* Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 281–290.
- Hofer, S. C. 2002. The Effects of Temperature on feeding and growth characteristics of the Sea Urchin *Lytechinus Variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Master's thesis. University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA.
- Hwang, D., 1992. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: Chow, C.K. (Ed.), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications.* Marcel Dekker, New York, NY, pp. 545–558.
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 45:237-249.
- Jaworski, J. G. (1987) in *The Biochemistry of plants*, ed. Stumpf, P. K. (Academic, New York), Vol. 9 pp. 159-174.
- Lim, C., Ako, H., Brown, C.L., Hahn, K., 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Peneaus vannamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture* 151, 143–153.
- Lorente, I. D. Gamo, J.L. Gómez, R. Santos, L. Flores, A. Camacho, L. Galindo, J. Navarro. Los efectos biológicos del cambio climático. *Ecosistemas* 13 (1): 103-110. Enero 2004
- Marsh, A.G., Watts, S.A., 2001. Energy metabolism and gonad development. In: Lawrence, J. M. (Ed.) *Edible Sea urchin: Biology and Ecology.* Elsevier, Amsterdam, pp. 27-42.

- Mateos, H.T., Lewandowski, P.A. & Su, X.Q. 2011. Dietary fish oil supplements increase tissue n-3 fatty acid composition and expression of delta-6 desaturase and elongase-2 in Jade tiger hybrid abalone. *Lipids*, 46: 741-751.
- Monroig, O., Navarro, J.C., Dick, J.R., Alemany, F. & Tocher, D.R. 2011. Identification of a  $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Marine Biotechnology*, DOI 10.1007/s10126-011-9423-2.
- Monroig, O., Li, Y., Tocher, D.R. 2011. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: High activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* p 206-213
- Morris RH, Abbott Dp, HAdlerlie EC (1980) *Intertidal invertebrates of California*. Stanford University Press, Stanford.
- Nelson, D.L., Cox. M.M. 2005. *Lehninger-Principles of Biochemistry*, 4th ed. New York: W.H. Freeman. 343-368 pp.
- Osovitz, C. J., Hofmann, G. E., 2005. Thermal history-dependent expression of the hsp70 gene in purple sea urchin: biogeographic patterns and the effect of temperatura acclimatation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327,134-143.
- Pantazis, P.A., Kelly, M.S., Connolly, J.G., Black, K.D., 2000. Effect of artificial diets on growth, lipid utilization, and gonad biochemistry in the adult sea urchin *Psammechinus miliaris*. *J. Shellfish Res.* 19, 995 – 1001.
- Pearse JS, Cameron A (1991) Echinodermata: Echinoidea. In: Giese AC, Pearse JS, Pearse VE (eds) *Reproduction of Marine Invertebrates*. Vol. VI. Echinoderms and Lophophorates. Boxwood Press, Pacific Grove, CA. pp 513–662
- Pernet, F., Gauthier-Clerc, S., Mayrand, É., 2007. Change in lipid composition in oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) exposed to constant or fluctuating temperatura regimes. *Biochem and Physiol. Part B* 147, 557-565.
- Rogers-Bennett Laura. 2007. The Ecology of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. p393
- Russell MP (1987) Life history traits and resource allocation in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 108: 199–216

- Sakamoto, T and Murata, N. 2002 Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Microbiology*, 5:206-210
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, pp. 353–372.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., and Henderson, R.J. (1995) Protist as Sources of (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids for Vertebrated Development, in *Protistological Actualities (Proceedings of the Second European Conference of Protistology, Clermont-Ferrand 1995)* (Brugerolle, G., and Mignot, J.-P., eds.) pp 54-64.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier Science, San Diego, California, USA, 3rd ed., pp. 181-257.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 522-525.
- Smith, W. L., 1989. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal* 259, 315-324.
- Strathmann, M. F., 1987. *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington, Seattle. 670 p
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. Freeman, New York.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., Tew, K. D., 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56, 215-222.
- Takagi, T., Eaton, C.A., Ackman, R.G., 1980. Distribution of fatty acid in lipids of the common Atlantic sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 195-202.
- Tiku, P.E., Gracey, A. Y., Macarteny, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1996. Cold-induced expresión of  $\Delta^9$ -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815-818.

- Tegner MJ (2001) The ecology of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. In: Lawrence JM (Ed) *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Elsevier, New York. Pp 307-331
- Tegner, M.J., Dayton, P. K., 1981. Population structure, recruitment and mortality of two sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) in the kelp forest. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5 255-268.
- Thompson G. A. Jr. (1983) Mechanisms of homeoviscous adaptation in membranes. In *Cellular Acclimatisation to Environmental Change* (Edited by A. R. Cossins and P. Sheterline). Cambridge University Press, Cambridge.
- Trueman, R.J., Tiku, P.E., Caddick, M.X., Cossins, A.R., 2000. Thermal thresholds of lipids restructuring and delta 9-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 641-650.
- Voogt, P.A., 1982. Steroid metabolism. In: Jangoux, M., Lawrence, J. M. (Eds.), *Echinoderm Nutrition*. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 417-436.
- Weaver, F.E., Shaikh, S.R & Edidin, M. 2008. Plasma membrane lipid diffusion and composition of sea urchin egg membranes vary with ocean temperature. *Chemistry and Physics of Lipids*, 151: 62-65.
- Wei, X., Kangsen, M., Wenbing, Z., Zhiguo, L., Beping, T., Hongming, M. A., *et al.* (2004). Influence of dietary lipid sources on growth & fatty acid composition of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Journal of Shellfish Research*, 127, 29–40.
- Wodtke, E., Cossins, A.R., 1991. Rapid cold-induced changes of membrane order and activity in the endoplasmic reticulum of carp liver: a time-course study of ternal acclimation. *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 343-350.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Fifth Edition, pp 85-87
- Ziboh, V. A., Miller, C. C., Cho, Y., 2000. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 361S-366S.