

TESIS DEFENDIDA POR
Verónica Vizcaíno Ochoa
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Coodirector

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Coodirector

Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Miembro del Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Miembro del Comité

Dra. María Teresa Viana Castrillón
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA LUZ UV SOBRE EL CULTIVO LARVARIO
DEL LENGUADO DE CALIFORNIA**
Paralichthys californicus (Ayres, 1851)

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

Verónica Vizcaíno Ochoa

Ensenada, Baja California, México, julio del 2010.

RESUMEN de la tesis de **Verónica Vizcaíno Ochoa** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Julio de 2010.

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA LUZ UV SOBRE EL CULTIVO
LARVARIO DEL LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus* (Ayres,
1851)**

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Coodirector

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Coodirector

El lenguado de California es una especie nueva para la acuicultura, posee un gran valor comercial y rápido crecimiento. El cultivo de esta especie comenzó recientemente en el norte del país y al igual que en los cultivos de otras especies de peces planos se presentan problemas asociados a las condiciones de cultivo y están relacionados con deficiencias nutricionales, calidad del agua y luz, lo cual se refleja en deformidades óseas y pigmentación anormal, por lo que los organismos pierden valor comercial. En este trabajo se estudió el desarrollo de la pigmentación y se observó que en el lenguado de California a diferencia de otras especies el patrón de pigmentación definitivo se desarrolla después de la metamorfosis; durante la etapa juvenil (75 dde). Se realizó un experimento como primera aproximación para reducir la pigmentación anormal, aumentar el crecimiento y determinar el requerimiento DHA, en larvas de lenguado de California. Se evaluó el efecto de cuatro niveles dietario de DHA, (nulo 0% DHA, bajo 5% DHA, medio 10% DHA y alto 10% DHA) administrado a través de metanauplios de *Artemia* enriquecidos, sobre el crecimiento, sobrevivencia, éxito en el destete y pigmentación. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento, la sobrevivencia y la pigmentación como resultado de la dieta con los cuatro niveles de DHA al día 50 dde. Sin embargo, las larvas alimentadas con el nivel alto de DHA mostraron el mayor crecimiento y sobrevivencia al final del experimento (75 dde). Se observó un número significativamente mayor de peces pigmentados (ca., 33%) con el tratamiento de DHA alto a los 75 dde, comparado con los tratamientos de DHA bajo y nulo (0 y 5%). Sin embargo, este tratamiento resultó con alto número de peces pseudoalbinos (ca., 30% of the population). Por medio de una regresión polinomial de segundo orden se estimó que el nivel de DHA recomendado en la dieta premetamórfica para el lenguado de California de 50 dde es de 1.21% de DHA del total de ácidos grasos (TFA) y para la etapa postmetamórfica de 2.40% de DHA del TAG. Adicionalmente se evaluó el efecto de la luz UV exponiendo a las larvas de lenguado de California de 15 a 50 dde a cuatro intensidades de luz UV (0, 33, 66 y 100%). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento ni en la pigmentación después

de la exposición a los diferentes tratamientos de luz UV, por lo que se concluyó que la luz UV no es un factor determinante de la síntesis de melanina ni de la pigmentación en el lenguado de California. Finalmente, se cuantificó la actividad de la enzima tirosinasa en piel de lenguado de California, utilizando tejido de peces pigmentados y pseudoalbinos y tomando muestras del lado oculado y del lado ciego. La actividad de la enzima se cuantificó espectrofotométricamente en todas las muestras analizadas y esta fue mayor en el extracto del tejido pigmentado lado oculado, seguido por el extracto del tejido pigmentado lado ciego, posteriormente por el extracto del tejido pseudoalbino lado oculado y finalmente por el extracto de tejido pseudoalbino lado ciego, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de actividad de la enzima entre las muestras de los cuatro tejidos analizados. Aunque tenemos avances importantes, aun no se logra elucidar el problema de pigmentación anormal en el lenguado de California, por lo que es necesario realizar más estudios para entender los procesos inhibitorios de la melanización y obtener información que permita hacer modificaciones en el cultivo larvario con el fin de disminuir la pigmentación anormal del lenguado de California.

Palabras Clave: pigmentación, ácidos grasos, tirosinasa, luz UV, lenguado de California.

ABSTRACT of the thesis presented by **Verónica Vizcaíno Ochoa** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México, July 2010.

**EFFECT OF FATTY ACIDS AND UV LIGHT ON CALIFORNIA HALIBUT
(*Paralichthys californicus*) LARVAL CULTURE (Ayes, 1851)**

The California halibut is a new species for aquaculture, with great market value and good growth rates. Culture of this species recently began in the north of Mexico, however as with many flatfish species there are problems in the production of juveniles associated with nutritional deficiencies (i.e., essential fatty acids) and environmental requirements (i.e., light conditions) which results in bone deformities and abnormal pigmentation of the juveniles produced and reduces their commercial value. In this study, we characterized the development of pigmentation process for the California halibut, and unlike other flatfish species, the pattern of final pigmentation was not completed until after metamorphosis during the early juvenile stage (75 days post hatch, dph). As a first approach to reduce abnormal pigmentation, improve growth and determine the requirement of the essential fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA), in California halibut late larvae, we evaluated the effect of four levels of dietary DHA (nul 0% DHA, low 5% DHA, medium 10% DHA , hi 15% DHA) on growth, survival, weaning success and pigmentation. DHA was administered to the larvae through enriched *Artemia* metanauplii. No significant differences on growth, survival and pigmentation as a result of increasing dietary DHA levels were found in 50 dph recently settled juveniles. However, larvae fed the highest DHA level resulted in the highest growth and survival at the end of the experiment (75 dph). Additionally, highest weaning success was achieved with this treatment. Significantly higher numbers of normally pigmented fish (ca., 33%) were obtained with the highest DHA level at 75 dph compared to the low DHA levels (0 and 5%). However, since this treatment resulted in the highest survival part of the population had abnormal pigmentation (ca., 30% of the population). Based on a second order polynomial regression, the recommended DHA level in the diet for pre-metamorphic larvae to attain adequate growth and survival as estimated here for recently settled California halibut at 50 dph is 1.21 % of DHA of the total fatty (TFA) acids. However, for post-metamorphosis fish (75 dph) highest pigmentation rates, growth and survival are obtained with 2.40% of DHA of TFA in the diet during the *Artemia* feeding period.

Additionally, we evaluated the effect of UV light on the pigmentation process by exposing 15 to 50 dph California halibut larvae to four UV light intensities (0, 33, 66 and 100%). There were no significant differences among treatment in terms of growth or pigmentation after exposure to the UV light, thus we concluded that UV light is not a critical factor in the synthesis of melanin and the pigmentation process in California halibut larvae.

Lastly, we measured the activity of the enzyme tyrosinase which is known to be a key enzyme in melanin biosynthesis. Tyrosinase activity was compare in California halibut skin samples from the o-cular and the blind side of pigmented and pseudoalbinos fish. The enzyme activity was quantified using a novel spectrophotometric technique. We were able to detect activity in all samples

analyzed, but enzyme activity was higher in extracts from tissues of the ocular side of pigmented fish compared to the other extracts. However, no significant differences were found between the enzyme activity among the tissues analyzed.

Although significant progress was made characterizing and reducing abnormal pigmentation in the California halibut, the pigmentation process is still unclear and requires further research to elucidate the mechanism inhibiting normal melanization. This information can then be used to modify current larval production protocols in order to further reduce abnormal pigmentation in California halibut.

Key words: Pigmentation, fatty acids, tyrosinase, UV light, California halibut.

Dedicatorias

***Con mucho cariño dedico esta tesis a Julio, Vicente, Sofía, Viviana,
Mina y Lana, por ser la base de mi vida.***

Agradecimientos

A los Doctores Benjamín Barón Sevilla y Juan Pablo Lazo Corvera, por dirigir ésta tesis, por compartir conmigo sus conocimientos y por su apoyo y paciencia durante todo el proceso de doctorado.

A mis sinodales: Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Dr. Eduardo Durazo Beltrán y Dra. María Teresa Viana Castrillón por su participación a lo largo del doctorado y sus observaciones para enriquecer este trabajo.

A los investigadores Dr. Manuel Segovia, Dr. Eugenio Díaz, Dra. Pilar Sánchez, Dr. Miguel Ángel del Río, Dr. Jorge Cáceres, Dra. Beatriz Cordero, Dr. Ernesto García y Dr. Gabriel Correa, por su apoyo en el préstamo de material para la realización de este trabajo.

Al personal del CICESE en especial a Varuní Arredondo y al personal de control escolar, por facilitar el proceso administrativo para obtener el grado.

A todos los técnicos del Departamento de Acuicultura del CICESE, especialmente a la M. en C. Yanet Guerrero, por facilitarme las tareas del laboratorio y por su amistad.

A los compañeros de laboratorio, especialmente al M. en C. Emmanuel Martínez por tener siempre actitud de compañerismo, al M. en C. Mario Galaviz, M. en C. Marisol Simón, M. en C. Getsemany Juárez y al M. en C. Fernando García por todo su apoyo y amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para la realización del doctorado.

A Sonia, Diego, Jimena, Nancy, Juan, Mike, Nicol, Eduardo, Karel, Vanessa, Alethea, Caro, Bere, Paloma, Magally, Eugenio, Ara, Alex, Desy, Gloria, Mata y todos los amigos que estuvieron siempre al pendiente de que este trabajo llegara al final.

A mi familia Vicente, Sofía y Viviana por su apoyo.

A Julio por compartir la vida conmigo, por su infinito apoyo y por recordarme siempre que las cosas que uno empieza las tiene que terminar.

CONTENIDO

	<i>Página</i>
Resumen español.....	I
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	x
Capítulo I. Introducción General.....	1
I.1 La acuicultura en México.....	1
I.2 Acuicultura de peces planos.....	2
I.3 Lengado de California (<i>Paralichthys californicus</i>).....	3
I.4 Pigmentación.....	5
Capítulo II. Desarrollo de la pigmentación del lengado de California	9
II.1 Introducción.....	10
II.2 Antecedentes.....	11
II. 3 Objetivo general.....	13
II.3.1 Objetivo particular.....	13
II.4 Materiales y Métodos.....	13
II.4.1 Cultivo larvario.....	13
II.4.2 Protocolo de alimentación.....	14
II.4.3 Patrón de pigmentación.....	14
II.4.4 Histología.....	15
II.5 Resultados.....	16
II.5.1 Células pigmentarias en un pez pigmentado.....	16
II.5.2 Melanoforos en peces pseudoalbinos.....	19
II.6 Discusión.....	20
II.6.1 Ontogenia pigmentaria.....	20
II.6. 2 Histología de la dermis en los peces pseudoalbinos.....	23
Capítulo III. Efecto del DHA en el desarrollo y pigmentación del lengado de California.....	25
III.1 Introducción.....	26
III.2 Antecedentes.....	27
III.3 Hipótesis.....	29
III.4 Objetivo general.....	29
III.4.1 Objetivo particular.....	29
III.5 Materiales y Métodos.....	29
III.5.1 Cultivo larvario.....	29

CONTENIDO (continuación)

	Página
III.5.2 Enriquecimiento de rotíferos.....	30
III.5.3 Enriquecimiento de <i>Artemia</i>	31
III.5.4 Protocolo de alimentación.....	32
III.5.5 Toma de muestras.....	32
III.5.6 Patrón de pigmentación.....	33
III.5.7 Análisis de ácidos grasos.....	34
III.5.8 Tasa de crecimiento específico.....	34
III.5.9 Estadística.....	34
III.6 Resultados.....	35
III.6.1 Crecimiento, sobrevivencia y éxito en el destete.....	35
III.6.2 Análisis de ácidos grasos.....	35
III.6.2.1 Ácidos grasos en metanauplios de <i>Artemia</i>	36
III.6.2.2 Ácidos grasos en juveniles.....	37
III.6.3 Patrón de pigmentación.....	39
III.6.4 Tasa de crecimiento específico.....	39
III.7 Discusión.....	40
III.7.1 Crecimiento, sobrevivencia y éxito en el destete.....	40
III.7.2 Pigmentación	43
Capítulo IV. Efecto de la luz UV en el desarrollo y pigmentación del lenguado de California.....	46
IV.1 Introducción.....	46
IV.2 Antecedentes.....	48
IV.3 Hipótesis.....	49
IV. 4 Objetivo general.....	49
IV. 4.1 Objetivo particular	50
IV. 5 Materiales y Métodos.....	50
IV.5.1 Protocolo de cultivo.....	51
IV.5.2 Fuente de luz.....	51
IV.5.3 Sobrevivencia y crecimiento.....	51
IV.5.4. Patrón de pigmentación después de la exposición.....	52
IV.5.5 Estadística.....	52
IV.6 Resultados.....	52
IV.6.1 Sobrevivencia y crecimiento.....	53
IV.6.2 Clasificación de color.....	53
IV.6.3 Luz UV en la lámpara.....	55
IV.7 Discusión.....	56
Capitulo V. Cuantificación de la enzima tirosinasa en la piel del lenguado de California.....	60
V.1 Introducción.....	61

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.2 Antecedentes.....	62
V.3 Hipótesis.....	63
V.4 Objetivo general.....	63
V.4.1 Objetivo particular.....	63
V.5 Materiales y Métodos.....	64
V.5.1 Cuantificación de la actividad de la Tirosinasa	64
V.5.2 Estadística.....	65
V.6 Resultados.....	65
V.7 Discusión.....	67
Capítulo VI. Conclusiones.....	71
Referencias.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplar de lenguado de California pigmentado	4
2	Ruta de síntesis de melanina en mamíferos	6
3	Esquema de un melanocito	6
4	Esquema de un melanóforo	7
5	Desarrollo pigmentario del lenguado de California 1	17
6	Desarrollo pigmentario del lenguado de California 2	18
7	Desarrollo pigmentario del lenguado de California 3	18
8	Desarrollo pigmentario del lenguado de California 4	19
9	Cortes histológicos de piel de lenguado de California	20
10	Sistema de cultivo	30
11	Patrones de pigmentación en juveniles de lenguado de California	33
12	Ubicación de lámparas UV y láminas	51
13	Patrón de pigmentación en peces de 50 dde	54
14	Patrón de pigmentación en peces de 75 dde	55
15	Irradiancia de las 12 lámparas de UV	56
16	Muestras de piel de lenguado de California y control	66
17	Actividad de enzima Tirosinasa en piel de lenguado de California	66

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Posición sistemática del Lenguado de California	3
II	Talla, peso y sobrevivencia del lenguado de California	36
III	Perfil de ácidos grasos en metanauplios de <i>Artemia</i>	37
IV	Perfil de ácidos grasos en tejido de juveniles de lenguado de California	38
V	Patrón de pigmentación en juveniles de lenguado de California	39
VI	Tasa de crecimiento específica en lenguado de California	40
VII	Talla, peso y sobrevivencia en peces irradiados con luz UV	53
VIII	Porcentaje de peces con diferente pigmentación 50 dde	54
IX	Porcentaje de peces con diferente pigmentación 75 dde	55
X	Irradiancia promedio en espectro UVA y UVB	56
XI	Unidades de actividad enzimática en tejido de lenguado de California	67

Capítulo I

I. Introducción General

I.1 La Acuicultura en México

En el ámbito pesquero, México figura entre los 20 primeros países del mundo en cuanto a la captura de recursos (1.5% de las capturas mundiales), lo que representa una importante fuente de divisas para el país. Dado que la actividad se basa en el aprovechamiento de los recursos naturales renovables y que algunos de éstos muestran signos de abatimiento, durante los últimos años, se le ha dado mayor importancia a la regulación de las actividades pesqueras y acuícolas con el fin de disminuir la presión sobre los recursos sobreexplotados (SAGARPA 2001).

La acuicultura participa con más del 12% de la producción pesquera y acuícola nacional y de acuerdo a las tendencias internacionales podría representar en nuestro país más del 40% de esta producción en un plazo de entre 10 y 15 años (SAGARPA, 2007).

El anuario estadístico de acuicultura y pesca de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reporta que durante el año 2007, el 52% del volumen total de la pesca nacional estuvo formado por sardina, camarón y atún; los estados, Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur contribuyeron con un 73.3% del volumen total de producción pesquera y acuícola. El valor de la producción pesquera y acuícola nacional en el 2007 generó 16, 682 millones de pesos, con un 5.6% de incremento con respecto a la producción de 2006 (SAGARPA, 2007).

A pesar de la importancia de la acuicultura en nuestro país, su desarrollo se ha visto obstaculizado por diversos factores, entre los que destacan la escasa difusión y asimilación de los conocimientos técnicos básicos para su explotación, insuficiencia de apoyos para la transferencia de tecnología, recursos financieros limitados y los

problemas en la tenencia de la tierra para uso acuícola, en especial en la zona costera (SAGARPA, 2001).

Para contribuir a la solución de dichos problemas, es necesario realizar investigaciones que aporten conocimiento para ser aplicado en un principio a nivel de micro escala en cultivos experimentales, que posteriormente puedan ser trasladados a cultivos con fines de producción comercial.

I.2 Acuicultura de peces planos

La acuicultura de peces planos comenzó en la década de los 70's en distintos países: en Francia se inició con el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), mientras que en Japón ya existía el cultivo de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), altamente cotizado por su carne blanca (Furusawa, 1997). Actualmente se cultivan en varios países especies con gran demanda, como el lenguado del Atlántico (*Hipoglossus hipoglossus*). En Noruega esta especie se cultiva tanto en jaulas marinas como en estanques de tierra y es muy apreciado por la calidad de su carne y por su sabor (Brancker, 2000). Esta especie registró una producción mundial en 2004 de 850,000 organismos de los cuales 350,000 se produjeron en Noruega (Hamre et al. 2007). En España el rodaballo (*S. maximus*) se considera una especie con alto potencial acuícola (Soutar, 2000) mientras que el pez sol (*Solea senegalensis*) que habita en las costas del mediterráneo se ha cultivado tanto en España como en Portugal desde la década de los años 80 (Villata et al. 2005 a). Esta especie registra alta mortalidad durante las etapas tempranas debido a una nutrición inadecuada y a problemas patológicos (Zarza et al. 2003).

En América el cultivo de peces planos comenzó en E.U.A. también durante los años 70 con el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*) y a pesar de que actualmente se comercializa esta especie, se conoce muy poco acerca de su desarrollo larval (Bengtson, 1999). En 1982 la Fundación Chile desarrolló un programa para el cultivo de rodaballo (*S. maximus*). El objetivo de este proyecto fue iniciar el cultivo de esta especie a escala comercial, utilizando la inversión privada para la transferencia de tecnología (Alvial y Manriquez, 1999).

I.3 Lenguado de California (*Paralichthys californicus*)

Actualmente el Lenguado de California se considera un candidato para la acuicultura en México. El género *Paralichthys* incluye 21 especies que se distribuyen en aguas costeras templadas y subtropicales, entre las cuales se encuentra *P. californicus*. Su distribución geográfica abarca desde el río Quillayute, Washington hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur (Eschmeyer et al. 1983).

Superclase: Gnathostomata

Clase: Actinopterygii

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Pleuronectiformes

Suborden: Pleuronectoidei

Familia: Paralichthyidae

Género: *Paralichtys*

Especie: *Californicus*

Tabla I. Posición sistemática del lenguado de California

Esta especie es abundante en fondos arenosos con una profundidad menor a 15 m y es una de las especies más importantes en la pesca comercial y recreativa en aguas cercanas a la costa. Los organismos juveniles y adultos tienen un cuerpo ovalado, la boca es grande y simétrica, arcos branquiales relativamente largos, ojos pequeños en un solo lado del cuerpo, nostrilas y poros laterales cefálicos en el rostro y mandíbulas (Allen, 1982).

La época reproductiva es de febrero a agosto, con un máximo en mayo. Es una especie gonocórica, la fertilización de los huevos es externa y el desove ocurre en fondos arenosos con profundidades de 6 a 20 m (Frey, 1971). Las larvas son pelágicas (12 a 45 mm) y la metamorfosis generalmente ocurre en las bahías, esteros y/o sistemas protegidos cuando el organismo cuenta con un mes de edad (Kramer y Hunter, 1987). Los juveniles permanecen cerca de dos años en ambientes protegidos para después migrar al mar abierto, como adultos o sub-adultos. Los machos alcanzan la madurez sexual a los 2 o 3 años con una longitud que va de 20

a 23 cm, mientras que las hembras pueden reproducirse cuando tienen 4 o 5 años y miden entre 38 y 43 cm de longitud total (Frey, 1971). Los hábitos alimenticios de esta especie varían de acuerdo a la etapa de desarrollo; las larvas son planctotróficas y cuando alcanzan la longitud de 0.7 a 2.0 cm se alimentan de copépodos, anfípodos, poliquetos, mísidos y larvas de cangrejo. Los adultos y sub-adultos se alimentan principalmente de peces y algunos invertebrados (Allen, 1982). El color característico de estos peces en el lado oculado, va del café claro al café oscuro y puede incluir puntos con tonalidades negras, naranja o blancas mezcladas con el café (Figura 1), el lado ciego es blanco (Allen, 1982).



Figura 1. Pigmentación característica de juveniles de lenguado de California (Imagen cedida por Benjamín Barón Sevilla).

En México el cultivo de esta especie comenzó en el 2003 en el norte del País teniendo como sede el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en dónde se han producido hasta 25,000 juveniles al año (Lazo, 2007).

A pesar de que en la actualidad se cultivan varias especies de peces planos en el mundo, aún existen diferentes problemas, principalmente durante las etapas de desarrollo temprano. La pigmentación anormal y la deformación de los huesos son los problemas más comunes durante la producción de semilla de lenguado y al parecer los factores nutricionales y las condiciones del cultivo son los que producen estas anomalías (Miki et al. 1990; Kanazawa, 1993; Takeuchi et al. 1995).

I.4 Pigmentación

En los vertebrados, las células embrionarias de la cresta neural se diferencian en varios tipos celulares, incluyendo a las células pigmentarias (Bagnara, 1987). Existen cuatro tipos principales de células que contienen pigmento y que dan la coloración a la piel, pelo y plumaje de los vertebrados (Wallin, 2002). Los melanocitos que son las únicas células pigmentarias presentes en los mamíferos, tienen una coloración negra o café y reciben el nombre de melanóforos en organismos poiquilotermos; los xantóforos que proporcionan una coloración naranja y los iridóforos que producen tonalidades claras o blancas (Fujji, 1993). Las células pigmentarias están compuestas de diferentes organelos involucrados en la síntesis de los pigmentos, en el caso de los mamíferos el proceso de pigmentación está más estudiado por lo que los modelos y las técnicas son una referencia útil para el estudio de la pigmentación en los peces planos. Los melanocitos son células redondas o cilíndricas con prolongaciones largas que se extienden, desde las áreas superficiales de las células y penetran en los espacios intercelulares del estrato espinoso, en donde se ubican los queratinocitos. El proceso de la síntesis de melanina comienza con la síntesis de tirosinasa que se lleva a cabo en el retículo endoplasmático del melanocito; esta se empaqueta en el aparato de Golgi en forma de gránulos ovoides conocidos como melanosomas. A partir de tirosina se sintetiza melanina por medio de una serie de reacciones en las que está involucrada la tirosinasa, en el caso de los mamíferos esta ruta de síntesis resulta en dos tipos de melanina, eumelanina que forma el pigmento negro y feomelanina que forma pigmento café o rojizo (Kadekaro et al. 2003) (Figura 2). La enzima tirosinasa se activa por medio de luz UV; los melanosomas son transportados desde el cuerpo del melanocito hasta la región apical de sus prolongaciones dendríticas. Una vez en este sitio pasan de la punta de las prolongaciones del melanocito hacia los queratinocitos, por proceso de secreción (Figura 3).

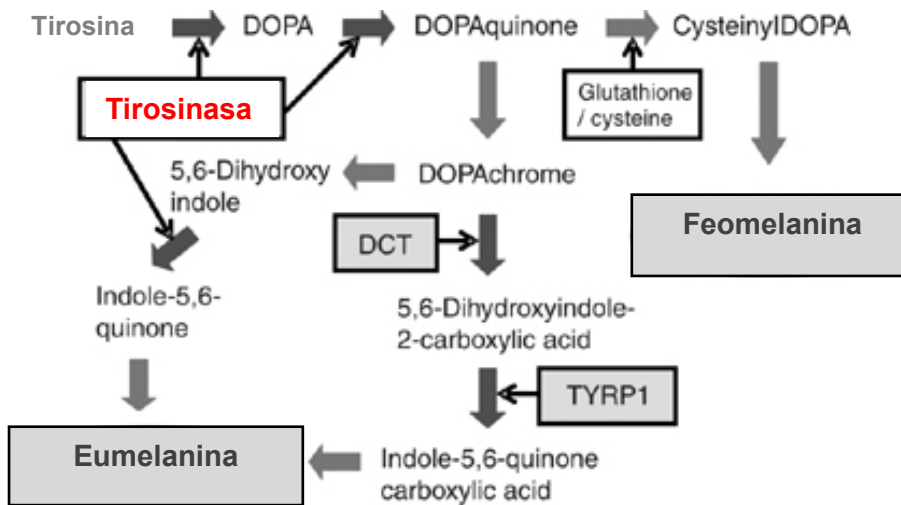


Figura 2. Ruta de síntesis de melanina en mamíferos (Ando et al. 2007).

Cada prolongación del melanocito se alarga y recibe más melanosomas que son transferidos constantemente hacia los queratinositos. Dentro de las células del estrato intermedio, los melanosomas se transportan a la región supranuclear, de tal manera que forman una barrera protectora entre el núcleo y los rayos UV (Pathak, 1996).

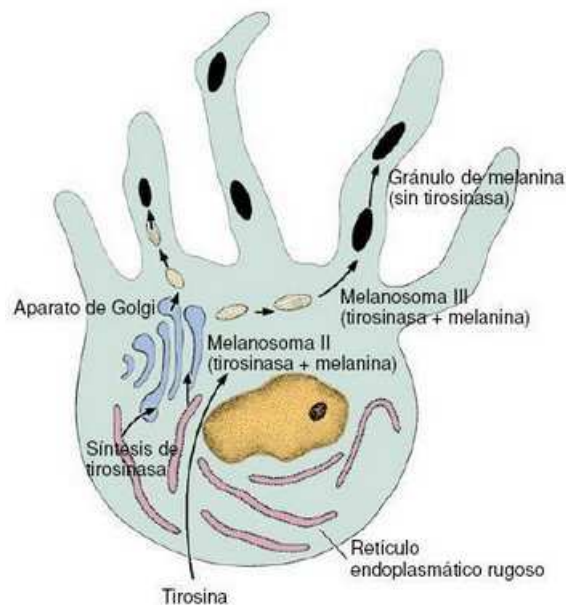


Figura 3. Esquema de un melanocito, la melanina se sintetiza en los melanosomas, que son transportados a la zona apical de las proyecciones dendríticas para ser transferidos a los queratinocitos (Honeyman, 2002).

En el caso de los peces las células pigmentarias primero se diferencian en el embrión como cromatoblastos (melanoblastos, xantoblastos, iridoforoblastos), estos migran hacia la dermis del organismo y se diferencian en cromatóforos. Como se mencionó previamente existen 3 tipos principales de cromatóforos, los melanóforos en donde se sintetiza la melanina, xantóforos que son los pigmentos formados a partir de carotenoides e iridóforos y leucóforos formados a partir de cristales de guanina. Los organelos especializados en donde se sintetiza el pigmento en cada una de estas células son el melanosoma, xantosoma y leucosoma respectivamente (Fujii, 2000).

A diferencia de los melanocitos de los mamíferos, en los melanóforos el pigmento se sintetiza dentro de la célula y no se transfiere a otras células especializadas como los queratinocitos. La melanina sintetizada en el melanosoma permanece en el cromatóforo y el color de la célula depende de la movilización intracelular del pigmento. Esta movilización se basa en la agregación y dispersión del pigmento a través del citoplasma (Fujii 2000). Cuando el pigmento se dispersa, el pez tiene una apariencia más colorida, mientras que cuando éste se agrega, los cromatóforos se ven como pequeños puntos de color (Figura 4).

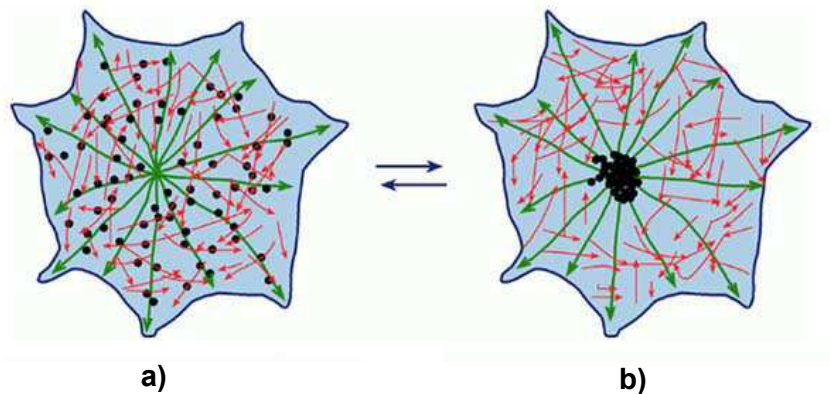


Figura 4. Esquema de un melanóforo a) con pigmento disperso en el citoplasma celular y b) con el pigmento contraído en el melanosoma.

Una hipótesis ampliamente aceptada acerca de los mecanismos de movilidad del pigmento menciona que los microtúbulos que van del centro hacia la periferia en la célula pigmentaria tienen una función activa en la movilidad del cromatosoma. La

fuerza entre la superficie del cromatóforo y los microtúbulos producen el movimiento del cromosoma en dirección centrípeta o centrífuga. Al parecer un grupo de proteínas motoras están encargadas de la translocación del pigmento (Fujii, 1993). Los cambios de color asociados con la movilidad de los cromatóforos son llamados cambios fisiológicos de color, están controlados principalmente por el sistema nervioso y/o el sistema endocrino; estos cambios son rápidos y están relacionados con las adaptaciones cromáticas del pez (Fujii, 1993). En el proceso de pigmentación intervienen diversos factores (ambientales y nutricionales) que pueden afectar desde la migración de las células pigmentarias hasta la síntesis de melanina en los melanóforos. Para poder entender el proceso de pigmentación en el lenguado de California es necesario tomar como referencia los estudios realizados en peces que se han utilizado como modelos, así como la información de trabajos en mamíferos.

El presente trabajo tiene como objetivo conocer el desarrollo de la pigmentación del Lenguado de California desde la etapa larval hasta el estado adulto e indagar sobre los efectos de los ácidos grasos y la luz UV en la sobrevivencia, el crecimiento, el éxito en el destete y la pigmentación. Así como cuantificar la actividad de la enzima tirosinasa de la piel de los peces con el fin de conocer su relación con los problemas de pigmentación anormal.

Capítulo II

Desarrollo de la pigmentación del lenguado de California

Resumen

En los peces planos la pigmentación se desarrolla en dos etapas, la primera está determinada por la presencia de melanóforos larvales que están presentes desde la etapa embrionaria; la segunda se lleva a cabo durante la metamorfosis, las células larvales son sustituidas por melanóforos adultos y estos determinan la pigmentación definitiva del organismo. En algunas especies este proceso es definitivo y la pigmentación es irreversible. Con el fin de conocer el desarrollo de la pigmentación del lenguado de California, se realizaron observaciones en larvas y juveniles de 0 a 50 días después de la eclosión (dde), cultivados en un sistema de recirculación y alimentados con alimento vivo enriquecido con ácidos grasos esenciales. Se observaron las características pigmentarias y se hizo un registro fotográfico de la presencia de melanóforos larvales y adultos *in vivo*. Se observó que en el lenguado de California el desarrollo pigmentario es similar al de otras especies de peces planos, sin embargo, en esta especie la definición del patrón definitivo de pigmentación puede determinarse hasta después de la metamorfosis (75 dde). Además se observó que el problema de pigmentación se da a dos niveles, durante el desarrollo y migración de células pigmentarias y por anomalías en la síntesis del pigmento en células diferenciadas. Adicionalmente el análisis histológico de la dermis en una muestra de juveniles pseudoalbinos permitió identificar melanóforos en la piel del lado oculado. Esta característica sugiere que en el lenguado de California con problemas de pigmentación, los melanóforos migran y se diferencian correctamente, pero el mecanismo de síntesis de melanina está interrumpido.

II.1 Introducción

Los mecanismos responsables del color en los peces, son similares a la de los vertebrados terrestres. La coloración de la piel es producto de la absorción y reflexión de la luz en ciertas longitudes de onda. Las células especializadas llamadas cromatóforos contienen los pigmentos que absorben la luz a través de pequeñas estructuras llamadas cromatosomas, las cuales tienen índices de refracción diferentes a los del medio circundante (Fujii, 1993). De acuerdo al color del pigmento que contienen, los cromatóforos de los peces se clasifican en: melanóforos (negros o café), xantóforos (amarillos), leucóforos (blancos) e iridóforos (reflejantes) (Fujii, 1969). Estas células se originan en la cresta neural del embrión y migran durante la ontogenia temprana a diferentes regiones del organismo (Fujii, 1969, Baganara et al. 1979).

Las células que contienen melanina son las células pigmentarias más estudiadas tanto en peces como en mamíferos. La melanina es el pigmento que se concentra en los melanóforos, es un pigmento negro o café que se encuentra en una gran variedad de especies de peces. Es un compuesto altamente polimerizado derivado de la tirosina. La síntesis de la melanina en los mamíferos se lleva a cabo primero por la oxidación de la tirosina a 3,4-dihydroxyphenylalanina (Dopa), la cual pasa a Dopa quinona y posteriormente a CisteinilDopa para formar feomelanina que produce un pigmento café claro o rojizo, en la ruta alterna de Dopa quinona se sintetiza Dopacromo y la ruta sigue para formar eumelanina que es el pigmento negro (Figura 2). La enzima limitante en esta reacción es la tirosinasa, la cual interviene en 3 de las reacciones de la ruta de síntesis de melanina. En el caso de los peces, mediante la ruta de síntesis de melanina se forma un solo tipo de pigmento y el proceso se lleva a cabo dentro del melanóforo (Fujii, 1969).

En los peces planos como el lenguado de California, las células pigmentarias aparecen primero como cromatoblastos larvales. Estas células dan origen a los melanóforos larvales, que son las primeras células pigmentarias que se desarrollan, posteriormente aparecen los xantóforos e iridóforos. Los melanóforos adultos comienzan a diferenciarse durante la metamorfosis cuando los melanóforos larvales aún están presentes y se pueden distinguir fácilmente por el tamaño. Los melanóforos larvales miden de 70 a 100 μm de diámetro, mientras que los

melanóforos adultos son mucho más pequeños, entre 20 y 50 μm (Seikai et al. 1987).

Las células pigmentarias larvales se pueden observar simétricamente en ambos lados del cuerpo y las células adultas se desarrollan predominantemente en el lado oculado del pez (Bolker y Hill, 2000).

II.2 Antecedentes

Entre los peces planos la especie más estudiada con respecto a la pigmentación es el lenguado japonés (*P. olivaceus*) (Seikai et al. 1987). Sin embargo, se ha generalizado el hecho de que en los peces planos el patrón pigmentario puede cambiar relativamente rápido en respuesta al ambiente y de forma más lenta durante el curso de la ontogenia (Bolker y Hills, 2000). Estos peces tienen la capacidad de ajustar la coloración del lado oculado para mimetizarse con el sustrato (Burton y O Driscoll, 1992). Esta capacidad se basa en la respuesta de los cromatóforos mediada por neurotransmisores y hormonas que son inducidas por señales físicas como la luz, que permiten cambios directamente en los cromatóforos. Estos ajustes citológicos afectan la concentración de los gránulos de pigmento en diferentes áreas de la piel, en un proceso dinámico y reversible (Fujji, 1993). Según el modelo propuesto por Fujji (2000) en donde se evidencian los diferentes sistemas involucrados en la movilización del pigmento dentro de los cromatóforos, las hormonas, el efecto directo de la luz y los neurotransmisores son los reguladores de la pigmentación, siempre y cuando el pigmento esté presente en la célula pigmentaria.

En contraste, la diferenciación y desaparición de los cromatoblastos dependen de los cambios que se registran durante la ontogenia pigmentaria de los peces planos y generalmente no son reversibles (Bolker y Hills, 2000). Los cambios pigmentarios dependen de un desarrollo ontogénico adecuado, por lo que si las células pigmentarias no migran y se diferencian adecuadamente, el color estará ausente (Bolker y Hills, 2000).

El patrón de pigmentación de los peces adultos, se desarrolla durante la metamorfosis como resultado de la migración de células diferenciadas desde la cresta neural hasta la dermis del organismo (Seikai et al. 1987) o de la diferenciación

de precursores de células que ya se encuentran en la piel (Seikai et al. 1987). En el lenguado japonés (*P. olivaceus*) el color blanco en el lado ciego, se debe a una reducción de la actividad de la tirosinasa y reabsorción de los melanóforos larvales, que además no son reemplazados por melanóforos adultos. Las células pigmentarias que quedan se diferencian en iridóforos que dan una coloración blanca al lado ciego del pez (Seikai y Matsumoto, 1994).

Existen diferencias en cuanto al desarrollo del patrón pigmentario entre las diferentes especies de peces planos. En la platija diamante (*Hypsopsetta guttulata*), los melanocitos adultos aparecen primero en la superficie dorsal y dorso lateral del cuerpo y la región caudal y al final se pigmenta la cabeza (Orton, 1953). En el lenguado japonés (*P. olivaceus*) las células pigmentarias aparecen primero en la zona dorsal del lado oculado y después en el resto del cuerpo (Seikai et al. 1987). En el caso de fletan negro (*Reinhardtius hippoglossoides*) primero se pigmentan de forma muy oscura ambos lados del cuerpo y después de una temporada corta, se pierde la pigmentación de lado ciego (Norman, 1934).

Existen diversos patrones pigmentarios sin embargo, en los análisis histológicos se ha observado que los problemas pigmentarios de los peces planos son similares (Seikai et al. 1987; Seikai y Matsumoto, 1994). En el lenguado Japonés (*P. olivaceus*) y el lenguado de invierno (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum), la piel del lado oculado de los peces pseudoalbinos es similar a la piel del lado ciego de un pez normal. Mientras que en los peces con lado ciego pigmentado, las características celulares son similares a las del lado oculado de un pez bien pigmentado. Estas observaciones sugieren que los defectos de pigmentación en estas especies pueden estar relacionados con defectos en la señalización de los mecanismos directamente involucrados en la diferenciación de los cromatóforos (Seikai y Matsumoto, 1994) lo que sugiere que la génesis de estas anomalías se registran durante la ontogenia.

En este capítulo se estudió la ontogenia del patrón de pigmentación del lenguado de California bajo condiciones de cultivo, con el fin de conocer el periodo de sustitución de los melanóforos larvales por melanóforos adultos y conocer en que etapas del desarrollo comienzan los problemas de pigmentación anormal. Además esta información se tomó como base para comparar los problemas de pigmentación de *P.*

californicus con los observados en otras especies de peces planos, en las cuales se han realizado más estudios para conocer el origen de la pigmentación anormal.

II.3 Objetivo general

Describir la ontogenia pigmentaria de *P. californicus* desde la eclosión y hasta la etapa juvenil (75 días después de la eclosión).

II.3.1 Objetivos Particulares

- Analizar cualitativamente por medio de observaciones *in vivo* y fotográficas, el desarrollo de las células pigmentarias larvales y juveniles en *P. californicus*, así como la definición del patrón final de pigmentación.
- Identificar por medio de histología la presencia de melanóforos en peces pseudoalbinos de *P. californicus*.

II.4 Materiales y Métodos

II.4.1 Cultivo larvario

Para estudiar las características pigmentarias del lenguado de California, se realizaron observaciones *in vivo* en organismos recién eclosionados 0 días después de la eclosión (dde) y durante el desarrollo larvario hasta los 75 dde. Para ello se obtuvieron huevos fértiles de *P. californicus* por medio de la reproducción en cautiverio de organismos adultos, sin manipulación hormonal. Los huevos fertilizados fueron donados por el laboratorio Hubbs-Sea World Research Institute (San Diego, CA.). El cultivo larvario se realizó en el Departamento de Acuicultura del CICESE; se utilizaron doce estanques de fibra de vidrio con fondo plano, de 200 L de capacidad conectados a un sistema de recirculación de agua marina. El sistema de recirculación suministraba agua de mar filtrada y tratada con UV y además pasada por filtros biológicos y un fraccionador de espuma. La temperatura del agua se mantuvo a 18 ± 1 °C, salinidad 34 ‰, oxígeno disuelto 8 mg L^{-1} y amonio <1.0

mg L⁻¹ N-NH₃, parámetros recomendados para el cultivo de esta especie (Gisbert et al. 2004). En cada tanque de cultivo se sembraron 1,200 larvas recién eclosionadas (6 larvas L⁻¹).

II. 4.2 Protocolo de Alimentación

Las larvas se alimentaron con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con Algamac 2000 (Bio Marine, Hawthorne, CA.) del día 3 al día 21 dde, se siguió la metodología propuesta por Zacarías-Soto et al. (2006). Desde el día 18 y hasta el día 50 dde las larvas se alimentaron con nauplios de *Artemia* enriquecidos con suplementos comerciales con DHA y ARA Aqua Grow®, Advanced BioNutrition (Maryland, USA). El protocolo de alimentación se realizó de forma similar al descrito por Zacarías-Soto et al. (2006). Se comenzó alimentando a las larvas con un nauplio de *Artemia* ml⁻¹ el día 18 dde y se incrementó el número hasta alcanzar 5 nauplios ml⁻¹, mientras que la ración de Rotíferos fue disminuyendo gradualmente por un periodo de 5 días; en este punto se suspendió el suministro de Rotíferos. Posteriormente el número de nauplios de *Artemia* se incrementó hasta llegar a 12 nauplios por ml en el día 50 dde. El destete comenzó el día 50 dde, fecha en la que se inició la alimentación con alimento balanceado B2 (360 - 620 µm) Otohime (Red Mariculture, Japón), a partir de este periodo se disminuyó gradualmente la ración de nauplios de *Artemia*, y se aumentó la ración de alimento balanceado hasta finalizar el destete el día 75 dde.

II. 4.3 Patrón pigmentario

Para caracterizar el desarrollo del patrón pigmentario de los organismos, se hicieron observaciones diarias y se tomaron fotografías de las larvas y juveniles utilizando un microscopio Olympus CKX41 (Pensilvania USA) equipado con una cámara Olympus C5060 (Pensilvania USA). A partir del día 15 dde debido al tamaño de las larvas se utilizó un microscopio estereoscópico Wild Heerbrug (MAX ERB Instrumental Company. USA).

Ya que en esta especie los melanóforos son las células predominantes en el patrón de pigmentación se hizo una estimación cualitativa, en donde se observó presencia y ausencia, así como el tamaño de los melanóforos larvales y adultos durante cada etapa de desarrollo. Durante la etapa premetamórfica se seleccionó un cuadrante de

1 x 1 mm en el costado de la larva, entre el opérculo y la aleta pectoral, después de la metamorfosis se seleccionó una sección del lado oculado, localizada entre la notocorda y la aleta pectoral. Este punto de observación se utilizó como referencia para todos los organismos analizados.

II. 4. 4 Histología

Para el análisis histológico se tomó una muestra de 15 juveniles pseudoalbinos de 50 dde. Se les removió la piel del lado oculado y el lado ciego, este tejido se fijó en una solución Bouin a temperatura ambiente durante 24h. Posteriormente el tejido se transfirió a una solución de alcohol al 70% para comenzar la deshidratación, la cual se llevó a cabo en un tren de concentraciones ascendentes (70 - 100%). Al final de este proceso el tejido deshidratado se incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor utilizando un microtomo de rotación (American optical, Minnesota USA). Se utilizó la técnica de tinción de Bielschowsky (Bancroft y Stevens, 1977), la cual utiliza plata para teñir las neurofibrillas de dendritas y axones. Para este estudio se utilizó esta técnica de tinción con el objetivo de teñir el citoesqueleto de las células nerviosas, técnica útil utilizada para este tipo de células debido al origen embrionario de los cromatóforos. Los cortes teñidos se analizaron en un microscopio Olympus CKX41 (Pensilvania USA), con diferentes aumentos. Para diferenciar los melanóforos larvales de los adultos en el tejido analizado se utilizó la clasificación de tamaño de las células pigmentarias descrita para el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*) por Bolker et al. (2005).

II.5 Resultados

II.5.1 Células pigmentarias en un pez pigmentado

Las células pigmentarias estuvieron presentes en los organismos desde antes de la eclosión, en esta etapa del desarrollo fue posible observar melanóforos y xantóforos distribuidos a lo largo de la notocorda de la larva y en el vitelo. A partir del día 1 dde, las observaciones se hicieron específicamente en torno a los melanóforos. Estas células al ser las sintetizadoras de melanina son las que definen en mayor grado el patrón de pigmentación de los organismos de esta especie (Figura 5).

A partir del día 1 dde y hasta el día 4 dde la población de melanóforos larvales se incrementó y estas células se hicieron más evidentes en la zona de la cabeza alrededor de la notocorda y en la zona caudal de la larva (Figura 5).

Del día 5 y hasta el día 11 dde los melanóforos larvales (70-90 μm) se distribuyeron de forma simétrica en ambos lados del cuerpo de la larva (Figura 6). En esta etapa los melanóforos mostraron el pigmento disperso en las ramificaciones de la célula por lo que cubrieron una mayor superficie de la epidermis de la larva. Así mismo, la zona abdominal comenzó a pigmentarse y en muchos casos se observaron melanóforos contraídos en forma de pequeños puntos negros. Del día 12 y hasta el día 18 dde los melanóforos larvales mantuvieron una distribución simétrica en ambos lados del cuerpo de la larva (Figura 7). En estos días comenzaron a desarrollarse los melanóforos adultos, la mayoría de estas células mostraron sus ramificaciones extendidas y fue fácil distinguirlas por ser más densas y más pequeñas (25 - 50 μm) que los melanóforos larvales. Los primeros melanóforos adultos se observaron en la cabeza y la zona abdominal de las larvas.

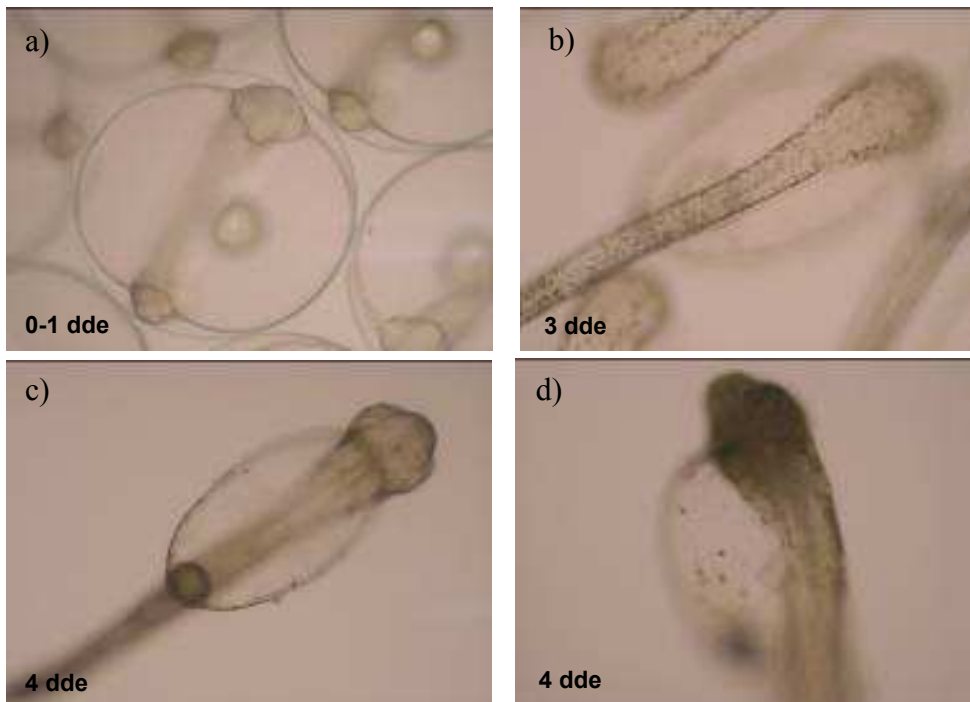


Figura 5. Desarrollo pigmentario del Lengua de California 1. a) huevos fertilizados con gota de aceite, b), c) y d) larvas de 3 y 4 dde con primeros melanóforos larvales, especialmente en el área de la cabeza y en el vitelo.

Entre los días 19 al 22 dde la población de melanóforos adultos se incrementó colonizando toda la superficie de la larva, en esta etapa las larvas estuvieron en proceso de metamorfosis y los melanóforos adultos se observaron en mayor proporción en las aletas pectorales y dorsales de las larvas (Figura 8). Los melanóforos larvales aún estuvieron presentes y resaltaron por su mayor tamaño, muchas de estas células permanecieron en el área de la cabeza y cubrieron la dermis abdominal que cubre al sistema digestivo.

Del día 23 al 26 dde durante el proceso de migración del ojo, los melanóforos larvales fueron más escasos. Los melanóforos adultos colonizaron todo el lado oculado del pez, sin embargo, el sistema digestivo aún era visible (Figura 8). Los melanóforos adultos al ser más densos que los larvales tuvieron una apariencia de estrella, en las larvas bien pigmentadas la población de estas células se incrementó y la larva dejó de verse transparente.

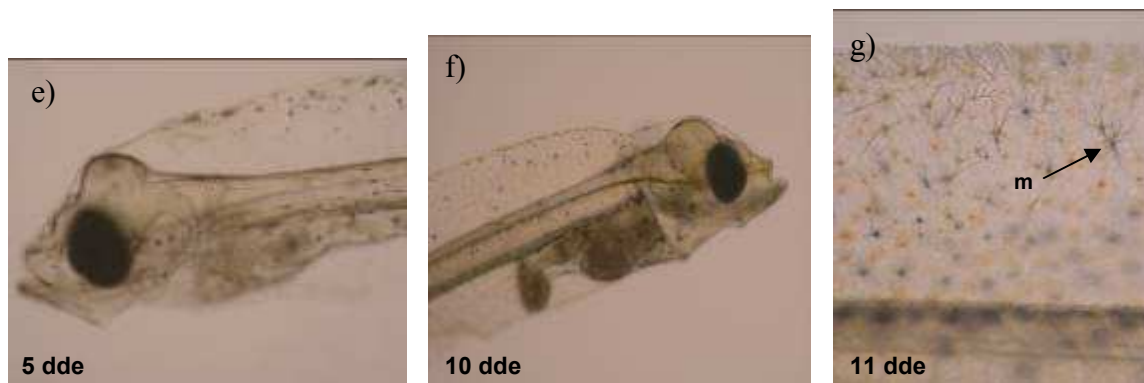


Figura 6. Desarrollo pigmentario del Lenguado de California 2. e) larvas de 5 dde con melanóforos más abundantes en la zona abdominal, f) larva de 10 dde con melanóforos que colonizan todo el cuerpo, g) se puede apreciar la densidad de los melanóforos (m), algunos con ramificaciones extendidas.

Del día 27 al 35 dde se observaron juveniles con todas las características de un pez adulto. Los melanóforos adultos cubrieron todo el lado oculado del organismo, en algunos casos fue posible observar melanóforos larvales pero para esta etapa la mayoría habían desaparecido (Figura 8).

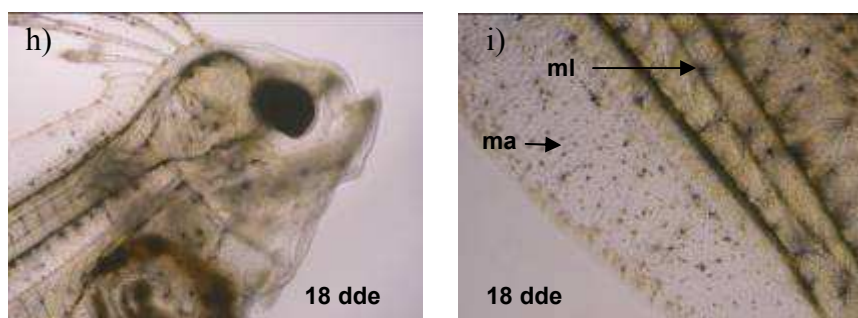


Figura 7. Desarrollo pigmentario del Lenguado de California 3. h) e i) larva al inicio de la metamorfosis, melanóforos que colonizan simétricamente a la larvas; ml: melanóforos larvales, ma: melanóforos adultos.

En el lado ciego se observaron algunos melanóforos contraídos y la coloración general del tejido fue transparente.

Entre los días 36 al 50 dde el lado oculado del pez se pigmentó totalmente por lo que ya no era posible observar la cavidad abdominal. Durante esta etapa todo el tegumento de lado oculado estuvo colonizado por melanóforos adultos y en ningún

caso se observaron melanóforos larvales. El lado ciego comenzó a adquirir una coloración blanca, sin embargo, no se analizaron los iridóforos que pudieran estar presentes en este tejido.

Del día 50 al 75 dde, los peces mostraron las características pigmentarias de un pez adulto.

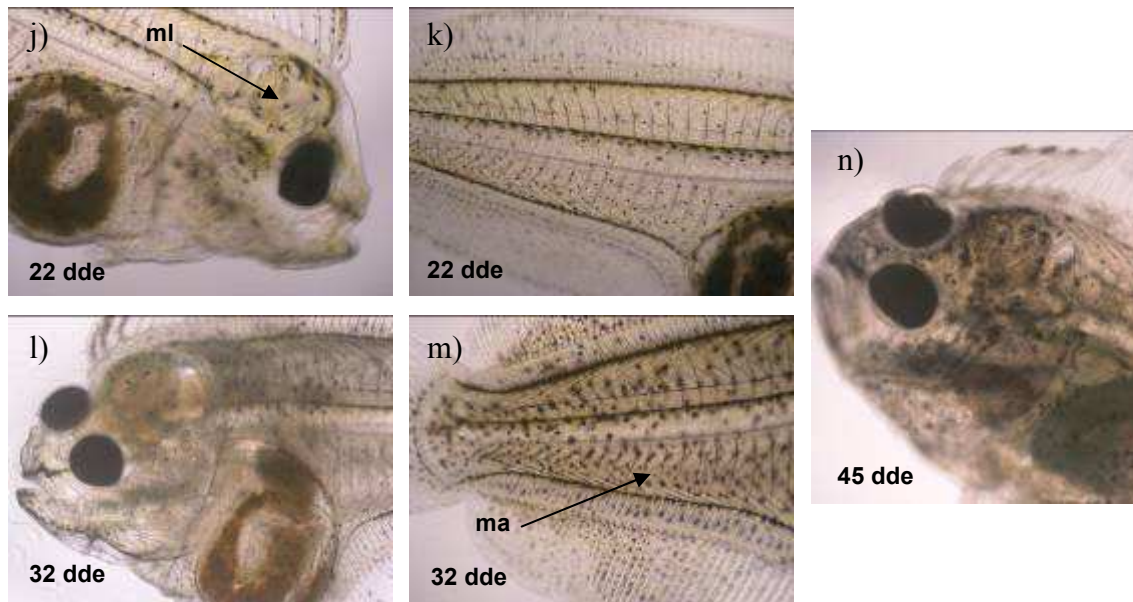


Figura 8. Desarrollo pigmentario del Lengüado de California 4. j) y k) larvas de 22 dde con melanóforos larvales y adultos, l) y m) larva al final de la metamorfosis con melanóforos que colonizan el lado oculado, se puede apreciar un patrón uniforme en la disposición de las células pigmentarias, n) juvenil temprano con el lado oculado totalmente pigmentado; ml: melanóforos larvales, ma: melanóforos adultos.

II.5.2 Melanóforos en peces Pseudoalbinos

Al analizar los cortes histológicos teñidos con nitrato de plata, se observó que en los peces pseudoalbinos de 50 dde había melanóforos (Figura 9). Se identificaron las células por sus características morfológicas y por su tamaño (38 μm) tomando la referencia de Bolker et al. (2005) para el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*).

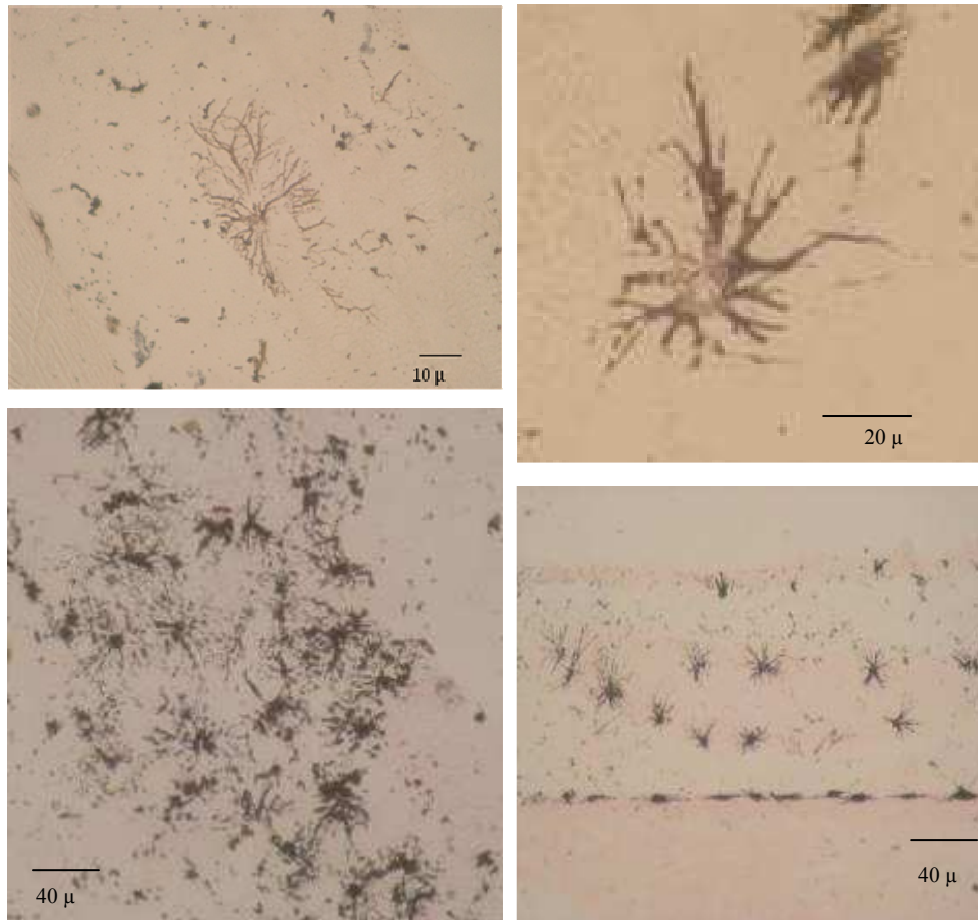


Figura 9. Cortes histológicos de piel de lenguado de California. a) Melanóforo de la piel de un juvenil pseudoalbino, b) otra vista de un melanóforo con ramificaciones extendidas en la piel de un juvenil pseudoalbino; c) y d) cortes longitudinales de la piel de lado oculado de un juvenil de lenguado de California, en dónde se observa una población de melanóforos. Tinción Bielschowsky.

II.6 Discusión

II. 6.1 Ontogenia pigmentaria

Fue posible identificar y distinguir los melanóforos larvales y adultos durante el desarrollo temprano del lenguado de California. Matsumoto y Seikai (1992) mencionan que las células pigmentarias del lenguado japonés (*P. olivaceus*) se desarrollan en dos etapas, los melanóforos larvales que se desarrollan desde la etapa embrionaria, cubren el cuerpo de la larva de forma simétrica y posteriormente, durante la metamorfosis los melanóforos adultos se distribuyen densamente en el lado oculado del pez. En el lenguado de California las primeras células pigmentarias estuvieron presentes desde la etapa de desarrollo embrionario. Después de la

eclosión los melanóforos larvales colonizan de forma simétrica toda la piel de la larva, comenzando por la cabeza y los costados de la notocorda, para posteriormente pigmentar la zona abdominal y caudal. Entre los días 12 y 18 dde se observaron los primeros melanóforos adultos. Estas células de menor tamaño se hicieron evidentes en todo el cuerpo de la larva, especialmente en el área de la cabeza, las aletas y el abdomen. Una vez que la larva finalizó la metamorfosis (27-30 dde) el lado oculado estuvo totalmente colonizado por melanóforos adultos, únicamente algunos melanóforos larvales estuvieron presentes. Seikai y colaboradores (1987) argumentan que durante la metamorfosis, en el lenguado japonés (*P. olivaceus*) hay una disminución en la síntesis de tirosinasa y los melanóforos larvales no son sustituidos por melanóforos adultos. Por esto es que existe un periodo en que larva durante la metamorfosis tiene un color transparente, para posteriormente retomar la pigmentación con los melanóforos adultos. En este estudio no se cuantificó la actividad de la enzima tirosinasa durante la metamorfosis, por lo que no se sabe si exista un cambio en la síntesis de melanina. Sin embargo, durante las diferentes etapas del desarrollo del lenguado de California se observó que entre los días 27 y 30 dde, el lado ciego cuenta con melanóforos, en los que el melanosoma está contraído, por lo que el tejido tiene una apariencia transparente con puntos difusos. Posteriormente alrededor del día 36 dde la coloración es blanca, posiblemente por el desarrollo de iridóforos.

Al término de la metamorfosis, se esperaría que la pigmentación del pez estuviera determinada únicamente por las células pigmentarias adultas, sin embargo, en un alto porcentaje de los peces analizados que no estaban bien pigmentados y que a simple vista se veían con manchas, los melanóforos larvales estuvieron presentes por más tiempo. En muchos casos, al analizar microscópicamente a los peces juveniles (75 dde o más) se observó que aun presentaban cromatóforos larvales, por lo que es posible que el desarrollo pigmentario tome más tiempo del que se ha documentado para otras especies de peces planos; o bien que este retraso esté relacionado con algún factor nutricional o ambiental particular de las condiciones de cultivo.

Benetti (1997) argumentó que los cambios en la ontogenia pigmentaria de los peces planos se basan en la diferenciación de los cromatoblastos y generalmente estos

cambios son irreversibles. Es por esto que en muchos estudios se menciona que los peces juveniles con una pigmentación defectuosa, no tienen la capacidad de retomar o desarrollar una pigmentación normal.

Es posible que el proceso de pigmentación del Lengudo de California no siga este patrón de diferenciación celular, ya que en el laboratorio se ha observado que los peces pseudoalbinos cambian su patrón pigmentario, aún después de la metamorfosis, cuando se esperaría que alcanzaran una coloración anormal definitiva. Esto ha llevado a pensar que al menos en el Lengudo de California, la pigmentación anormal se puede revertir, porque los cromatoblastos que aun se encuentran en la epidermis cuentan con la capacidad de formar células pigmentarias. Es posible que este proceso dependa de factores extrínsecos asociados a las condiciones de cultivo, por lo que tal vez la definición del patrón final de pigmentación toma más tiempo que el reportado para otras especies de peces planos.

El patrón de pigmentación del lengudo de California al igual que el de otros peces planos se define en dos niveles. En primer lugar están los mecanismos ligados a la diferenciación y la migración de las células pigmentarias (Seikai y Matsumoto, 1994); si durante el periodo posterior a la metamorfosis no se diferencian las células pigmentarias, el patrón de pigmentación estará ausente. La segunda parte del proceso es la movilización del pigmento ya existente en las células que como propone Fujji (2000) se relaciona con una serie de factores tanto internos como externos. Por ello los problemas asociados a la pigmentación anormal en los peces planos deben diagnosticarse en función de estos dos niveles; por un aparte los problemas asociados a la señalización para la diferenciación de melanóforos y la falta de funcionalidad de las células pigmentarias diferenciadas y por otro lado los problemas asociados con la movilización del pigmento aun cuando las células estén presentes y sean funcionales. Con las observaciones realizadas en el presente estudio se logró constatar que los peces con problemas de pigmentación anormal en el laboratorio, cuentan con anomalías en los mecanismos de desarrollo que permiten a las células sintetizar la melanina y que al cambiar las condiciones de cultivo, estos peces pueden restablecer el funcionamiento de los melanosomas y sintetizar el pigmento. Sin embargo, en la mayoría de los casos observados estos peces no

adquieren una pigmentación normal, pero sí se melanizan. En la mayoría de los casos los peces adquieren una coloración totalmente negra que cubre la mayor parte del lado ocular del pez y no logran obtener el patrón característico de la especie, con tonalidades grises y algunas parches claros simulando ocelos en el área caudal. Por otro lado están los peces pseudoalbinos que permanecen bajo esta condición indefinidamente, en los que no es posible reparar el funcionamiento de las células pigmentarias, aun cuando estas están presentes en el tegumento del pez.

II.6.2 Histología de la dermis en los peces pseudoalbinos

El hecho de encontrar melanóforos en la epidermis de los peces pseudoalbinos puede ser un indicador de que en estos peces los cromatoblastos se diferencian oportunamente, pero por alguna razón estas células no logran sintetizar melanina. Una hipótesis es que el lenguado de California cuenta con melanóforos adultos que se desarrollan al finalizar la metamorfosis, sin embargo, factores asociados a las condiciones de cultivos, como una alimentación subóptima (principalmente deficiencias en ácidos grasos esenciales), falta de luz natural, estrés por ruido o una deficiente calidad del agua; pueden afectar los mecanismos intracelulares reguladores de la síntesis de melanina, por lo que se produce la ausencia de color en la piel de los peces. Una vez que las condiciones estresantes desaparecen, los melanóforos recuperan su capacidad para sintetizar melanina y los peces se pigmentan.

El lenguado de California presenta un desarrollo pigmentario similar al de otros peces planos, sin embargo, bajo las condiciones en que se realizó el cultivo se pudo observar que en los peces con pigmentación anormal, los melanóforos larvales y adultos tienen diferentes tiempos de colonización y de desaparición de la piel, con respecto a los peces pigmentados. Esto sugiere que en esta especie, los peces que después de la metamorfosis tienen un patrón de manchas, presenta un retraso en la sustitución de melanóforos larvales por melanóforos adultos, lo que explicaría su capacidad para lograr una posterior pigmentación.

Por otro lado los peces pseudoalbinos que cuentan con melanóforos pero permanecen sin melanina indefinidamente, posiblemente tengan problemas asociados con deficiencias nutricionales que estén relacionados a la inhibición de

factores de crecimiento y rutas de señalización específicas que afecten directamente la viabilidad y normalidad de las células pigmentarias, como propone Hamre et al. (2007) para el lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).

Capítulo III

Efecto del DHA en el desarrollo y la pigmentación del lenguado de California

Resumen

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) es un buen candidato para la acuicultura debido a su rápido crecimiento y valor comercial. Uno de los principales problemas al cultivar esta especie, es el alto porcentaje de peces con pigmentación anormal (>80%); este problema parece estar relacionado entre otras cosas, con deficiencias nutricionales, particularmente con la cantidad y proporción de ácidos grasos insaturados (HUFAS) en la dieta. En este estudio se realizó una primera aproximación en determinar el requerimiento dietario de DHA en larvas y juveniles con el fin de incrementar el porcentaje de peces pigmentados, la sobrevivencia y el crecimiento antes y después del destete. Para ello se evaluaron los efectos de cuatro niveles dietarios de DHA (0, 5, 10, 15% de los TAG) administrados a las larvas de lenguado de California a través de metanauplios de *Artemia* enriquecida. Se tomaron mediciones de la longitud estándar y peso húmedo durante el periodo de alimentación con *Artemia* (18 días después de la eclosión, dde), al principio del destete (50 dde) y al final del experimento (75 dd). El mayor porcentaje de peces pigmentados (33%) se obtuvo con el tratamiento alto de DHA que fue significativamente diferente a los demás tratamientos al día 75 dde, mientras que el menor porcentaje fue el nivel bajo con (5%). El tratamiento de DHA alto mostró a su vez el mayor porcentaje de sobrevivencia (39.8%) y el mayor crecimiento. Por medio de una regresión polinomial de segundo orden se determinó que el nivel de DHA recomendado para la dieta pre metamórfica es del 1.2% de DHA del TAG y para lograr un mayor porcentaje de peces pigmentados y sobrevivencia al día 75 dde, el nivel recomendado es de 2.4% de DHA de los TAG.

III.1 Introducción

El lenguado de California es una especie nueva para la acuicultura y posee un elevado valor comercial así como rápido crecimiento (Gisbert et al. 2004). Al igual que otras especies de peces planos, existen diferentes problemas durante el cultivo larvario. Estos problemas están relacionados con deformidades óseas, migración inadecuada del ojo (Harboe y Adoff, 2005) y pigmentación anormal (Bolker y Hills, 2000). Se ha hecho mucho énfasis en la importancia de la composición de los ácidos grasos en la dieta y su efecto sobre el desarrollo de los organismos, los estudios se han centrado en la evaluación de los niveles del ácido docosaenoico (DHA, 22:6n-3) y la relación entre DHA y ácido ecosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (Villata et al. 2005 a,b,c). Recientemente se ha puesto más atención a la función del ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) por ser un ácido graso esencial para los vertebrados (Hamre et al. 2007).

En las larvas de algunos peces planos como *Solea senegalensis*, los altos niveles de ARA afectan el desarrollo de los eventos metamórficos, tales como la migración del ojo y la pigmentación. Esto sugiere que el ARA y sus derivados pueden afectar directamente los procesos metamórficos en los peces planos, sin embargo el proceso bioquímico aún no está bien entendido (Villalta et al. 2005 a).

El problema de pigmentación anormal es común en la mayoría de las especies de peces planos que se cultivan, lo que afecta la rentabilidad debido a que los peces con un patrón anormal de pigmentación pierden valor comercial (Seikai, 1991).

Seikai et al. (1987) sugieren que la deficiencia de ácidos grasos en el alimento vivo, durante las etapas tempranas de desarrollo de los peces, pueden interferir con el desarrollo de los melanóforos adultos, posiblemente debido a que estas deficiencias modifican el ambiente celular. Posteriormente Matsumoto y Seikai (1992) propusieron la hipótesis de que las anomalías en la pigmentación son el resultado de fallas en los mecanismos responsables de la estructura asimétrica de la piel y que esto podría deberse a un bloqueo de la diferenciación de las células germinales que dan origen a las células pigmentarias en la formación de los melanóforos adultos.

Otra hipótesis, propuesta por Kanasawa (1993) sugiere que los peces mal pigmentados tienen deteriorado el sistema visual y que las deficiencias nutricionales

pueden interrumpir la estimulación del sistema nervioso. Esto podría relacionarse con una baja producción de la hormona estimuladora de la melanina (MSH por sus siglas en inglés), la cual es necesaria para la síntesis de melanina y la movilización del pigmento dentro de la célula. En el mismo estudio se observó que al alimentar al lenguado japonés con dietas formuladas con niveles suficientes de fosfolípidos, vitamina A y DHA, se estimulaba el desarrollo de la pigmentación normal.

III.2 Antecedentes

La mayoría de los estudios relacionados con la nutrición de las larvas en etapas tempranas se han centrado en dos tipos de nutrientes: la vitamina A y sus precursores (Ronnestad et al. 1998) y en los ácidos grasos, particularmente el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Izquierdo et al. 1992; Estévez y Kanasawa, 1995).

Los ácidos grasos juegan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso. El DHA se requiere en la dieta para asegurar el desarrollo del tejido nervioso y la visión (Koven, 2003). Algunos estudios sugieren que la relación de DHA y EPA es el factor clave para lograr un buen desarrollo de las larvas, mientras que otros indican que resulta más importante el nivel absoluto de cada uno de los compuestos (Sargent et al. 1997; Naess y Lie, 1998). Otros han encontrado una ligera pero significativa mejoría en la pigmentación de *Solea senegalensis* al otorgar dietas con diferentes relaciones de EPA:ARA (Villalta et al. 2005b). En estudios con diferentes niveles de ARA administrados a larvas de *Paralichthys olivaceus* se ha encontrado que este ácido graso tiene un efecto en el patrón final de pigmentación de los peces, sin embargo, aún no se evidencia como interactúa en el desarrollo del organismo. Una hipótesis, tiene que ver con la formación de prostaglandinas y leucotrienos sintetizados a partir de ARA, sin embargo su papel aún no es claro (Estéves et al. 2001).

En contraste Villalta y colaboradores (2008) mencionan que observaron diferencias en la pigmentación y en el crecimiento en larvas de *S. senegalensis* al alimentarlas con 4 tratamientos con diferentes niveles de ácidos grasos. Las larvas alimentadas con la dieta sin ARA crecieron menos y un mayor número desarrollaron una buena

pigmentación, en contraste con las dietas con altos niveles de ARA las larvas crecieron más, pero el porcentaje de larvas bien pigmentadas fue menor. Estos autores sugieren que el exceso de ARA induce pseudoalbinismo.

En los peces planos la composición de los fosfoglicéridos en el cerebro es más susceptible a los cambios de ARA en la dieta en comparación con cualquier otro tejido. En este sentido, Estévez y colaboradores (1999) mencionan que el desbalance de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) durante el desarrollo larval puede tener serios efectos en la formación del cerebro, tales como problemas en la diferenciación y en el funcionamiento del sistema neuroendocrino y en el sistema nervioso central, lo que conlleva al desarrollo de problemas en el sistema visual y la pigmentación del pez.

Por otro lado, los eicosanoides derivados de ARA y EPA pueden ser ligandos de receptores de activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARS). Estos receptores nucleares están involucrados en la transcripción de diversos genes (Hamre et al. 2007). Es posible que en los peces planos la proporción de eicosanoides en la dieta, tenga un efecto sobre la expresión de genes tales como el gen (Tyr) que codifica la enzima tirosinasa. En mamíferos se han documentado que estos factores de transcripción tiene un efecto en la degradación de la tirosinasa, mediante el proceso de ubiquitinación por medio del cual la tirosinasa se degrada en los proteosomas del melanocitos (Ando, et al. 2006). Dada la importancia de la tirosinasa en la producción de melanina este proceso puede a su vez estar relacionado con el desarrollo del patrón pigmentario de los peces planos.

Esta es una de las causas del porque es tan importante mantener un equilibrio en la síntesis de eicosanoides. La síntesis de eicosanoides así como la proporción entre los dos grupos (derivados de ARA o EPA), depende de la cantidad de sustrato (i.e., compiten en la misma ruta enzimática) y del aporte dietario de los dos ácidos grasos a través de la dieta (Estévez et al. 2001).

A pesar de los avances en el conocimiento de la función de los ácidos grasos y de las nuevas hipótesis relacionadas con las anomalías pigmentarias de los peces planos, el problema sigue presente. Aún no se han determinado con exactitud cuáles son los niveles adecuados de nutrientes y de sus múltiples mecanismos de acción

en el desarrollo de las larvas (Sargent et al. 1999). En este capítulo se describen algunos efectos del DHA en el desarrollo del lenguado de California.

III.3 Hipótesis

La administración de ácido docosahexaenoico (DHA) a través de alimento vivo enriquecido (i.e *Artemia*), durante los estadios de desarrollo tempranos de *P. californicus* aumentará la sobrevivencia, el crecimiento e incrementará significativamente el porcentaje de juveniles con pigmentación normal.

III.4 Objetivo general

Evaluar el efecto de cuatro niveles de DHA en las larvas de *P. californicus* y su relación con el sistema pigmentario.

III.4.1 Objetivo particular

- Evaluar el efecto de cuatro niveles de DHA (0, 5, 10 y 15% del total de ácidos grasos de alimento enriquecido) sobre el sistema pigmentario, el éxito en el destete, el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas de *P. californicus*.

III.5 Materiales y Métodos

III.5.1 Cultivo larvario

Los bioensayos se realizaron en el Departamento de Acuicultura del CICESE, a partir de huevos fértiles de *Paralichthys californicus* por medio de la reproducción en cautiverio de organismos adultos, sin manipulación hormonal. Los huevos fueron donados por el laboratorio Hubbs-Sea World Research Institute (San Diego, CA.). Los huevos se incubaron hasta la eclosión y a partir del día 3 después de la eclosión (dde) y hasta el día 18 dde se alimentaron con rotíferos enriquecidos con *Algamac 2000* (BioMarine, Hawthorne, Ca), se siguió el protocolo de alimentación propuesto por Zacarías-Soto, et al. 2006.

A partir del día 18 y hasta el día 50 de las larvas se alimentaron con metanauplios de *Artemia* enriquecida con los cuatro niveles experimentales de DHA. El día 50 comenzó el destete y los metanauplios fueron sustituidos gradualmente por alimento balanceado Otohime B1 (Japón). El cultivo larvario se realizó utilizando doce estanques de 200 L conectados a un sistema de recirculación suministrados con agua de mar filtrada y tratada con UV, los cuales contaron con filtros biológicos y un fraccionador de espuma (Figura 10), la temperatura del agua del cultivo, se mantuvo en 18 ± 1 °C, la salinidad 34 ‰, el oxígeno disuelto 8 mg L^{-1} y el amonio $<1.0 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$. Se utilizaron 1,200 larvas por estanque (6 larvas L^{-1}) y se contó con tres repeticiones para cada tratamiento.

III.5. 2 Enriquecimiento de rotíferos

Para el enriquecimiento de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*), se utilizaron columnas de 200 litros con agua de mar filtrada y se mantuvo una temperatura de 26°C con una salinidad de 32‰. La densidad de rotíferos durante el enriquecimiento no excedió los 500,000 organismos por L de agua. Los rotíferos se alimentaron constantemente con *Nannochloropsis sp.* (Instant Algae ®; Campbell, Ca) por medio de una bomba peristáltica conectada al tanque. La densidad de las microalgas se mantuvo cerca de $35 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$.

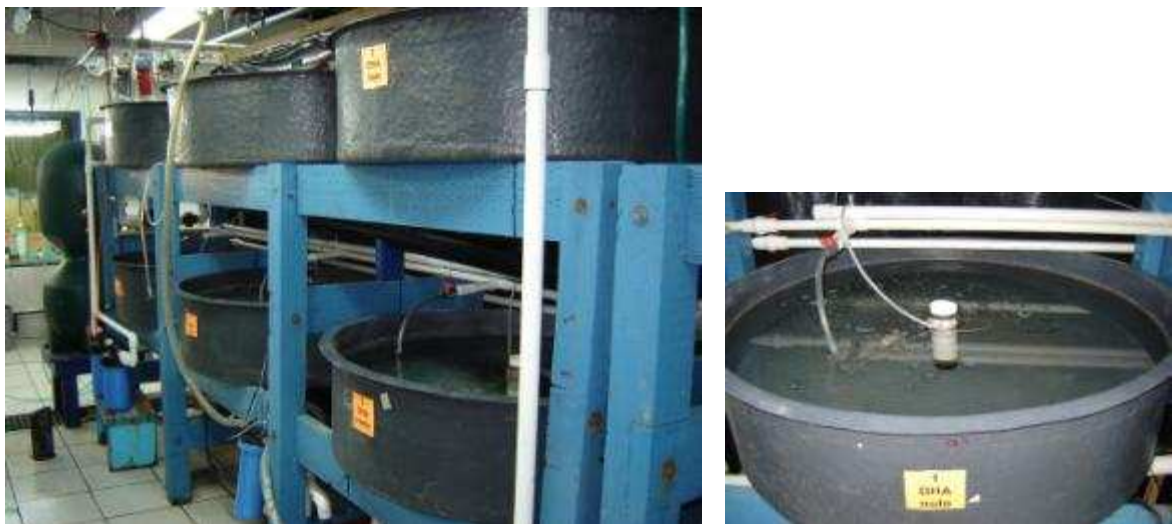


Figura 10. Sistema de cultivo en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE.

Se utilizó el enriquecedor comercial Algamac 2000 (BloMarine, Hawthorne Ca) en una proporción de 300 mg de producto por 1 millón de rotíferos, según el protocolo recomendado por el productor. El enriquecimiento fue por 12 hrs, durante este tiempo se mantuvo aireación constante.

III.5.3 Enriquecimiento de *Artemia*

Para el cultivo de los metanauplios de *Artemia* se utilizaron garrafones de 20 L con agua de mar filtrada por UV, se mantuvieron con aireación constante y luz fluorescente. Se utilizaron quistes de *Artemia* (Salt Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA.) los cuales se hidrataron por una hora en agua dulce y posteriormente se desinfectaron y descapsularon en una solución de agua dulce y cloro comercial, en una proporción de 1:1. Una vez que los nauplios eclosionaron, estos se lavaron con agua filtrada e irradiada con luz UV y se llevó a cabo el enriquecimiento en agua marina filtrada a 25°C con aireación continua siguiendo el procedimiento propuesto por Sorgeloos et al. (1986). Se prepararon cuatro emulsiones con niveles ascendentes de DHA, el nivel Nulo (0% de DHA del Total de Ácidos Grasos TAG), Bajo (5% del TAG), Medio (10% del TAG) y Alto (15% del TAG). Se utilizaron enriquecedores comerciales Spray-dried Gold Fat, Aqua Grow DHA®, Advanced BioNutrition (Maryland, USA) con 42.8% DHA of TAG (15% DHA por peso), compuesto principalmente por fosfolípidos de biomasa de microalgas. Adicionalmente se utilizó ARA Aqua Grow®, Advanced BioNutrition (Maryland, USA), con 37.6% de ARA, (12% ARA por peso). Este último producto se utilizó con el fin de alcanzar un 5% de ARA del TAG y proveer de este ácido graso esencial para las larvas de peces marinos a los cuatro niveles de enriquecimiento y mantener un mínimo nivel de fluctuación entre ellos (Villalta et al. 2005). No se adicionó EPA a las emulsiones debido a que los nauplios de *Artemia* cuentan de manera natural con suficiente cantidad de este ácido graso esencial (Hamre et al. 2002). Las emulsiones de los cuatro niveles de DHA, se prepararon homogeneizando vigorosamente las cantidades de DHA y ARA (ABN) correspondientes para cada nivel de enriquecimiento, con 10 volúmenes agua de mar filtrada, durante 2 minutos, siguiente los propuesto por Harel et al. (2002) y las recomendaciones de ABN (54 Maryland, USA). Cada tratamiento se hizo por triplicado.

III.5.4 Protocolo de alimentación

Las larvas se alimentaron con rotíferos enriquecidos (*Brachionus plicatilis*) del día 3 al día 21 dde, se siguió la metodología propuesta por Zacarías-Soto et al. (2006). El experimento de alimentación con *Artemia* enriquecida se llevó a cabo a partir del día 18 y hasta el día 50 dde, fecha en que se inició el destete.

El protocolo de alimentación se realizó de forma similar al descrito por Zacarías-Soto et al. (2006). Se comenzó alimentando a las larvas con un metanauplio de *Artemia* ml^{-1} el día 18 dde y subsecuentemente se incrementó el número hasta alcanzar 5 metanauplios ml^{-1} , mientras que la ración de rotíferos fue disminuyendo gradualmente por un periodo de 5 días. Posterior a esto se suspendió el suministro de rotíferos y el número de metanauplios de *Artemia* se incrementó hasta llegar a 12 nauplio ml^{-1} en el día 50 dde. El destete comenzó el día 50 dde y en esta fecha se inició la alimentación con alimento balanceado B2 (360 - 620 μm) Otohime (Japón). A partir de este periodo se disminuyó gradualmente la ración de metanauplios de *Artemia*, y se aumentó la ración de alimento balanceado hasta finalizar el destete el día 75 dde.

III.5.5 Toma de muestras

Se tomaron muestras de 30 organismos de cada uno de los tratamientos durante los días 50 y 75 dde. Los peces se anestesiaron con Tricaina metanosulfonato (MS 222, 0.1 g L^{-1} , Argent Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, U.S.A.) y se tomaron datos de la longitud estándar utilizando un microscopio estereoscópico Wild Heerbrug (MAX ERB Instrumental Company. USA). Se registró también el peso húmedo de los peces utilizando una balanza analítica (Precisa Instruments Ltd. Switzerland). Adicionalmente se tomaron muestras de metanauplios de *Artemia* enriquecida y larvas de 18 y 50 dde de los 12 tanques, las cuales se anestesiaron con MS222 y se sacrificaron por medio de congelación para su posterior análisis de ácidos grasos.

III.5.6 Patrón de pigmentación

Durante los días 50 y 75 dde todos los peces de los 12 tanques se clasificaron de acuerdo a su patrón de pigmentación. Debido a que los juveniles de lengudo de California son relativamente sedentarios, la clasificación de la pigmentación se realizó por medio de una observación visual dentro del tanque, no se sacrificó ningún juvenil para este análisis.

Los peces se clasificaron en tres categorías; A) pigmentado, cuando el lado oculado se encontró totalmente pigmentado, B) pseudoalbino o con hipomelanismo, cuando el pez mostró el lado oculado totalmente blanco y C) manchado, esta categoría incluye peces con casi todo el lado oculado pigmentado a excepción de parches sin melanina y peces con casi todo el lado oculado blanco y con manchas pigmentadas (Figura 11). No se presentaron casos de pigmentación del lado ciego (ambicoloración).



Figura 11. Patrones de pigmentación en juveniles de lengudo de California, a) pigmentado, b) pseudoalbino y c) con manchas.

III. 5.7 Análisis de Ácidos grasos

La extracción de lípidos en los juveniles (organismos completos) y los metanauplios de *Artemia* se realizó siguiendo la metodología propuesta por Folch et al. (1957). Las alícuotas de ácidos grasos totales se preservaron en una solución de cloroformo-metanol (2:1) en una atmósfera de nitrógeno y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis final. Los ésteres metilados de los ácidos grasos (FAMES) se prepararon siguiendo la metodología descrita por Metcalfe et al. (1966). Los FAMES se analizaron por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890II) utilizando un detector de flama ionizado (260°C), una columna capilar (Omegawax 320; 30 m x 0.32 mm, grosor de película de 0.25 µm, Supelco Inc., Park City PA, USA). La temperatura inicial fue de 140°C cinco minutos, después de la inyección de la

muestra la temperatura se incrementó a 240°C (4°C min⁻¹) y se mantuvo por 10 minutos. Los ácidos grasos se identificaron por comparación de los tiempos de retención y las áreas de dos estándares (37 Component FAME Mix, Supelco Inc.; GLC 87, Nu-Chek Prep, Park City PA, USA and PUFA1 and PUFA3, Supelco Inc.). La concentración de ácidos grasos se calculó utilizando el programa del equipo (HP ChemStation rev. A.06 for Windows).

III.5.8 Tasa de crecimiento específica.

Se estimó la tasa de crecimiento específica (TCE) de los organismo del día 0 al 18 dde, del 18 a 50 dde, del 50 a 75 dde y durante los periodos de 0 a 50 dde y del 0 a 75 dde con el fin de conocer la tasa de crecimiento antes y después de la metamorfosis y antes y después del destete. Se utilizó la metodología de Ricker (1979); con la fórmula:

$$TCE(\% \text{ dia}) = (\ln X_f - \ln X_i) / X_i (t_f - t_i) * 100$$

En donde $\ln X_f$ corresponde al logaritmo natural de la talla final, $\ln X_i$ al logaritmo natural de la talla inicial, X_i corresponde a la talla inicial, t_f al tiempo final y t_i al tiempo inicial.

III.5.9 Estadística

La variación de los datos se presentó en desviaciones estándar de la media de dos repeticiones en el perfil de ácidos grasos, y tres repeticiones para los análisis de clasificación de color, sobrevivencia y crecimiento. La diferencias entre las medias se analizó con una significancia estadística ($P \leq 0.05$) por medio de una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba a posteriori de Tuckey. Previo al análisis estadístico, los datos de porcentajes se transformaron con la función de arcoseno. Se utilizaron regresiones lineales y polinomiales con el fin de identificar las relaciones entre la dieta y los diferentes parámetros. Se estimó el requerimiento de DHA para los juveniles de 50 y 75 dde utilizando un modelo polinomial de segundo

orden (Stickney, 2000). Se utilizó el paquete Statistica 6 (Stat.Soft. Inc. OK, USA) para todos los análisis.

III.6 Resultados

III.6.1 Crecimiento, sobrevivencia y éxito en el destete.

El nivel alto de DHA promovió el mayor porcentaje de sobrevivencia a los 50 dde y a los 75 dde, con valores de $56.9 \pm 8.1\%$ y $39.8 \pm 6.7\%$ respectivamente. El menor porcentaje de sobrevivencia se obtuvo en las larvas alimentadas con el nivel de DHA Nulo con un porcentaje de $47.2 \pm 3.01\%$ al 50 dde y $9.7 \pm 9.9\%$ a los 75 dde (Tabla I). No se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia entre los tratamientos al día 50 dde, ni al final de experimento (75 dde). A los 75 dde los peces alimentados con los niveles de DHA alto y medio alcanzaron el mayor crecimiento en talla y peso. El crecimiento final fue más de dos veces mayor en las larvas que se alimentaron con 10% o más DHA en la emulsión de enriquecimiento, comparado con las que se alimentaron con 0% de DHA. Al final del experimento los peces alimentados con el nivel nulo de DHA mostraron ser significativamente menores en peso y talla (106.4 ± 14.4 gr y 19.2 ± 0.7 mm) comparado con los otros niveles (Tabla II). Por medio de una regresión polinomial de segundo orden se estimó que hasta los 75 dde el requerimiento de DHA es de 2.5% del TAG en la dieta ($DHA=17.9 + 7.7 \times DHA$ en la dieta, $P= 0.05$, $r^2 =1$) o 14.1% de DHA del TAG en la emulsión ($DHA=19.1 + 1.1 \times DHA$ en la dieta, $P= 0.05$, $r^2 =0.98$).

Tabla II. Talla, peso y sobrevivencia de *Paralichtys californicus* alimentado con nauplios de *Artemia* enriquecida. Datos al inicio (50 dde) y final (75 dde) del destete, media \pm D.E.

50 DDE				
	DHA Nulo	DHA Bajo	DHA Medio	DHA Alto
Peso (mg)	32.9 \pm 9.1	30.4 \pm 7.1	32.6 \pm 1.7	29.7 \pm 7.1
Talla (mm)	10.5 \pm 2.4	10.2 \pm 1.2	10.3 \pm 0.6	9.4 \pm 1.8
Sobrevivencia (%)	47.2 \pm 3.0	52.2 \pm 10.9	51.9 \pm 2.4	56.9 \pm 8.1
75 DDE				
Peso (mg)	106.4 \pm 14.4 ^a	186.8 \pm 19.1 ^b	275.3 \pm 111.3 ^c	240.1 \pm 57.9 ^{bc}
Talla (mm)	19.2 \pm 0.7 ^a	23.3 \pm 0.2 ^a	26.3 \pm 4.5 ^{bc}	26.6 \pm 2.4 ^c
Sobrevivencia (%)	9.7 \pm 9.9	20.0 \pm 11.1	23.4 \pm 25.4	39.8 \pm 6.7

Los superíndices a, b, c, denotan diferencias significativas entre las dietas ($P < 0.05$).

III.6.2 Análisis de Ácidos grasos

III.6.2.1 Ácidos grasos en metanauplios de *Artemia*

Se encontraron diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de los metanauplios de *Artemia* enriquecidos con los diferentes niveles de DHA.

Las diferencias fueron en el porcentaje de ácidos grasos saturados y monoinsaturados C14:0, C:16:0, C:18:0, C20:1n-9, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:6n-3, así como en el total de saturados, total de monoinsaturados y en las relaciones de DHA/EPA y EPA/ARA entre los cuatro tratamientos (Tabla III).

Tabla III. Perfil de ácidos grasos en metanauplios de *Artemia* enriquecida con los cuatro niveles de DHA (Nulo 0%, Bajo 5%, Medio 10%, Alto 15% del TAG), media \pm D.E., n = 2.

Ácido graso	DHA Nulo	DHA Bajo	DHA Medio	DHA Alto
C14:0	0.84 \pm 0.01 ^{ab}	0.61 \pm 0.20 ^a	0.88 \pm 0.05 ^{ab}	1.13 \pm 0.03 ^b
C16:0	16.18 \pm 1.22 ^b	11.65 \pm 0.74 ^a	13.72 \pm 0.28 ^{ab}	14.26 \pm 1.26 ^{ab}
C18:0	12.70 \pm 0.65 ^{ab}	14.90 \pm 1.36 ^b	10.39 \pm 0.30 ^a	10.16 \pm 0.22 ^a
Total saturados	29.73 \pm 1.86 ^b	27.16 \pm 0.43 ^{ab}	24.99 \pm 0.54 ^a	25.55 \pm 1.07 ^{ab}
C16:1 n -7	2.56 \pm 1.02	2.04 \pm 0.01	4.12 \pm 2.48	2.31 \pm 0.27
C18:1 n -9	26.74 \pm 2.18	26.11 \pm 0.43	28.57 \pm 1.16	30.34 \pm 0.07
C20:1 n -9	0.74 \pm 0.12 ^a	1.61 \pm 0.26 ^b	0.70 \pm 0.11 ^a	0.69 \pm 0.02 ^a
Total monoinsaturados	30.04 \pm 0.49 ^a	29.76 \pm 0.69 ^a	33.39 \pm 1.22 ^b	33.34 \pm 0.22 ^b
C18:2 n -6	8.59 \pm 0.45	8.94 \pm 1.12	9.94 \pm 1.23	10.54 \pm 2.09
C20:3 n -6	5.21 \pm 2.24 ^b	3.11 \pm 1.17 ^{ab}	2.94 \pm 0.44 ^{ab}	0.50 \pm 0.17 ^a
C20:4 n -6	4.79 \pm 0.07 ^b	5.58 \pm 0.18 ^c	3.96 \pm 0.25 ^a	3.64 \pm 0.13 ^a
Total n -6 PUFA	18.60 \pm 2.62	17.62 \pm 2.47	16.83 \pm 1.41	14.68 \pm 2.13
C18:3 n -3	18.34 \pm 5.11	19.90 \pm 2.27	18.40 \pm 2.93	18.13 \pm 1.28
C20:5 n -3	4.41 \pm 0.90	4.70 \pm 0.11	4.77 \pm 0.12	5.06 \pm 0.08
C22:6 n -3	0.16 \pm 0.23 ^a	0.85 \pm 0.05 ^{ab}	1.61 \pm 0.12 ^{bc}	3.25 \pm 0.37 ^c
Total n -3 PUFA	22.92 \pm 3.98	25.45 \pm 2.21	24.78 \pm 3.17	26.43 \pm 0.83
Total PUFA	41.51 \pm 1.37	43.07 \pm 0.26	41.61 \pm 1.75	41.12 \pm 1.29
n -3/ n -6	1.23 \pm 0.39	1.44 \pm 0.33	1.47 \pm 0.31	1.80 \pm 0.32
DHA/EPA	0.04 \pm 0.05 ^a	0.18 \pm 0.02 ^{ab}	0.34 \pm 0.02 ^b	0.64 \pm 0.06 ^c
EPA/ARA	0.92 \pm 0.20 ^a	0.84 \pm 0.00 ^a	1.20 \pm 0.05 ^{ab}	1.39 \pm 0.07 ^b

Los superíndices a, b, c, denotan diferencias significativas entre las dietas ($P < 0.05$).

El protocolo de enriquecimiento resultó exitoso debido a que el nivel de DHA mostró un incremento gradual positivo (Nulo 0.2 ± 0.23 , Bajo 0.8 ± 0.05 , Medio 1.6 ± 0.12 y Alto 3.2 ± 0.37) con una correlación de $r^2 = 0.95$.

III.6.2.2 Ácidos grasos en juveniles

Se registraron diferencias significativas en los ácidos grasos C 14:0, C18:2 n -6 y C20:3 n -6. No hubo diferencias significativas en los resultados del contenido de DHA en las muestras de juveniles de 50 dde, alimentados con metanauplios de *Artemia* enriquecidos.

Tabla IV. Perfil de ácidos grasos en el tejido de larvas de lenguado de California de 50 dde, alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecida, media \pm D.E., n = 3.

Ácido grasos	Inicial	DHA Nulo	DHA Bajo	DHA Medio	DHA Alto
C14:0	4.42	2.46 \pm 1.22 ^a	0.95 \pm 0.26 ^{ab}	0.53 \pm 0.46 ^{ab}	0.93 \pm 0.21 ^b
C16:0	29.96	20.89 \pm 3.19	21.57 \pm 2.91	21.56 \pm 2.68	29.31 \pm 4.28
C18:0	10.09	14.02 \pm 0.23	16.80 \pm 3.71	17.48 \pm 1.82	19.08 \pm 4.72
Total saturados	44.46	37.36 \pm 4.17	39.33 \pm 6.28	39.57 \pm 4.24	49.31 \pm 3.22
C16:1 <i>n</i> -7	9.79	4.37 \pm 1.61	2.34 \pm 0.41	1.51 \pm 1.36	2.30 \pm 0.75
C18:1 <i>n</i> -9	20.40	29.56 \pm 3.11	28.11 \pm 3.99	28.02 \pm 0.91	27.14 \pm 5.45
C20:1 <i>n</i> -9	0.85	0.84 \pm 0.08	0.91 \pm 0.12	0.87 \pm 0.03	0.91 \pm 0.17
Total					
monoinsaturados	31.04	34.78 \pm 4.65	31.36 \pm 4.41	30.39 \pm 1.52	30.34 \pm 6.09
C18:2 <i>n</i> -6	11.65	12.85 \pm 3.00 ^a	10.48 \pm 0.85 ^a	10.13 \pm 0.58 ^a	6.00 \pm 0.35 ^b
C20:3 <i>n</i> -6	0.88	0.35 \pm 0.30 ^a	0.36 \pm 0.32 ^a	1.52 \pm 1.29 ^{ab}	3.00 \pm 1.40 ^b
C20:4 <i>n</i> -6	2.16	4.73 \pm 4.11	6.48 \pm 4.40	5.05 \pm 1.80	2.47 \pm 2.27
Total <i>n</i> -6 PUFA	14.69	17.93 \pm 1.45	17.32 \pm 5.02	16.69 \pm 1.22	11.47 \pm 2.63
C18:3 <i>n</i> -3	0.00	7.16 \pm 4.55	7.70 \pm 3.30	6.86 \pm 1.94	2.85 \pm 1.63
C20:5 <i>n</i> -3	2.56	1.64 \pm 1.74	1.56 \pm 1.55	3.46 \pm 1.00	4.27 \pm 2.92
C22:5 <i>n</i> -3	1.94	0.28 \pm 0.48	0.44 \pm 0.76	0.55 \pm 0.16	0.00
C22:6 <i>n</i> -3	5.31	0.85 \pm 0.78	2.29 \pm 2.15	2.47 \pm 0.78	1.75 \pm 2.89
Total <i>n</i> -3 PUFA	9.81	9.93 \pm 7.35	11.99 \pm 5.75	13.34 \pm 3.81	8.87 \pm 5.49
Total PUFA	24.50	27.86 \pm 8.75	29.31 \pm 10.61	30.03 \pm 4.95	20.34 \pm 8.11
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	0.36	0.55 \pm 0.35	0.69 \pm 0.20	0.80 \pm 0.17	0.77 \pm 0.32
DHA/EPA	2.07	0.52 \pm 0.10	1.46 \pm 7.12	0.71 \pm 0.13	0.41 \pm 0.61
EPA/ARA	1.19	0.35 \pm 0.35	0.24 \pm 0.27	0.69 \pm 0.07	1.73 \pm 2.52

Los superíndices a, b, denotan diferencias significativas entre las dietas (P < 0.05).

El contenido de DHA en las larvas fue afectado por los tratamientos, sin embargo debido a la alta variabilidad de los datos no fue posible determinar diferencias significativas entre los cuatro niveles de DHA (Nulo 0.8 \pm 0.78, Bajo 2.3 \pm 2.15, Medio 2.4 \pm 0.78 y Alto 1.7 \pm 2.89). Así mismo el contenido de EPA y ARA no mostró diferencias significativas entre los cuatro tratamientos.

III.6.3 Patrón de pigmentación

El patrón de pigmentación en los peces al día 50 dde fue similar en los cuatro tratamientos. Sin embargo, al final del destete si registraron diferencias significativas. El mayor número y porcentaje de peces bien pigmentados se observó en el tratamiento de DHA Alto ($33.2\% \pm 2.1$). En este tratamiento también se encontró el mayor número de peces pseudoalbinos, con un total de $32.0\% \pm 6.2$, mientras que los peces con manchas fueron más abundantes en el tratamiento de DHA Nulo (77.2 ± 7.9) (Tabla V). En este experimento no se observaron peces con el lado ciego pigmentado (ambicoloración).

Tabla V. Patrón de pigmentación en juveniles de lenguado de California expresado como porcentaje del total de larvas al día 50 y 75 dde.

50 DDE				
	DHA Nulo	DHA Bajo	DHA Medio	DHA Alto
Pigmentado	4.08 ± 2.64	4.14 ± 1.77	4.22 ± 2.36	3.63 ± 0.69
Manchado	76.05 ± 7.56	65.65 ± 10.81	71.70 ± 1.90	60.67 ± 8.11
Pseudoalbino	19.87 ± 5.27	30.21 ± 12.20	24.08 ± 0.82	35.70 ± 6.46
75 DDE				
Pigmentado	19.22 ± 6.18^a	31.95 ± 17.08^a	$30.36 \pm 5.01^{a,b}$	33.25 ± 2.11^b
Manchado	77.16 ± 7.87	54.73 ± 11.97	54.47 ± 7.51	34.72 ± 7.97
Pseudoalbino	3.61 ± 3.13^a	13.32 ± 5.12^a	15.18 ± 2.50^a	32.04 ± 6.16^b

Los superíndices a, b, denotan diferencias significativas entre las dietas ($P < 0.05$).

III.6.4 Tasas de crecimiento

Los peces de los tratamientos suplementados con niveles Medio y Alto mostraron las mayores tasas de crecimiento (Medio $4.01 \pm 0.83 \%$ día⁻¹ y DHA Alto $4.38 \pm 0.49 \%$ día⁻¹). Las tasas de crecimiento diarias fueron más del doble después de la metamorfosis en los tratamientos DHA Medio y DHA Alto (Tabla VI).

Tabla VI. Tasas de crecimiento específico en lenguado de California, expresadas como media \pm D.E., % día, n = 3.

DDE	Inicial 18 dde	DHA Nulo	DHA Bajo	DHA Medio	DHA Alto
0-18	5.01				
18-50		1.93 \pm 0.67	2.03 \pm 0.40	1.70 \pm 0.18	1.66 \pm 0.64
50-75		2.67 \pm 1.00	3.43 \pm 0.46	4.00 \pm 0.83	4.38 \pm 0.49
0-50		3.04 \pm 0.43	3.10 \pm 0.25	3.09 \pm 0.11	2.87 \pm 0.41
0-75		2.88 \pm 0.04 ^b	3.17 \pm 0.03 ^{ab}	3.30 \pm 0.23 ^a	3.32 \pm 0.12 ^a

Los superíndices a, b, denotan diferencias significativas entre las dietas ($P < 0.05$).

III. 7 Discusión

III.7.1 Crecimiento, sobrevivencia y éxito en el destete.

Este es el primer trabajo en el que se evalúa el efecto de la concentración de DHA en el alimento sobre el crecimiento, pigmentación y éxito después del destete en el lenguado de California. Además a diferencia de otros estudios en donde únicamente se ha observado el efecto sobre la calidad de la larva, en este trabajo el experimento se llevó a cabo hasta la etapa juvenil (75 dde).

El enriquecimiento de *Artemia* fue efectivo ya que se obtuvieron niveles ascendentes de DHA como resultado del enriquecimiento en los cuatro tratamientos. No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia y el crecimiento en los juveniles al día 50 dde. Sin embargo, después del destete (75 dde) se observó un incremento en la sobrevivencia y el crecimiento de los juveniles, específicamente con el nivel de DHA alto.

El lenguado de California es capaz de completar la metamorfosis aun cuando se alimentan con metanauplios de *Artemia* enriquecidos sin DHA, con el nivel Nulo de DHA (0.16 ± 0.23 % DHA del TAG). En otras especies de peces planos se han observado resultados similares, como por ejemplo para el pez sol (*S. senegalensis*) no se encontró un requerimiento de DHA durante el desarrollo larvario (Villalta et al. 2005a). Se han evaluado dietas con 0.1 mg g^{-1} peso seco, de DHA (Morais et al. 2004) o totalmente sin DHA (Villalta et al. 2005a) y no se reportó un efecto negativo.

En las larvas del lenguado japonés (*P. olivaceus*) un nivel de 0.1 % de DHA del TAG (Izquierdo et al. 1992) es suficiente para completar la metamorfosis exitosamente.

En este experimento no se observaron diferencias en la sobrevivencia, crecimiento y éxito en el destete por efecto de los niveles de DHA en los juveniles de 50 dde. Es posible que el requerimiento de DHA en los estadios pre metamórficos sea bajo y se satisfaga con las reservas endógenas de DHA y complementado con el DHA dietario durante la etapa de alimentación con rotíferos. En contraste, se observaron diferencias significativas en el crecimiento y el patrón de pigmentación en los juveniles de 75 dde, como resultado de las dietas experimentales. Después del destete, los peces alimentados con el nivel nulo de DHA tuvieron una talla y peso significativamente menor, comparados con los demás tratamientos. Las tasas de crecimiento observadas en este estudio muestran un efecto positivo del nivel de DHA después de la metamorfosis, cuando el crecimiento del organismo se incrementa drásticamente. Además, los juveniles alimentados con el nivel de DHA alto, al día 50 dde, mostraron un perfil lipídico con mayor contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y EPA, por lo que contaron con mayor sustrato metabólico para generar energía mediante catabolismo lipídico a través de la β -oxidación mitocondrial (Sargent et al. 1989), lo que posiblemente les permitió tener mayores tasas de crecimiento.

En este trabajo se observó mayor sobrevivencia larval, comparada con experimentos previos en este laboratorio, en los cuales se utilizó el mismo protocolo de alimentación, pero con un producto comercial con un solo nivel de DHA (i.e., Algamac 2000). El porcentaje de sobrevivencia reportado en años anteriores fue de 40.5% al día 50 dde (Zacarías-Soto, 2007), mientras que en este estudio fue de 56.9% con el nivel de DHA alto.

Al parecer, la carencia de DHA en la dieta suministrada durante los estadios de desarrollo larval en los peces planos no tiene un efecto significativo en términos de crecimiento y sobrevivencia, siempre que el nivel de EPA u otro HUFA n-3 este presente en la dieta (Villalta, 2005c). Sin embargo en este estudio hubo un claro efecto por el nivel dietario de DHA en la condición del organismo después de la metamorfosis, ya que se encontró una relación positiva entre el DHA de la dieta pre-metamorfosis, con el crecimiento y la sobrevivencia. Esto sugiere que el

requerimiento de HUFAS n-3 y en especial de DHA sea diferente antes y después de la metamorfosis, lo cual concide con Villalta y colaboradores (2005c). Existe poca información en donde se mencionan los hábitos alimenticios del lenguado de California, especialmente durante la etapa larval. Las larvas de Lenguado de California de entre 7 y 20 mm de longitud total (estadios G, H, I y juveniles tempranos de acuerdo a la clasificación de Gisbert et al. 2002) cuyo desarrollo corresponde a la etapa final de la metamorfosis y juveniles tempranos, se alimentan principalmente de copépodos harpacticoides, pequeños anfípodos gamaridos y poliquetos (Allen, 1988). Todas estas presas contiene cantidades importantes de PUFAS n-3 (De Silva y Anderson, 1995), especialmente los copépodos que tienen altas concentraciones de DHA (Hamre et al. 2002; Evjemo et al. 2003; Bell et al. 2003), lo que sugiere que durante la metamorfosis el lenguado de California requiere altos niveles de este ácido graso esencial. Desde el momento en que comienza la alimentación exógena (3 dde), el lenguado de California tiene altas tasas de crecimiento del día 0 al día 18 dde (Tabla V). Durante este periodo las larvas muestran cambios fisiológicos y morfológicos significativos que aparentemente fueron cubiertos con el perfil nutricional de los rotíferos. Sin embargo, antes y durante la metamorfosis las tasas de crecimiento junto con otros procesos metabólicos se reducen para permitir este proceso (Youson, 1988). Durante estos estadios pre metamórficos, el requerimiento de DHA parece ser menor y es cubierto con la dieta. Una vez que la metamorfosis finaliza, los juveniles restablecen sus altas tasas de crecimiento, lo que incrementa el requerimiento de DHA como se observa en este estudio. Es probable que en los juveniles silvestres el requerimiento de DHA esté cubierto con la dieta a base de copépodos y anfípodos (Allen, 1988) con altos contenidos de DHA (Sargent et al. 2002).

Con los resultados de este experimento y estudios previos, se sugiere que hay tres categorías de requerimiento de DHA en las larvas de peces planos:

1. Peces con estadios pelágicos cortos y bajo requerimiento de DHA pre y post metamórficos, tales como el pez sol (*Solea senegalensis*) (Villalta et al. 2005) y *Pleuronectes platessa* (Dickey-Collas y Geffen, 1992)

2. Peces con estadios pelágicos medios o intermedios con bajos requerimientos de DHA antes de la metamorfosis y con requerimientos post metamórficos moderados, como el lenguado de California (*Paralichthys californicus*).
3. Aquellos con estadios pelágicos largos con altos requerimientos de DHA y otros HUFAs antes y después de la metamorfosis, como el turbot (*Scophthalmus maximus*) o el lenguado cola amarilla (*Limanda ferruginea*) (Copeman et al. 2002).

III.7.2 Pigmentación

No se observaron diferencias significativas entre los patrones de pigmentación y los niveles dietarios de DHA en las larvas de 50 dde. Sin embargo, los niveles específicos de HUFAs, y las relaciones de DHA/EPA y EPA/ARA en los tejidos de las larvas de lenguado si mostraron ser significativamente diferentes entre los cuatro tratamientos. La relación de DHA/EPA recomendada para lograr un desarrollo y pigmentación adecuadas en peces planos es >2 (Sargent et al. 1997; Reitan et al. 2004). En este estudio la relación de DHA/EPA fue baja para los cuatro tratamientos y menor a lo recomendado. Sin embargo, el tratamiento con el nivel de DHA alto que mostró una relación de DHA/EPA = 0.64 fue el que mostró el mayor porcentaje de peces con pigmentación normal después de la metamorfosis (75 dde). En este trabajo se observaron un gran número de peces con manchas (60 – 70%) al día 50 dde por lo que es posible que el lenguado de California requiera periodos más largos de alimentación con suplementación de DHA para completar el proceso de pigmentación, en comparación con otras especies de peces planos. Se ha observado que los juveniles de lenguado de California se pigmentaron después del periodo de destete (75 dde) por lo que es posible que el requerimiento de DHA siga siendo alto hasta esta fecha.

A los 42 dde ($18.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$) el lado oculado del lenguado de California está totalmente cubierto de melanóforos (Gisbert et al. 2002) y en este laboratorio se ha observado que esto puede ocurrir hasta después del día 75 dde. Al final del periodo de destete, el porcentaje de peces manchados disminuye y esto sugiere que un alto porcentaje de los peces manchados observados el día 50 dde desarrollan su pigmentación característica al día 75 dde. Por otro lado se encontró un alto número

de peces manchados en los tratamientos de DHA nulo, bajo y medio al día 75 dde, combinado con un bajo porcentaje de peces pseudoalbinos. Estos datos sugieren que el patrón de manchas es parte del desarrollo característico del lenguado de California y que el nivel de ARA presentado en los tratamientos probablemente retardó el desarrollo normal. Villalta y colaboradores (2005c) mencionan que altos niveles de ARA pueden afectar los procesos de metamorfosis, tales como la migración del ojo.

En el lenguado del Atlántico, se establece que niveles bajos de PUFAs n-3 combinado con un alto contenido de ARA producen pseudoalbinismo (Hamre et al. 2007). Este efecto no se observó en el lenguado de California de 50 dde, ya que se encontró un número significativamente alto de peces pigmentados en el tratamiento de DHA alto en el que se observó la relación más alta de EPA/ARA. El alto número de peces pseudoalbinos observado a los 75 dde, con el tratamiento de DHA alto, probablemente esté relacionado con un desequilibrio en la relación de EPA/ARA (Hamre et al. 2007). Finalmente tomando como base una regresión polinomial de segundo orden, la ingestión diaria recomendada de DHA durante el periodo previo a la metamorfosis para que el lenguado de California de 50 dde tenga un crecimiento y sobrevivencia adecuados es de 1.21% de DHA del TAG y 5.59% de DHA en la emulsión utilizada para el enriquecimiento de los nauplios de *Artemia*. Mientras que para la etapa posterior a la metamorfosis (75 dde) se obtuvo una alta tasa de pigmentación, crecimiento y sobrevivencia con 2.40% y 14.08% de DHA del TAG en la dieta y en la emulsión respectivamente.

Los resultados de la ingesta de DHA a través de alimento vivo enriquecido indican que el lenguado de California es capaz de sobrevivir con muy poco DHA en la dieta (i. e., nivel Nulo de DHA). No se encontró un efecto claro del nivel dietario de DHA en la calidad de los juveniles y la pigmentación al día 50 dde. Después de este periodo y hasta el día 75 dde los juveniles mostraron un efecto positivo al nivel DHA Alto. La pigmentación al día 75 dde puede tener relación con un nivel subóptimo de DHA/EPA y el alto número de peces manchados puede estar ligado a altos niveles de ARA, que afectan el desarrollo de la pigmentación. Es necesario realizar más estudios con el fin de entender la función de los ácidos grasos esenciales (AGE) en el desarrollo y la pigmentación del lenguado de California.

Capítulo IV

Efecto de la Luz UV en el desarrollo y pigmentación del lenguado de California

Resumen

En el cultivo de peces planos existen varios problemas, uno de ellos es la pigmentación anormal que está asociada con problemas nutricionales y ambientales lo que repercute sobre el valor comercial de los organismos. La pigmentación de los organismos depende de la presencia de células especializadas y de la síntesis de pigmento; si el pigmento está presente y difundido dentro de las células el color es visible, mientras que si hay ausencia del pigmento o se encuentra contraído dentro de las células, los organismos muestran un patrón pseudoalbino. En este estudio se realizó un experimento irradiando con luz UV a larvas y juveniles de lenguado de California. Debido a que los cultivos generalmente se realizan con luz fluorescente, los organismos fueron expuestos a la luz generada por lámparas con capacidad de producir un amplio espectro de radiación, semejante a la luz solar. Se utilizaron peces con edades de 15 a 75 dde, cultivados en un sistema de recirculación y alimentados con alimento vivo enriquecido con ácidos grasos esenciales. Se utilizaron focos de 60 watts con 5% de luz UV, se probaron cuatro tratamientos, con niveles de exposición de 0, 33, 66 y 100% de la luz UV producida por las lámparas. La intensidad se graduó utilizando placas de acrílico perforadas. Se registró la longitud estándar y el peso húmedo al inicio del experimento (15 dde) al inicio del destete (50 dde) y al final del experimento (75 dde). El crecimiento fue mayor con el tratamiento 100% UV al día 75 dde (92.1%) y significativamente diferente de los tratamientos de 33 y 66% de UV, pero igual al tratamiento 0% UV. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento ni en la pigmentación entre los tratamientos al día 50 y 75 dde. La exposición a luz UV como factor aislado no tuvo un efecto positivo en la pigmentación del lenguado de California.

IV.1 Introducción

El color de los peces depende de la presencia de células especializadas llamadas cromatóforos, estas células contienen a los pigmentos que se encuentran en pequeños organelos llamados cromatosomas. En los peces todos los cromatóforos o células embrionarias que dan origen a células pigmentarias, tiene un origen embrionario común, y se derivan de la cresta neural (Fujii, 1969). El color en la piel de los peces depende de la cantidad de pigmento contenido en los diferentes tipos de células pigmentarias y los cambios de color, característicos de algunas especies de peces, se deben principalmente a que los melanóforos responden directamente a la incidencia de la luz ya que la distribución del pigmento en estas células está controlado por el sistema nervioso y/o por sistema endocrino (Fujii, 2000).

A la fecha no existe mucha información con respecto al efecto de la luz sobre la pigmentación en los peces, principalmente por la dificultad que involucra el desarrollo de los bioensayos para elucidar su efecto. Sin embargo, ya que en los mamíferos el efecto de la luz sobre los melanocitos está bien documentado (Adachi et al. 2005) por lo que se utilizará esta información como base para explicar los resultados observados en los peces.

Unos de los principales factores que tiene efecto sobre las células pigmentarias de la piel de todos los organismos es la luz UV. Este tipo de luz es una forma de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda más corta que la de la luz visible. La radiación ultravioleta se encuentra entre la luz visible y los rayos X del espectro electromagnético. Este tipo de luz se divide en tres subtipos, la luz UVA, conocida también como de onda larga tiene una longitud de onda que va de los 400 a los 320 nm; la luz UVB o de onda media tiene una longitud de onda de 320 a 280 nm y la luz UVC, llamada también de onda corta, es la que tiene mayor energía por fotón y se ubica entre los 280 a 200 nm (Hockberger, 2002). Las células pigmentarias absorben estas radiaciones en un rango específico de longitud de onda. En los mamíferos, los melanocitos absorben la energía de los fotones y pasan de un estado de reposo o basal a un estado de excitación que lleva rápidamente a la liberación de energía como calor o luz (fluorescencia o fosforescencia) o bien reacciona con otras moléculas para formar un fotoproducto como es el caso de la melanina. Estos a su vez producen cambios bioquímicos y celulares que culminan

en una respuesta clínica biológica (Honeyman, 2002). La luz UV al tener más energía por fotón que cualquier otra longitud de onda, tiene un efecto biológico sobre las células pigmentarias ya que las radiaciones son absorbidas por el ADN, ARN, proteínas, lípidos de las membranas y organelos celulares presentes en la epidermis y dermis, incluyendo el sistema vascular. Además la luz tiene la capacidad de iniciar una serie de reacciones de reducción-oxidación para formar especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo en las células y tejidos (Zagarese y Williamson, 2001). Se ha descrito también que la exposición a este tipo de luz produce apoptosis, supresión de sistema inmune e incremento de la pigmentación (Franklin y Haseltine, 1989) y puede causar mutagénesis. (Mitchel et al. 1991).

Los efectos de la radiación solar son acumulativos y dosis-dependiente, además de estar en función de la duración, frecuencia, calidad e intensidad de la radiación. Y llevan como efecto inmediato, a la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina, prostaglandinas y citocinas que causan la inflamación, y como efecto tardío cáncer de piel. La luz UVB causa mutaciones en los genes supresores de tumores que llevan al cáncer de piel tipo carcinomas basocelulares y espinocelulares. Por su parte la luz UVA causa daño en el ADN por una reacción de fotosensibilidad que producen alteraciones cromosómicas que produce citotoxicidad y carcinogénesis que hoy se considera inducen el melanoma o cáncer en la piel, como ha sido demostrado en modelos animales y cultivo de células epidérmicas humanas (Camacho, 2001). El incremento en la pigmentación cutánea inducido por la luz UV en mamíferos, es un proceso de dos pasos: el oscurecimiento inmediato el cual ocurre unos minutos después de la exposición y el oscurecimiento tardío, que es aparente de 2 a 3 días después de la exposición. El oscurecimiento inmediato es producto de la oxidación de la melanina preexistente; este efecto inmediato involucra la reorganización de los melanocitos y keratinocitos. Mientras que el oscurecimiento tardío es inducido por la luz UVA y UVB e involucra un incremento en el número de los melanocitos funcionales, la estimulación de la melanogénesis, el incremento de las dendritas de los melanocitos y la transferencia de pigmento, así como alteraciones del empaquetamiento en los melanosomas. En los peces se ha

observado que al igual que en los mamíferos la melanización por exposición a altas intensidades de luz UV es una respuesta de fotoprotección (Adachi et, al. 2005).

Es importante conocer el efecto de la luz UV en el desarrollo temprano de los peces planos, con el fin de identificar la intensidad requerida de radiación en esta longitud de onda para lograr una correcta melanización y así poder establecer un protocolo correcto de cultivo. En general las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo de estos peces, es a base de luz fluorescente.

IV.2 Antecedentes

Existen pocos estudios relacionado con el efecto de la luz UV sobre la pigmentación de los peces. En los peces planos, particularmente en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) el problema de hipomelanismo o pseudoalbinismo es el resultado de una dieta con nauplios de *Artemia* deficientes nutricionalmente o bien una inadecuada exposición a la luz UV durante el periodo de desarrollo sensible, previo a la metamorfosis (Matsumoto y Seikai, 1991). Al exponer a las larvas premetamórficas a la luz UVA (312 nm) y UVB (360 nm) durante dos semanas, se observó una disminución significativa en el porcentaje de larvas pseudoalbinas (menos del 5%), la mayoría de los peces mostraron un patrón de pigmentación normal en el lado oculado, salvo en algunos casos en que las larvas tenían algunos parches sin melanina. También se observó melanina en el lado ciego, este patrón de pigmentación por ambos lados del cuerpo se conoce como ambicoloración. Los peces que se mantuvieron como control, bajo condiciones ordinarias de cultivo con luz fluorescentes (1000 lux) también mostraron ambicoloración, sin embargo la frecuencia de peces con lado oculado sin melanina fue alta. Con estos resultados los autores concluyen que cuando los cromatoblastos reciben una estimulación adecuada, tienen la capacidad de diferenciarse en melanóforos que se distribuyen de forma bilateral en la piel de las larvas, aun después de la metamorfosis, sin embargo, no está claro el papel de la luz UV como inductor de la melanogénesis.

Fuji (2000) menciona que se ha subestimado el efecto de algunos factores ambientales como la intensidad y tipo de luz en el cultivo de los peces planos. La luz UV es particularmente importante para la pigmentación de los peces, principalmente por su efecto sobre las células pigmentarias, ya que afecta las fibras nerviosas que

controlan las respuestas celulares de agregación y concentración de pigmento dentro de los cromatóforos.

En estudios que se han hecho en mamíferos sobre el efecto de la luz UV en los melanocitos, se sabe que el oscurecimiento de la piel se debe principalmente a un proceso de fotoprotección (Adachi et al. 2005). Se ha observado también que los PUFAS n-3 tienen un papel de protección ante el efecto de la luz UV, principalmente por dos mecanismos: a) la acción competitiva de los PUFAS n-3 para el metabolismo de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, que resulta en la producción menos activa de prostaglandinas y leucotrienos, con lo que se reduce la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α . b) como estos ácidos grasos altamente insaturados son rápidamente oxidados por las especies reactivas de oxígeno/radicales libres, su presencia protege a las estructuras vitales de este posible daño (Rhodes, 1998).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la intensidad luz UV total en la pigmentación del lenguado de California desde etapas tempranas (15 dde) y estudiar el efecto sobre el patrón pigmentario del lenguado de California durante la etapa pre y post metamórfica.

IV.3 Hipótesis

El proceso de pigmentación normal en las larvas de *P. californicus* es afectado por la intensidad de la luz UV.

IV.4 Objetivo General

Evaluar el efecto de la luz UV sobre la pigmentación de lar las larvas de *P. californicus*.

IV. 4.1 Objetivo Particular

- Cuantificar el patrón de pigmentación de *P. californicus* durante las etapas pre y post metamórficas, expuestos a cuatro intensidades de luz UV (0, 33, 66 y 100%) con un foto-periodo de 12 /12 luz-oscuridad (LO).

IV.5 Materiales y Métodos

IV.5.1 Cultivo larvario

Este experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que el experimento del capítulo III. Brevemente; se utilizaron huevos de lenguado de California, en este caso provenientes del laboratorio de peces marinos de Redondo Beach (California, USA). Los huevos se incubaron y a partir del día 3 dde se inició la alimentación con rotíferos enriquecidos con Algamac 2000 (Hawthorne Ca. USA) de acuerdo al protocolo de Zacarías-Soto (2007) (ver capítulo III). Para este experimento se utilizaron 350 larvas por tanque $1.75 \text{ larvas L}^{-1}$. Una vez que las larvas llegaron al día 16 dde y estuvieron en condiciones de cambiar de alimento, se alimentaron con metanauplios de *Artemia* enriquecidos con el nivel de DHA Alto del experimento anterior, 15% de DHA del TAG y 5% de ARA del TAG (ver enriquecimiento en capítulo III). La temperatura del agua durante todo el experimento fue de $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidad 34 ‰, oxígeno disuelto 8 mg L^{-1} y amonio $<1.0 \text{ N-NH}_3 \text{ mg L}^{-1}$.

IV.5.2 Fuente de luz UV

Con el fin de observar el efecto de la luz UV sobre la síntesis de melanina en los melanóforos de las larvas, previo al inicio de la metamorfosis (día 15 dde) en cada tanque se colocaron lámparas fluorescentes de 60 watts, con emisión de 5 % de luz UV (Super UV coil lamp, Zilla Franklin IL). Se seleccionaron estas lámparas por que el espectro de luz que emiten es similar al de luz solar, además por el tiempo de vida que garantizan las lámparas fue ideal para el tiempo que duró el experimento. Los tanques permanecieron cerrados para evitar la entrada de luz adicional, se utilizaron tapas de plástico del mismo diámetro que los tanques (Figura 12).

Se aplicaron cuatro intensidades de luz UV, 0%, 33%, 66% y 100% (del 5 % total de luz UV emitido por la lámpara), cada una con tres repeticiones. La intensidad de luz UV de los tratamientos se controló por medio de láminas de acrílico transparente de 25 x 25 cm y 0.3 mm de grosor, capaces de retener el 100% de luz UV. Se utilizaron láminas de mica con perforaciones que permitieron el paso de la luz UV en diferentes porcentajes; se utilizaron láminas con el 66% del área de la mica perforada para el tratamiento de 66% UV y lámina que con el 33% del área perforada, para permitir el paso del 33 % de luz UV. Se utilizaron láminas sin

perforar para el tratamiento 0% UV por medio del cual se bloqueo el 100% de la luz UV emitida por la lámpara y para el tratamiento de 100% UV no se colocó la lámina.

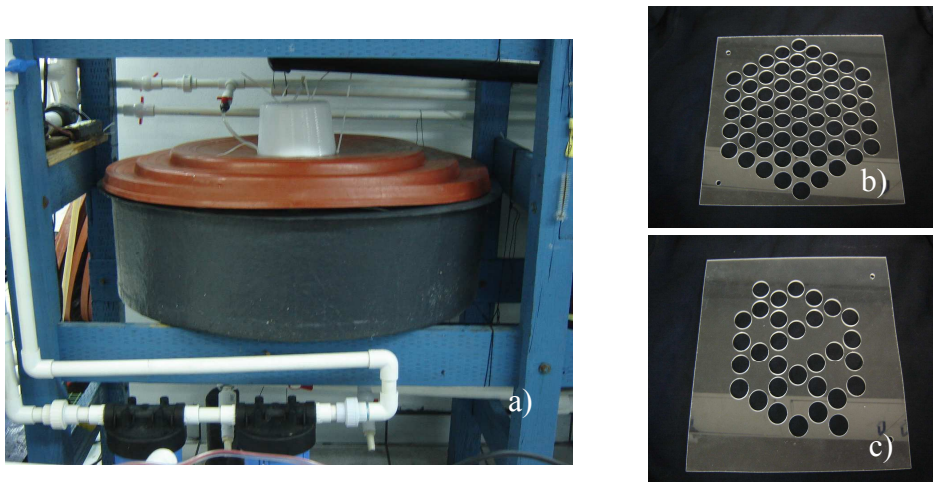


Figura 12. a) Ubicación de las lámparas de UV en los tanques y láminas perforadas, b) lámina de acrílico con 66% de la superficie perforada, c) lámina de acrílico con el 33% de la superficie perforada.

Los peces se mantuvieron en estas condiciones hasta el día 75 dde. El destete inició el día 50 dde y terminó el día 75 dde. Una vez finalizado el experimento se registró la intensidad de luz en cada foco y se determinó el espectro de irradiación con el fin de corroborar si las lámparas emitieron la cantidad de luz UV que se esperaba. La irradiación se midió con un espectro radiómetro RPS900-W International light (Massachusetts USA).

IV.5.3 Sobrevivencia y crecimiento

A los 50 y 75 dde se midieron todos los peces de los 12 tanques experimentales para estimar la sobrevivencia, para ello, se removieron las tapas con las lámparas de luz UV y se definieron cuadrantes virtuales en cada tanque y se contó el número de organismos, adicionalmente, se estimó la mortalidad acumulada. Para cuantificar el crecimiento se tomaron al azar 30 peces de cada tanque de cultivo, se anestesiaron con Tricaina metanosulfonato (MS 222, 0.1 g L⁻¹, Argent Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, U.S.A.), y se registró la longitud estándar utilizando un microscopio estereoscópico de marca Wild Heerbrug (MAX ERB Instrumental Company. USA). Adicionalmente se registró el peso húmedo de los

peces utilizando una balanza analítica (Precisa Instruments Ltd. Switzerland). Los peces fueron regresados a sus tanques después de la toma de datos.

IV.5.4 Patrón de pigmentación después de la exposición a la luz UV.

Para conocer el efecto de la luz UV sobre la pigmentación de las larvas y juveniles de lenguado de California, se hicieron observaciones directas en los tanques de cultivo. Después de remover las tapas con las lámparas de cada tanque, los peces se clasificaron de forma visual en tres categorías: peces pigmentados, con manchas y pseudoalbinos. Estas observaciones se realizaron en los 50 dde y 75 dde, que corresponden al inicio y final del destete.

IV.5.5 Estadística

La variación de los datos se presentó con desviaciones estándar de la media de tres repeticiones para los análisis de clasificación de color, sobrevivencia y crecimiento. Las diferencias entre las medias se analizó con una significancia estadística de ($P \leq 0.05$) por medio de una ANOVA de una vía, seguida de una prueba a posteriori de Tuckey. Previo al análisis estadístico, los datos de porcentajes de pigmentación se transformaron con la función arcoseno. Se utilizó el paquete Statistica 6 (Stat.Soft. Inc. OK, USA) para todos los análisis.

IV.6 Resultados

IV.6.1 Sobrevivencia y crecimiento

Al comparar la sobrevivencia y el crecimiento entre las cuatro intensidades de luz UV a los 50 dde, no se observaron diferencias significativas. La sobrevivencia al día 75 fue significativamente diferente en el tratamiento con el 100% de luz UV, con respecto a los tratamientos con 33 y 66% UV, pero igual al tratamiento con 0% UV. En cuanto al crecimiento, no se observaron diferencias significativas en la talla y el peso como respuesta a la exposición de las diferentes intensidades de luz UV en el 75 dde (Tabla VII).

Tabla VII. Datos de talla, peso y sobrevivencia de peces irradiados con las cuatro intensidades de luz UV. Media \pm D.E.

50 DDE				
Luz UV	0%	33%	66%	100%
Peso (mg)	31.45 \pm 2.09	30.59 \pm 4.80	30.20 \pm 2.71	32.69 \pm 3.06
Talla (mm)	12.13 \pm 2.95	12.36 \pm 2.07	11.56 \pm 1.96	12.49 \pm 1.39
Sobrevivencia (%)	82.57 \pm 4.16	68.95 \pm 9.57	68.85 \pm 11.39	92.05 \pm 10.63
75 DDE				
Peso (mg)	212.80 \pm 2.01	198.36 \pm 4.51	208.26 \pm 6.25	219.09 \pm 9.14
Talla (mm)	25.20 \pm 1.14	22.51 \pm 2.19	22.39 \pm 2.76	28.59 \pm 3.79
Sobrevivencia (%)	36.07 \pm 4.16 ^{ab}	33.71 \pm 2.44 ^a	32.19 \pm 4.65 ^a	47.52 \pm 7.26 ^b

Los superíndices a, b, denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cabe mencionar que a pesar de que no hubo diferencias estadísticas en la sobrevivencia y crecimiento a los 50 dde, a los 75 dde los peces expuestos al tratamiento con 100% UV se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia significativamente mayor (47.52 ± 7.26) que los peces expuestos a 33% y 66% (33.71 ± 2.44 y 32.19 ± 4.65), pero igual que los no expuestos de 0% (36.07 ± 4.16).

IV.6.2 Clasificación de color

A los 50 dde no se encontraron diferencias significativas entre los patrones de pigmentación observados en los cuatro tratamientos con intensidad de luz UV, aunque se registró un alto porcentaje de peces con manchas (Figura 13). El tratamiento con 33% de UV mostró el mayor porcentaje de peces pigmentados (32.24 ± 10.07), mientras que el de menor porcentaje fue el nivel 0% UV (13.20 ± 7.93). Los peces pseudoalbinos fueron más abundante en el nivel 0% UV (9.78 ± 1.45) y menos abundantes con la intensidad de 33% UV (7.41 ± 3.54) (Tabla VIII). Al sumar los peces pigmentados con los peces manchados el porcentaje de los cuatro tratamientos fue similar.

Tabla VIII. Porcentaje de peces con diferentes tipos de pigmentación observados el día 50 dde. Media \pm D.E.

Tratamiento	0% UV	33% UV	66% UV	100% UV
Pigmentado	13.20 \pm 7.93	32.24 \pm 10.07	24.18 \pm 9.94	18.20 \pm 3.29
Manchados	77.02 \pm 9.36	60.35 \pm 8.21	66.85 \pm 10.09	73.96 \pm 3.15
Pseudoalbino	9.78 \pm 1.45	7.41 \pm 3.54	8.96 \pm 0.72	7.84 \pm 3.78
Pigmentado + Manchados	90.22 \pm 1.45	92.59 \pm 3.54	91.04 \pm 0.72	92.16 \pm 3.78

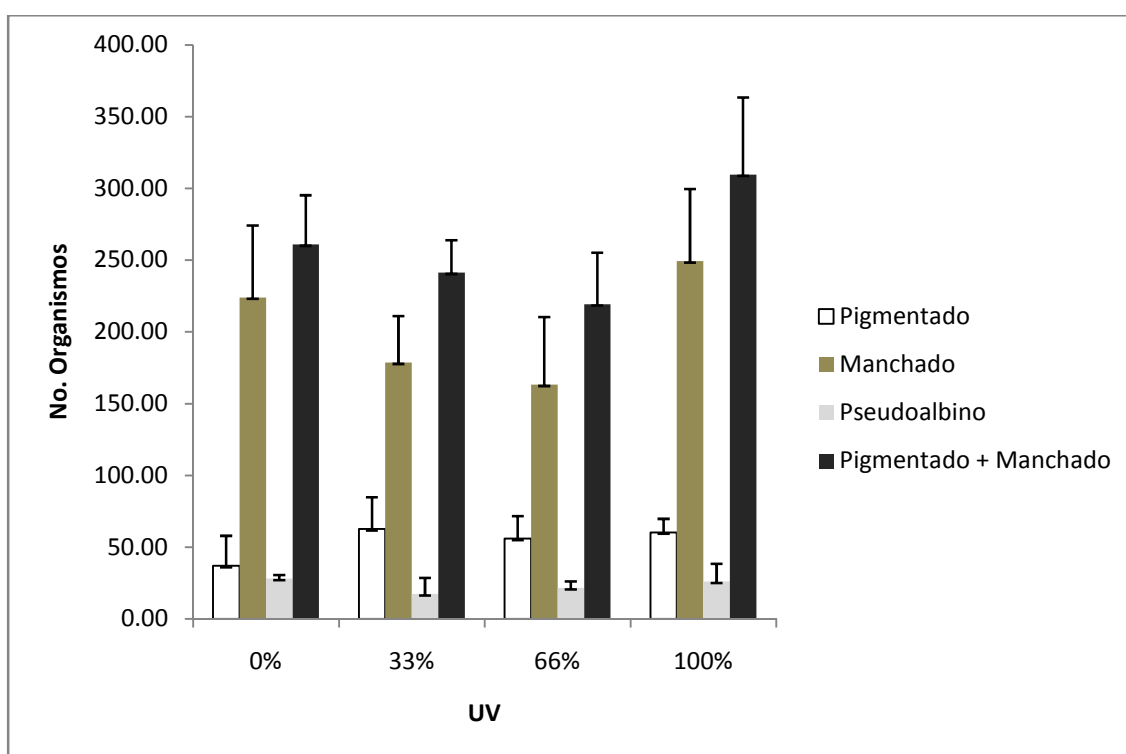


Figura 13. Patrón de pigmentación en peces de 50 dde expuestos a los cuatro tratamientos de luz UV. Media del total de organismos \pm D.E.

A los 75 dde no se observaron diferencias significativas, ni un patrón claro en la pigmentación de los peces. El tratamiento con mayor porcentaje de peces pigmentados fue el de 33% UV (63.06 \pm 41.01), mientras que el de menor porcentaje fue 0% UV (40.55 \pm 5.06) (Tabla IX). Además los peces pseudoalbinos también fueron más abundantes con el tratamiento 33% UV (11.06 \pm 0.88) y el menor porcentaje de este patrón de pigmentación se observó en el tratamiento de 0% UV (10.98 \pm 2.29)

Tabla IX. Porcentaje de peces con diferentes tipos de pigmentación observados el día 75 dde. Media \pm D.E.

Tratamiento	0% UV	33% UV	66% UV	100% UV
Pigmentados	40.55 \pm 5.06	63.06 \pm 14.01	52.10 \pm 5.59	46.48 \pm 9.94
Manchados	48.47 \pm 6.68	25.89 \pm 14.39	36.27 \pm 10.29	42.93 \pm 13.27
Pseudoalbinos	10.98 \pm 2.29	11.06 \pm 0.88	11.63 \pm 4.71	10.59 \pm 5.74
Pigmentado + Manchados	89.02 \pm 2.29	88.94 \pm 0.88	88.37 \pm 4.71	89.41 \pm 5.74

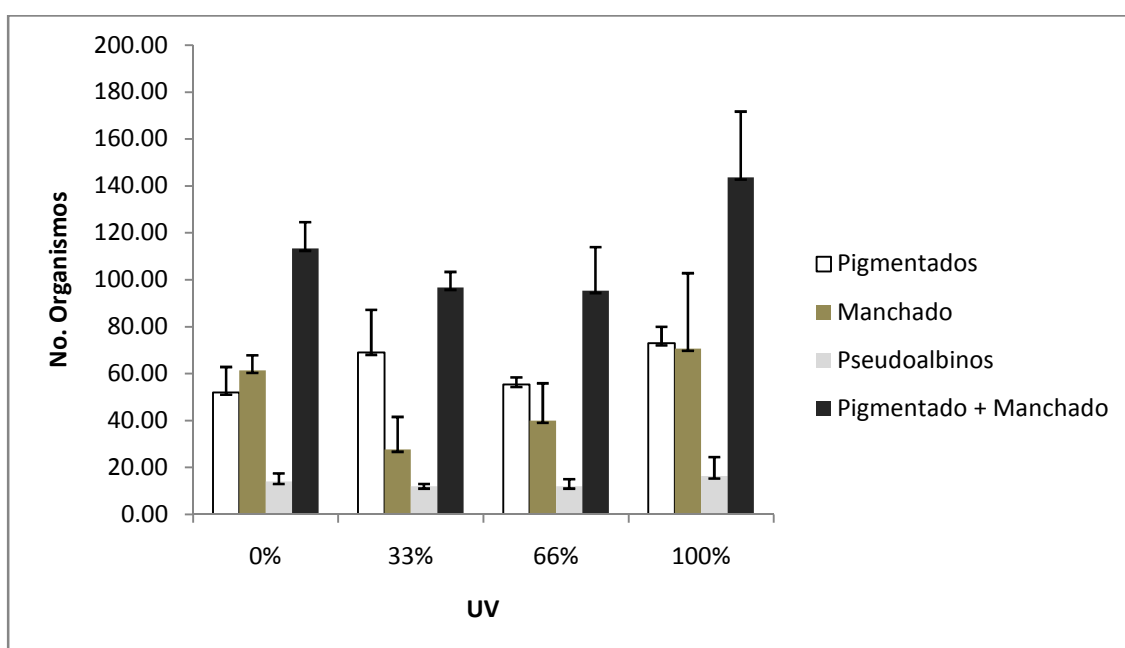


Figura 14. Patrón de pigmentación en peces de 75 dde expuestos a los cuatro tratamientos de luz UV. Media del total de organismos \pm D.E.

IV.6.3 Luz UV en las lámparas

Al analizar el espectro de luz y la intensidad de las lámparas utilizadas para el experimento, se encontró que todas las lámparas emitieron los 60 watts de luz fluorescente y emitieron luz de tipo UVA y UVB. Al medir la irradiación emitida por las lámparas acopladas a las láminas de acrílico utilizadas en los tanques, se observó que si se logró graduar la intensidad de la luz UV dependiendo del número de perforaciones presentes en las láminas (Figura 15), es decir 0, 33, 66 y 100% de luz UV. Al analizar la capacidad de las láminas de acrílico perforadas para bloquear

el paso de la luz UV en las cuatro graduaciones (0, 33, 66 y 100% UV), se encontró que las láminas fueron significativamente diferentes entre ellas en el espectro de luz UVB (360 nm), mientras que para el espectro de luz UVA (312 nm) fueron diferentes entre los tratamiento 0, 33 y 66 %, y el tratamiento 100, fue igual al de 66% (Figura 15).

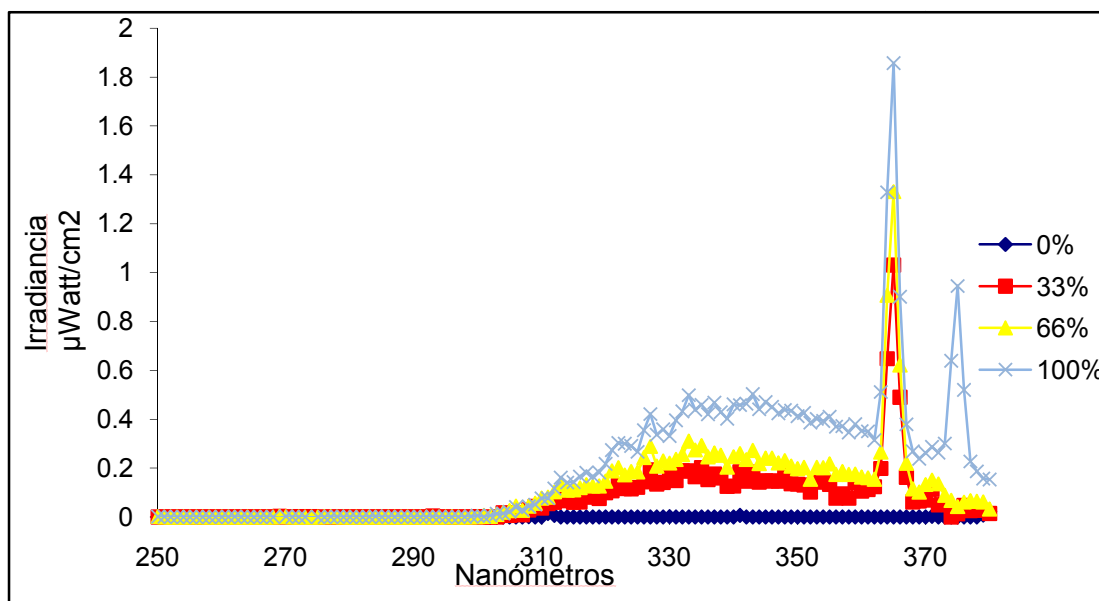


Figura 15. Nivel de Irradiación utilizada en el experimento.

Tabla X. Irradiación ($\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$) promedio en el espectro UVA y UVB en los cuatro tratamiento.

	0% UV	33%UV	66%UV	100% UV
UVA 312 nm	0.01 ^a	0.06 ^b	0.10 ^c	0.12 ^c
UVB 360 mn	0.00 ^a	0.11 ^b	0.16 ^c	0.35 ^d

Los superíndices a, b, c y d denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

IV.7 Discusión

Los resultados de este experimento muestran que a pesar de no haber diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, la sobrevivencia y el crecimiento estimados a los 50 dde, fueron mayores con la intensidad de 100% UV. Con este tratamiento la sobrevivencia fue de 92.05 %, superior a la sobrevivencia registrada en el experimento anterior con el tratamiento de DHA alto (56.9 %) y a la registrada en cultivos de años anteriores en el mismo laboratorio (40.5%, Zacarías-Soto, 2007).

No se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia al día 75 entre los tratamientos de 100 y 0% UV. El tratamiento de 0% UV fue significativamente diferente a los tratamientos de 33 y 66% UV y estos dos fueron significativamente inferiores al de 100% UV. En todos los casos en los muestreos de los días 50 y 75 de el crecimiento y la sobrevivencia fueron mayores en el tratamiento 100%. Esto sugiere que a pesar de que la diferencia no es significativa, de alguna forma la exposición a 100% de UV tuvo un efecto positivo sobre las condiciones del cultivo del lenguado de California.

Se logró comprobar que efectivamente las lámparas comerciales que se utilizaron emitieron luz en la longitud de onda del UV y que las láminas de acrílico utilizadas para graduar la intensidad retuvieron la cantidad de radiación esperada.

En el lenguado japonés (*P. olivaceus*) el papel de la luz UV no es claro, ya que al exponer a los peces a este tipo de radiación, se observó un incremento en el número de peces pigmentados, pero al mismo tiempo un alto porcentaje de ambicoloración. Después de la metamorfosis las células que dan origen a los melanóforos adultos, proliferan en la piel de los dos lados de los peces y posiblemente la luz UV tiene un efecto sobre la melanización de estas células (Matsumoto y Seikai, 1992). Es posible que la exposición a la luz UV funcione como un inductor de la melanización para la fotoprotección, sin embargo no es clara la forma en que actúa sobre los melanoblastos de los peces, en etapas tempranas como es el caso de la metamorfosis. Además no se ha determinado si la luz UV es esencial para la primera melanización de los melanóforos en los peces.

El proceso de primera melanización en los mamíferos está bien estudiado, en los cultivos de células cutáneas. En donde se ha observado que los keratinocitos que se unen a los melanocitos en la epidermis, liberan factores de crecimiento que modulan la proliferación de los melanocitos y la síntesis de melanina, todo esto en ausencia de luz UV (Gordo et al. 1989). En el caso de los peces los melanoblastos que contienen a los melanosomas tienen las mismas funciones que el keratinocito (Fuji, 2001). Sin embargo, no se ha determinado si la primera melanización en los melanóforos es dependiente de factores como la luz.

La exposición prolongada a luz UV tiene efectos dañinos, sin embargo, las exposiciones controladas son fundamental para la síntesis de vitamina D, que es

importante para el crecimiento y el desarrollo del esqueleto ya que esta vitamina facilita la absorción de calcio (Holick, 1981). Por esta razón, es necesaria una adecuada exposición a esta tipo de luz, sin embargo, para peces aun no está determinado este requerimiento lumínico. En este sentido es posible que la exposición de 100% de UV haya tenido un efecto positivo en el crecimiento y la sobrevivencia de los peces, lo que explica que este tratamiento haya sido el más exitoso.

En los peces planos, los melanoblastos pueden desarrollarse en ambos lados del pez después de la metamorfosis, una vez que el melanóforo se diferencia, depende de factores de crecimiento y de la señalización celular que le permiten melanizarse (Matsumoto y Seikai, 1992). Es posible que la luz UV tenga un efecto sobre la dispersión y producción de melanina para la fotoprotección, pero para que esto ocurra, como primer paso debe haber una melanización que seguramente es parte de la ontogenia pigmentaria del organismo.

Es necesario dividir el proceso de pigmentación en dos etapas; la primera relacionada con la ontogenia, que es la que involucra la diferenciación celular del melanoblasto, el desarrollo del melanóforo y su primera melanización; y la segunda que tiene que ver con la movilización del pigmento ya existente en la célula, la dispersión o contracción del melanosoma y el aumento en la síntesis de melanina para la fotoprotección celular. En este trabajo no se observó un efecto claro en el patrón de pigmentación como respuesta a la exposición a la luz UV. Es posible que las anomalías de pigmentación anormal del lenguado de California estén relacionadas con problemas asociados a la primera parte del proceso pigmentario, es decir con el desarrollo y la funcionalidad de las células pigmentarias. Como se describió en el primer experimento de este trabajo, posiblemente las deficiencias nutricionales durante el cultivo tienen efecto sobre la falta de melanina en los melanóforos; en este caso la intensidad de luz UV no es un factor importante para la diferenciación de los melanoblastos ni para la síntesis de melanina en los peces con pigmentación anormal.

Sabemos que los peces pseudoalbinos cuentan con melanóforos, pero si estas células no recibieron el estímulo adecuado, muy seguramente no se llevó a cabo la primera melanización y ante esta situación tal vez la incidencia de luz UV sobre

estas células pigmentarias no tenga efecto en la producción de melanina. Esto explicaría el porqué los peces con problemas pigmentarios pueden recuperar una pigmentación relativamente normal con el tiempo, ya que cuando las condiciones de cultivo cambian, los peces pueden recibir el estímulo adecuado para la primera melanización y el pigmento se vuelve evidente en las células.

La pigmentación anormal en los peces planos sigue siendo un problema sin resolver del todo. En este estudio se observó que la luz UV no es un factor determinante en la melanogénesis del lenguado de California. Tanto las deficiencias nutricionales, como las condiciones del cultivo tienen un efecto en el desarrollo de los peces. Los experimentos con diferentes niveles de enriquecimiento de DHA en el alimento vivo y con los diferentes niveles de exposición a luz UV, no son lo suficientemente claros hasta el momento para evidenciar cual o cuales factores son determinantes en el desarrollo de una pigmentación normal. Los ácidos grasos polinsaturados n-3 actúan compensando el efecto de luz UV dentro de las células de mamíferos (Rhodes, 1998) pero no se sabe de qué forma puedan interactuar estos dos factores en la determinación de la pigmentación en las etapas tempranas de desarrollo de los peces planos. Es necesario realizar más estudios para comprender el papel de la luz UV sobre las células pigmentarias de los peces planos y determinar si esta radiación tiene un papel determinante en la melanización de los organismos.

Capítulo V

Cuantificación de la enzima tirosinasa en la piel de Lengado de California

Resumen

En los peces planos cultivados, los problemas de pigmentación se caracterizan por la presencia de manchas o falta de melanina en el lado oculado o por la presencia de melanina en el lado ciego, esto provoca pérdida del valor comercial y baja rentabilidad del cultivo. El problema aun no está bien entendido, pero las principales hipótesis giran en torno a que se debe a una combinación de varios factores específicos de las condiciones de cultivo, tales como deficiencias nutricionales y factores ambientales. En los mamíferos se ha determinado que la falta de melanina en muchos casos tiene que ver con mutaciones genéticas o mecanismos que interfieren con el funcionamiento de la enzima tirosinasa. Como primera aproximación para conocer el papel de la tirosinasa en los procesos de pigmentación del lenguado de California, en el presente estudio se cuantificó la actividad de la tirosinasa en la piel del lado oculado y del lado ciego de organismos pigmentados y pseudoalbinos. Se utilizaron homogenizados de piel de tres peces adultos, silvestres y bien pigmentados y 15 juveniles pseudoalbinos cultivados en el laboratorio. La actividad de la tirosinasa se estimó mediante la medición de la tasa de oxidación de Levodopa y se cuantificó por medio de espectrofotometría.

Se detectó la actividad de la enzima en todos los tejidos analizados, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los homogeneizados de la piel de peces pigmentados lado oculado, pigmentado lado ciego, pseudoalbino lado oculado y pigmentado lado ciego. Esto sugiere que en los cuatro tipos de tejido se dan las mismas condiciones celulares para que la tirosinasa esté presente, sin embargo, en los peces pseudoalbinos la síntesis de melanina no se lleva a cabo. Es necesario realizar más estudios y afinar la técnica utilizada para conseguir resultados que permitan comprender el papel de la tirosinasa en la pigmentación del lenguado de California.

V.1 Introducción

Las anomalías pigmentarias observadas en los peces planos producidos mediante acuicultura, tienen implicaciones económicas debido a que estos peces pierden su valor comercial. Además, si estos organismos son utilizados para rehabilitar poblaciones naturales, su incapacidad para mimetizarse con el fondo los hace más vulnerable a los depredadores (Bolker y Hills, 2000). Los problemas de pigmentación en los peces planos se caracterizan por el desarrollo de parches o áreas blancas en una parte del lado oculado o por la falta total de melanina en el lado oculado del organismo (Hamre et al. 2000). La pigmentación anormal también ocurre en los mamíferos, aves, anfibios e insectos; en estos grupos la base genética de las anomalías pigmentarias se ha estudiado más y en la actualidad son más claras las causas; el albinismo es una enfermedad autosómica recesiva producida por la mutación del gen de la tirosinasa (Kong et al. 2000). Los mecanismos que producen el albinismo en peces son aun confusos, sin embargo, es posible que en medaka (*Oryzias latipes*) y el pez zebra (*Danio rerio*) el albinismo sea producido por la misma enfermedad autosómica recesiva que en los mamíferos (Fue et al. 1998). Sin embargo, esta información aún es contradictoria en el caso de los peces ya que también se ha observado que al aislar una cepa de trucha arco iris mutante (albinos dominantes), los rasgos albinos no son producto de la mutación del gen de la tirosinasa (Nakamura et al. 2001).

La pigmentación anormal en los peces planos se ha relacionado con factores ambientales y nutricionales (Seikai, 1985; Kanazawa, 1993). Se ha dado mayor énfasis a los factores nutricionales tales como el contenido dietario de vitamina A y los ácidos grasos poliinsaturados (DHA, ARA y EPA), de reproductores y juveniles (Estevez et al. 1999). Estos ácidos grasos han demostrado tener un efecto en la pigmentación de los peces planos durante y después de la metamorfosis. Sin embargo, los mecanismos determinantes de la pigmentación en los peces planos aun se desconocen (Guo et al. 2003). En mamíferos se han realizado investigaciones que revelan que en algunos casos los problemas pigmentarios están relacionados con la ausencia o inactividad de la enzima tirosinasa (Jiménez-Cervantes et al. 2001). Esta enzima interviene en tres de las reacciones de la ruta de

síntesis de la melanina y se considera la enzima limitante en el proceso de melanización.

La tirosinasa cataliza las dos primeras reacciones del proceso; la hidroxilación de tirosina a dopa y la subsecuente oxidación de dopa a dopaquinona. *In vivo* la melanogénesis se induce mayormente por luz UVA y UVB y por medio de la hormona estimuladora de la melanina (MSH) (Busca, 1996). La ausencia de melanina en mamíferos está relacionada con la presencia de inhibidores de tirosinasa tales como el estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS); desbalance de antioxidantes (Jimenez-Cervantes et al. 2001), mecanismos de degradación enzimática intracelular, tales como la ubiquitinación, que en el caso de la tirosinasa, está relacionado con la presencia de ciertos ácidos grasos (Ando et al. 2004) o mutaciones del gen Tyr que dan como resultado un fenotipo albino (Rungta et al. 1996). Dado que la presencia y funcionalidad de la enzima tirosinasa es fundamental para la pigmentación, en el presente estudio se realizó un ensayo mediante el cual se detectó y se evaluó la cantidad de enzima tirosinasa en la dermis de peces pigmentados y pseudoalbinos, mediante espectrofotometría, con el propósito de investigar los mecanismos asociados a la pigmentación anormal en el lenguado de California.

V.2 Antecedentes

La tirosinasa (EC 1.14.18.1) es una glicoproteína de membrana de tipo I y es la enzima limitante en la biosíntesis de melanina. Algunos desordenes pigmentarios tales como el albinismo oculocutáneo son causados por la disfunción de la tirosinasa y las enzimas melanogénicas relacionadas. Así como por la retención anormal de estas proteínas en el retículo endoplasmático, que resulta en su degradación por los proteosomas y que da como resultado un fenotipo hipopigmentado (Ando et al. 2004).

Algunos estudios demuestran que la tirosinasa se sintetiza en el retículo endoplasmático y es procesada rápidamente en el aparato de Golgi. Durante este proceso la degradación de la tirosinasa ocurre de forma espontánea. La tirosinasa puede ser degradada de forma endógena por los proteosomas (Ando et al. 2004).

Esta degradación es mediada por el proceso de ubiquitinación, durante el cual las proteínas celulares son marcadas para ser degradadas, la proteína se marca por medio de una proteína altamente conservada conocida como ubiquitina, la degradación ocurre por medio del proteosoma 26S, una proteína citosólica gigante (Nandi et al. 2006).

Es por esto que para regular la pigmentación, es necesario un balance entre la síntesis de tirosinasa y su degradación por ubiquitinación. Se ha demostrado que los ácidos grasos tiene un papel importante en la regulación de la melanogénesis. Por ejemplo, los ácidos oleico (18:1), linoléico (18:2) y linolénico (C18:3) disminuyen la síntesis de melanina y la actividad de la tirosinasa, mientras que los ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y el esteárico (18:0) la incrementan (Ando et al. 2004).

Aun no se han realizado estudios en peces planos con problemas de pigmentación, para conocer si el desbalance en la producción de la melanina por ubiquitinación es el factor principal de la pigmentación anormal, por eso en este experimento se realizó una primera aproximación cuantificando la actividad de la tirosinasa con el fin de conocer si existen diferencias entre la actividad de la enzima en peces pigmentados y pseudoalbinos.

V.3 Hipótesis

La piel de los juveniles de *Paralichthys californicus* pseudoalbinos tienen una actividad de la enzima tirosinasa significativamente más baja que los peces bien pigmentados.

V. 4 Objetivo general

Conocer si existen diferencias entre la actividad enzimática de la tirosinasa del lenguado de California pigmentado y el pseudoalbino.

V.4.1 Objetivo particular

Cuantificar la actividad de la enzima tirosinasa por medio de espectrofotometría para conocer si existen diferencias en la actividad de esta enzima entre los peces con problemas de pigmentación y pigmentados.

V. 5 Materiales y Métodos

V.5.1 Cuantificación de la actividad de la Tirosinasa (EC 1.14.18.1)

La actividad de la tirosinasa se estimó mediante la medición de la tasa de oxidación de Levodopa (L-Dopa), siguiendo la metodología descrita por Choi et al. (2007). Brevemente, se tomaron muestras de la piel de Lenguado de California del lado oculado (LO) y el lado ciego (LC). Para esto se utilizaron 3 peces silvestres con pigmentación normal de aproximadamente 30 cm de longitud, así como 15 juveniles pseudoalbinos cultivados en el laboratorio y con una talla de 6 – 8 cm de longitud. Estos peces fueron donados por el laboratorio Hubbs Research Institute (San Diego, Ca).

Para la extracción de la tirosinasa se disectaron secciones de piel de 1 cm² de ambos lados del organismo, se utilizó la sección central del cuerpo del juvenil entre la cabeza y la aleta caudal, hacia la zona superior del cuerpo, evitando tomar muestras de la piel de la zona abdominal con el fin de evitar contaminación con los fluidos de los órganos internos. Para el análisis se tomaron muestras de 0.1 g de piel del lado ciego (LC) y del lado oculado (LO) de cada organismo, las cuales se colocaron en viales con 1 ml con buffer de fosfato con un pH de 6.8. El tejido se homogeneizó utilizando un homogeneizador polytron PT 1,200 (Kinematica Inc, Bohemia N.Y.) manteniendo una temperatura aproximada de 2°C, para su posterior almacenamiento a -2°C durante 8 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 5 minutos a 10,000 rpm y posteriormente se recuperó el sobrenadante, se resuspendió el material sedimentado y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 10,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -40 °C para posteriormente utilizarlo en el ensayo.

Se utilizaron 200 µL del homogeneizado de piel, 300 µl de buffer de fosfato y como sustrato 100 µL de una solución 1mM de L-Dopa. Se registró la absorbancia a 475 nm cada 5 minutos durante una hora a temperatura ambiente. El control positivo

contenía 300 µl de buffer de fosfato, 200 µl de una solución con 832 U de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Sigma, México) y 100 µl de 1mM L-Dopa. Para el control negativo se sustituyeron los 100 µl de L-Dopa por agua destilada. Cada muestra se analizó por triplicado.

Los resultados de absorbancia se transformaron a unidades de actividad enzimática (U). Para este estudio se definió como una unidad de actividad enzimática (1U) la cantidad de enzima necesaria para causar el incremento en 0.01 unidades de absorbancia a 475 nm. Se utilizaron los datos de absorbancia a los 2 minutos ya que en este periodo se observó una máxima linealidad en la actividad enzimática.

V.5.2 Estadística

La variación de los datos se presentó en desviaciones estándar de la media de tres repeticiones para los datos de actividad máxima de la enzima. La diferencias entre las medias se analizó con una significancia estadística de $P \leq 0.05$ por medio de una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba a posteriori de Tuckey. Se utilizó el paquete Statistica 6 (Stat.Soft. Inc. OK, USA) para todos los análisis.

V.6 Resultados

Se detectó actividad de la enzima tirosinasa en todos los tejidos analizados (Figura 17). La actividad en la piel del lenguado pigmentado en el lado oculado (LO) mostró ser mayor, pero no estadísticamente diferente a los extractos de piel pigmentado del lado ciego (LC), pseudoalbino LO y pseudoablino LC. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras de piel del lado pigmentado LO (-), pigmentado LC, pigmentado LC (-), pseudoablino LO y pseudoablino LC. Las muestras del lado pigmentado LO fue significativamente diferente a los controles pseudoalbino LO (-) y pseudoalbino LC (-) (Figura 17).

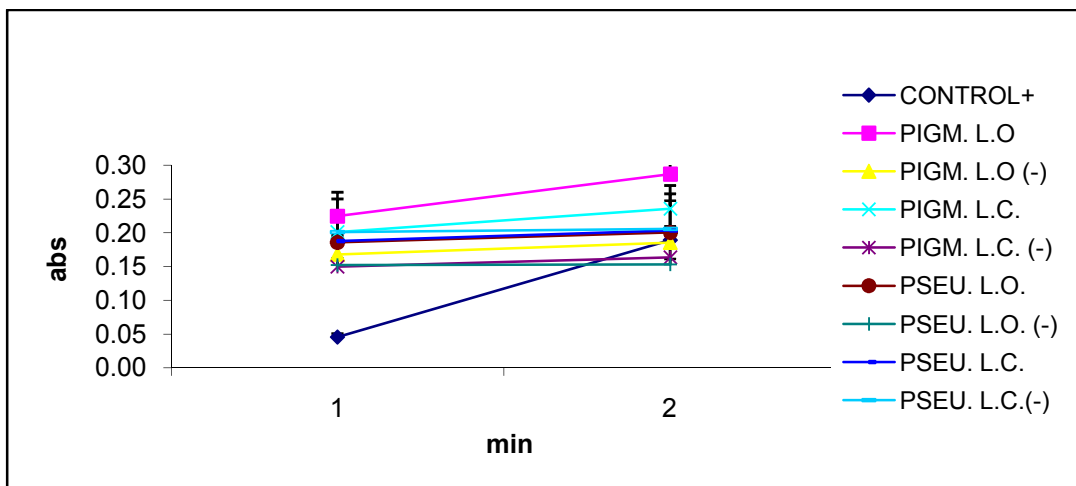


Figura 16. Muestras de piel de lenguado de California y controles negativos. LO = lado oculado, LC = lado ciego.

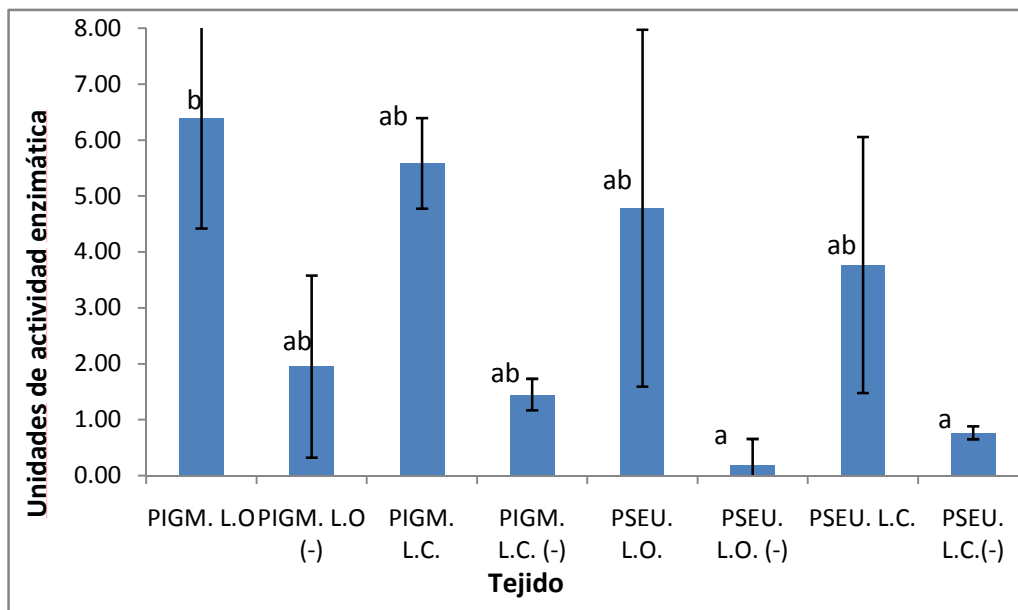


Figura 17. Actividad de la enzima tirosinasa en piel de lenguado de California estimada en Unidades enzimáticas (1U= 0.01 unidades de abs) a los dos minutos de la reacción. Las letras a, ab y b, denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 18 a los dos minutos de reacción, la actividad enzimática fue mayor en el extracto del tejido pigmentado LO, seguido por el

extracto del pigmentado LC, posteriormente por el extracto pseudoalbino LO y finalmente por el pseudoalbino LC.

Tabla XI. Unidades de actividad enzimática en los diferentes tejidos de lenguado de California. LO = Lado oculado, LC = Lado ciego.

Tejido	Unidades de actividad enzimática 1U=0.01abs
PIGM. L.O	6.40 ± 1.97 ^b
PIGM. L.O (-)	1.95 ± 1.62 ^{ab}
PIGM. L.C.	5.58 ± 0.80 ^{ab}
PIGM. L.C. (-)	1.45 ± 0.28 ^{ab}
PSEU. L.O.	4.78 ± 3.18 ^{ab}
PSEU. L.O. (-)	0.18 ± 0.47 ^a
PSEU. L.C.	3.77 ± 2.28 ^{ab}
PSEU. L.C.(-)	0.77 ± 0.11 ^a

V.7 Discusión

En el lenguado de California se identificó y cuantificó la actividad de la enzima tirosinasa en los tejidos del LO y LC tanto de peces bien pigmentados como peces pseudoalbinos. Con base en estos resultados se puede mencionar que en esta especie, aún en la edad adulta, el LC cuenta con melanóforos inactivos, con actividad de tirosinasa, pero que no sintetizan melanina.

Seikai y colaboradores (1987) detectaron mediante un análisis histoquímico, melanoblastos Dopa positivos en larvas postmetamórficas de lenguado japonés (*P. olivaceus*). Estas células fueron abundantes en el lado oculado y las aletas de las larvas, mientras que estuvieron presentes de forma limitada en el lado ciego. Hamre y colaboradores (2007), argumentan que en el lenguado del Atlántico (*H. hippoglossus*) con pigmentación normal, después de la metamorfosis, se incrementó la proliferación de melanoblastos en el LO de los peces, mientras que los melanóforos larvales del LC desaparecieron mediante citólisis y solo se diferenciaron algunos iridóforos adultos. Esto sugiere que durante la metamorfosis de estos peces hay melanoblastos en todo el organismo, pero una vez que se desarrollan las características de un juvenil, los melanoblastos del LC desaparecen.

El hecho de que en el presente estudio las muestras del LO del lenguado pseudoalbino mostraran una actividad de la enzima tirosinasa similar a la del LC de peces pseudoalbinos y pigmentados, indica que en el LO de los organismo pseudoalbinos se dan las mismas condiciones celulares que en el LC de los dos tipos de peces. Es decir, en ambos lados del organismo están presentes las células pigmentarias, capaces de sintetizar melanina; aparentemente la tirosinasa está presente pero la síntesis de melanina no se lleva a cabo. La ruta de síntesis de melanina está controlada por la tirosinasa, que cataliza las primeras dos reacciones (limitantes) del proceso; la hidroxilación de la tirosina a dopa y la subsecuente oxidación a dopaquinona (Busca et al. 1996). Según las estimaciones de este estudio, la tirosinasa está presente en todo el tegumento del lenguado de California, pero a pesar de esto en el LC de los peces pigmentados y LO y LC de los pseudoalbinos la síntesis de melanina está inhibida.

En la actualidad no están bien entendidos los mecanismos mediante los cuales se inhibe la actividad de la enzima tirosinasa en los peces. La interrupción del proceso de síntesis de melanina dentro de los melanóforos del lenguado de California puede estar relacionada con las anomalías descritas en los melanocitos de mamíferos. Una de ellas describe la retención aberrante de la tirosinasa en el retículo endoplasmático, que resulta en su degradación por los proteosomas y que produce un fenotipo hipopigmentado (Ando et al. 2004). En este sentido, los ácidos grasos tienen un papel importante en la regulación de la melanogénesis, por ejemplo, los ácidos grasos oleico (18:1 n-9) linoléico (18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3) disminuyen la síntesis de melanina y la actividad de la tirosinasa, esto mediante pequeños cambios en los niveles del RNA_m de la tirosinasa (Ando et al. 1995). Si este proceso se lleva a cabo en el lenguado de California, probablemente la mayor parte de la tirosinasa sintetizada en el melanóforo sea degradada y éste sea el motivo del patrón pseudoalbino que se observó en los peces del laboratorio. Por otro lado está la inhibición de tirosinasa como respuesta al estrés oxidativo. El H₂O₂ y otros compuestos reactivos de oxígeno (ROS) son importantes en la regulación de varias reacciones intracelulares y los mecanismos que las regulan aun no están bien entendidos. Se ha demostrado que los ROS activan las kinasas intracelulares para inducir a la tirosina fosfatasa (Keyse y Emslie, 1992) y controlar la actividad y

expresión de factores transcripcionales y respuestas tempranas de genes. Así mismo, están involucradas en la activación de rutas de ubiquitinación proteolítica, todo esto como respuesta al estrés oxidativo. Los niveles intracelulares de H₂O₂ y otros ROS aumentan a nivel intracelular como respuesta de estímulos externos, tales como factores de crecimiento epidermales (Bae et al. 1997). Como resultado, el estrés oxidativo en melanocitos de ratón ha demostrado tener un efecto inhibitorio en la melanogénesis (Jiménez-Cervantes et al. 2001). Este podría ser otro mecanismo por el cual no se lleve a cabo la melanización en los peces con pigmentación anormal, para conocer si esto es cierto sería necesario realizar estudios específicos, tales como cultivos celulares y pruebas moleculares para identificar la actividad de la tirosinasa, que permitan conocer si el problema se da a este nivel.

Posiblemente existe un problema de señalización celular que no permite el desarrollo de melanóforos funcionales en el LO de las larvas que se encuentran expuestas a algún tipo de desbalance nutricional o a condiciones de estrés ambiental, que dan como resultado a los peces pseudoalbinos. En relación a los peces mancados, se puede asumir que hay melanóforos, algunos con capacidad para sintetizar melanina y otros que se encuentran en un estado de reposo.

Como se mencionó en el capítulo anterior, es evidente que en esta especie se lleva a cabo la migración y diferenciación de los melanóforos juveniles, aun en los peces pseudoalbinos, sin embargo, existe algún problema con la señalización para que los melanóforos del lado ciego desaparezcan y para que se lleve a cabo la melanización del lado oculado.

Después de analizar los tejidos de los peces pigmentados y pseudoalbinos y de los análisis histológicos para identificar los melanóforos en los peces pseudoalbinos, se puede concluir que en estos peces, las células pigmentarias están presentes, hay cierta cantidad de tirosinasa y el proceso de melanización se encuentra bloqueado. Esta hipótesis coincide con lo que mencionan Matsumoto y Seikai (1992), quienes argumentan que las anomalías pigmentarias en el lenguado japonés (*P. olivaceus*) son el resultado de la alteración de los mecanismos responsables de la estructura asimétrica de la piel y que esto posiblemente bloquean el desarrollo de los melanóforos adultos funcionales. En el lenguado de California aun no se identifica

que tipo de factores son los que determinan este desbalance, sin embargo, con los resultados de este ensayo es posible argumentar que en los peces pseudoalbinos el ambiente celular es similar en la piel del LC y el LO.

Para conocer si realmente se llevan a cabo este tipo de procesos dentro de los melanóforos del lenguado de California y relacionarlo con las posibles deficiencias de la dieta de los juveniles, es necesario realizar estudios más específicos. Hasta este momento los resultados de la cuantificación de la enzima tirosinasa son una primera aproximación para tratar de identificar los mecanismos que producen el pseudoalbinismo en el lenguado de California y posiblemente sea necesario afinar la técnica de extracción de la enzima. Para obtener más información de los procesos inhibitorios de la melanización se pueden realizar cultivos celulares, con el fin de efectuar pruebas de inmunoquímica y biología molecular, para identificar y cuantificar el RNA_m de la tirosinasa por medio de PCR y de esta forma corroborar la expresión génica de la enzima e intentar elucidar a qué nivel se regula su actividad.

Capítulo VI

Conclusiones

- Las anomalías pigmentarias en el lenguado de California, son el resultado de un problema multifactorial.
- La ontogenia pigmentaria de esta especie, es similar a la de otros peces planos ya que muestra una clara sustitución de melanóforos larvales por melanóforos adultos después de la metamorfosis, sin embargo, en los peces con problemas de pigmentación anormal parece haber anomalías en el primer paso del proceso de melanización, las células pigmentarias se diferencian y migran, pero no son capaces de sintetizar melanina.
- El requerimiento de DHA para esta especie, es bajo o casi nulo antes de la metamorfosis, pues al disminuir las tasas de crecimiento durante esta etapa, el requerimiento de DHA puede disminuir y puede ser cubierto por las reservas endógenas y por el aporte de la dieta a partir de la primera alimentación, en este caso durante la etapa de alimentación con rotíferos.
- Se observó un efecto positivo en la pigmentación con el nivel de DHA alto (15% de los TAG), ya que se logró aumentar el porcentaje de peces pigmentados al día 50 dde, en comparación con los resultados observados en experiencias de cultivo anteriores en el laboratorio. También se obtuvo un aumento en el porcentaje de sobrevivencia con el tratamiento de DHA alto en relación a otros estudios.
- De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio se determinó que el requerimiento de DHA en el lenguado de California de 75 dde es de 2.49% del TAG en la dieta o 14.08% de DHA del TAG en la emulsión.
- No se observó un efecto claro en la pigmentación al exponer a los peces a distintas intensidades de luz UV, mientras que si se registró un efecto en el crecimiento y la sobrevivencia a los 50 y 75 dde en los peces expuestos al tratamiento de 100% UV.

- No se observó un efecto inductor de la luz UV en la síntesis de melanina en los melanóforos de los peces con pigmentación anormal, debido posiblemente a que el mecanismo de melanización está inhibido.
- Se encontró y cuantificó la actividad de la enzima tirosinasa en los tejidos de peces pigmentados y pseudoalbinos, tanto en el lado ciego como en el lado oculado. Esto sugiere que los melanóforos no reciben la estimulación adecuada para desaparecer del lado ciego de juveniles y que estas células en el lado oculado de peces con pigmentación anormal cuentan con la enzima pero no se lleva a cabo el proceso de melanización. Es probable que esto se deba a un proceso como la ubiquitinación o del estrés oxidativo que degrada la enzima tirosina.
- En resumen con base en los resultados del presente estudio, el problema de pigmentación anormal en el lenguado de California está relacionado con una inadecuada señalización celular que no permite la correcta distribución de las células pigmentarias de forma asimétrica en el cuerpo del pez y por la inhibición del proceso de melanización en los melanóforos. El proceso de melanización puede restablecerse con el estímulo adecuado y es posible que esto ocurra cuando las condiciones del cultivo cambian, ya que los peces pueden melanizarse después del destete.

Referencias

Allen, M.J. 1982. Functional structure of soft bottom fish communities of Southern California shelf. Ph.D. dissertation, Univ. Calif., San Diego, La Jolla CA. 557 p.

Alvial, A., Manriquez, J. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture*. 176:65-73.

Allen, L.G., 1988. Recruitment, distribution, and feeding habits of young of the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay Long Beach, California 1983–1985. *Bulletin Southern California Academy of Science* 87:19–30.

Ando, H., Itoh, A., Mishima, Y., Ichihashi, M. 1995. Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents. *J. Cell. Physiol.* 163:608–614.

Ando, H., Watabe, H., Valencia, J. C., Yasumoto, K., Furumura, M., Funasaka, Y., Oka, M., Ichihashi, M., Hearing, V. J. 2004. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 279: 15427–15433.

Ando, H., Wen, Z. M., Kim, H. Y., Valencia, J. C., Costin, G. E., Watabe, H. 2006. Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin–proteasome pathway. *Biochem. J.* 394: 43–50

Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M., Hearing V. J. 2007. Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*.127: 751–761.

Bagnara, J. T., Hadley, M. E. 1979. *Chromatophores and Color Change: the Comparative Physiology of animal Pigmentation*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall. 389p.

Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227: 211–220.

Benneti, D. 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlana*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture* 176: 39-49.

Bengtson, D. A. 1999. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current search and future research priorities. *Aquaculture*. 176: 39-49.

Bolker, J. A., Hill, C. R. 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* 56: 1029-1052.

Branker, M. 2000. Enfoque veterinario de la cría de halibut. En: Brown, L. (ed.). *Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces*. Acribia, S. A. España. 256p.

Busca, R., Bertolotto, C., Ortonne, J. P., Ballotti, R. 1996. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/p70S6-Kinase Pathway Induces B16 Melanoma Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 31824-31830.

Camacho, F. 2001. Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. *Clin Dermatol.* 47: 441-448.

Choi, T. Y., Kim, J. H., Ko, D. H., Kim, C. H., Hwang, J. S. Ahn, S., Kim S. Y., Kim, C. D., Lee, J. H., Yoon, T. J. 2007. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pig. Cell Res.* 20: 120-127.

Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304.

De Silva, S.S., Anderson, T.A., 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*, first ed. Chapman and Hall, London. 298p.

Dickey-Collas, M., Geffen, A.J., 1992. Importance of the fatty acids 20:5 N3 and 22:6 N3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Marine Biology*. 113: 463–468.

Eschemeyer, W.N., E.S. Herald y H.Hamman, 1983. A field guide to Pacific coast fishes or North America, Houghton Mifflin Co., Boston, MA. 336 p.

Estévez, A., Kanazawa, A., 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. *Fisheries Science* 62: 88–93.

Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180: 321–343.

Estévez, A., T.Kaneko, T. Seikai, M. Tagawa y M. Tanaka. 2001. ACTH and MSH production in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae fed arachidonic acid-entiches live prey. *Aquaculture*. 192: 309:319.

Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227: 191–210.

Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.

Frey, H.W. 1971. California's living marine resources and their utilization. Calif. Dept. Fish and Game, Sacramento, CA. 148p.

Fujii R. 1969. Chromatophores and pigments. In: Hoar WS, Randall DJ. *Fish Physiology*, vol. 3. New York: Academic Press. 307–353 p.

Fujii R. 1993. Coloration and chromatophores. En: Evans DH. *The Physiology of Fish*. Boca Raton, FL: CRC Press. 535–562 p.

Fujii. R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment cell research*. 13: 300-319.

Furusawa, T., 1997. Key problems of sea-farming associated with its perspective. In: Minami, T., Tanaka, M. (Eds.), *Biology and Stock Enhancement of Japanese flounder*. Koseisha Koseikaku, Tokyo. 117– 126 p.

Gisbert, E., Merino, G., Muguet, J.B., Bush, D., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *Journal of Fish Biology* 61: 1217–1229.

Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E. 2004. Ontogenic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232: 455-470.

Gordon, P.R., Mansur, C. P., Gilchrest, B. A. 1989. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol.* 92(4): 565-72.

Guo, H., Huand, B., Zhang, S., Qi, F. 2003. Biochemical and histological activities of tyrosinase in the skin of normal and albino turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiology and Biochemistry.* 29: 67-76.

Hamre, K., Opstad, I., Espe, M., Solbakken, J., Hemre, G.-I., Pittman, K., 2002. Nutrientcomposition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquaculture Nutrition* 8: 139–148.

Hamre, K., Holen, E., Moren, M., 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypothesis. *Aquaculture Nutrition* 13: 65–80.

Harel, M., Koven, W., Lein, I., Bar, Y., Behrens, P., Stubblefield, J., Zohar, Y., Place, A.R., 2002. Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. *Aquaculture* 213: 347–362.

Hockberger. P. E. 2002. A History of Ultraviolet Photobiology for Humans, Animals and Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology.* 76(6): 561–579.

Honeyman, J. 2002. Efecto de las radiaciones ultravioleta en la piel. *Revista Peruana de Dermatología.* 2: 13-20.

Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R., Watanabe, T., 1992. Effect of n-3 HUFA levels in Artemia on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105: 73–82.

Jiménez-Cervantes, C., Martínez-Esparza, M., Perez, C., Daum, N., Solano, F., García-Borrón, J. C. 2001. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *Journal of Cell Science*. 114: 2335-2344.

Kadekaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., Abdel-Malek, Z. A. 2003. Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who Will Win the Final Round?. *Pigment Cell Res*. 16: 434-447.

Kanazawa, A. 1993. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flounder. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 162–166.

Kim, Y. J., Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for future. *Cell. Mol. Life Sci*. 62: 1707-1723.

Kong, K.H., Park, S.Y., Hong, M.P., Cho, S.H. 2000. Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125: 563–569.

Koven, W., 2003. Key factors influencing juvenile quality in mariculture: a review. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh* 55: 283–397.

Kramer, S.H. y J.R. Hunter. 1987. Southern California wetland shallow water habitat investigation annual report for fiscal year 1987. U.S. Dept Commerce, Natl. Oceanic & Atmos. Admin. Natl. Mar. Fish. Serv. Southw. Fish. Cen. La Jolla CA. 12 p.

Lazo, J. P. 2007. Desarrollo del cultivo de lenguado, *Paralichthys californicus*: avances sobre la fisiología digestiva y nutrición de larvas y juveniles. *Aquamar Internacional*. Boca del Río, Veracruz. 118p.

Matsumoto, J., Seikai, T. 1992 Asymmetric pigmentation and pigment disorders in pleuronectiformes (Flounders). *Pigment Cell Res.*, Suppl. 2: 275–282.

Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., Pelka, D.J.R., 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* 38: 514–515.

Miki, N., Taniguchi, T., Hamakawa, H., Yamada, Y., 1990. Reduction of albinism in hatchery-reared flounder 'hirame' *Paralichthys olivaceus* by feeding on rotifer enriched with vitamin A. *Suisanzoshoku* 38: 147–155.

Nakamura K., Ozaki, A., Akutsu, T., Iwai, K., Sakamoto, T., Yoshizaki, G. and Okamoto, N. 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetic Genomics* 265(4): 687–693.

Naess, T., Lie, Ø., 1998. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet. *Aquaculture Research* 29: 925–934.

Pathak. J. 1996. Sunscreens: Progress and perspectives on photoprotection of human skin against UVB and UVA radiation. *J Dermatol.* 23: 783-800.

Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquaculture International* 2: 33–48.

Rhodes, L. E. 1998. Topical and systemic approaches for protection against solar radiation-induced skin damage. *Clin Dermatol.* 16: 75-82.

Rønnestad, I., Hemre, G. I., Finn, R. N. y Lie, Ø. 1998a. Alternate sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A.* 119: 787–793.

Rungta, D., Corn, T. D., Fuller, B. B. 1996. Regulation of Tyrosinase mRNA in Mouse Melanoma Cells by α -Melanocyte-Stimulating Hormone. *Journal of Investigative Dermatology.* 8: 689-693.

SAGARPA. 2001. Programa Sectorial de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001-2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 104 p.

Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA. 153–218 p.

Seikai, T. 1985. Reduction in occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery reared on wild zooplankton. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51: 1261–1267.

Seikai, T., 1991. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Japanese Journal of Ichthyology* 39: 85–92.

Seikai, T. y Matsumoto, J. 1994. Mechanism of pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation. *Journal of the World Aquaculture Society* 25: 78–85.

Seikai, T., Shimozaki, M., Watanabe, T. 1987. Estimation on larval stage determining the appearance of albinism in hatcheryreared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 53: 1107–1114.

Sorgeloos, P., Lavens, P., Le, P., Tackarert, W., Veerlichele, D., 1986. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Documento de campo 10. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-ITA-LIA. Universidad de Estado de Gent, Bélgica. 210p.

Soutar, R. 2000. Enfoque veterinario de la cría del rodaballo. En: L. Brown (ed.). *Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces*. Acribia, S.A. España 343-356 p.

Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K., Nakazoe, J., 1995. The effect of b-carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 61: 141–148.

Villalta (a), M., Estevez, A. y Bransden, M.P. 2005 Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245: 193–209.

Villalta (b), M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005. The effect of graded concentration of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249: 353–365.

Villalta (c), M., Estevez, M. P., Brandsen, M. P., Bell, G. 2005. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. *Aquaculture Nutrition*. 13: 1–10.

Villalta, M., Estévez, A., Brandsen, M. P. y J.G. Bell. 2008. Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* 2008 14: 120–128.

Youson, J.H., 1988. Fish metamorphosis. In: Hoar, W.S., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiology Col. XI. B*. Academic Press, New York. 135–196 p.

Zacarías-Soto, M., 2007. Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema. Tesis de Doctorado. CICESE. 158 p.

Zacarías-Soto, M., Muguet, J.B., Lazo, J.P., 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society* 37 (2): 175–185.

Zagarase. H., Williamson C. E. 2001. The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish and Fisheries*. 2 : 250–260