



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis transcriptómico para identificar genes biomarcadores del estado nutricional en la dorada (*Sparus aurata*): efecto de la sobreexpresión hepática de SREBP-1a

Jonás Ismael Silva Marrero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO PARA IDENTIFICAR GENES
BIOMARCADORES DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA
DORADA (*SPARUS AURATA*):
EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN
HEPÁTICA DE SREBP-1a

JONÁS ISMAEL SILVA MARRERO 2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO PARA IDENTIFICAR GENES
BIOMARCADORES DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA
DORADA (*SPARUS AURATA*):
EFECTO DE LA SOBREENEXPRESIÓN
HEPÁTICA DE SREBP-1a

Memoria presentada por Jonás Ismael Silva Marrero para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona

Ma. Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

JONÁS ISMAEL SILVA MARRERO 2017

**Este trabajo está dedicado a una persona excepcional,
heroína anónima que fue pilar de toda una familia
como un increíble ejemplo de trabajo y dedicación,
Juana Francisca Paragüiche, mi querida abuela,
que se despidió del plano terrenal
cuando emprendí un viaje con un sueño
y que culmina con esta tesis doctoral. Gracias abuelita.**

AGRADECIMIENTOS

Todo logro humano es producto de un gran esfuerzo colectivo en el que participan muchas personas en pro de una tarea, que por su naturaleza y complejidad, sería imposible lograr por una única persona. Es por ello que la mayoría de las empresas humanas no podrían llevarse a cabo sin la voluntaria (o a veces involuntaria) participación de la sociedad a la que pertenecemos, de la familia, maestros, tutores, colegas, amigos, algunos desconocidos y uno que otro loco que también presta su granito de arena sin siquiera darse cuenta. En definitiva, sólomente con todo el andamiaje de relaciones humanas y sociales es que los seres humanos podemos desarrollar tareas que no sólo redundan en un beneficio personal sino que trascienden y dejan un legado en la sociedad. En este sentido, el trabajo que aquí se presenta es consecuencia de ese enorme esfuerzo colectivo que en este momento me tocó a mí sacar adelante para la profundización del conocimiento científico, proceso de acumulación de conocimiento que nunca se detiene ni detendrá hasta que dejemos de existir como especie, y que ayuda a que la sociedad (y nosotros con ella) avance.

Tener tan pocas páginas para agradecer a tantas personas puede resultar a veces sumamente injusto y legar a una sólo persona la recopilación de todas esas ayudas también, sobretodo cuando tenemos mala memoria, ya que corremos el riesgo que alguien no sea mencionado. Sin menosprecio de todo aquel que pudiese verse excluído injustamente de esta lista hago mención a todas aquellas personas que considero han sido fundamentales para que esta tesis haya llegado a buen término.

En primer lugar, quisiera agradecer a quienes son la razón de que yo esté acá, mis padres, María Isabel y Tomás Roberto, sin ustedes sencillamente no existiría; pero más allá de ese hecho biológico irrefutable, la verdad es que sin su apoyo, amor y comprensión desde que fui concebido sencillamente nada de esto hubiese sido posible. Sé que tanto para ustedes como para mí, han sido particularmente duros estos 6 años de distancia, pero sin ustedes no hubiese sido posible lograr nada de lo que hasta ahora he conseguido. En segundo lugar, quiero agradecer a mi hermano "Tomache", ese ser increíblemente noble que desde que tengo conciencia, siempre ha estado a mi lado para apoyarme, jugar, divertirnos, hacerle una que otra maldad y quererme; hermanito gracias a tu apoyo pude venir, cuando necesitaba sacar papeles tú lo hiciste y también has tenido la oportunidad de venir tres veces a acompañarme en aventuras por España, gracias.

En este mismo sentido quiero agradecer a mi madrina Leyda Fuenmayor, que como le dije en algún momento era mi segunda mamá y que al igual que el resto de mi familia siempre ha estado allí a mi lado con su amor, apoyo incondicional y consintiéndome con cachapitas y cosas ricas que espero pronto volver a compartir y que pronto pueda venir a conocer España. En mi familia no puedo dejar de lado a mi abuelo Manuel, quien con sus 90 años aún sigue fuerte y apoyándome y a mi

primo José Ramón, quién es el único que vive en Cataluña y con el que he vivido muy buenas experiencias. También quiero agradecer al resto de mi familia, porque sé que todos me han apoyado, a los Marrero Paragüiche, los Silva y los Moreno.

En los primeros días de estar en Barcelona conocí a una persona, que sin saberlo en ese momento llegaría a ocupar un puesto principal en mi familia y que al igual que el resto ha estado a mi lado incondicionalmente. Maryury definitivamente sin el amor que me das no hubiese podido resistir las embestidas de escribir una tesis con cordura, gracias por todo. Así mismo, quiero agradecerle a Belkis por haberme aceptado en su familia y por todas las atenciones que ha tenido en este tiempo en el que he compartido con su hija.

Cuando llegué a la Universidad de Barcelona no tenía claro qué venía a hacer y hasta dónde era posible llegar. En ese momento Pepita fue quien guió mis primeros pasos y siempre estuvo allí para cualquier carta o documento que pudiese necesitar con ese particular pero alegre “¿ahora que pasa?” que demostraba sus ganas de ayudar a los estudiantes. Gracias a Pepita contacté con Maribel, quien me recibiría en el seno de su grupo de investigación y con su estilo calmado y gentil, de una persona verdaderamente buena y sabia, ha sabido guiar los pasos de numerosos tesisistas entre los cuales tengo el honor de cerrar la lista.

Con Maribel conocí a Isidoro, un excelente jefe, investigador y docente del cual he tenido la oportunidad de aprender y crecer profesionalmente, además de que como persona en los momentos apremiantes ha estado allí para prestar incondicionalmente su apoyo. Lo único que lamentaría es no poder seguir trabajando contigo porque me gusta tu forma de dirigir y me parece que aún me quedaría mucho por aprender y quizás entablar una que otra charla de política. Tanto a Isidoro como a Maribel tengo que agradecer todo el apoyo recibido durante estos años y sobretodo el haberme permitido postular a una beca y desarrollar esta tesis.

Aprender todas las técnicas necesarias para poder desarrollar una tesis no es posible sin la colaboración de quienes antes ya han pasado por esta experiencia. La primera persona de la cual aprendí fue de Mari, que con su ternura y alegría hizo que empezar a aprender fuese fácil. Luego vinieron Ivan Vieigas y Marina Giralt, ejes principales de mi formación y crecimiento en este laboratorio. Con ustedes aprendí con rigor casi todas las técnicas que manejo y pude conocer en primera persona todas sus facetas, como la de “Marinetor”, que son buenos recuerdos para compartir unas cervezas. Así mismo, sin Albert Caballero no hubiese sido posible realizar ningún experimento, porque sin peces hubiese sido realmente difícil. Gracias a ti y a Felipe pude aprender todo lo relativo a las doradas, las dietas y los acuarios, conocimiento que valoro sobremanera porque complementa mi formación como biólogo molecular con conocimientos en acuicultura.

Alberto y yo éramos compañeros de Máster y del mismo grupo al tiempo, lo que nos permitió crecer y aprender a la par las técnicas. De hecho, parte de esta tesis es fruto de ese trabajo colaborativo que ambos desarrollamos. Contigo no sólo aprendí desde el punto de vista profesional sino también personal, por lo que tuve la oportunidad de crear fuertes vínculos no sólo contigo, sino también con tu esposa Nancy a quien también quisiera agradecer. A mitad de camino se incorporó como tesista Carlos, con quien también he aprendido técnicas y he colaborado en parte del trabajo de esta tesis. También es importante mencionar a todos aquellos pequeños pero no menos importantes aportes que han hecho los estudiantes de trabajos dirigidos, máster y estancias a los que hago mención y de los cuales también he tenido la oportunidad de aprender: Isadora, Ana Siles, Anne, Ana, Aline, Sedighe, Meis, Rhand, Margalida, Andrea, Alberto, Manel, Juliana, María y Carlota.

Es importante reconocer el trabajo que realiza todo el personal que labora en la sección de Bioquímica y Biología Molecular, empezando por el personal de limpieza que madruga para que tengamos un lugar más habitable. También es fundamental el trabajo en la secretaría, María José, Brugues y Maite, y aquellos otros que estuvieron pero que por diversos motivos ya han cogido otros caminos. Sin el aporte de los técnicos, Quim y Andrés, no sería posible resolver los cientos de contingencias que ocurren en el día a día. Así mismo es importante resaltar el aporte de los profesores y directores, y sobretodo a todos los compañeros que aún desarrollan sus tesis y a los que ya han ido saliendo, ya que siempre contamos con ustedes para salir de apuros en medio de un experimento.

Agradezco a las Dras. Montserrat Miñarro y Anna Fàbregas del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Físicoquímica de la Facultad de Farmacia por la colaboración prestada con las nanopartículas de quitosán usadas en esta tesis; y al Dr. Diego Haro del Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía de esta misma facultad, quién nos cedió gentilmente el plásmido pSG5-SREBP1a.

No quiero dejar de mencionar a mis amigos que siempre me han apoyado desde la distancia y algunos que se han sumado a la vida en Barcelona: Yohan, Patricia, María, Richard, Marcial y Karina pero especialmente a Jorge Veloso, quien es el artista que está detrás de la portada de esta tesis. A mis compañeros de piso pero especialmente a Jahir, José y Diego con los que más tiempo he convivido y tuve la oportunidad de forjar una amistad. Y a los amigos del máster y del doctorado con los que he podido compartir estos años, especialmente a los del grupo de *Whatsapp* "almuerzo": Lili, Eloy, Yesi y Ceci.

A Asunción, quien me recibió en aquella época del año 2011 y a Angela, una excelente persona con la que he compartido unas charlas muy interesantes y que siempre me ha apoyado.

Por último, pero imprescindible, he de agradecer a la ciudad de Barcelona por ser el centro de todas las experiencias y aprendizajes obtenidos. Al estado venezolano por darme la formación de calidad necesaria de forma gratuita que me proporcionó las bases intelectuales para sacar adelante esta tesis, y por subsidiar parte de mi estancia y de mis estudios; y al estado español por haberme concedido la beca FPU, indispensable para poder sacar adelante este trabajo.

TABLA DE ABREVIATURAS

A-Z

18s	Subunidad 18s ribosomal
6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AGPAT	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
Apo	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferasa
CE	Colesterol esterasa
CO	Colesterol Oxidasa
COX	Citocromo c Oxidasa
CPT	Carnitina palmitiltransferasa
Ct	Ciclo umbral
DE	Desviación Estándar
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EF1 α	Elongation factor 1 α
ELOVL	Elongasa de ácidos grasos de cadena larga
EST	Expressed sequence tag
F-2,6-P ₂	Fructosa-2,6-bisfosfato
FABP	Fatty acid binding protein
FADSD6	Desaturasa- Δ 6 de ácidos grasos
FASN	Síntasa de ácidos grasos
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
FC	Veces de cambio (Fold Change)
FFA	Ácidos grasos libres
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gb	Gigabases
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
GK	Glucoquinasa
GO	Ontología génica
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GPO	Glicerolfosfato Oxidasa
HADH	L-3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HLL	Dieta de alto contenido en proteína, bajo contenido en lípidos, bajo contenido en carbohidratos
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
KEEG	Enciclopedia de genes y genomas Kyoto
LCAT	Lecitin:colesterol aciltransferasa

LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LHH	Dieta de bajo contenido en proteína, alto contenido en lípidos, alto contenido en carbohidratos
LLH	Dieta de bajo contenido en proteína, bajo contenido en lípidos, alto contenido en carbohidratos
LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa / <i>1-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine acyltransferase</i>
LPL	Lipoproteín Lipasa
LXR	Liver X receptor
Mb	Megabases
MDH	Enzima Málica/Malato deshidrogenasa
MHL	Dieta de contenido medio en proteína, alto contenido en lípidos, bajo contenido en carbohidratos
MLH	Dieta de medio contenido en proteína, bajo contenido en lípidos, alto contenido en carbohidratos
NGS	Next-generation sequencing
pb	Pares de bases
PGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEMT	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK-1	6-Fosfofructo-1-quinasa
PFKFB	6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PK	Piruvato quinasa
POD	Peroxidasa
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
PVDF	Membrana de difluoruro de polivinilideno
RIN	RNA integrity number
RNAseq	Secuenciación del RNA
RT-qPCR	Transcriptasa inversa- PCR cuantitativa
SCAP	Cleavage-activating protein
SCD	Stearoyl Δ 9 fatty acid desaturase
SDS	Dodecíl sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecíl sulfato sódico
SREBP	Sterol Regulatory-Element Binding Protein
TPI	Triosa Fosfato Isomerasa
TPP	Tripolifosfato
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Lista de genes anotados mediante análisis transcriptómico

A-Z

ABCG2	ATP-Binding Cassette Sub-Family G Member 2-Like
ACAT2	Acetyl-Coa Acetyltransferase, Cytosolic-Like
ACC1tv1	Acetyl Coa Carboxilase 1 Transcript Variant 1
ACC1tv2	Acetyl Coa Carboxilase Transcript Variant 2
ACC2	Acetyl Coa Carboxilase 2
ACER2	Alkaline Ceramidase 2
ACO2	Aconitate Hydratase, Mitochondrial-Like Isoform X2
ACSBG2	Long-Chain-Fatty-Acid--Coa Ligase ACSBG2 Isoform X2
ACSL1	Long-Chain-Fatty-Acid-Coa Ligase 1 Isoform X2
ACSS2	Acetyl-Coenzyme A Synthetase Cytoplasmic Isoform X2
AGPAT3	1-Acyl-Sn-Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gamma
AHSG	Endocytosis Alpha-2-HS-Glycoprotein
ALDH1L1	Cytosolic 10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase-Like
APOA1	Apolipoprotein A-I
APOA4	Apolipoprotein A IV
APOB	Apolipoprotein B
APOC1A	Apolipoprotein C-I Acidic Form-Like
APOD	Apolipoprotein D-Like
ARG2	Arginase, Non-Hepatic 2
ARG2-A	Notothenia Coriiceps Arginase, Non-Hepatic 1-Like, Partial mrna
ATP5A1	ATP Synthase Subunit Alpha, Mitochondrial
ATP5B	ATP Synthase Subunit Beta, Mitochondrial
ATP5D	ATP Synthase Subunit Delta, Mitochondrial
ATP5G3	ATP Synthase F0 Complex Subunit C3, Mitochondrial
ATP5I1	ATP Synthase Subunit E Isoform 1, Mitochondrial
ATPIF1	ATPase Inhibitor, Mitochondrial
BAAT	Bile Acid-Coa:Amino Acid N-Acyltransferase-Like
C3	Complement Component C3
CBX4	E3 SUMO-Protein Ligase CBX4-Like
CD28	T-Cell-Specific Surface Glycoprotein CD28
CD9	CD9 Antigen-Like Isoform X2
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein Isoform X2
CHIA	Acidic Mammalian Chitinase-Like
CHIA2	Acidic Mammalian Chitinase-Like Isoform X2
COQ10	Coenzyme Q-Binding Protein COQ10, Mitochondrial
COX18	Mitochondrial Inner Membrane Protein COX18
COX4I2	Cytochrome C Oxidase Subunit 4 Isoform 2, Mitochondrial
COX5A2	Cytochrome C Oxidase Subunit 5A Isoform 2
COX5B1	Cytochrome C Oxidase Subunit 5B Isoform 1

COX6A2	Cytochrome C Oxidase Subunit 6A2, Mitochondrial
COX6B1	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B1
COX6B1B	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B1 Isoform B
COX7A2	Cytochrome C Oxidase Subunit 7A2, Mitochondrial-Like
COX8B	Cytochrome C Oxidase Subunit 8B, Mitochondrial
CPT1A	Carnitine O-Palmitoyltransferase 1a
CPT1B	Carnitine O-Palmitoyltransferase 1 Muscle Isoform Isoform X2
CRYL1	Lambda-Crystallin Homolog Isoform X2
CTPS1	CTP Synthase 1
CYCS	Cytochrome c
CYP7A1	Cholesterol 7-Alpha-Monooxygenase
DGAT1	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase
DYRK4	Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase 4-Like Isoform X3
EBP	3-Beta-Hydroxysteroid-Delta8,Delta7-Isomerase Isoform X2
ELOVL4	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 4-Like Isoform X1
ELOVL5	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 5
ELOVL6	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6
ELOVL6	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6
ERG28	Probable Ergosterol Biosynthetic Protein 28-Like Isoform X1
ETFB	Electron Transfer Flavoprotein Subunit Beta
FABP	Fatty Acid-Binding Protein
FABP3	Fatty Acid Binding Protein 3 Muscle And Heart
FADSD6	Fatty Acid Delta-6 Desaturase Splice Variant 5
FASN	Fatty Acid Synthase
FDFT1	Squalene Synthase Isoform X1
FDPS	Farnesyl Pyrophosphate Synthase
FEN1	Flap Endonuclease 1 Isoform X1
FILIP1L	Filamin-A-Interacting Protein 1-Like
GCDH	Glutaryl-Coa Dehydrogenase, Mitochondrial-Like
GCNT7	Beta-1,3-Galactosyl-O-Glycosyl-Glycoprotein Beta-1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase 7
GDF15	Growth/Differentiation Factor 15
GLS2	Glutaminase Liver Isoform, Mitochondrial
GPAT3	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3
GPD1	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase [NAD+] Cytoplasmic
H6-FABP	Fatty Acid Binding Protein H6 Isoform
HACD3	Very-Long-Chain 3R-3-Hydroxyacyl-Coa Dehydratase 3
HADH	Hydroxyacyl-Coa Dehydrogenase
HADHA	Trifunctional Enzyme Subunit Alpha, Mitochondrial Isoform X2
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase A Isoform X1
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-Coa Synthase, Cytoplasmic-Like Isoform X1
IDH2	Larimichthys Crocea Isocitrate Dehydrogenase , Mitochondrial, mrna

IDI1	Isopentenyl-Diphosphate Delta-Isomerase 1-Like Isoform X1
IGFBP1	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1
LCAT	Phosphatidylcholine-Sterol Acyltransferase
LCNL1	Lipocalin-Like
LCNL1	Lipocalin-Like
L-FABP/FABP1	Liver-Basic Fatty Acid Binding Protein
LIPC	Hepatic Triacylglycerol Lipase-Like Isoform X2
LXR-A	Oxysterols Receptor Lxr-Alpha Isoform X2
MCM6	Minichromosome Maintenance Complex Component 6
MFSD2A	Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein 2a
MOGAT2	2-Acylglycerol O-Acyltransferase 2
MSMO1	Methylsterol Monooxygenase 1
MT-ND1	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 1
MT-ND2	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 2
MT-ND4	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 4
MT-ND5	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Chain 5
MVD	Diphosphomevalonate Decarboxylase
MVD	Diphosphomevalonate Decarboxylase
NAAA	N-Acylethanolamine-Hydrolyzing Acid Amidase
NDUA4	NADH Dehydrogenase 1 Alpha Subcomplex Subunit 4
NDUFA10	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 10, Mitochondrial
NDUFA11	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 11
NDUFA4L2	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Subunit 4-Like 2
NDUFAF3	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha Subcomplex Assembly Factor 3
NDUFB8	NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Beta Subcomplex Subunit 8, Mitochondrial
NDUFS1	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 75 Kda Subunit, Mitochondrial-Like
NLRP12	NACHT, LRR And PYD Domains-Containing Protein 12-Like, Partial
ORC2	Origin Recognition Complex Subunit 2-Like Isoform X3
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHYH	Phytanoyl-Coa Dioxygenase Peroxisomal Isoform X1
PIM2	Pim-2 Oncogene
PISD	Phosphatidylserine Decarboxylase Pisd, Transcript Variant X3
PLA2	Phospholipase A2
PLA2G12A	Group XIIA Secretory Phospholipase A2
PLA2G15	Group XV Phospholipase A2-Like
PLA2G1B	Phospholipase A2 Major Isoenzyme
PLA2G7	Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Isoform X2
PNLIPRP1	Inactive Pancreatic Lipase-Related Protein 1-Like Isoform X1
PNPLA2	Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 2
PNPLA2-X3	Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 2 Isoform X3
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PRIM1	DNA Primase Small Subunit
PRODH	Proline Dehydrogenase 1, Mitochondrial-Like

PYCARD	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD Isoform X2
RBP2	Retinol-Binding Protein 2 Isoform X1
RBP5	Retinol-Binding Protein 5
RDH12	Retinol Dehydrogenase 12
RFC2	Replication Factor C Subunit 2
RRM1	Ribonucleoside-Diphosphate Reductase Large Subunit
RXR-G	Retinoic Acid Receptor rxr-Gamma-B
SCD	Acyl-Coa Desaturase-Like
SCD-X1	Acyl-Coa Desaturase Isoform X1
SCO1	Protein SCO1 Homolog, Mitochondrial
SDHAF4	Succinate Dehydrogenase Assembly Factor 4, Mitochondrial
SLC22A6	Solute Carrier Family 22 Member 6-Like Isoform X1
SLC25A20	Mitochondrial Carnitine/Acylcarnitine Carrier Protein Isoform X2
SLC25A25	Calcium-Binding Mitochondrial Carrier Protein Scamc-2-A-Like
SLC25A36	Solute Carrier Family 25 Member 36-A-Like
SLC25A6	ADP/ATP Translocase 3
SOAT2	Stegastes Partitus Sterol O-Acyltransferase 2, mrna
SQLE	Squalene Monooxygenase
TDH	L-Threonine 3-Dehydrogenase, Mitochondrial-Like
TM7SF2	Delta 14-Sterol Reductase Isoform X1
TRIM21	E3 Ubiquitin-Protein Ligase TRIM21
TRIM39	E3 Ubiquitin-Protein Ligase TRIM39-Like
UQCC1	Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Complex Assembly Factor 1
UQCR11A	Cytochrome B-C1 Complex Subunit 10 Isoform A
UQCRC1	Cytochrome B-C1 Complex Subunit 1, Mitochondrial
UQCRC2	Cytochrome B-C1 Complex Subunit 2, Mitochondrial
UQCRH	Cytochrome B-C1 Complex Subunit 6, Mitochondrial-Like
USP18	Ubiquitin Specific Peptidase 18
XPO1	Exportin-1 Isoform X1

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	5-36
1.1 ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA	7
1.2 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PECES	9
1.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES	12
1.4 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN PECES	13
1.4.1 Lipogénesis.....	15
1.4.2 Digestión y catabolismo lipídico	18
1.4.3. Transporte de lípidos	20
1.4.4. Regulación nutricional del metabolismo lipídico en peces	21
1.5. SREBP	22
1.6. CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.....	24
1.7 TRANSCRIPTÓMICA	27
1.7.1 DNA, RNA y expresión génica	27
1.7.2 <i>Next-generation sequencing</i>	28
1.7.3 Sistemas de clasificación de productos génicos	30
1.8 <i>MICROARRAYS</i> DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	31
1.9 EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS.....	33
1.9.1 Nanopartículas de quitosán como vehículo para la expresión de genes	34
2 OBJETIVOS	37-40
3 MATERIALES Y MÉTODOS	41-79
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	43
3.2 CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS PECES.....	44
3.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	45
3.3.1 Elaboración de las dietas.....	45
3.3.2. Experimento 1: obtención del transcriptoma de dorada para la realización de estudios nutricionales.....	45
3.3.3 Experimento 2: efecto metabólico de la sobreexpresión transitoria de SREBP-1a en hígado de dorada.....	47
3.4. PLÁSMIDOS	48
3.4.1. Digestión con enzimas de restricción.....	48
3.4.2. Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA	48
3.4.3. Obtención de extremos romos de dna mediante <i>fill-in</i> y ligación de fragmentos de DNA	49
3.4.4 Obtención de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	50
3.4.5. Transformación bacteriana	51
3.4.6. PCR <i>screening</i>	52
3.4.7. Obtención DNA plasmídico	52

3.4.8. Secuenciación de DNA	53
3.5. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DNA-QUITOSÁN-TPP	53
3.6 MANIPULACIÓN, SACRIFICIO DE DORADAS Y COLECCIÓN DE MUESTRAS	54
3.7 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	55
3.7.1 Determinación de glucosa sérica	55
3.7.2 Determinación de triglicéridos en suero	55
3.7.3 Determinación de colesterol en suero	56
3.7.4 Determinación de glucógeno en hígado	57
3.7.5 Determinación de actividades enzimáticas	57
3.8 EXTRACCIÓN DE RNA	65
3.9 TRANSCRIPCIÓN INVERSA	66
3.10 PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR).....	66
3.11 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO	69
3.11.1 Ensamblado de secuencias y anotación	70
3.12 <i>MICROARRAYS</i>	71
3.12.1 Fabricación, hibridación y análisis de <i>microarrays</i>	71
3.12.2 Análisis funcional	72
3.12.3 Validación de genes	73
3.13 <i>WESTERN BLOT</i>	73
3.13.1 Determinación de proteína: método de Bradford	73
3.13.2 Electroforesis de proteína	73
3.13.3 Transferencia de proteína a membrana.....	75
3.13.4 Bloqueo de la membrana	77
3.13.5 Inmunodetección.....	77
3.13.6 <i>Stripping</i>	78
3.13.7 Anticuerpos utilizados.....	79
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
4 RESULTADOS	81-142
4.1 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE <i>SPARUS AURATA</i>	83
4.1.1 Calidad e integridad del RNA.....	83
4.1.2 Obtención de bibliotecas de cDNA, análisis transcriptómico por pirosecuenciación 454 FLX y ensamblado de secuencias	84
4.1.3 Anotación y ontología génica	87
4.1.4 Rutas metabólicas KEGG	90
4.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN HÍGADO DE DORADA	92
4.2.1. Metabolitos en suero e hígado.....	92
4.2.2. Efecto de la composición de la dieta sobre la actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario en hígado de <i>S. aurata</i>	93

4.3 ANÁLISIS POR <i>MICROARRAYS</i> DEL EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE DORADA	96
4.3.1 Expresión diferencial de genes en hígado de dorada mediante el uso de <i>microarrays</i>	96
4.3.2 Análisis funcional	97
4.4 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN HIGADO Y MÚSCULO DE DORADA ...	120
4.4.1 Expresión diferencial de genes de la cadena respiratoria en hígado y músculo de dorada mediante el uso de <i>microarrays</i>	120
4.4.2 Validación por RT-qPCR de la expresión diferencial de genes de la cadena respiratoria en hígado y músculo esquelético de dorada.....	124
4.5 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN HÍGADO DE DORADA	127
4.5.1 Evaluación de la expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico en hígado de dorada mediante el uso de <i>microarrays</i>	127
4.5.2 validación por RT-qPCR de la expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico en hígado de dorada	130
4.6 EFECTO METABÓLICO DE LA SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE SREBP-1a EN HÍGADO DE DORADA	134
4.6.1. Obtención de nanopartículas de Quitosán-TTP acomplejadas con dna plasmídico y administración intraperitoneal a juveniles de <i>S. aurata</i>	134
4.6.2. Efecto metabólico de la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada	136
4.6.3 Expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico y de carbohidratos tras la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada	140
5 DISCUSIÓN	143-170
5.1 TRANSCRIPTOMA DE HÍGADO Y MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA.....	145
5.2 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y EL AYUNO SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN HÍGADO DE DORADA	149
5.3 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y EL AYUNO SOBRE EL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE DORADA	154
5.4 REGULACIÓN NUTRICIONAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN HÍGADO DE DORADA	159
5.5 EFECTO METABÓLICO DE LA SOBREENPRESIÓN HEPÁTICA DE SREBP-1a EN DORADA.....	168
6. CONCLUSIONES	171-175
7. REFERENCIAS.....	177-193
8. ANEXOS.....	195

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA

Uno de los retos que la sociedad del siglo XXI tiene que afrontar es la necesidad de incrementar la producción de alimento de forma sostenible, a fin de nutrir a una población creciente sin sobreexplotar ni dañar el medio natural. La proteína de origen animal y en particular de pescado es considerada de alto valor nutricional. No obstante, la pesca de captura se encuentra estancada en 90-95 millones de toneladas al año desde la década de los noventa del siglo pasado debido a la sobreexplotación de los caladeros pesqueros. Sin embargo, la acuicultura ha tenido un crecimiento importante en las últimas décadas, superando por primera vez en el año 2014 a los métodos extractivos en la aportación de pescado para consumo humano. Este incremento en la producción ha permitido producir 73,8 millones de toneladas de pescado en 2014, mayoritariamente para el consumo humano (FAO, 2016)

La acuicultura representa un método de producción predecible, planificable y con un menor impacto ecológico que otros métodos de producción de proteína para consumo humano. Sin embargo, son diversos los desafíos que presenta para la consolidación y expansión de sistemas de cultivo que sean sostenibles y que permitan satisfacer la demanda por parte de una población en expansión y con mejor acceso a recursos económicos. Entre estos problemas destaca, la dependencia de algunos sistemas a ciertos componentes en la dieta, como proteínas o aceites de origen piscícola, que además de encarecer la cadena productiva, generan una dependencia de la pesca extractiva que resulta insostenible a largo plazo y genera un mayor impacto ecológico (Naylor *et al.*, 2000; Gormaz *et al.*, 2014).

En España, la acuicultura tiene un papel relevante en la economía y la sociedad, siendo el principal país europeo con mayor volumen de producción acuícola (282.242 toneladas en 2014) y el cuarto en cuanto al valor de la producción (450,1 millones de euros). La dorada (*Sparus aurata*) es una especie marina ampliamente cultivada en España. Su producción en 2015 generó 94,8 millones de euros (APROMAR, 2016). Actualmente, la dorada representa la especie acuícola más cultivada en España y, entre los peces de origen marino, en Europa. Esta especie es de hábitos carnívoros, como muchas de las especies marinas cultivadas, razón por la cual existe la necesidad de incorporar una concentración elevada de proteína (en particular procedente de harina de pescado) a los piensos. Considerando que más del 80 % del pienso utilizado en España (la mayoría producido en el país) se destina a alimentar especies marinas (como la dorada), existe un importante interés en promover una investigación que permita ampliar los conocimientos del metabolismo de esta especie y así

optimizar la composición de la dieta para mejorar su producción, disminuir costos y hacer sostenible la actividad a largo plazo.

En este sentido, son numerosas las investigaciones que se han desarrollado en nutrición de peces con múltiples objetivos, tales como: comprender el papel que juegan enzimas claves en el metabolismo intermediario (Metón *et al.*, 1999b; Panserat *et al.*, 2002a, 2002b; Fernández *et al.*, 2007), profundizar en el conocimiento de la regulación génica de péptidos reguladores de la ingesta (Babaei *et al.*, 2017) o el papel de los carbohidratos en el metabolismo de los peces carnívoros (Wilson, 1994; Polakof *et al.*, 2012). Cabe destacar, que los peces carnívoros son altamente dependientes de los aminoácidos de la dieta para satisfacer sus requerimientos energéticos debido a la poca capacidad que muestran para metabolizar los carbohidratos de la dieta (Wilson, 1994; Polakof *et al.*, 2012).

Es importante considerar que los peces, especialmente los marinos, son la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ω -3 y ω -6, en la dieta humana considerados de alto valor nutricional e importantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Li *et al.*, 2016b). En este sentido, son diversos los estudios que vinculan la síntesis de ácidos grasos a la composición de la dieta, comparando la proporción de aceite de pescado y aceites vegetales que contiene la dieta, con la cantidad y proporción de las distintas especies de ácidos grasos en los distintos tejidos del organismo (Panserat *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2013; Van Hoestenbergh *et al.*, 2013). Así, en el año 2010 el 80 % de las reservas globales de aceite de pescado, cuyo precio sigue en aumento, se destinaron para la producción de piensos para acuicultura.

Debido a la necesidad de incorporar tanto harina como aceite de pescado en los piensos acuícolas, se genera una tasa de entrada/salida negativa que sitúa entre 3 y 20 los peces utilizados como alimento por cada pez que es producido en cultivo (Van Hoestenbergh *et al.*, 2013). Es por ello que son múltiples los estudios que se han realizado con el fin de ajustar la proporción de proteínas en la dieta e intentar su sustitución por nutrientes más económicos alternativos a la harina de pescado (Fernández *et al.*, 1999, 2007; Metón *et al.*, 1999b), intentando además eliminar los aceites de pescado en la dieta sin alterar la calidad del producto (Cruz-García *et al.*, 2015). Tanto la disminución en la cantidad de proteína como de aceite de pescado en la dieta aliviarán la presión sobre los caladeros pesqueros disminuyendo la dependencia de la pesca extractiva y facilitarán el acceso de nutrientes de alto valor añadido a la sociedad actual (Naylor *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2015).

1.2 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PECES

La capacidad que tienen las distintas especies de peces para aprovechar los carbohidratos de la dieta parece depender de los hábitos alimenticios en el entorno natural y por lo tanto de las adaptaciones evolutivas del metabolismo que en este sentido han desarrollado (Wang *et al.*, 2015). Los peces omnívoros presentan mecanismos que les permite metabolizar la glucosa, aunque esta capacidad resulta ser menor que la encontrada en los mamíferos (Furuichi and Yone, 1981), mientras que los peces carnívoros poseen una capacidad marcadamente limitada para metabolizar carbohidratos, lo que se evidencia en la poca capacidad que tienen de regular los niveles de glucosa en sangre. En los peces carnívoros, tras la alimentación con dietas con un elevado porcentaje en carbohidratos o la administración de glucosa, se observa una marcada hiperglicemia que se mantiene por un tiempo prolongado, de manera similar al comportamiento de la diabetes tipo 2 en humanos (Wright *et al.*, 1998; Moon, 2001).

Son diversos los trabajos que se han desarrollado y demuestran que, a pesar de la limitación en la metabolización de carbohidratos que estos peces presentan, es posible su utilización para sustituir parcialmente las proteínas como fuente de energía en los peces de cultivo (Fernández *et al.*, 1999, 2007; Metón *et al.*, 1999b; Naylor *et al.*, 2009). En este sentido, se ha descrito que en la dorada la sustitución parcial de proteínas por carbohidratos en la dieta promueve la adaptación de la actividad de enzimas hepáticas que resultan clave en glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato y metabolismo de aminoácidos (Fernández *et al.*, 1998, 2007; Metón *et al.*, 1999b). Cabe destacar los estudios realizados sobre la regulación nutricional en los niveles de expresión de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la piruvato kinasa (PK) (Caseras *et al.*, 2002; Panserat *et al.*, 2002a, 2002b; Metón *et al.*, 2004), entre otros.

Son diversos los mecanismos que han sido propuestos con el fin de explicar la poca capacidad que tienen los peces carnívoros para metabolizar los carbohidratos. Una de las primeras hipótesis propuestas señalaba que, debido a niveles bajos de insulina endógena, los peces mantienen una hiperglicemia prolongada además de una baja capacidad para utilizar niveles elevados de carbohidratos (Palmer and Ryman, 1972; Wilson and Poe, 1987). Posteriormente se demostró que los niveles de insulina en los peces son similares o a menudo más elevados que los observados en mamíferos (Plisetskaya, 1998), además de observarse un aumento de la insulina en plasma después de la administración de glucosa en los peces (Furuichi and Yone, 1982). Así mismo, también se ha vinculado la capacidad que tienen ciertos aminoácidos de estimular en los peces la liberación de insulina más eficazmente que la glucosa (Navarro *et al.*, 2002). En este sentido, se ha descrito que los

peces también poseen receptores específicos para la insulina y para los factores de crecimiento insulínico *insulin-like growth factor*, I y II (Gutiérrez and Plisetskaya, 1991; Drakenberg *et al.*, 1993; Navarro *et al.*, 1999; Reinecke *et al.*, 2005). Sin embargo, las propiedades de unión de estos receptores es otro factor a considerar. Por ejemplo, un estudio describe un mayor porcentaje de receptores de insulina en el tejido muscular de trucha arcoíris respecto a la rata, aún cuando la capacidad de unión de estos receptores a la insulina resulta inferior en esta especie a la observada en mamíferos (Gutiérrez and Plisetskaya, 1991).

Por otra parte, también se ha señalado que la baja capacidad de los peces carnívoros para utilizar los carbohidratos puede estar relacionada en parte con la ausencia de actividad de la enzima glucoquinasa (GK) en hígado (Wilson, 1994). La GK es una hexoquinasa característica de hígado y páncreas de mamíferos que presenta baja afinidad por la glucosa. No obstante, estudios posteriores demostraron su expresión en hígado de peces, como *S. aurata* (Caseras *et al.*, 2000), *Hippoglossus hippoglossus* (Tranulis *et al.*, 1997), *Salmo salar* (Tranulis *et al.*, 1996) y *Cyprinus carpio* (Panserat *et al.*, 2000). La enzima que cataliza la reacción inversa a la GK es la G6Pasa, la cual es capaz de convertir la glucosa-6-fosfato (G6P) en glucosa. Una excesiva producción hepática de glucosa, puede promover la hiperglicemia como consecuencia de la sobreexpresión de G6Pasa (Trinh *et al.*, 1998). Recientemente se ha descrito que la falta de regulación en la expresión de genes de la gluconeogénesis podría estar relacionada con eventos de duplicación génica originados durante el proceso de adaptación evolutiva de la trucha (Marandel *et al.*, 2015).

La regulación conjunta de los procesos glucolíticos y gluconeogénicos juega un papel crucial en el metabolismo de los carbohidratos en peces. Así, diversos estudios se han centrado en la regulación nutricional de otras enzimas reguladoras de la glucólisis-gluconeogénesis, como la 6-Fosfofructo-2-quinasa/Fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), enzima bifuncional capaz de sintetizar y degradar fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-P₂), principal activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) (glucólisis) e inhibidor de la FBPasa (gluconeogénesis) (Figura 1.1). En dorada, la alimentación con dietas ricas en carbohidratos estimulan la actividad quinasa de PFKFB, promoviendo un incremento de los niveles de F-2,6-P₂ en hígado y una consecuente estimulación de la glucólisis (García de Frutos *et al.*, 1990). En trabajos subsiguientes se purificaron y caracterizaron las isoformas hepática y muscular de PFKFB, encontrándose diferencias importantes en las características cinéticas de ambas isoformas, tales como la ausencia de inhibición por el glicerol-3-Fosfato o la no fosforilación por la quinasa dependiente de cAMP en la isoforma muscular (García de Frutos and Baanante, 1994, 1995). En este sentido, la clonación del mensajero que codifica PFKFB1 (isoforma hepática de la enzima) de dorada (Metón *et al.* 1999a) ha permitido evaluar su regulación bajo diferentes condiciones nutricionales (Metón *et al.*, 1999a, 2000). Estos estudios han permitido concluir que, en peces, la

alimentación con dietas ricas en carbohidratos estimula la expresión de PFKFB a nivel de mRNA, mientras que el ayuno desciende su expresión.

Muchas especies de peces muestran un elevado grado de adaptación a períodos prolongados de ayuno, característica que está relacionada con la migración, el desove o la disponibilidad de alimento (Day *et al.*, 2014). Debido a estas adaptaciones, las variaciones en los niveles de glucógeno en hígado y músculo de peces dependen en gran medida de la especie estudiada, lo cual contrasta con lo observado en mamíferos como la rata, en los que el glucógeno hepático es rápidamente metabolizado y sus niveles están prácticamente agotados después de 24 horas de ayuno, incluso en ausencia de actividad física vigorosa (Freedland, 1967). En este sentido, el glucógeno en *S. aurata* disminuye significativamente tras 8 días de ayuno y no alcanza niveles prácticamente indetectables hasta los 20 días de ayuno (Baanante *et al.*, 1991; García de Frutos *et al.*, 1991; Metón *et al.*, 1999b), de manera similar a lo descrito en trucha de río (Navarro *et al.*, 1992). Sin embargo, en otras especies como la anguila europea (*Anguilla anguilla*) las reservas de glucógeno son más estables tras largos períodos de ayuno, siendo detectables tras un ayuno de 96 días en hígado y de 164 días en tejido muscular (Dave *et al.*, 1975).

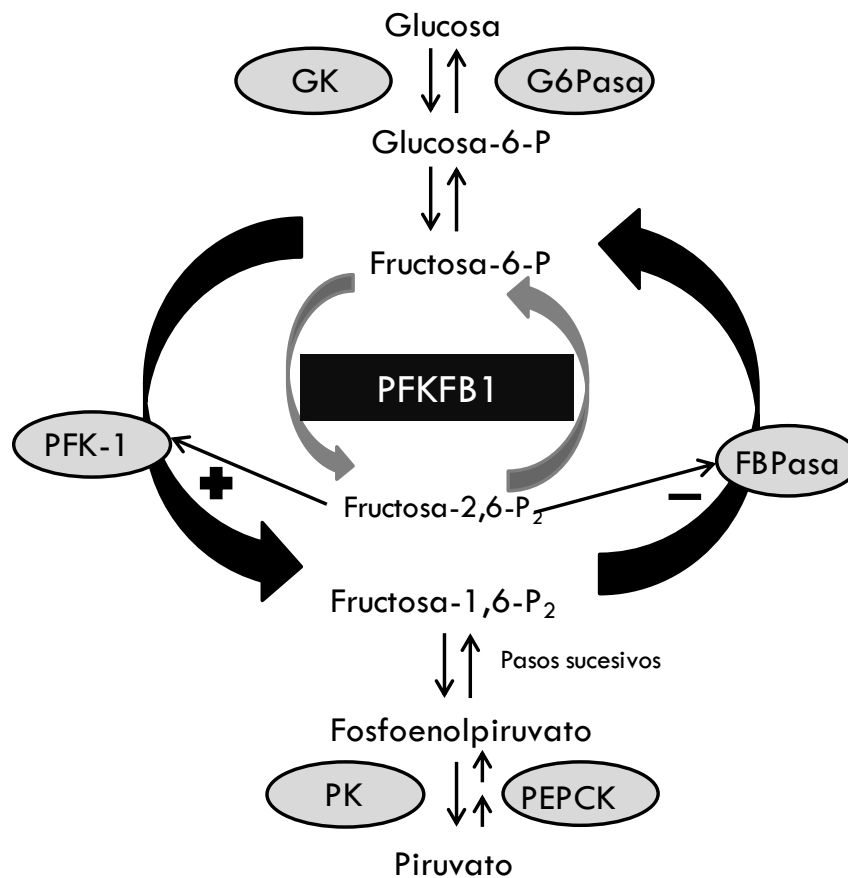


Figura 1.1. Principales enzimas reguladoras de la glucólisis/Gluconeogénesis. Papel regulador de la PFKFB.

1.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES

Una importante cantidad de especies de peces son carnívoras, por lo que su metabolismo está adaptado a la necesidad de consumir dietas con alto contenido de proteína. Los aminoácidos son los componentes estructurales de las proteínas, pudiendo ser clasificados como esenciales o no esenciales de acuerdo con la capacidad que presenta un organismo para su síntesis endógena o la necesidad de adquirirlos con la dieta. Los requerimientos de proteína en la dieta varían entre un 35 y un 55 % dependiendo de la especie, razón por la que en los peces carnívoros la proteína es el componente más abundante y el de coste más elevado (Ballantyne, 2001).

Los peces carnívoros presentan un metabolismo adaptado a emplear aminoácidos como principal sustrato energético y gluconeogénico (Ballantyne, 2001). En otros organismos los aminoácidos son utilizados preferentemente para la síntesis de proteínas y, en menor medida, para la síntesis de otros compuestos, como hormonas, purinas, neurotransmisores y cofactores. Sin embargo, en los peces además de los requerimientos de aminoácidos para la síntesis de proteínas, es vital su uso para la producción de energía, tal como se ha demostrado en estudios en los que embriones y larvas de peces muestran una dependencia exclusiva de los aminoácidos para la obtención de energía y consecuente desarrollo (Ohkubo and Matsubara, 2002). Una ventaja que presentan los peces teleósteos para el catabolismo de los aminoácidos es que pueden excretar directamente el amonio al medio a través de las branquias, por lo que no precisan gastar energía para convertir el amonio en urea (Kaushik and Seiliez, 2010). Sin embargo, esta característica resulta ser negativa para el cultivo extensivo de peces, ya que debido a las altas concentraciones de amonio excretadas se promueve la eutrofización local de las aguas (Davenport *et al.*, 2003).

El catabolismo de proteínas corporales, como suministro de aminoácidos, proporciona menos de la mitad de los aminoácidos que se requieren para formar proteínas en los peces. Es por eso, que los peces resultan ser más dependientes de aminoácidos provenientes de la dieta que otros vertebrados. Desde el punto de vista energético, los aminoácidos son catabolizados para proveer ATP con fines biomecánicos, sintéticos y para procesos de transporte. En peces, los aminoácidos son la fuente de energía primordial comparado con los carbohidratos (Cowey, 1994); además la capacidad de convertir la proteína ingerida en proteína somática es mucho más eficiente en peces que en aves y mamíferos (Tacon and Cowey, 1985).

Se ha atribuido a una posible falta de control del catabolismo aminoacídico como el principal factor que determina requerimientos elevados de proteína en peces (Kaushik and Seiliez, 2010). No obstante, estudios diversos llevados a cabo en peces señalan que las enzimas del metabolismo de los aminoácidos son moduladas por la composición de la dieta. Por ejemplo, se ha demostrado que la

reducción en la relación proteína/carbohidrato de la dieta disminuye la actividad de las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en el hígado de dorada (Metón *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*, 2007), *Rhamdia quelen* (Bibiano Melo *et al.*, 2006) y *Oreochromis niloticus* (Gaye-Siessegger *et al.*, 2006). Estas enzimas son claves en la desaminación de los aminoácidos de las proteínas y en la homeostasis de piruvato y α -cetoglutarato, los cuales sirven como sustrato del ciclo de Krebs para la generación de energía o de la gluconeogénesis.

En los peces, la tasa de oxidación de los aminoácidos es muy superior a la de incorporación a glucosa a través de la vía gluconeogénica (Ballantyne, 2001), mientras que en mamíferos los requerimientos energéticos del organismo están más adaptados para la metabolización de la glucosa, ya que la completa oxidación de los aminoácidos en el hígado produciría un exceso de ATP (Brosnan, 2003). En peces carnívoros, como el salmón atlántico, la tasa de oxidación de aminoácidos como la alanina es 10 veces superior a la tasa de incorporación de glucosa. Es por ello, que tanto para la síntesis de glucosa (Enes *et al.*, 2009; Polakof *et al.*, 2012), como para sintetizar lípidos endógenos (Masanori and Ikeda, 1972), los aminoácidos resultan ser precursores preferentes en los peces.

La reducción de la relación proteína/energía en la dieta, mediante el suministro de nutrientes no nitrogenados, ha permitido optimizar la retención de proteínas en peces y disminuir la excreción de nitrógeno soluble al medio (Kaushik y Seiliez, 2010). Sin embargo, esta sustitución de proteínas por otros macronutrientes en el aporte energético de la dieta presenta ciertas limitaciones. Por un lado, la incorporación de carbohidratos es limitada (Metón *et al.*, 1999b) debido a la naturaleza carnívora del metabolismo hepático de los peces y aunque los lípidos son fácilmente digeridos y metabolizados por los peces, niveles muy altos en dieta ocasionan mayor acumulación de grasas corporales y pueden derivar en un crecimiento menor (McGoogan y Gatlin, 2000).

Otro aspecto relevante a considerar es el papel de los aminoácidos como reguladores del flujo metabólico, al estar implicados como moléculas de señalización celular. Se ha demostrado que en trucha arcoíris los aminoácidos, de manera dependiente de la dosis, son capaces de regular la expresión de algunos genes, como la G6Pasa, PEPCCK y PK, enzimas implicadas en la homeostasis energética (Lansard *et al.* 2010). Así mismo, junto con la insulina, los aminoácidos son capaces de provocar un incremento significativo la expresión de en enzimas lipogénicas y genes glicolíticos mediante la vía de señalización mTOR (Seiliez *et al.*, 2011).

1.4 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN PECES

Los lípidos presentan una función esencial en el metabolismo energético de los peces, muy superior al papel que desempeñan los carbohidratos (Tocher, 2003). Así mismo, es importante

considerar la importancia que tienen tanto los lípidos como el colesterol como componentes estructurales de las membranas celulares y como reguladores de diversos procesos celulares. En este sentido, la grasa de los peces es rica en PUFAs ω -3 y ω -6, los cuales son especialmente importantes para la nutrición humana, ya que juegan roles metabólicos muy importantes como la prevención de enfermedades cardiovasculares, metabólicas y como promotores de la función inmune (Calder, 2007; Torrejon *et al.*, 2007). En humanos, la síntesis de estos ácidos grasos no es posible a una tasa que permita cubrir los requerimientos nutricionales, razón por la cual es necesario que sean consumidos a través de la dieta, siendo una de las principales fuentes para el consumo humano los peces (Van Hoestenbergh *et al.*, 2013).

Sin embargo, aún cuando los peces tienen una alta capacidad para producir PUFAs, son diversos los estudios sobre la relación existente entre el tipo de ácidos grasos que los peces incorporan a sus tejidos y los ácidos grasos que los peces consumen en la dieta (Tocher *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016b). Es por ello que la acuicultura sigue presentando en la actualidad una alta dependencia del aceite de pescado, por lo que conforme ha aumentado la producción de peces en acuicultura incrementa la tasa de consumo de aceite de pescado para fines piscícolas, lo cual conlleva a una disminución de las reservas mundiales y al incremento de precios (Van Hoestenbergh *et al.*, 2013).

Esto ha generado un creciente interés para poder sustituir el aceite de pescado destinado a acuicultura por otras fuentes de lípidos tales como los aceites vegetales de soja o de linaza, entre otros. Sin embargo, el contenido de PUFAs disponible en los peces de cultivo ha disminuido como consecuencia de la incorporación de estos aceites vegetales (Li *et al.*, 2016b). Son diversos los enfoques y estudios que se han desarrollado para entender el funcionamiento del metabolismo de lípidos en peces. Entre otros factores que se ha evaluado: el efecto de la composición de la dieta (Castro *et al.*, 2016), el tamaño de la ración (Benedito-Palos *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2016), o la obtención de peces cebras transgénicos en los que la incorporación de genes exógenos incrementa la producción de PUFAs (Alimuddin *et al.*, 2008).

Es importante destacar que la síntesis de ácidos grasos y colesterol puede llevarse a cabo en múltiples tejidos y células. Sin embargo, tanto el hígado como el tejido adiposo son tejidos particularmente importantes en los organismos animales, ya que son tejidos especializados en la producción, movilización y acúmulo de grasas (Eberlé *et al.*, 2004). Por otro lado, en los peces la β -oxidación de ácidos grasos es un proceso importante para la producción de energía en forma de ATP para múltiples procesos vitales, como la reproducción, el crecimiento o la natación, tal como lo demuestran los altos porcentajes de lípidos encontrados en varias especies de peces marinos

(Tocher, 2003). En este sentido, el estudio de la incorporación de lípidos y su utilización en diferentes tejidos como el hígado, el músculo esquelético o el tejido adiposo es de vital importancia para conocer la proporción de ácidos grasos que pueden estar disponibles para el consumo humano.

Debido a su alto contenido energético, los lípidos son la principal forma de almacenaje corporal, razón por la cual, tanto la síntesis como la degradación de lípidos están fuertemente reguladas por el estado energético de la célula o del organismo. La síntesis de ácidos grasos está regulada alostéricamente por acetil-CoA, el elemento principal a partir del cual comienzan a construirse los ácidos grasos. Sin embargo, uno de los procesos de mayor interés en el conocimiento de la regulación del metabolismo lipídico es la regulación por señalización celular de la transcripción de genes relacionados con la síntesis y degradación de lípidos. En este sentido se han descrito múltiples reguladores del proceso de transcripción de genes del metabolismo lipídico tales como los *Sterol Regulatory-Element Binding Proteins* (SREBPs), que han sido descritos como “reguladores principales de la homeostasis de lípidos” (Eberlé *et al.*, 2004), los receptores nucleares *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPARs) y el factor *Liver X Receptor* (LXR), que también tienen un rol crucial en la regulación del metabolismo de lípidos y colesterol en peces, tanto en la síntesis como en la degradación (Sánchez-Gurmaches *et al.*, 2013).

1.4.1 Lipogénesis

Se denomina lipogénesis al proceso de síntesis de lípidos endógenos, que comienza por la síntesis de ácidos grasos en la mitocondria. El acetil-CoA, proveniente de la descarboxilación oxidativa del piruvato en el metabolismo de los carbohidratos o de la degradación oxidativa de algunos aminoácidos, es la fuente de carbono necesaria para iniciar el proceso de síntesis de ácidos grasos. La síntesis de ácidos grasos requiere de la formación de malonil-CoA, producto de la carboxilación del acetil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Este compuesto de 3 carbonos es posteriormente condensando con otra molécula de acetil-CoA por acción de la sintasa de ácidos grasos (FASN), un complejo macroproteico que permite la adición sucesiva de 2 carbonos a una cadena creciente, que mediante esta vía puede alcanzar hasta los 18 carbonos de extensión.

El proceso de formación de los ácidos grasos es un proceso secuencial, en el cual, en cada uno de sus pasos se utiliza NADPH para condensar una molécula de malonil-CoA y extender la cadena en formación dos átomos de carbono. Las vías por las cuales se puede generar el NADPH necesario para que la FASN pueda funcionar y elongar la cadena incluyen la vía de las pentosas fosfato, controlada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), y la enzima málica o malato deshidrogenasa (MDH). En peces se ha descrito que la principal

fuerza generadora de NADPH es la vía de las pentosas fosfatos y en particular la enzima G6PD (Dias *et al.*, 1998).

En trucha y tilapia el principal órgano lipogénico es el hígado (Henderson and Sargent, 1985; He *et al.*, 2015), tejido a partir del cual se exportan los lípidos hacia otros tejidos donde son almacenados o utilizados. Sin embargo, la importancia del proceso lipogénico en el metabolismo depende en gran medida de la especie y de los hábitos alimenticios que presenta, por lo que los estudios no sólo se centran en el hígado sino que se han realizado en otros tejidos como el adiposo o el músculo esquelético (Benedito-Palos *et al.*, 2013, 2014; Sánchez-Gurmaches *et al.*, 2013). Es importante considerar que los hábitos alimenticios regulan la síntesis de lípidos de diferentes modos. Por ejemplo, la alanina es la principal fuente de carbono utilizada en trucha para la síntesis de ácidos grasos, por lo que la incorporación de proteína en la dieta tiene efecto lipogénico, mientras que una mayor proporción de lípidos respecto a las proteínas tiende a disminuir la síntesis de lípidos (Tocher, 2003).

Los peces, al igual que el resto de animales, tienen la capacidad de elongar y añadir insaturaciones a los ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos sintetizados por acción de la FASN. El primer paso de este proceso comprende la producción de ácido palmitoleico (16:1n-7) y ácido oleico (18:1n-9) en un proceso aeróbico, que requiere NADPH y O₂ y que se desarrolla en el retículo endoplasmático por un complejo sistema que comprende la *NADPH-cytochrome b5 reductasa*, el *cytochrome b5* y desaturasas como la *stearoyl Δ9 fatty acid desaturase* (SCD), cuya actividad y modulación de la transcripción se ha descrito en diferentes estudios desarrollados en peces (Tiku *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2001; Benedito-Palos *et al.*, 2014). La vía de elongación convencional microsomal, que actúa sobre los productos del proceso de desaturación es capaz de generar varias especies de ácidos grasos de mayor longitud, destacando los ácidos grasos 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-9 y 24:1n-9 (Tocher, 2003).

Sin embargo, a través de mecanismos moleculares endógenos ningún vertebrado es capaz de introducir dobles enlaces adicionales al ácido oleico para producir ácido linoleico (18:2n-6) y ácido α-linolénico (18:3n-3), producidos por las desaturasas Δ12 y Δ15. Debido a ello, estos ácidos grasos son esenciales y han de consumirse con la dieta, siendo los precursores de los PUFAs ω-6 y ω-3, como el ácido araquidónico, el ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexanoico. El proceso a través del cual se forman estos ácidos grasos, con importantes funciones en el metabolismo de los animales, se produce gracias a la acción de las desaturasas Δ6 y Δ5, y a procesos de elongación en los que actúan varias elongasas con afinidad por distintos sustratos (Figura 1.2). El proceso de adición de dobles enlaces y de elongación de ácidos grasos para producir los ácidos grasos poliinsaturados, aunque se

produce en todos los vertebrados, está fuertemente influenciado por los procesos de adaptación de los animales a la dieta que consumen. En este sentido, la capacidad que tenga una determinada especie para consumir los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta se vincula con una baja capacidad para generarlos. Como se ha mencionado anteriormente, los peces son la principal fuente de este tipo de ácidos grasos para los seres humanos, por lo que el conocimiento de este proceso es de gran interés para la producción acuícola. Son múltiples los estudios que se han realizado para entender la efectividad de este proceso en diversas especies de peces de consumo humano y la posibilidad de sustitución de aceite de pescado por otras fuentes de ácidos grasos esenciales en la dieta (Diez *et al.*, 2007; Monroig *et al.*, 2011; Van Hoestenbergh *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016b; Jin *et al.*, 2017).

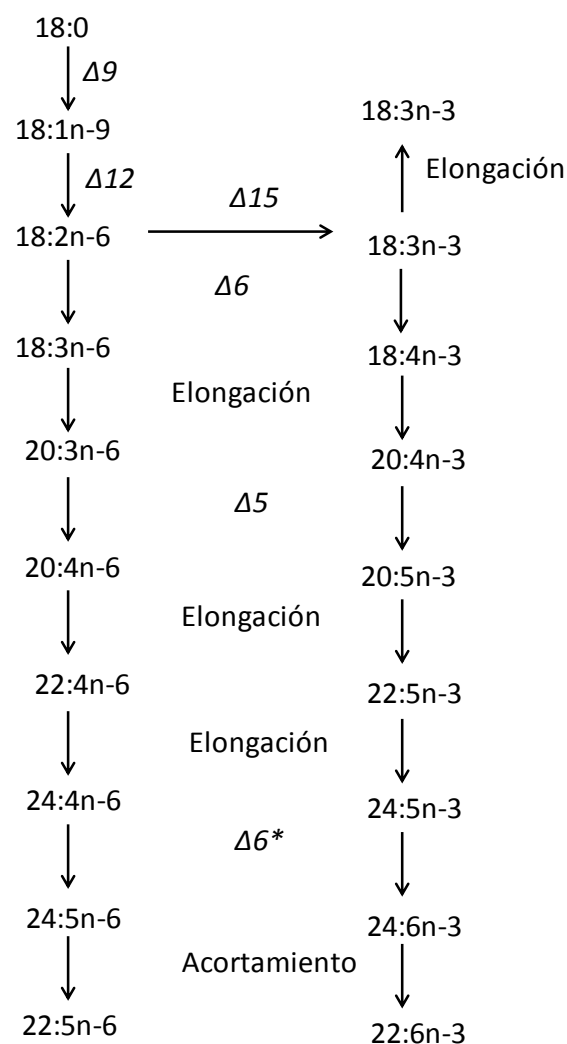


Figura 1.2. Vía sintética de los ácidos grasos poliinsaturados C20 and C22 desde los precursores n-3 y n-6 de 18 carbonos. Desaturasas: Δ5, Δ6, Δ6*, Δ9, Δ12 y Δ15. La enzima Δ6* desaturasa, que actúa sobre ácidos grasos de 24 carbonos, puede o no ser la misma enzima (Δ6) que actúa sobre los ácidos grasos de 18 carbonos según la especie. Figura adaptada de Van Hoestenbergh *et al.*, (2013).

El proceso de síntesis de otros componentes del metabolismo de lipídico, tales como colesterol, esfingolípidos o fosfolípidos, está poco estudiado en peces (Tocher, 2003). No obstante,

gracias al uso de nuevas tecnologías como los *microarrays* para analizar patrones de expresión génica, hay estudios que revelan la presencia y modulación de la transcripción de enzimas involucradas en éstas y otras vías del metabolismo de lípidos en peces (Panserat *et al.*, 2008). El proceso de síntesis *de novo* de fosfolípidos es muy parecido al de los mamíferos terrestres, aunque ciertas evidencias sugieren que algunas larvas de peces tienen una capacidad limitada para su síntesis (Geurden *et al.*, 1995, 1997; Coutteau *et al.*, 1997; Fontagnéa *et al.*, 1998), lo que podría estar en relación con la abundancia de estos componentes en las dietas naturales de los peces.

La formación de triglicéridos implica la esterificación secuencial de dos ácidos grasos con glicerol-3-fosfato, la ruptura de un grupo fosfato y la esterificación de un tercer ácido graso mediante la acción secuencial de las enzimas *glicerol-3-fosfato aciltransferasa* (GPAT), *1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa* (AGPAT), *fosfatidato fosfatasa* y *diacilglicerol aciltransferasa* (DGAT) (Berg *et al.*, 2008). Durante la alimentación, el exceso de ácidos grasos es exportado desde el hígado en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), acumulándose como triglicéridos en los tejidos de almacenamiento, como el tejido adiposo, el músculo y entre la piel y el músculo (Tocher, 2003). Adicionalmente, el proceso de acumulación de triglicéridos en hígado puede ser de relevancia en algunas especies de peces (Sargent *et al.*, 1989). Son varias las enzimas que actúan en este proceso de transporte y carga de lípidos a distintos tejidos y la remodelación de lipoproteínas, proceso que será descrito en la sección 1.4.3.

1.4.2 Digestión y catabolismo lipídico

La degradación de los ácidos grasos mediante β -oxidación, es la principal fuente de energía en varios tejidos de diversas especies de peces, tales como el hígado, el corazón, el músculo rojo y el músculo blanco (Frøyland *et al.*, 1998, 2000). Este proceso se lleva a cabo en la mitocondria y peroxisomas, a diferencia de la síntesis que tiene lugar en el citosol.

Para que los ácidos grasos puedan ser degradados, éstos deben ser activados mediante la acción de enzimas como la acil-CoA sintasa (o ácido graso: CoA ligasa) y el consumo de ATP. El transporte de los acil-CoAs dentro de la mitocondria, requiere la acción de la carnitina palmitiltransferasa (CPT) 1 (unida a la membrana mitocondrial interna) que esterifica los ácidos grasos con carnitina para formar acilcarnitina, que puede ser translocada a través de la matriz mitocondrial interna mediante un transportador. A nivel de la matriz mitocondrial la CPT2 libera la carnitina y transfiere el grupo acilo nuevamente a una molécula de acetil-CoA, el cual entra en un proceso secuencial de corte de dos en dos unidades de carbono que en cada ciclo genera una molécula de FADH₂, acetil-CoA y NADH. Para la completa degradación de los ácidos grasos se requiere en cada ciclo la actuación de las enzimas acil-CoA deshidrogenasas, enoil-CoA hidratasa

(también denominada crotonasa o 3 hidroxiaxil-CoA hidroliasa), L-3-hidroxiaxil-CoA deshidrogenasa (HADH) y β -cetotiolasa (Berg *et al.*, 2008).

Por un lado, el acetil-CoA producido puede ser metabolizado en el ciclo de Krebs para la formación de NADH, FADH₂ y ATP o bajo ciertas condiciones, como en el ayuno, el hígado es capaz de transformarlo en cuerpos cetónicos, acetoacetato y 3-hidroxibutirato, para exportarlos a algunos tejidos periféricos que utilizan estos compuestos como fuente de energía mediante su oxidación (Tocher, 2003). El NADH y el FADH₂ producido, es utilizado para la formación de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (Berg *et al.*, 2008).

La oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma es un proceso complementario al mitocondrial, que puede representar niveles significativos del total de β -oxidación en algunas condiciones y especies de peces (Crockett and Sidell, 1993). Este proceso juega un rol fundamental en la degradación inicial de algunas moléculas de cadena larga, PUFAs o ácidos grasos inusuales, como el ácido graso 22:6n-3, que es principalmente degradado en el peroxisoma de rata (Madsen *et al.*, 1999). Este proceso de degradación de ácidos grasos puede requerir de la acción de algunas enzimas auxiliares, como la 2,4-dienoil-CoA reductasa (NADPH dependiente) y la *cis*- Δ^3 -Enoil-CoA isomerasa (Berg *et al.*, 2008).

Otro proceso relacionado con la degradación lipídica es la remodelación de fosfolípidos, mediante la cual se liberan los ácidos grasos que contienen para ser degradados o bien se incorporan los ácidos grasos de la dieta en moléculas de fosfolípidos. La composición de ácidos grasos de la dieta desempeña un papel fundamental en la determinación final de la composición de fosfolípidos en las células. Aunque ha sido poco estudiado, algunas de las enzimas involucradas en este proceso se han encontrado en peces. Particularmente, en músculo de distintas especies se ha descrito que en la hidrólisis de fosfoglicéridos participan principalmente las fosfolipasas A1 y A2 (Shewfelt *et al.*, 1981), esta última también interviene en la digestión y absorción de fosfolípidos de la dieta (Tocher, 2003). En la embriogénesis del pez cebra también participa la fosfolipasa A2 como principal enzima involucrada en la hidrólisis de fosfatidil colina (Farber *et al.*, 1999). Otras enzimas cuya actividad en la hidrólisis y la remodelación de fosfolípidos ha sido demostrada en diferentes tejidos de peces son la fosfolipasa C y la *1-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine acyltransferase* o lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) (Tocher, 2003).

Debido a la abundancia de ácidos grasos en la dieta natural de los peces, estos tienen la capacidad para digerir, asimilar y almacenar grandes cantidades de grasa. Sin embargo, la digestión, absorción y transporte de lípidos en peces es un proceso similar al de mamíferos. Aunque se ha encontrado actividad lipasa en intestino y estómago en peces, la mayoría de la actividad lipasa para

la digestión proviene del páncreas o hepatopáncreas. Para el proceso de digestión, básicamente existen dos tipos de lipasas: las lipasas activadas por sales biliares y el sistema pancreático-colipasa. En peces, la principal actividad lipasa está relacionada con las sales biliares. Aunque el segundo sistema pudiese ser menos frecuente, no se descarta su presencia en varias especies, así como la acción de otras enzimas (como la enzima colesteril ester hidrolasa y otras esterasas) capaces de digerir, no sólo los triglicéridos de la dieta, sino una gran variedad de compuestos lipídicos que son absorbidos por múltiples procesos, entre los que destaca la emulsión con sales biliares en micelas (Tocher, 2003).

1.4.3. Transporte de lípidos

El transporte de lípidos de la dieta o desde tejidos lipogénicos hacia tejidos periféricos para su utilización es llevado a cabo por las lipoproteínas, las cuales se clasifican de acuerdo a su composición y densidad en: quilomicrones, VLDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La composición de las lipoproteínas en peces es similar a la composición en mamíferos, en las que los lípidos totales y el núcleo de la lipoproteína son principalmente triglicéridos y esteril ésteres, mientras que los componentes de la superficie son básicamente fosfolípidos, colesterol libre y proteínas. Los componentes de la superficie están en mayor proporción en las HDL, mientras que en los quilomicrones abundan los componentes del núcleo de la lipoproteína. Así, en trucha los triglicéridos constituyen el 85 % de los quilomicrones, el 52 % de las VLDL, el 22 % de las LDL y el 11 % en las HDL. Por otro lado, los fosfolípidos representan el 8 % en los quilomicrones, el 19 % de las VLDL, el 27 % en las LDL y 32 % en las HDL (Babin and Vernier, 1989).

En el retículo endoplasmático de los enterocitos, la mayoría de los ácidos grasos procedentes de la digestión de la dieta pasan a formar parte de los quilomicrones, aunque una pequeña proporción de ácidos grasos saturados generan VLDL a nivel intestinal (aunque la mayoría de las VLDL son generadas en el hígado). Las lipoproteínas formadas en el intestino son posteriormente transportadas al hígado, desde donde pasan a la circulación sistémica. Los triglicéridos presentes en quilomicrones y VLDL son hidrolizados por la acción de la lipoproteín lipasa (LPL) en los tejidos periféricos y la lipasa hepática en el hígado. La pérdida de triglicéridos en las VLDL genera IDL y LDL en circulación. Las HDL nacientes, generadas en hepatocitos y enterocitos, contienen una menor proporción de triglicéridos y constituyen el sistema de transporte inverso de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, proceso en el que interviene la enzima lecitín:colesterol aciltransferasa (LCAT). En el hígado, la LPL y la lipasa hepática hidrolizan los remanentes de las VLDL y quilomicrones provenientes de la circulación sistémica. La proporción de las lipoproteínas varía de acuerdo a la especie, la edad, el ciclo sexual y el estado nutricional. Por ejemplo, en trucha se ha

descrito que las HDL son las lipoproteínas más abundantes, seguidas de las LDL y las VLDL. Así mismo, se ha indicado que la composición de ácidos grasos en las lipoproteínas en peces varía de acuerdo a la dieta, aunque en líneas generales es posible afirmar que contienen más ácidos grasos ω -3 que en mamíferos (Tocher, 2003).

Otro de los componentes de las lipoproteínas son las apolipoproteínas (Apo). En las HDL abunda la apo clase A, en las LDL la B, en las VLDL las clases B, C y E y en los quilomicrones las A, B y C. Las funciones metabólicas de las Apo son similares a las descritas en mamíferos. Las Apo B y E se unen a receptores que se encuentran en tejidos como el hígado y permiten el reconocimiento de las lipoproteínas para ser captadas por endocitosis. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de Apo E en el desarrollo de rodaballo está relacionada con la nutrición endógena de lípidos y con la síntesis de lipoproteínas (Poupard *et al.*, 2000). Por su parte, la Apo AI puede activar la LCAT, mientras que la LPL puede ser activada tanto por la Apo AI como por la Apo CII.

Por último, el transporte intracelular de lípidos es llevado a cabo por proteínas citoplasmáticas específicas de bajo peso molecular que son capaces de unir tanto ácidos grasos de cadena larga como otros compuestos hidrofóbicos. Estas proteínas, denominadas de forma genérica *fatty acid binding proteins* (FABPs), son específicas de cada tejido y se ha descrito que en peces presentan un alto grado de homología con las proteínas descritas no sólo en mamíferos sino en otros vertebrados, por lo que se cree que el transporte de lípidos intracelular en peces es básicamente el mismo que en otros organismos (Tocher, 2003).

1.4.4. Regulación nutricional del metabolismo lipídico en peces

El estudio de la regulación nutricional del metabolismo lipídico en peces se ha centrado mayoritariamente en el efecto de la composición de aceites de distintos orígenes (pescado vs vegetales) en la dieta sobre la acumulación, composición de ácidos grasos de distintos tejidos y la actividad de enzimas clave en el metabolismo lipídico. Debido a que los lípidos son la principal fuente energética durante el ayuno en peces (Gong *et al.*, 2017), uno de los aspectos que más se ha estudiado es el efecto del ayuno sobre la regulación de enzimas y otras proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico. Recientemente Gong *et al.*, (2017) evaluaron el efecto de variaciones en la ración alimenticia sobre la expresión de genes lipogénicos y lipolíticos en hígado de carpas herbívoras, estableciendo que bajo privación alimentaria aumentan los niveles de expresión de genes lipolíticos mientras que disminuyen los niveles de expresión de genes lipogénicos. Otros estudios han descrito resultados similares con varios genes lipolíticos y lipogénicos en hígado y otros tejidos de doradas sometidas a diferentes grados de privación alimentaria e incluso sometidas a ayuno total por un período de tiempo (Benedito-Palos *et al.*, 2013, 2014). Así mismo, se ha descrito

que la actividad de enzimas lipogénicas, tales como FASN, G6PD o la MDH, y enzimas lipolíticas, como LPL, HADH y β -hidroxibutirato deshidrogenasa, muestran cambios significativos producidos por el ayuno en hígado y músculo de *Larimichthys crocea* (Huang *et al.*, 2017), así como en hígado, músculo y corazón de *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012).

Los carbohidratos digeribles promueven la acumulación de lípidos de una manera limitada en trucha (Brauge *et al.*, 1995), mayor actividad de varias enzimas lipogénicas en hígado de lubina (Dias *et al.*, 1998) y más recientemente la activación de la lipogénesis en el hígado de *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2015). En dorada, Castro *et al.*, (2016) encontraron que aumentando la cantidad de carbohidratos en peces alimentados con dietas ricas en aceite de pescado o vegetal se incrementa significativamente en intestino la expresión del citocromo P450 51 (involucrado en la vía de colesterol) y PPAR β , mientras que en hígado se incrementan PPAR α/γ y la elongasa de ácidos grasos de cadena larga (ELOVL) 5, aunque la desaturasa- $\Delta 6$ de ácidos grasos (FADSD6) disminuye su expresión. Sin embargo, a pesar del efecto lipogénico de los carbohidratos, la activación de genes de esta vía en hígado de trucha es promovida en mayor medida por la cantidad de proteínas o aminoácidos que por los carbohidratos o la glucosa (Skiba-Cassy *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2016). Asimismo, los genes de la lipólisis muestran una tendencia contraria en peces alimentados con dietas ricas en proteína (Skiba-Cassy *et al.*, 2013). La incorporación de lípidos en la dieta parece afectar negativamente la actividad de enzimas lipogénicas en hígado de lubina (Dias *et al.*, 1998). En tilapia los lípidos alimenticios disminuyen la expresión de genes de la vía lipogénica en hígado, la aumentan en tejido adiposo y no la afectan en músculo (He *et al.*, 2015), mientras que en hígado de carpa, una mayor cantidad de ácidos grasos en la dieta también hace que disminuya la expresión de genes de la síntesis de ácidos grasos y que aumente la expresión de genes de la vía lipolítica (Li *et al.*, 2016a).

1.5. SREBP

Los SREBPs constituyen una familia de factores de transcripción unidos a membrana que están implicados principalmente en la regulación génica de procesos relacionados con la homeostasis celular de lípidos (Horton, 2002). En mamíferos, se han descrito tres isoformas distintas de SREPBs codificadas por los genes SREBF-1 y SREBF-2. El gen SREBF-1 es capaz de generar dos isoformas, SREBP-1a y SREBP-1c, debido a la presencia de un inicio alternativo de la transcripción, que en el caso de la isoforma SREBP-1c produce un primer exón de menor longitud. El resto de los exones se mantienen igualmente presentes en estas dos isoformas, aún cuando en humanos también se ha descrito procesos de *splicing* alternativo menores. La tercera isoforma es transcrita por el gen SREBF-2 y se denomina SREBP-2, presentando aproximadamente un 47 % de homología respecto a las isoformas anteriores (Eberlé *et al.*, 2004).

La isoforma 1a se expresa de manera constitutiva en diferentes tejidos (Horton, 2002), aunque con mayor intensidad en tejidos con una gran capacidad de regeneración celular, como el bazo y el intestino (Eberlé *et al.*, 2004). Tanto la isoforma 1c como la 2 son reguladas a nivel transcripcional mediante diferentes mecanismos de regulación que involucran: la autorregulación por la presencia de elementos de respuesta a esteroides en los respectivos promotores, LXR, insulina y glucagón (Horton, 2002). La isoforma 1c es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos, como el hígado, el tejido adiposo blanco, el músculo esquelético, la glándula adrenal y el cerebro (Eberlé *et al.*, 2004).

SREBP-1a es un factor de transcripción más potente que las isoformas 1c y 2 ya que es capaz de transactivar la mayoría de los genes de respuesta a SREBP, incluyendo aquellos relacionados con la síntesis de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos. Por su parte, el papel que juega la isoforma 1c en la regulación de genes está limitado exclusivamente al metabolismo de ácidos grasos, mientras que SREBP-2 activa preferentemente los genes relacionados con la síntesis de colesterol (Horton, 2002). Sin embargo, a pesar de que el efecto de SREBP sobre genes del metabolismo de lípidos ha sido ampliamente estudiado, cada vez son más las evidencias que demuestran el efecto de SREBP-1 sobre genes del metabolismo de carbohidratos (Foufelle and Ferré, 2002; Gosmain *et al.*, 2005). En este sentido, se ha descrito que SREBP-1c transactiva la región promotora de los genes de la Hexokinasa II y GK en mamíferos (Foretz *et al.*, 1999; Gosmain *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004), y nuestro grupo ha demostrado que SREBP-1a es capaz de transactivar GK y PFKFB en dorada (Metón *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2008). Estudios más recientes, en los que se han evaluado patrones de expresión mediante *microarrays* han mostrado que en células musculares humanas 28 genes del metabolismo de carbohidratos se ven afectados por la sobreexpresión de SREBP-1a/c, de los cuales 15 son dianas directas de la acción de estos factores de transcripción y participan en el transporte de glucosa, la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo del piruvato-citrato (Rome *et al.*, 2008).

Un aspecto importante para entender el mecanismo de acción de los SREBPs es su regulación post-traducciona. El mRNA de las distintas isoformas de SREBPs se traduce a una proteína que para poder activarse y viajar al núcleo de la célula requiere un procesamiento proteolítico previo. El precursor inactivo de SREBP se encuentra anclado al retículo endoplasmático, con su dominio regulador carboxilo terminal unido a la proteína denominada SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP). Regulada por distintos estímulos, tales como niveles bajo de colesterol o la presencia de insulina, SCAP promueve la migración de SREBP al aparato de Golgi, donde se encuentran ancladas las proteasas S1P y S2P, que son capaces de hidrolizar enlaces peptídicos específicos de SREBP y otras proteínas. En el aparato de Golgi, S1P realiza un primer corte sobre un *loop* luminal de SREBP, dividiendo la proteína en dos fragmentos. Seguidamente S2P libera el extremo amino terminal de la

membrana, realizando un corte sobre el primer dominio transmembrana. El extremo amino terminal es la porción nuclear activa de SREBP, capaz de viajar al núcleo y transactivar los genes, tal como se muestra en la figura 1.3.

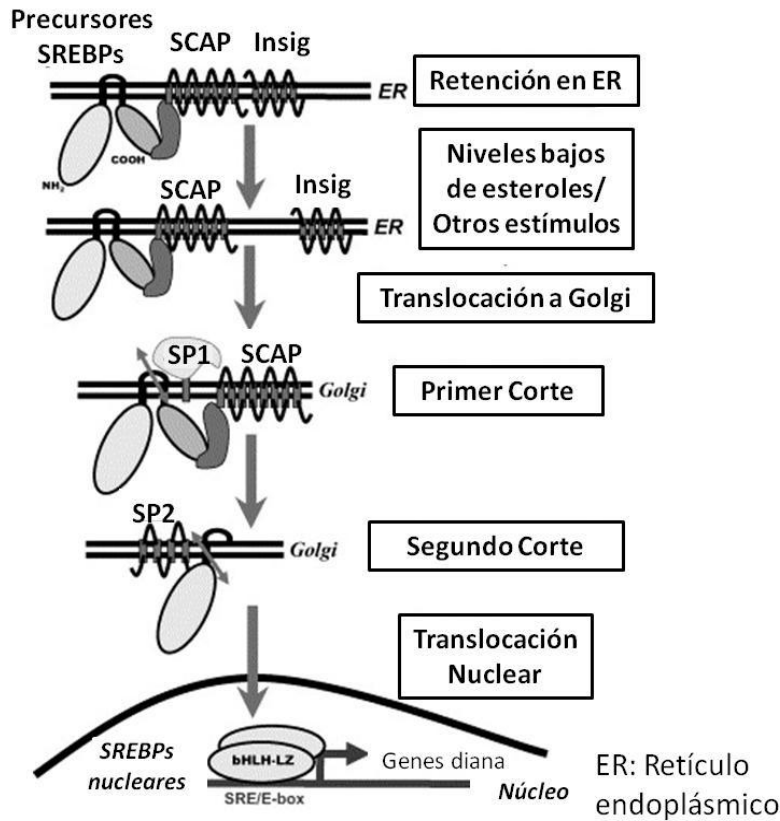


Figura 1.3. Procesamiento de SREBP, mediante el cual la proteína SCAP transloca SREBP al aparato de Golgi, donde se encuentran las proteasas S1P y S2P, que mediante cortes sucesivos producen la liberación de la porción nuclear de SREBPs para activar la transcripción de genes. Figura basada en Eberlé *et al.*, (2004).

1.6. CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La mitocondria desempeña un papel importante en el metabolismo de las hormonas esteroideas, síntesis de pirimidinas, eliminación de amonio en el ciclo de la úrea y muerte celular programada, además de ser la principal fuente de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, todas estas funciones están directa o indirectamente relacionadas con su principal función, la fosforilación oxidativa, la cual produce más del 90 % del ATP requerido en la mayoría de células y tejidos. La maquinaria que lleva a cabo la fosforilación oxidativa, se encuentra ubicada en la membrana mitocondrial interna y comprende los complejos I, II, III y IV, que se encargan de la cadena de transferencia de electrones, el complejo V o ATP sintetasa y la ubiquinona y el citocromo c como transportadores móviles de electrones (Srinivasan and Avadhani, 2012).

En la cadena respiratoria NADH y succinato sirven como donadores de electrones al complejo I, denominado NADH-ubiquinona oxidoreductasa, y al complejo II, succinato deshidrogenasa respectivamente. Desde estos complejos los electrones son transportados a la ubiquinol-citocromo c reductasa o complejo III y posteriormente al complejo IV o citocromo c oxidasa (COX), donde el O₂ sirve como aceptor final de electrones en una reacción final que forma H₂O. En la figura 1.4 se muestra el esquema del complejo multiproteico de la fosforilación oxidativa y su relación con la formación de un gradiente de protones a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, que proporciona la energía necesaria para que la ATP sintasa, genere ATP a partir de ADP y P_i.

Por otro lado, el intercambio de ATP por ADP entre los compartimentos citosólico y mitocondrial permite mantener el equilibrio entre estas dos moléculas. Este intercambio es llevado a cabo por una familia de transportadores denominados ADP/ATP translocasas. Estas proteínas permiten que la energía generada en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la mitocondria, pueda ser transportada hacia el citosol, donde es utilizada para distintos procesos celulares. La acción de las ADP/ATP translocasas no forma parte directamente de la fosforilación oxidativa, pero está íntimamente relacionada con este proceso. En humanos, existen 4 isoformas de ADP/ATP translocasas que comparten un 60-80 % de identidad, algunas de las cuales adicionalmente se han relacionado a un complejo de proteínas que intervienen en el proceso apoptótico (Yang *et al.*, 2007). Debido a su importancia en el balance de energía en la célula, estas proteínas son reguladas para ajustarse a las necesidades energéticas y de desarrollo en los distintos tejidos (Houldsworth and Attardi, 1988).

La fosforilación oxidativa en mamíferos está fuertemente regulada a nivel transcripcional. En este sentido, 13 de los genes que participan en este proceso son producidos por la maquinaria mitocondrial, mientras que más de 70 proteínas que participan en este proceso están codificadas por DNA nuclear, siendo sintetizadas en el citosol para ser importadas a la mitocondria gracias a la acción de chaperonas (Bermejo-Nogales *et al.*, 2015). Debido a ello, la regulación de este proceso es mucho más compleja, ya que la cantidad de proteínas y procesos involucrados comprenden desde la transcripción de genes hasta la localización subcelular de las proteínas en la mitocondria.

Debido a la importancia de este proceso en la generación de energía celular y a la emergencia de nuevas tecnologías que permiten la evaluación sistemática en la expresión de genes, son diversos los estudios que se han llevado a cabo y en los que se ha evaluado en diferentes especies, incluyendo la dorada, el efecto de factores como la restricción de alimentos sobre la fosforilación oxidativa (Bermejo-Nogales *et al.*, 2015; Keogh *et al.*, 2016).

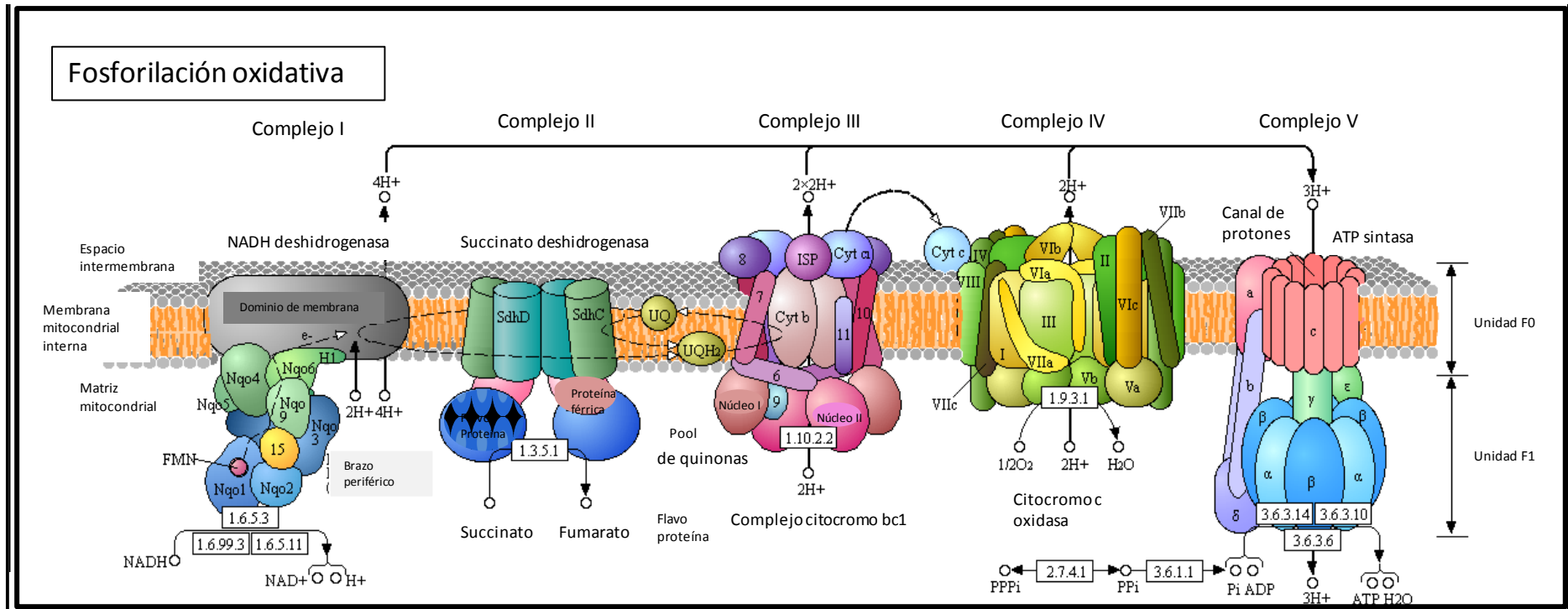


Figura 1.4. Mapa *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) representativo de los genes involucrados en el proceso de fosforilación oxidativa (Kanehisa, 1997). En la figura se describe el proceso de transferencia de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria, generando un gradiente de protones que se acopla a la síntesis de ATP en el complejo V o ATP sintasa. NADH dona dos electrones al complejo I, el cual a su vez los cede a la ubiquinona. El succinato es el donador de electrones (2) del complejo II, que a su vez también son transferidos a la ubiquinona. La ubiquinona reducida transfiere los electrones de ambas fuentes al complejo III, quien los cede de uno en uno al citocromo c. Del citocromo c pasan al complejo IV, el cual los acaba cediendo en paquetes de 4 a una molécula de oxígeno generando agua.

1.7 TRANSCRIPTÓMICA

1.7.1 DNA, RNA y expresión génica

Los ácidos nucleicos son moléculas fundamentales para la vida, ya que son los depositarios de la información estructural y funcional de la célula. El DNA es el encargado de mantener la información genética y de pasarla de generación en generación a través del proceso de replicación que precede a la división celular. Mediante la transcripción, el DNA es transcrito a diferentes tipos de RNA, entre los cuáles el mRNA permite transportar la información genética fuera del núcleo de las células eucariotas para que la maquinaria celular pueda sintetizar las proteínas que la célula requiere para su funcionamiento vital. Aunque por mucho tiempo este mecanismo que describe el paso de DNA a mRNA y luego a proteína, se conoció como el “dogma central de la biología molecular”, posteriormente se descubrió que existen mecanismos capaces de retrotranscribir la información del RNA para producir DNA (Berg *et al.*, 2008).

El estudio de la información genética de un organismo, una célula e incluso un virus, puede realizarse a través de distintos enfoques que dependen de los objetivos e hipótesis planteadas. En la actualidad es relevante el análisis de la expresión génica, ya que la determinación de los niveles de mRNA permite estudiar la funcionalidad génica. Así mismo, el enfoque “ómico” (estudio del conjunto) ha cobrado importancia desde que nuevas tecnologías han permitido disminuir los costos y tiempos para generar y procesar grandes cantidades de información. En este sentido, el transcriptoma nos permite conocer las diferentes variedades de mRNAs presentes en una célula, tejido u organismo en un momento particular o bajo ciertas condiciones, ya que está influenciado por factores tales como: el estadio de desarrollo y las condiciones medioambientales (Goetz and MacKenzie, 2008).

Los primeros estudios llevados a cabo sobre el transcriptoma en peces se desarrollaron sobre la especie modelo pez cebra (*Danio rerio*) en la década de los 90 (Gong *et al.*, 1997). Esta es una de las especies de peces con mayor cantidad de marcadores de secuencia expresados conocidos (ESTs, abreviatura de *expressed sequence tag*). Diversas colecciones de ESTs se han generado por el estudio transcriptómico de especies de interés en acuicultura, entre las que destacan: el salmón atlántico (*Salmo salar*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), la solea senegalense (*Solea senegalensis*) y la solea común, (*Solea solea*), entre otros. Previamente a la aplicación de tecnologías de *next-generation sequencing* (NGS), la caracterización de ESTs en dorada había sido llevada a cabo en hígado y embriones (Sarropoulou *et al.*, 2005).

1.7.2 *Next-generation sequencing*

Desde los inicios de la secuenciación con el método de Sanger, este proceso ha experimentado importantes mejoras tecnológicas que hacen posible generar un gran número de secuencias de forma más eficiente y económica. La pirosecuenciación de última generación permite en cortos periodos de tiempo (horas-días) procesar una gran cantidad de información genómica, desde megabases (Mb) a gigabases (Gb), por lo que esta plataforma se ha convertido en una herramienta esencial en la investigación científica con nuevas tecnologías (Cerdà y Manchado, 2013).

Actualmente, las tecnologías de NGS se pueden dividir fundamentalmente en plataformas de secuenciación de segunda, tercera y cuarta generación. La principal diferencia entre estas tecnologías radica en que las plataformas de segunda generación requieren una etapa de amplificación de PCR previa a la reacción de secuenciación. Las principales plataformas de segunda generación son: (1) plataforma 454 (Roche *Applied Science*), que permite obtener de 0,4 a 0,5 Gb por lectura con una longitud media en sus secuencias de 400 a 700 pares de bases (pb) y se basa en una PCR en emulsión seguida de la reacción de pirosecuenciación; (2) plataforma Solexa Illumina® (Illumina, Inc.), que mediante el fraccionamiento del genoma seguido de una amplificación clonal sobre la superficie sólida de una celda de flujo, es capaz de generar entre 200 a 300 Gb por lectura, con secuencias de 100 pb de longitud; y (3) *Solid*® (Life Technologies), con un proceso parecido al de la plataforma 454, con la diferencia de que las moléculas se fijan a una superficie de cristal donde se lleva a cabo la secuenciación (Glenn, 2011).

Las tecnologías de tercera generación permiten la secuenciación a partir de una única molécula de DNA y las principales plataformas son PacBio (Pacific Biosciences of California, Inc.), GridION (Oxford Nanopore Technologies Ltd.) y HeliScope (Helicos BioSciences Corporation) (Van Dijk *et al.*, 2014). Las tecnologías NGS de cuarta generación se basan en realizar procesos de secuenciación sobre extractos sólidos, lo que permite preservar la localización espacial de las secuencias de DNA y RNA, proporcionando perspectivas prometedoras para el estudio de patologías como el cáncer (Ke *et al.*, 2016).

Secuenciación 454

La secuenciación 454 es una tecnología de secuenciación ampliamente usada debido a su bajo error (<1 %), y al aumento de la profundidad y la cobertura de la secuenciación con respecto a otros métodos. Su utilización ha promovido y facilitado estudios transcriptómicos en peces (Qian *et al.*, 2014).

Esta plataforma sigue el método de pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1996), en el que el DNA es previamente fragmentado. Estos fragmentos se unen a adaptadores específicos ligados a microesferas de agarosa, por lo que cada fragmento de DNA queda asociado a una microesfera. El proceso se lleva a cabo en una emulsión de agua y aceite, capaz de formar micelas, en las que cada microesfera (con su respectiva secuencia) se encuentra aislada del resto junto con los reactivos y enzimas necesarios para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en emulsión). De esta manera, se obtiene un gran número de copias de cada fragmento de DNA en la superficie de la microesfera, aproximadamente un millón de copias (Margulies *et al.*, 2005).

Tras la amplificación, cada microesfera es cargada en una placa “*PicoTiterPlate*” que se introduce en el equipo secuenciador. Esta placa contiene un millón de pocillos que albergarán una única esfera con sus respectivos fragmentos de DNA, lo cuales serán secuenciados de manera independiente (Figura 1.5).

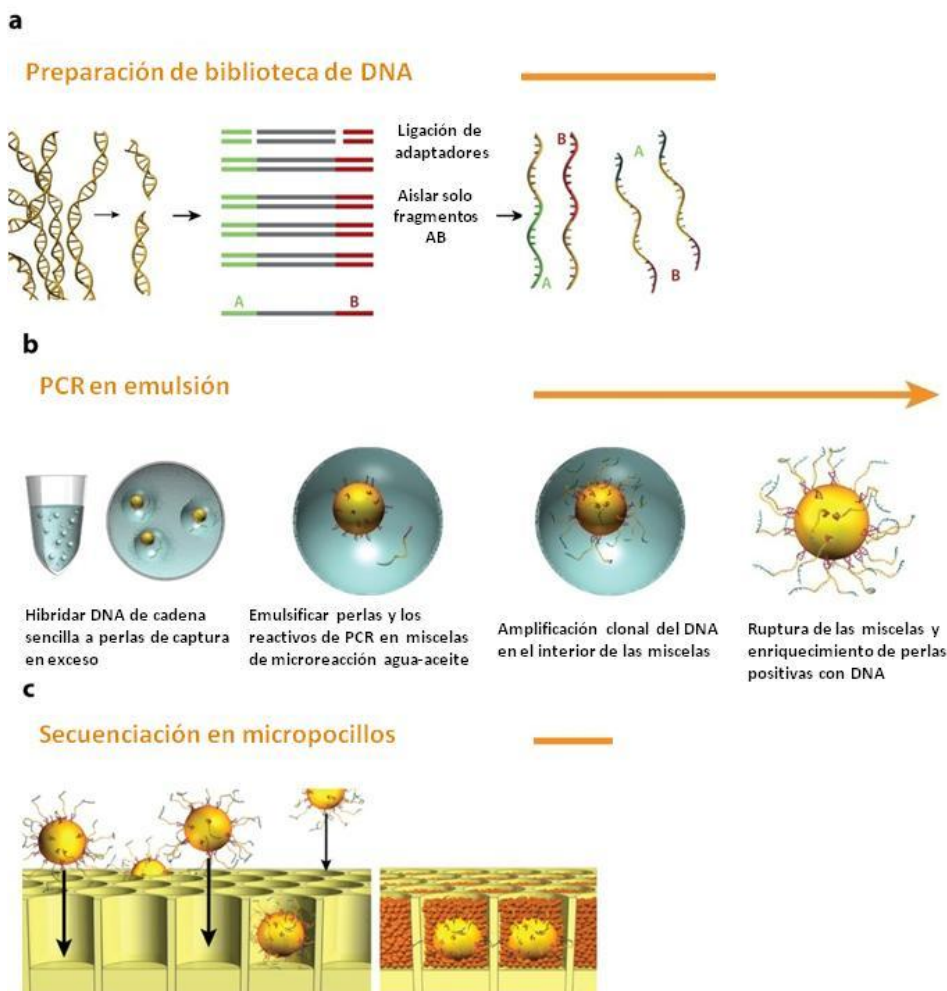


Figura 1.5. Flujo de trabajo de amplificación de la PCR en emulsión. (a) DNA genómico es aislado, fragmentado y ligado a adaptadores. (b) Los fragmentos obtenidos son unidos a microesferas en las cuales se produce la amplificación en presencia de los reactivos y las enzimas necesarias para la reacción. (c) Las microesferas son dispuestas en la placa “*PicoTiterPlate*” donde se produce la reacción de pirosecuenciación. Figura adaptada de Mardis, (2008).

1.7.3 Sistemas de clasificación de productos génicos

Cuando se maneja un gran número de datos de información, en este caso secuencias génicas, resultan relevantes los sistemas de clasificación que proporcionan información de interés biológico. Para ello, se han diseñado diversos sistemas de clasificación que permiten agrupar los genes en base a la función, tales como: el sistema de clasificación por ontología génica (GO) y la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEEG). La base de datos GO es el producto de un esfuerzo colaborativo que permitió establecer descripciones y agrupar los productos génicos anotados en diferentes bases de datos ya existentes, mediante su vinculación a procesos, estructuras o mecanismos en los que se ha descrito que están involucrados. El Consorcio GO fue fundado en 1998 por representantes de las bases de datos de tres organismos modelo (*Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Mus musculus*) y permitió la creación de terminologías que definen con precisión la descripción de las funciones de los genes y productos genéticos de cualquier organismo (Ashburner *et al.*, 2000). La base de datos GO organiza los términos funcionales en tres categorías complementarias y no excluyentes:

Procesos Biológicos: establece la relación de un producto génico con un determinado procedimiento de interés biológico. Puede implicar reacciones bioquímicas que intervienen en la transformación de moléculas en el entorno celular (como los procesos catabólicos o anabólicos) u otros procesos celulares tales como la expresión génica y transducción de señales, entre otros.

Función Molecular: se refiere a la actividad descrita de un determinado producto génico a escala molecular. Estos términos representan actividades y no entidades (moléculas o complejos moleculares) que llevan a cabo las acciones, sin especificar detalles del proceso en el que esta actividad pueda estar involucrada.

Componente Celular: Hace referencia al espacio celular donde se encuentra el producto génico. Un componente celular puede ser una estructura anatómica, como el retículo endoplasmático, el núcleo celular, o una estructura molecular más simple formada por productos génicos, como el ribosoma (Ashburner *et al.*, 2000).

La clasificación por términos GO presenta distintos niveles que describen con mayor o menor precisión la función génica en cuestión. Por ejemplo, para procesos biológicos, podemos encontrar en un nivel superior de clasificación términos tales como *procesos metabólicos*, o *respuesta a estímulos*, mientras que en un nivel más bajo estarían términos tales como *proceso biosintético de lípidos* o *procesos de oxido-reducción*.

Por otra parte, la base de datos KEGG (Kanehisa, 1997) permite clasificar los productos génicos en base a las rutas metabólicas en las que puede participar y facilita la agrupación de los genes en un contexto funcional. En 1995 se inició el proyecto que ha originado la clasificación KEGG bajo el Programa Genoma Humano del Ministerio de Educación, Ciencia, Deportes y Cultura de Japón (Minoru Kanehisa y Susumu Goto, 1999). El sistema KEGG permite la representación computacional del sistema biológico que integra un determinado producto génico y construye diagramas, en donde están integrados genes, proteínas, componentes químicos, reacciones e interacciones moleculares. Todos los conceptos que forman parte de la base de datos KEGG están categorizados en cuatro grupos principales: información de sistemas, información genómica, información química e información de salud, los cuales se subclasifican en 15 subgrupos.

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva durante la década pasada ha supuesto un importante estímulo para realizar estudios transcriptómicos. Particularmente en dorada, hasta la fecha se han llevado a cabo cinco proyectos transcriptómicos, de los que cuatro han utilizado el sistema 454 de Roche (García de la Serrana *et al.*, 2012; Yúfera *et al.*, 2012; Caldach-Giner *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013) y uno, el más reciente, el sistema Illumina (Sarropoulou *et al.*, 2016). Estos proyectos han analizado el transcriptoma a partir de diferentes tejidos, condiciones y estadíos del desarrollo. Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios llevados a cabo hasta la fecha, la información transcriptómica de dorada en base de datos públicas sigue siendo limitada y particularmente nuestro estudio es el primero llevado a cabo en hígado utilizando tecnologías de NGS, lo que permitiría ampliar la información transcriptómica disponible para comprender los mecanismos a que está sujeta la regulación del metabolismo en esta especie, de gran interés en la acuicultura.

1.8 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para el desarrollo de la transcriptómica, como área de investigación encargada del estudio de los genes transcritos a nivel celular bajo condiciones específicas, ha sido necesario el desarrollo de técnicas de secuenciación de RNA. En este sentido, con el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de secuenciación masiva e interpretación de datos a gran escala, ha cobrado impulso la secuenciación del RNA (RNAseq) como herramienta para conocer el transcriptoma de un determinado organismo o tejido bajo circunstancias determinadas. Esta metodología puede, además de secuenciar el RNA, cuantificarlo mediante el conteo de las secuencias originadas y el mapeo genómico, permitiendo establecer la cantidad de los diferentes transcritos en un momento determinado.

El perfeccionamiento de técnicas de microdiseño ha permitido el desarrollo de *microarrays* de DNA, los cuales permiten comparar los perfiles de expresión génica de miles de secuencias simultáneamente. Gracias a esta herramienta, más antigua que el RNAseq, es posible determinar cambios en la expresión génica bajo diferentes condiciones y por tanto determinar aquellos genes responsables de cambios fenotípicos, procesos biológicos, procesos moleculares, respuesta a enfermedades, etc. (Miller y Maclean, 2008). Esta herramienta en un principio ha permitido profundizar en los conocimientos de la genómica funcional de varias especies modelo, como: *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans* y *Danio rerio* (Altmann *et al.*, 2001; Furlong *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Actualmente, sigue siendo una técnica ampliamente utilizada para evaluar los niveles de expresión y el transcriptoma de diferentes organismos y tejidos en condiciones cambiantes.

Los *microarrays* se basan en la hibridación entre sondas de DNA (o RNA) unidas a una superficie sólida y moléculas diana objeto de estudio marcadas con fluorocromos (generalmente cianina de coloración verde -Cy3- o roja -Cy5-). Para la determinación de la expresión génica existen básicamente dos tipos de *microarrays* dependiendo del tipo de sonda utilizada para detectar la expresión: *microarrays* de cDNA y *microarrays* de oligonucleótidos. La diferencia principal radica en que en los de cDNA, como su nombre indica, las sondas corresponden al cDNA de la condición a analizar, por lo que el tamaño de las moléculas oscila entre 500 y 5.000 pb. Por otro lado, en los *arrays* de oligonucleótidos, las sondas, de menor longitud, se sintetizan *in situ* mediante fotolitografía.

La compañía Affymetrix es pionera en la comercialización de *microarrays* de oligonucleótidos, con sondas de 25 pb de longitud sintetizadas directamente en la superficie. Así mismo, la compañía Agilent produce *microarrays* de oligonucleótidos de 60 pb de longitud (utilizados en este estudio), que mejoran la especificidad debido al aumento de la longitud de la sonda, observándose mayor fluorescencia en el sitio de hibridación (Šášík *et al.*, 2004). La compañía Agilent, posee la herramienta web (eArray) que permite a los usuarios personalizar el diseño del *microarray*, lo cual representa otra ventaja. Sin embargo, la elección de la plataforma dependerá del experimento concreto a realizar, por lo que es recomendable considerar las ventajas y desventajas que cada tecnología proporciona.

En el ensayo de *microarrays* con dos canales, previamente a la hibridación de las secuencias dianas con sus respectivas sondas, se realiza el marcaje con dos fluorocromos distintos de las muestras a comparar (rojo -Cy5- y verde -Cy3-). Una vez marcadas, se ponen las muestras en contacto, en igualdad de condiciones, con las sondas dispuestas en la superficie del *microarray* para

que se produzca la hibridación mediante complementariedad de bases. Para determinar la cantidad de muestra hibridada, el *microarray* es excitado mediante una luz láser que provoca la emisión de fluorescencia de las moléculas marcadas. En base al grado de hibridación de las secuencias en el *microarray* con las secuencias diana marcadas, cada celda emite fluorescencia de un color e intensidad específica. De esta manera, se cuantifica la intensidad de la fluorescencia, que depende del grado de hibridación relativo (Figura 1.6).

Por último, se precisa la normalización de los datos de intensidad para eliminar la variabilidad de esta tecnología. Se describen dos tipos de variaciones: sistemáticas (ligadas a procedimientos técnicos) y aleatorias (atribuibles tanto a razones técnicas como biológicas) (Sánchez y Villa, 2008). Para llevar a cabo la normalización se utilizan paquetes bioinformáticos como Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004).

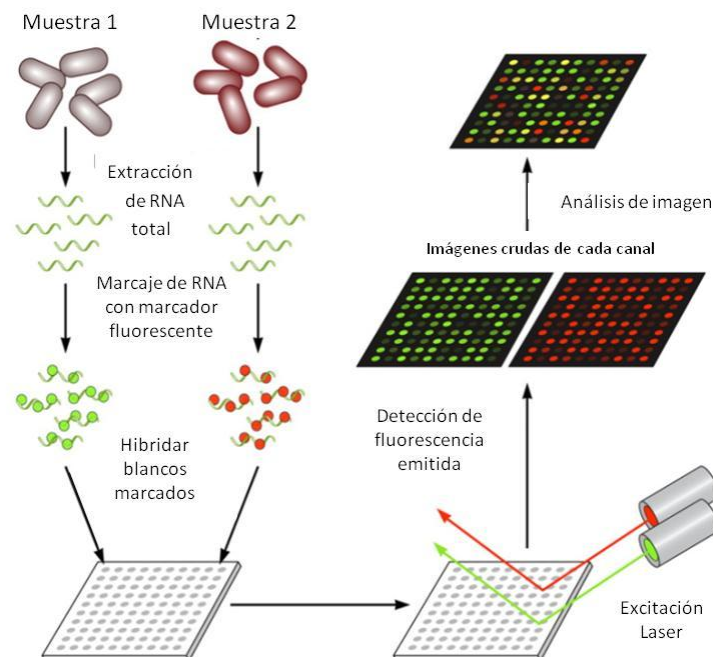


Figura 1.6. Flujo de trabajo para la determinación de expresión de genes mediante la utilización de *microarrays*. Figura adaptada de Miller y Tang (2009).

1.9 EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS

Son diversos los mecanismos utilizados para la expresión de genes exógenos en sistemas biológicos. De acuerdo al tipo celular (procarionta/eucarionta) y al nivel de organización (células en cultivo/organismos vivos), se describen diferentes vehículos para introducir DNA foráneo y promover la expresión de los genes que contenga. Por un lado, los vectores de expresión son moléculas de DNA que poseen todos los elementos necesarios para que la maquinaria de la célula sea capaz de

expresar genes específicos. Existen diferentes vectores de expresión, entre los que se encuentran los plásmidos de origen bacteriano diseñados para la expresión y los virus.

Cada vector de expresión presenta ventajas y desventajas que deben ser consideradas de acuerdo al diseño experimental a desarrollar. En este sentido, es importante considerar no sólo el vector, sino el método de transfección para que el DNA sea capaz de internalizarse en la célula huésped que se desea modificar. Los virus, como sistemas de expresión, presentan como principal ventaja que no sólo contienen DNA, sino que presentan todos los elementos necesarios para poder ser reconocidos e infectar a un determinado tipo celular, lo que genera una eficiencia de transfección por lo general mayor al 90 %. Sin embargo, los vectores virales presentan una serie de limitaciones tales como: toxicidad, restricción a determinados tipos de células, limitada capacidad de carga de DNA, producción, problemas de ensamblaje, recombinación, y alto coste (Tripathy *et al.*, 1996).

La producción de plásmidos de expresión es más sencilla, económica y genera menor inmunogenicidad que los virus. No obstante, su principal desventaja es la necesidad de utilizar algún tipo de vehículo que permita transportar y descargar el DNA dentro de la célula. A fin de evitar la degradación del DNA, así como facilitar la entrada del mismo en las células de tejidos *in vivo* se ha probado la formación de complejos polielectrolitos entre macromoléculas de DNA y sales inorgánicas, policationes, lípidos, etc. (Lárez Velásquez, 2006). Uno de los sistemas más utilizados actualmente son los liposomas o análogos sintéticos de la bicapa lipídica de la membrana celular, capaces de interactuar con el DNA y en solución acuosa, formando micelas que lo protegen y transportan (Eichhorn *et al.*, 2007; Morrey *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). Sin embargo, otros polímeros están siendo estudiados y utilizados con el fin de transportar DNA, entre los que destacan: polietilenimina, poli-L-lisina, quitosán y poliamidoamina (Lee *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002).

1.9.1 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN COMO VEHÍCULO PARA LA EXPRESIÓN DE GENES

La quitina es un biopolímero de amplia distribución en la naturaleza, la cual mediante un proceso de deacetilación parcial genera el polisacárido quitosán, compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Gartner and López, 2010). Gracias a ciertas ventajas, tales como, ser biodegradable, biocompatible y no inmunogénico, este compuesto ha sido ampliamente estudiado para diversas aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo vehículo para dirigir DNA al interior celular, en donde además lo protege de la degradación por parte de nucleasas (Nimesh *et al.*, 2010). El complejo DNA-quitosán se produce como resultado de la interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente del quitosán y los grupos fosfato cargados negativamente del DNA. El complejo de DNA nanoencapsulado con quitosán interactúa con las membranas celulares mediante

fuerzas electrostáticas no específicas, lo que permite su internalización mediante endocitosis (Nimesh *et al.*, 2010).

El quitosán posee un pKa de 6,5, por lo que es soluble en soluciones ácidas (pH 1-6), en las que se protonan la mayoría de los grupos amino. A valores de pH superiores a 6 el quitosán puede acomplejarse con diferentes componentes en solución. Por otro lado, uno de los parámetros primordiales en el control de la interacción de partículas en suspensión es el potencial zeta. En este sentido, cuando el potencial zeta del quitosán se aproxima a 0, tienden a formarse partículas con un tamaño de 1 a 5 μm (Erbacher *et al.*, 1998). Sin embargo, el tamaño de las partículas no es el único factor a considerar, dado que la carga superficial de las partículas también parece ser relevante (Dash *et al.*, 2010).

Los trabajos pioneros en el uso de quitosán como transportador de material genético datan del 1996 (Mumper *et al.*, 1996). El tamaño de los complejos de DNA-quitosán puede oscilar entre 80 y 800 nm de diámetro (MacLaughlin *et al.*, 1998; Richardson, 1999; González *et al.*, 2016; Sáez *et al.*, 2017) y se forman al mezclar quitosán y DNA plasmídico. El tamaño de las partículas formadas parece estar relacionado con el peso molecular del quitosán, concentración del DNA, concentración salina, pH, carga y temperatura (Borchard and Junginger, 2001; Janes *et al.*, 2001a, 2001b). Así mismo, se ha investigado el efecto de diversos factores como pH, suero, concentración, peso molecular, formulación, modificaciones en su estructura o la incorporación de aditivos a fin de optimizar la estabilidad de complejos DNA –quitosán que faciliten la transfección de material genético (Ishii *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2010; Saranya *et al.*, 2011).

Los derivados de quitosán han demostrado ser un sistema de transfección de DNA eficiente en diversos tejidos y en especial en hígado (Richardson, 1999; Schatzlein *et al.*, 2005; González *et al.*, 2016; Sáez *et al.*, 2017). En este sentido, previamente en nuestro laboratorio se describió como nanopartículas de DNA-quitosán-tripolifosfato (TPP) inyectadas intraperitonealmente a juveniles de dorada, fueron eficaces para transfectar un plásmido de expresión de shRNA y provocar la disminución de los niveles de mRNA y de actividad enzimática de la alanina aminotransferasa citosólica en hígado de dorada, modificando además los niveles de actividad de diversas enzimas del metabolismo intermediario (González *et al.*, 2016).

Otros estudios en peces también han utilizado DNA acomplejado con quitosán a fin de transferir información genética *in vivo*. Ramos *et al.* (2005) reportaron la viabilidad de la transferencia de genes utilizando el quitosán en la dieta como vehículo de transfección en tilapias, en donde se indujo la expresión de β -galactosidasa de origen bacteriano en bazo, estómago e intestino. En esta misma línea, un estudio reciente en dorada comprobó que la administración oral, mediante

cánula gástrica, de DNA plasmídico nanoencapsulado con quitosán, resultó ser un medio eficiente para la detección tanto del gen como de actividad β -galactosidasa en intestino e hígado (y en menor medida en músculo) hasta 60 días después del tratamiento (Sáez *et al.*, 2017).

La expresión de genes exógenos en animales de consumo humano genera cierto rechazo en la población. Sin embargo, a diferencia de los organismos transgénicos, en los que el DNA se integra en el genoma del animal y puede ser transferido de generación en generación, la expresión transitoria de genes exógenos permite la modulación temporal de la expresión génica, proceso que cesa tras la degradación del DNA exógeno días después de la transfección (Winegar *et al.*, 1996). Adicionalmente, en acuicultura la transferencia transitoria de genes resulta de interés para la administración de vacunas de DNA que permitan prevenir enfermedades infecciosas en especies comerciales, con resultados prometedores en diversos estudios tras la administración oral o intramuscular en peces (Hansen *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1996; Corbeil *et al.*, 2000).

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

En la actualidad, la acuicultura se perfila como uno de los métodos de producción de proteína de origen animal con mayor crecimiento y excelentes perspectivas para cubrir la creciente demanda de alimentos para la población. Así mismo, los peces son la principal fuente de PUFAs ω -3 y ω -6, componentes esenciales de la dieta en los seres humanos que reportan importantes beneficios para la salud, tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares (Li *et al.*, 2016b).

Uno de los principales objetivos en la investigación acuícola es la sustitución, al menos parcial, de proteínas de la dieta suministrada a peces en cultivo por nutrientes más económicos y sostenibles, como los carbohidratos. Una disminución de la proteína suministrada con la dieta contribuiría a una menor dependencia de la harina de pescado en la acuicultura. La harina de pescado constituye el aporte principal de proteína para las dietas manufacturadas para acuicultura y es un componente poco sostenible, obtenido a partir de capturas en caladeros pesqueros cada vez más sobreexplotados, con un importante efecto medioambiental a nivel local y que encarece significativamente la producción de peces (Naylor *et al.*, 2000, 2009; Gormaz *et al.*, 2014)(Naylor 2000, Gormaz, 2014).

Por otra parte, la composición final de ácidos grasos en los peces presenta una alta dependencia del tipo de lípidos consumidos, que en el medio natural provienen de lípidos acumulados en los niveles inferiores de la red trófica. Adicionalmente a la harina de pescado, la producción de piensos acuícolas presenta una alta dependencia del aceite de pescado. Y, como ocurre con la harina de pescado, los aceites de pescado son asimismo otro de los componentes que encarecen fuertemente la elaboración de los piensos y ponen en duda la sostenibilidad de la acuicultura a largo plazo.

En este sentido, se han hecho grandes esfuerzos con el fin de incrementar los conocimientos relacionados con la regulación nutricional del metabolismo de diversas especies de peces comerciales y, particularmente, el efecto que producen los componentes de la dieta. La dorada (*Sparus aurata*) es una especie ampliamente cultivada en los países mediterráneos, resultando ser el pez más producido en España y, de entre las especies marinas, el de mayor producción en Europa. A pesar de la importancia comercial que presenta el cultivo de dorada, la cantidad de información disponible sobre los mecanismos de regulación metabólica a nivel molecular sigue siendo limitada para esta especie, a diferencia de otras especies de peces, como el salmón o el pez cebra. Es por ello que se requiere incrementar y profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que determinan el control nutricional del metabolismo en la dorada, especie de hábitos mayoritariamente carnívoros.

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido realizar un análisis transcriptómico a partir de muestras de hígado y músculo esquelético de dorada que pudiera resultar de utilidad para realizar estudios nutricionales e incrementar la información transcriptómica disponible para esta especie. La información transcriptómica derivada de este trabajo se utilizó para diseñar los *microarrays* de oligonucleótidos y evaluar los cambios en el patrón global de expresión génica en hígado y músculo esquelético de doradas como consecuencia de la composición de la dieta suministrada o el estado nutricional, permitiendo asimismo la identificación de genes biomarcadores relacionados con la utilización de los nutrientes de la dieta.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral han sido:

- Obtener un transcriptoma a partir de RNA total de hígado y músculo esquelético de doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales, con el fin de disponer de una amplia base de datos de secuencias de utilidad para desarrollar investigación nutricional en *S. aurata*.
- Diseñar un *microarray* de oligonucleótidos a partir de la información transcriptómica obtenida y evaluar, mediante hibridación del *microarray*, el efecto del ayuno y la alimentación con dietas de diferente composición en macronutrientes sobre el patrón global de expresión génica en hígado y músculo esquelético, y en especial sobre la expresión de genes implicados en la cadena respiratoria-fosforilación oxidativa y el metabolismo lipídico.
- Validar e identificar genes biomarcadores del efecto de la composición de la dieta y el estado nutricional en dorada.
- Obtener nanopartículas de quitosán-TPP acomplejadas con un plásmido de expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster para analizar el efecto metabólico de la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de de dorada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se han utilizado juveniles de dorada (*Sparus aurata*). La dorada es un pez teleósteo de la familia *Sparidae* que habita principalmente en los mares Mediterráneo y Negro, aunque su distribución geográfica se extiende adicionalmente al océano Atlántico desde el Sur de las islas británicas hasta Senegal. Con cuerpo ovalado y comprimido lateralmente, presenta una mancha oscura sobre el opérculo y una franja dorada situada entre los ojos, de la que deriva su nombre común. Por lo general mide unos 30 cm de largo aunque puede llegar a 70 cm y sobrepasar los 5 kg de peso.

Es una especie hermafrodita protándrica. En el primer año de vida suelen ser inmaduros sexualmente, aunque algunos individuos pueden madurar como machos durante este tiempo. La primera maduración sexual, como machos, suele producirse durante el transcurso del segundo año de vida y se extiende hasta el tercer año. Al finalizar esta etapa reproductiva, aproximadamente un 80% de la población lleva a cabo un proceso de reversión sexual, momento en el cual comienzan a comportarse como hembras, mientras que el 20 % restante no culmina este proceso y permanece como machos (Ortega, 2008).

En los países mediterráneos ha adquirido gran importancia el desarrollo del cultivo y producción de la dorada debido al notable impacto económico y alimentario que supone esta especie para las poblaciones humanas de la zona.

En condiciones naturales es un animal de hábitos mayoritariamente carnívoros, que se alimenta de moluscos bivalvos, crustáceos, pequeños peces y cefalópodos. Soporta un gran rango de salinidad, lo cual le permite habitar ambientes costeros de aguas salobres, por lo general poco profundos, aunque los adultos pueden llegar a vivir a profundidades entre los 100-150 metros y adoptar un comportamiento solitario. Los juveniles suelen habitar litorales de aguas de menor profundidad. La temperatura óptima de crecimiento está alrededor de los 25-26 °C, aunque puede soportar temperaturas de hasta 32 °C; sin embargo, es una especie bastante sensible a bajas temperaturas, dejando de alimentarse por debajo de los 12 °C y no sobreviviendo a temperaturas inferiores a 5-7 °C.

3.2 CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS PECES

Los peces utilizados en estos estudios procedían de piscifactorías pertenecientes al grupo Andrómeda.

Por un lado se desarrolló un primer experimento con peces alimentados con dietas de distinta composición en macronutrientes. Los alevines de dorada procedían de la piscifactoría Piscimar S.L. (Burriana, Castellón). Este primer experimento permitió generar un transcriptoma que posteriormente fue utilizado para realizar estudios de expresión génica mediante el uso de *microarrays*.

Se realizó un segundo experimento a fin de producir modificaciones genéticas transitorias puntuales en juveniles de doradas mediante inyección intraperitoneal de nanopartículas de DNA-quitosán-TPP. El objetivo de este experimento era analizar el efecto promovido tras la sobreexpresión de SREBP1-a en el hígado. En este caso los peces provenían de las instalaciones de la empresa en Águilas, Murcia.

En ambos casos los peces fueron transportados desde la empresa en tanques de 50 L de agua marina procedente del acuario de Barcelona, cuya salinidad fue previamente equilibrada a 35 ‰, bajo temperatura controlada y con suplemento de oxígeno. Una vez llegaron a nuestras instalaciones ubicadas en el Departamento de Ecología de la Facultad de Biología (Universidad de Barcelona), los peces fueron pesados (peso inicial: 5 - 8 g) y transferidos a acuarios con una capacidad de 260 litros de agua, instalados en dos cámaras climatizadas que nos permitían mantener la temperatura del agua constante, a $21 \pm 0,5$ °C, así como programar la iluminación para someter a los peces a un fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad.

Cada acuario constituía un sistema cerrado independiente, donde las condiciones fisicoquímicas eran monitorizadas de forma periódica, a fin de mantener las condiciones de homogeneidad entre acuarios e idoneidad para el mantenimiento de los peces. Los niveles de oxígeno disuelto se garantizaban mediante compresores que suministraban aire a una velocidad de circulación de 400 L/h (Stellar S-30, California, USA). A fin de mantener los acuarios en condiciones óptimas los restos de comida y excrementos se eliminaban mediante aspiración manual. Así mismo, cada acuario poseía un filtro externo Eheim profesional 3 (Eheim, Deizisau, Alemania) compuesto por tres secciones que permiten un filtrado mecánico (cerámica), químico (carbón activado) y biológico (bacterias nitrificantes) mediante el bombeo de agua (1800 L/h); para garantizar el mantenimiento de los niveles de amonio y pH, así como la eliminación de cualquier otra especie química tóxica para los peces que se pudiera generar a partir de las excreciones o la degradación del

alimento no ingerido. Para controlar la carga microbiana cada acuario estaba provisto de una lámpara ultravioleta Eheim reeflexUV 800 (Eheim, Deizisau, Alemania) ubicada a la salida del filtro. Por último, para mantener la salinidad del agua y reponer cualquier disminución del volumen total producto de la evaporación fue necesario añadir agua destilada o agua de mar en proporciones adecuadas.

3.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.3.1 Elaboración de las dietas

Mediante el uso de una batidora (Kenwood) se mezclaron en seco todos los ingredientes (Tablas 3.1 y 3.2), a excepción del cloruro de colina, hasta obtener una masa homogénea. Se disolvía el cloruro de colina en un volumen de agua destilada equivalente al peso de la mezcla y se agregaba sin dejar de mezclar. Tras asegurar la incorporación completa del agua a la mezcla se agregaba el aceite de pescado y se continuaba mezclando hasta obtener una pasta homogénea. Seguidamente se procesaba la mezcla en un moldeador de pasta Simac Pastamatic 700 con poros de 2,5 mm de diámetro. Los filamentos obtenidos se secaron en una estufa (WTE Binder 7200, Alemania) a 70 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de secado se fragmentaron en una trituradora (Kenwood) hasta obtener fragmentos pequeños que se sometían a un proceso de tamizado con distintos tamaños de poro permitiendo eliminar el polvo y retener los fragmentos mayores, sobre los cuales se realizó un nuevo proceso de trituración hasta obtener un pienso granulado de 3 a 5 mm de largo y 2 mm de diámetro. Los piensos se almacenaron a 4 °C durante todo el desarrollo experimental.

3.3.2. Experimento 1: Obtención del transcriptoma de dorada para la realización de estudios nutricionales

A fin de obtener datos transcriptómicos de utilidad para desarrollar estudios de interés nutricional en la dorada, se formularon 5 dietas que variaban en la composición de macronutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos) manteniendo la cantidad de energía constante. Las dietas se denominaron con la siguiente nomenclatura*: HLL, MHL, LLH, MLM, LHM (Tabla 3.1). Adicionalmente, un sexto grupo de peces fue sometido a ayuno. La suma de las 6 condiciones nutricionales nos permitió obtener una amplia representación de mRNA de interés en estudios metabólicos relacionados con el aprovechamiento de nutrientes.

*Nota: Cada letra indica el nivel relativo de macronutrientes (*High*, *Medium* and *Low*), la primera letra se refiere a las proteínas, la segunda a los lípidos y la tercera a los carbohidratos. Por ejemplo: HLL indica altos niveles relativos de proteínas, bajo nivel de lípidos y bajo nivel de carbohidratos.

Tras una semana de aclimatación en nuestras instalaciones en que los peces fueron alimentados a saciedad con la dieta Microbaq 15 (Dibaq Grupo, España) (Tabla 3.2), los juveniles de dorada fueron pesados y separados en acuarios a razón de 20 - 25 peces/acuario. A partir de este momento a cada acuario se suministraba una de las dietas indicadas anteriormente o bien fueron sometidos a un proceso de ayuno durante un período de 23 días. Los peces fueron alimentados a saciedad de lunes a viernes suministrando el alimento una vez a la mañana (9:30) y otra por la tarde (15:30), mientras que los fines de semana recibieron una única ración al mediodía (12:00). Cada 7-10 días los peces se pesaron a fin de adaptar la ración de dieta que les corresponde.

Al finalizar el experimento se recolectaron los siguientes datos y muestras: peso final de cada pez, sangre, peso del hígado, muestra de hígado y muestra de músculo esquelético.

Tabla 3.1. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales.

DIETAS	HLL	MHL	LLH	MLH	LHH
Formulación (%)					
Harina de pescado *	81,62	67,55	54,35	67,55	54,32
Almidón ‡	15,00	16,70	37,06	26,70	26,60
Aceite de pescado †	0,76	13,13	5,97	3,13	16,46
Mezcla de minerales ¶	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Mezcla de vitaminas	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Carragenano §	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Energía bruta (kJ/g dw)	20,1	22,4	19,9	20,02	22,13
Análisis químico (% peso seco)					
Proteína cruda	58,0	48,0	38,6	48,0	38,6
Grasas	9,9	20,7	12,1	10,7	22,5
Carbohidratos**	15,0	16,7	37,1	26,7	26,6
Cenizas	15,4	12,9	10,5	12,9	10,5

* Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

‡ Almidón pregelatinizado de maíz adquirido en Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

† A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

¶ Mezcla mineral (mg/Kg): CaHPO₄·2H₂O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO₄·7H₂O, 60; ZnO, 30; MnO₂, 15; CuSO₄·5H₂O, 1.7; CoCl₂·6H₂O, 1.5; KI, 1.5; Na₂SeO₃, 0.3.

|| Mezcla de vitaminas (mg/Kg): Cloruro de colina, 1200; mio-inositol, 400; ácido ascórbico, 200; ácido nicotínico, 70; acetato de alfa tocoferol, 60; pantotenato de calcio, 30; riboflavina, 15; piridoxina, 10; ácido fólico, 10; menadiona, 10; tiamina-HCl, 8; trans retinol, 2; biotina, 0,7 colexaliferol, 0,05; cianocobalamina, 0,05.

§ Iota carrageenan (Sigma-Aldrich).

** Los carbohidratos fueron calculados por diferencia (100 - % proteína cruda - % lípidos - % cenizas).

†† Calculado a partir de la composición (proteína 24 kJ/g, lípidos 39 kJ/g, carbohidratos 17 kJ/g).

Tabla 3.2. Composición y análisis proximal de la dieta comercial Microbaq 15

Microbaq 15	
<i>Formulación (%)</i>	
Harina de pescado	60,50
Trigo	11,50
Aceite de pescado	13,50
Gluten de trigo	8,30
Minerales	1,70
Lecitina de soja	2
Concentrado soluble de pescado	2,50
TOTAL	100
<i>Análisis químico (% peso seco)</i>	
Proteína	53,59
Lípidos	21,44
Carbohidratos	15
Humedad	5
Cenizas	9,97
Fósforo total	1,20
Celulosa	0,50
TOTAL	100

3.3.3 Experimento 2: Efecto metabólico de la sobreexpresión transitoria de SREBP-1a en hígado de dorada

SREBP-1a es un factor de transcripción involucrado en el metabolismo energético, afectando principalmente la expresión de genes del metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol, aunque presenta también la capacidad de modular genes de otras rutas como por ejemplo el metabolismo de la glucosa. A fin de analizar el efecto metabólico de la sobreexpresión hepática de este factor de transcripción y su relación sobre la utilización de los nutrientes de la dieta suministrada, se determinó el efecto que produce sobre la expresión génica en hígado de doradas alimentadas con las dietas HLL o LLH una única dosis, inyectada intraperitonealmente, de nanopartículas de quitosán-TPP acomplexadas con un plásmido de expresión del dominio activo de la proteína SREBP-1a de hámster.

Para este estudio, tras un período de aclimatación de 19 días con la dieta Microbaq 15 (Dibaq Grupo, España), los peces una vez fueron pesados y distribuidos en acuarios (20 - 30 peces por acuario) se sometieron a una rutina de alimentación a saciedad con las dietas HLL o LLH una vez al día durante 15 días. Posteriormente, a 20 peces de cada grupo alimentado con la dieta correspondiente, se le administró por vía intraperitoneal 10 µg/g de pez de plásmido pSG5-SREBP-1a

o pSG5 vacío (control negativo) acomplejados con quitosán-TPP en solución de cloruro de sodio estéril al 0,09 % (10 peces por tratamiento).

3.4. PLÁSMIDOS

El plásmido pSG5-SREBP-1a fue gentilmente facilitado por el Dr. Diego Haro del Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España.

A partir del constructo pSG5-SREBP-1a obtuvimos el plásmido pSG5 vacío mediante digestión enzimática, eliminación del inserto, ligación y purificación.

3.4.1. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son enzimas capaces de reconocer e hidrolizar secuencias específicas en el DNA permitiendo obtener fragmentos del mismo. Dado que para clonar el inserto de SREBP-1a en pSG5 se habían utilizado las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, estas enzimas fueron utilizadas para extraer este fragmento y obtener un plásmido control vacío (pSG5). La restricción enzimática se realizó incubando a 37 °C la mezcla de restricción I (Tabla 3.3) durante 1 hora 30 minutos, se añadió 10 U adicionales de cada enzima y se incubó durante el mismo tiempo una vez más.

Tabla 3.3. Mezcla de restricción I

Restricción I	
Plásmido	5 µg
EcoRI (<i>Thermo Scientific</i>)	20 U
BamHI (Roche)	20 U
Buffer B Roche	5 µl
Agua	q.s.p. 50 µl

3.4.2. Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

La electroforesis es una técnica que permite la separación de fragmentos de DNA de acuerdo al tamaño mediante el paso por una matriz porosa de agarosa. La carga negativa del DNA es utilizada para este proceso ya que al aplicar un voltaje en una solución tampón TAE 1X (Tabla 3.4) se produce la migración y el paso de los fragmentos a través del gel.

Para cargar la muestra en el gel es necesario mezclarla con un tampón de carga (Tabla 3.5), que posee glicerol, a fin de proporcionar densidad a la muestra y permitir la adecuada deposición en los pocillos del gel, la presencia de un colorante (*Orange G*), permite visibilizar el desarrollo de la electroforesis, ya que esta molécula de pequeño tamaño y con color es la que más se desplaza en el gel (frente de electroforesis). Los fragmentos de DNA en el gel fueron visualizados mediante la incorporación al gel de un agente intercalante del DNA (*red safe, Intron Biotechnology*) que es capaz de emitir fluorescencia al ser expuesto a luz ultravioleta. Las imágenes fueron captadas utilizando un *Gel Logic 100 Imaging System* (Kodak). Para identificar los fragmentos de acuerdo a su tamaño se utilizó el marcador de peso molecular *Gene ruler 1 Kb DNA ladder* (Fermentas).

El plásmido digerido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Tabla 3.6), lo que permitió separar el inserto del plásmido propiamente dicho. Una vez separados los fragmentos se utilizó el kit *High Pure PCR Product Purification* de Roche para cortar y aislar el fragmento del gel que contiene únicamente el plásmido lineal.

Tabla 3.4. Tampón de electroforesis

TAE 50X pH 8	
Tris HCl	2 M
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	100 mM
Ácido Acético Glacial	57,1 ml

Tabla 3.5. Tampón de carga de muestra

TAE 6X	
Glicerol	30 %
Orange G	0,25 %

Tabla 3.6. Gel de agarosa

Gel de Agarosa	
Agarosa	0,8 % - 2 % p/v
Buffer TAE 1X	100 mM
<i>Red Safe</i>	0,1 µl/ml

Nota: Una vez pesada, la agarosa se disuelve completamente en Buffer TAE calentando hasta llegar a punto de ebullición. Posteriormente se añade el gel a la cámara soporte con el *red safe*, se mezcla y se espera a que solidifique.

3.4.3. Obtención de extremos romos de DNA mediante *Fill-in* y ligación de fragmentos de DNA

Para asegurar una correcta recircularización del plásmido mediante ligación fue necesario previamente producir extremos romos mediante *Fill-in*, técnica que utiliza el fragmento *Klenow* de la polimerasa (*Thermo Scientific*) y dNTPs (Tabla 3.7). Tras incubar 15 minutos a 37 °C se convierten extremos 5' protuberantes en romos. Para inactivar la enzima se incubó 10 minutos a 75 °C.

La ligación es un proceso que permite el empalme de fragmentos lineales de DNA mediante la formación de un enlace entre los extremos 5'-fosfato y 3'-OH. Para recircularizar el plásmido pSG5, se utilizó *2X Rapid Ligation Buffer* y ligasa del fago T4 (Promega) en la proporción descrita en la tabla 3.8. Se promovió la ligación mediante incubación de 1 h a temperatura ambiente y posteriormente a 4 °C toda la noche.

Tabla 3.7. Mezcla de *Fill-in*.

Fill-In	
Plásmido Lineal	500 ng
<i>Klenow fragment</i>	10 U
dNTPs	0,5 mM
10X Buffer	4 µl
Agua	q.s.p. 20 µl

Tabla 3.8. Mezcla de ligación

Ligación	
<i>2X Rapid Ligation Buffer</i>	5 µl
Plásmido luego del <i>Fill-In</i>	4 µl
<i>T4 DNA ligase (Promega)</i>	10 U

3.4.4 Obtención de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Con el fin de aumentar la permeabilidad de la membrana de *E. coli* y aumentar la eficiencia de la transformación bacteriana, que en condiciones naturales es muy baja, las células bacterianas pueden ser sometidas a un tratamiento para hacerlas competentes. En nuestro caso se utilizó el procedimiento basado en tratar las células con calcio y cuyo protocolo se describe a continuación:

- Inocular células *E. coli* en 3 ml de medio LB.
- Colocar en agitación constante, a 37 °C, durante 12-15h.
- Utilizar 0,5 ml del cultivo obtenido para inocular 50 ml de medio LB estéril cuya composición está indicada en la tabla 3.9.
- Dejar las células a 37 °C en agitación, unas 2-3 horas, hasta que la $DO_{590\text{ nm}}$ alcance 0,7-0,8, indicando que el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial. La densidad óptica no debe sobrepasar 0,9.
- Centrifugar las células a 2500 xg durante 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 50 ml de $MgCl_2$ 100 mM a 4 °C.
- Centrifugar nuevamente a 2500 xg durante 10 min, para lavar las células.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 10 ml de $MgCl_2$ 100 mM a 4 °C.
- Agregar 100 ml de $CaCl_2$ 100 mM y mantener las células en hielo, durante 60-90 min.
- Volver a centrifugar 10 min a 2500 xg y retirar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 12,5 ml de solución de resuspensión (Tabla 3.10).
- Realizar alícuotas de 200 µl de células y congelarlas inmediatamente a -80 °C.

Tabla 3.9. Composición del medio LB

Medio LB	
Triptona	1 %
Extracto de levaduras	0,5 %
NaCl	1 %
Agua	Solvente

Tabla 3.10. Solución de resuspensión de células

Solución de resuspensión	
CaCl ₂	85 mM
Glicerol	15 %

Nota: Esterilizar la solución mediante autoclave.

3.4.5. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se basa en utilizar métodos que permitan la modificación transitoria de la permeabilidad de la membrana de células competentes para favorecer la entrada de DNA. En nuestro caso se utilizó el método del shock térmico para introducir DNA plasmídico en células *E.coli* DH5 α competentes. El método utilizado se describe a continuación:

- Mezclar 5 μ l de producto de ligación con al menos 50 μ l de células competentes.
- Incubar 15 minutos en hielo
- Incubar 3 minutos a 42 $^{\circ}$ C y posteriormente 5 minutos en hielo.
- Agregar 600 μ l de medio LB estéril (Tabla 3.9) e incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 45 minutos
- Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad, descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en un volumen < 100 μ l.
- Sembrar el *pellet* celular en placas de LB-Ampicilina 100 μ g/ml (Tabla 3.11).
- Incubación durante la noche a 37 $^{\circ}$ C.

Tabla 3.11. Composición de placas LB

Placas de LB-Agar/Ampicilina 100 μ g/ml	
Triptona	1 %
Extracto de levaduras	0,5 %
NaCl	1 %
Agar Bacteriológico	1,5 %
Agua	Solvente
Ampicilina	100 μ g/ml

Nota: La ampicilina se añade al volumen total del medio tras autoclavado y atemperación a 55 $^{\circ}$ C. Luego se deposita el medio en las placas y se espera a que solidifique.

3.4.6. PCR Screening

La PCR es una técnica fundamental en biología molecular que permite la amplificación de fragmentos de DNA. En este trabajo se verificó la presencia de colonias positivas en placas de LB-agar mediante un *PCR Screening* de colonia que permite amplificar fragmentos específicos de DNA presentes en una pequeña cantidad de células bacterianas procedentes de una colonia aislada. Para realizar el *PCR Screening* del plásmido pSG5 se utilizaron los oligonucleótidos T7 y pSG5-rev (Tabla 3.12) La amplificación de un fragmento de 391 pb fue detectada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Tanto la mezcla de reacción para la PCR como el programa utilizado se indican en las tablas 3.13 y 3.14.

Tabla 3.12. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los plásmidos pSG5-SREBP-1a y pSG5 vacío.

Oligo	Secuencia (5'-3')
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGG
JS1503	AGAATACCCAGCACAGGAG
JS1504	AGACAACTGCCCATCCATC
pSG5rev	CGGAGCCTATGGAAAACG

Tabla 3.13. Mezcla de reacción PCR

<i>PCR Screening</i>	
Células	Se añade una porción con punta estéril
<i>Oligo Forward</i>	0,2 mM
<i>Oligo Reverse</i>	0,2 mM
<i>DNA polymerase (Biotools)</i>	0,03 U
dNTPs	0,2 mM
<i>10X Standard reaction buffer with MgCl₂ (Biotools)</i>	1,5 µl
Agua	q.s.p 15 µl

Tabla 3.14. Programa de PCR

<i>Programa PCR Screening</i>			
Desnaturalización	94 °C	2 minutos	
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Hibridación	60 °C	30 segundos	38 ciclos
Elongación	72 °C	1 minuto	
Terminación	72 °C	2 minutos	

3.4.7. Obtención DNA plasmídico

Se utilizaron los Kits *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma) y *PureLink™ HiPure Plasmid Megaprep Kit* (Invitrogen) para purificar DNA plasmídico obtenido a partir de cultivos bacterianos de células de *E. coli* transformadas. Para ello se incubó a 37 °C toda la noche un cultivo en medio LB con antibióticos como método de selección. Se recogieron las células por centrifugación, se sometieron a

lisis alcalina y se continuó con el protocolo indicado en cada *kit*, que permite obtener una alta concentración de plásmido libre de otros contaminantes celulares.

El primero de los *kits* permite aislar pequeñas cantidades del plásmido y se utiliza como primer paso de purificación previo a la comprobación de los plásmidos, mientras que con el segundo se obtienen grandes cantidades de plásmido para poder llevar a cabo su caracterización y el experimento en el que se vaya a utilizar.

3.4.8. Secuenciación de DNA

Con el objetivo de verificar la secuencia de los plásmidos pSG5-SREBP-1a y pSG5 vacío, se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos T7 promotor, JS1503 y JS1504 (tabla 3.12). Este proceso se basa en la amplificación de un extremo de la secuencia a partir de un único oligo mediante PCR, con la utilización de un *kit* que consta de cuatro ddNTPs marcados con fluoróforos distintos que además de emitir fluorescencia son capaces de terminar la reacción de elongación de la cadena de DNA. Este procedimiento nos permite identificar la marca fluorescente que posee cada fragmento de distinto tamaño y así identificar el nucleótido añadido en esa posición. Este procedimiento fue realizado por el servicio de genómica de los servicios científico técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

3.5. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DNA-QUITOSÁN-TPP

Las nanopartículas de quitosán-TPP se utilizaron para vehiculizar DNA plasmídico hacia el interior de las células del tejido hepático de dorada. Una vez se obtuvo cantidad suficiente de cada plásmido se utilizaron alícuotas de 1 mg de DNA para preparar las nanopartículas de DNA-quitosán-TPP siguiendo el método modificado de gelación iónica de Calvo *et al.*, (1997), que se describe a continuación:

- Lentamente se mezcló quitosán de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, MA, USA) con una solución de tampón acetato a pH 5,0 hasta alcanzar una concentración de 2 mg/ml.
- Se agitó vigorosamente con barra de agitación magnética durante 3 horas hasta disolver el quitosán.
- Se filtró la solución para remover trazas de quitosán no disuelto.
- Se añadió 300 µg del plásmido a 1,2 ml de una solución de 0,84 mg/ml TPP (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain)
- Bajo agitación magnética a 800 rpm se añadió, gota a gota, la solución de plásmido-TPP a 3 ml de la solución de quitosán hasta alcanzar una relación 1:0.4 quitosán/TPP.

- Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 15 °C para recuperar las nanopartículas.
- Las nanopartículas se lavaron dos veces con agua ultrapura.
- Se resuspendieron en 2 ml de solución de manitol al 2 % (p/v) mediante agitación con vórtex.
- Se secaron mediante *freeze-drying* a -47 °C.
- Para eliminar residuos de moléculas de agua se realizó un segundo secado a 25 °C.
- El producto liofilizado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

3.6 MANIPULACIÓN, SACRIFICIO DE DORADAS Y COLECCIÓN DE MUESTRAS

Con la finalidad de facilitar la manipulación y evitar estrés en las doradas, antes de que fueran pesadas, inyectadas o sacrificadas, fueron anestesiadas por inmersión en un acuario auxiliar suplementado con 5 L con agua de mar y metasulfonato de triclaína (MS-222) a una concentración de 70 mg/L. La manipulación se llevaba a cabo en grupos de 10 peces como máximo para evitar una exposición excesiva al anestésico. Al finalizar la manipulación, si los peces no eran sacrificados, se inducía su completa recuperación antes de ser devueltos a los acuarios de mantenimiento mediante la inmersión en un tanque auxiliar de 5 L de agua de mar sin anestésico.

La inyección intraperitoneal de 10 µg de DNA/gramo de pez acomplejados con quitosán-TPP y disuelto en solución 0,09 % de cloruro de sodio estéril se realizó utilizando jeringas de insulina con agujas de 23 G. La administración se llevó a cabo 2 horas después de la última ingesta y tras ser anestesiadas y pesadas las doradas. Pasadas 24 horas de aplicada la inyección se continuó la rutina de alimentación con la dieta correspondiente 1 vez al día. A las 72 horas de la inyección y 24 horas después de la última ingesta, los peces fueron sacrificados para la recolección de muestras biológicas: sangre, hígado y músculo esquelético (González *et al.*, 2016).

Los peces una vez anestesiados fueron sacrificados mediante corte cervical. Inmediatamente se recogió la sangre aspirando con una pipeta Pasteur de vidrio previamente lavada con citrato de sodio al 3 % como agente anticoagulante. La sangre extraída se almacenó en tubos eppendorf a 4 °C hasta la separación del suero mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El suero se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

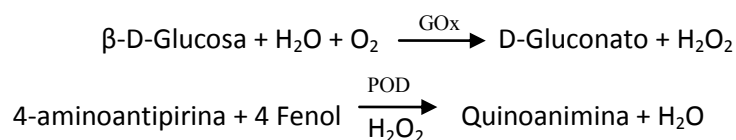
Una vez obtenida la sangre se procedió a extraer el hígado mediante corte ventral de las doradas, con ayuda de pinzas y bisturí se separó el hígado de la cavidad abdominal y del resto de órganos adyacentes. Se eliminaron restos de grasa, se lavó en solución de cloruro de sodio 0,9 %, se secó en papel de filtro, se pesó y congeló el hígado mediante la técnica de *freeze clamping*, utilizando pinzas previamente enfriadas en nitrógeno líquido. De manera similar, se procedió a recolectar muestras de músculo esquelético. Finalmente, las muestras se almacenaron individualmente a -80 °C

hasta su utilización. Antes de utilizar los tejidos para análisis moleculares o bioquímicos, se pulverizaron las muestras en un mortero manteniendo la temperatura a -80 °C con nitrógeno líquido.

3.7 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.7.1 Determinación de glucosa sérica

Mediante el kit comercial Glucosa MR (*Linear Chemicals*, España) se determinó la concentración de glucosa en suero sanguíneo. El método se fundamenta en la reacción de oxidación de la glucosa a D-gluconato por acción de la glucosa oxidasa (GOx), formando peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A esta reacción se acopla una segunda reacción enzimática que produce una quinona de color rojizo a partir de la reacción del peróxido de hidrógeno con fenol y 4-aminoantipirina (reacción Trinder) en presencia de peroxidasa (POD). La cantidad de quinona formada se determina mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm y su valor es directamente proporcional a la cantidad inicial de glucosa:



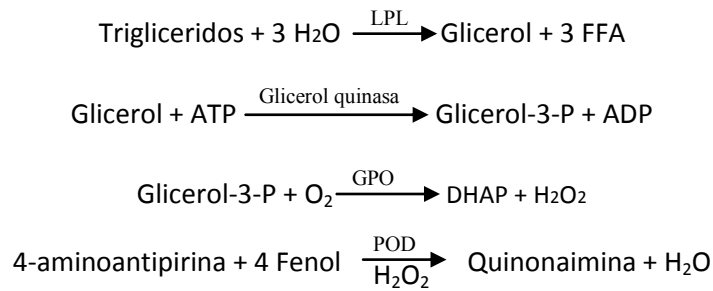
El protocolo descrito por el fabricante fue adaptado al autoanalizador Cobas Mira S (Roche) como se describe a continuación:

- Mezclar 2,5 µL de muestra con 200 µL de monorreactivo suministrado con el kit
- Incubación de 12 minutos a 30 °C.
- Determinación de la absorbancia a 500 nm a punto final de la reacción.
- Estimación de la cantidad de glucosa mediante curva patrón diseñada a partir de diluciones de una muestra de 200 mg/dL de glucosa en un rango de 6,25 a 200 mg/dL.

3.7.2 Determinación de triglicéridos en suero

Para determinar la concentración de triglicéridos se utilizó el kit comercial Triglicéridos MR (*Linear Chemicals*, España). El método se basa en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres (FFA) mediante la acción de la LPL. En una segunda reacción la glicerol quinasa se encarga de fosforilar el glicerol liberado a glicerol-3-fosfato, el cual es oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y peróxido de hidrógeno por acción de una tercera enzima, la glicerolfosfato oxidasa (GPO). Finalmente, mediante la reacción Trinder, la peroxidasa (POD) transforma el peróxido de

hidrógeno en una quinonaimina que se detecta a 500 nm y cuya concentración es directamente proporcional a la cantidad inicial de triglicéridos.

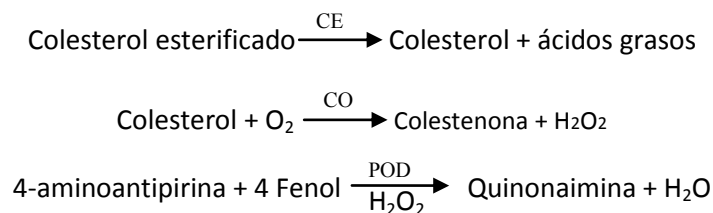


El protocolo descrito por el fabricante fue adaptado al autoanalizador Cobas Mira S (Roche) como se describe a continuación:

- Mezclar 3 µL de muestra con 200 µL del monorreactivo suministrado con el kit
- Incubar la reacción durante 4 minutos a 30 °C.
- Determinar la variación de absorbancia a punto final
- Estimar la concentración de triglicéridos a partir de una curva patrón elaborada a partir de diluciones de una muestra de 200 mg/dL en un rango desde 12,5 a 200 mg/dL.

3.7.3 Determinación de colesterol en suero

La concentración de colesterol fue analizada utilizando el kit comercial Colesterol total MR (*Linear Chemicals*, España). El método se basa en la acción de tres enzimas. La primera etapa es catalizada por la enzima colesterol esterasa (CE), que hidroliza el colesterol esterificado. Posteriormente, la colesterol oxidasa (CO) oxida el colesterol en colesteno y H₂O₂. Finalmente, la POD, mediante la reacción de Trinder, produce una quinonaimina en presencia de peróxido de hidrógeno, que es detectada a 500 nm y cuya concentración es directamente proporcional a la cantidad de colesterol inicial.



El protocolo descrito por el fabricante fue adaptado al autoanalizador Cobas Mira S (Roche) como se describe a continuación:

- Mezclar 3 μL de muestra con 200 μL del monorreactivo suministrado con el kit
- Incubar la reacción durante 4 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$.
- Determinar la variación de absorbancia a punto final
- Estimar la concentración de colesterol a partir de una curva patrón elaborada a partir de diluciones de una muestra de 200 mg/dL en un rango desde 12,5 a 200 mg/dL.

3.7.4 Determinación de glucógeno en hígado

Para determinar el glucógeno hepático se homogeneizaron 25 mg de tejido en HClO_4 0,6 M a una relación 1:10 P/V (mg/ μl) mediante el uso de un POLYTRON-PTA 7. A partir del extracto obtenido se siguió el método descrito por Keppler and Decker, (1974):

1. Diluir 0,1 ml de extracto en 0,1 ml de agua destilada
2. Añadir 0,1 ml de KHCO_3 1 M y 2 ml de amiloglucosidasa (1 mg/ml) (Sigma) tamponada a pH 4,8 en acetato sódico 0,2 M.
3. Incubar durante 2 horas a 40 $^{\circ}\text{C}$ agitando frecuentemente.
4. Parar la reacción agregando 1 ml de HClO_4 (0,6 N).
5. Centrifugar la mezcla a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$.
6. Obtener el sobrenadante y determinar la concentración de glucosa obtenida mediante la hidrólisis del glucógeno por la acción de la amiloglucosidasa siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para determinar glucosa en suero (apartado 3.7.1).

El contenido de glucógeno se expresó como mg de glucosa/100 mg de tejido.

3.7.5. Determinación de actividades enzimáticas

La actividad enzimática de extractos proteicos se ensayó a 30 $^{\circ}\text{C}$, con concentraciones saturantes de sustratos, enzimas auxiliares y pH óptimo. Los diferentes métodos de determinación fueron previamente adaptados y calibrados para ser realizados en el autoanalizador Cobas Miras S (Roche).

3.7.5.1 Obtención de extractos crudo a partir de tejidos congelados:

1. Pesar 50-60 mg de tejido en un tubo previamente sumergido en nitrógeno líquido
2. Agregar tampón de homogeneización (tabla 3.15) en una relación 1:5 P/V (mg/ μ L) manteniendo las muestras en hielo.
3. Homogeneizar las muestras utilizando un POLYTRON-PTA 7 (Kinematica GmbH, Littau-Luzern, Suiza) en posición 3-4, durante 10 segundos.
4. Centrifugar el extracto a 13000 rpm durante 30-45 minutos a 4 °C con el fin de eliminar los compuestos sólidos insolubles.
5. Recoger el sobrenadante descartando la capa superior de grasa y el sedimento.

Para determinar la concentración de proteína total se utilizó el método de (Bradford, 1976), descrito en el apartado 3.13.1.

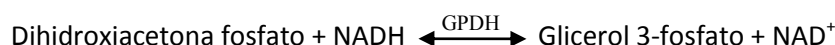
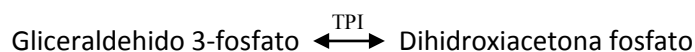
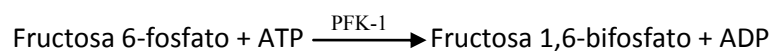
Tabla 3.15. Composición del tampón de homogeneización

Tampón de homogeneización	
Tris HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	4 mM
NaF	50 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM
Sacarosa	250 mM

3.7.5.2 Determinación de la actividad PFK-1 (EC 2.7.1.11)

La fosforilación de fructosa 6-fosfato en presencia de ATP para formar fructosa 1,6-bifosfato y ADP es catalizada por la PFK-1. Para determinar la actividad de esta enzima es necesario acoplar tres reacciones distintas. La primera ellas es la catalizada por la aldolasa A o fructosa bifosfato aldolasa, enzima que rompe la fructosa 1,6-bifosfato formada por la PFK-1 en gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Seguidamente, la triosa fosfato isomerasa (TPI) transforma el gliceraldehido 3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato. Por último, se reduce la dihidroxiacetona a glicerol 3-fosfato por acción de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). En esta última reacción se produce

NAD^+ por la oxidación de NADH, por lo que la absorbancia de la mezcla de la reacción a 340 nm disminuye en función de la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato.



El protocolo de detección utilizado está basado en el método empleado por Castaño *et al.* (1979), adaptado en nuestro laboratorio al autoanalizador Cobas Mira S (Roche). La detección se realiza a 30 °C y la mezcla de reacción se describe en la tabla 3.16:

Tabla 3.16. Mezcla de reacción de determinación de la actividad PFK-1 en autoanalizador Cobas Mira S (Roche)

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Tris-HCl, pH 8,25 ¹	200 mM	105	105 mM
	MgCl ₂ ¹	1 mM	1	5 mM
	KCl ¹	1 mM	10	0,05 mM
	NADH ²	10 mM	3	0,15 mM
	Sulfato amónico ¹	400 mM	2	4 mM
	β -mercaptoetanol ¹	200 mM	12	12 mM
	F6P ¹	100 mM	20	10 mM
	G6P ¹	300 mM	20	30 mM
	Aldolasa ³	2,1 mU		0,7 U/ml
	TPI ³	15 mU	3	5 U/ml
GPDH ³	6 mU		2 U/ml	
R1	ATP ¹	10 mM	20	1 mM
	Extracto crudo		4	
	Total		200	

¹ Las disoluciones de Tris-HCl, MgCl₂, KCl, sulfato amónico, fructosa 6-fosfato (Sigma), G6P (Sigma) y ATP (Sigma) se guardaban en alícuotas a -20 °C hasta el análisis. Las alícuotas de β -mercaptoetanol (Sigma) se guardaron a 4 °C.

² La solución de NADH (Sigma) se preparó antes de cada ensayo.

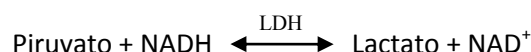
³ Se preparó una única disolución con la aldolasa (Sigma), la TPI (Sigma) y GPDH (Sigma), previamente mezcladas y desaladas mediante centrifugación de 2 minutos a 13.000 rpm y resuspensión del precipitado en tampón de reacción.

⁴ Para la preparación de los reactivos se utiliza el tampón de reacción Tris-HCl, pH 8,25.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para consumir 2 μmol de NADH por minuto.

3.7.5.3 Determinación de la actividad PK (EC 2.7.1.40)

La formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP está catalizada por la PK mediante la transferencia de un grupo fosfato entre estas moléculas. El ensayo de esta actividad enzimática se realiza mediante el acoplamiento de la reacción catalizada por la PK y una segunda reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), enzima que promueve la reducción del piruvato a lactato, reacción en que se oxida NADH a NAD^+ . La determinación a 340 nm, nos permite observar la disminución de la absorbancia debida a la oxidación del NADH.



El método de detección se basa en el protocolo descrito por *Staal et al. (1975)* adaptado en nuestro laboratorio para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche) a 30°C. En la tabla 3.17 se describe la mezcla de reacción:

Tabla 3.17. Mezcla de reacción para determinación de la actividad PK en autoanalizador Cobas Mira S (Roche)

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Glicilglicina, pH 7,4 ¹	100 mM	177,8	88,9 mM
	MgCl_2 ¹	1 M	2,5	0,0125 M
	KCl ¹	1 M	25	0,125 M
	NADH ²	10 mM	3,75	0,1875 mM
	Fosfoenolpiruvato ¹	50 mM	14	3,5 mM
	LDH ²	78,8 mU	3,75	21 U/ml
R1	ADP ¹	30 mM	20,7	2,5 mM
	Extracto crudo		4	
	Total		251,5	

¹ Las disoluciones de glicilglicina, MgCl_2 , KCl, PEP (Sigma) y ADP (Sigma) se guardan en alícuotas a -20 °C hasta el análisis.

² Las disoluciones de NADH (Sigma) y LDH (Sigma) se prepararon antes de cada ensayo. La LDH fue previamente desalada mediante centrifugación de 2 minutos a 13.000 rpm y resuspensión del precipitado en tampón de reacción.

³ Para la preparación de los reactivos se utiliza el tampón de reacción Glicilglicina, pH 7,4.

La cantidad de enzima necesaria para consumir 1 μmol de NADH por minuto define una unidad de actividad enzimática.

3.7.5.4 Determinación de la actividad FBPasa (EC 3.1.3.11)

La fructosa 1,6-bifosfato pierde un fosfato y se transforma en fructosa 6-fosfato por acción de la FBPasa. Para su determinación se requiere acoplar las reacciones catalizadas por dos enzimas. La fructosa 6-fosfato generada por la FBPasa se transforma en G6P mediante la reacción reversible catalizada por la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI). Seguidamente la G6PD oxida la G6P a 6-fosfogluconolactona acoplado la reducción de NADP^+ a NADPH y el concomitante aumento de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción.



Mediante el método descrito por Ekdahl and Ekman, (1985) y adaptado para el autoanalizador Cobas Mira S (Roche) se llevó a cabo la determinación de actividad FBPasa a 30 °C. En la tabla 3.18 se muestra la mezcla de reacción utilizada:

Tabla 3.18. Mezcla de reacción para determinación de la actividad FBPasa en autoanalizador Cobas Mira S (Roche)

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	100 mM	170	85 mM
	MgCl ₂ ¹	1 M	1	0,005 M
	NADP ²	10 mM	10	0,5 M
	β -mercaptoetanol ¹	200 mM	12	12 mM
	Fructosa 1,6-bifosfato ¹	5 mM	2	0,05 mM
	PGI ³	2,5 mU		2,5 U/ml
	G6PD ³	0,48 mU	1	0,48 U/ml
	Extracto crudo		4	
	Total		200	

¹ Las disoluciones de Imidazol-HCl, MgCl₂ y fructosa 1,6-bifosfato (Sigma) se guardan en alícuotas a -20 °C hasta el análisis. Las alícuotas de β -mercaptoetanol (Sigma) se guardan a 4 °C.

² La solución extemporánea de NADP (Sigma) se preparó antes de cada ensayo.

³ Se preparó una única solución con PGI (Sigma) y G6PD (Sigma), antes de cada ensayo.

⁴ Todos los reactivos utilizados se preparan con en el tampón de reacción Imidazol-HCl, pH 7,4.

Se definió una unidad de actividad FBPasa como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto.

3.7.5.5 Determinación de la actividad G6PD (EC 1.1.1.49)

La G6P se oxida en 6 fosfogluconolactona con la reducción de NADP^+ a NADPH catalizada por la G6PD y el subsiguiente aumento de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción.



La determinación se basa en el método descrito por (Lee, 1982) adaptado el protocolo para la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche) a 30 °C, la mezcla de reacción utilizada se muestra en la tabla 3.19.

Tabla 3.19. Mezcla de reacción para determinación de la actividad G6PD en autoanalizador Cobas Mira S

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	100 mM	155	77,5 mM
	MgCl ₂ ¹	1 M	1	0,005 M
	G6P ¹	10 mM	20	1 M
	NADP ²	10 mM	20	1 mM
	Extracto crudo		4	
	Total		200	

¹ Las disoluciones de Imidazol-HCl, MgCl₂ y G6P (Sigma) se guardan en alícuotas a -20 °C hasta el análisis.

² La solución de NADP (Sigma) se preparó antes de cada ensayo.

³ Todos los reactivos utilizados se preparan con el tampón de reacción Imidazol-HCl, pH 7,4.

Se define una unidad de actividad G6PD como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto.

3.7.5.6 Determinación de la actividad 6PGD (EC 1.1.1.43)

El 6-fosfogluconato se oxida a ribulosa 5-fosfato mediante la reducción de NADP^+ a NADPH en una reacción catalizada por la 6PGD. Se observa un aumento de la absorbancia a 340 nm como consecuencia de la formación de NADPH.



El método descrito por Möellering and Bergmeyer, (1984) fue adaptado para efectuar el ensayo automatizado en Cobas Mira S (Roche) a 30 °C. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Mezcla de reacción de determinación de la actividad 6PGD en autoanalizador Cobas Mira S

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	100 mM	165,4	82,7 mM
	MgCl ₂ ¹	1 M	0,6	0,003 M
	6-fosfogluconato ¹	20 mM	20	2 M
	NADP ²	10 mM	10	0,5 mM
	Extracto crudo		4	
	Total		200	

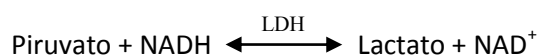
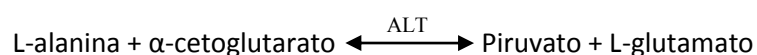
¹ Las disoluciones de Imidazol-HCl, MgCl₂ y 6-fosfogluconato (Sigma) se guardaban en alícuotas a -20 °C hasta su análisis.

² La solución de NADP (Sigma) se preparó antes de cada ensayo.

Una unidad de actividad 6PGD se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto.

3.7.5.7 Determinación de la actividad ALT (EC 2.6.1.2)

La reacción de transaminación de la L-alanina y α -cetoglutarato para formar piruvato y L-glutamato es catalizada por la ALT. La determinación se realiza acoplando una segunda reacción en la que el piruvato es reducido a lactato con la oxidación de NADH a NAD^+ , mediante la reacción catalizada por LDH.

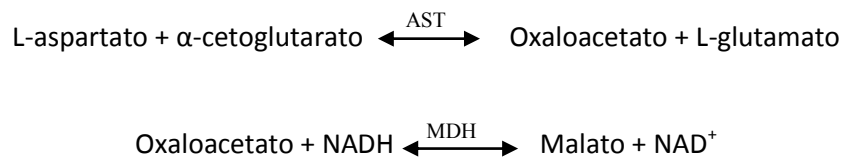


Mediante el uso del kit comercial ALT-GPT BR (*Linear Chemicals*) se determinó la actividad ALT siguiendo las instrucciones del fabricante y adaptado para su utilización en el autoanalizador Cobas Mira S.

Una unidad de actividad ALT se definió como la cantidad de enzima necesaria para consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.7.5.8 Determinación de la actividad AST (EC 2.6.1.1.)

La transaminación del L-aspartato y α -cetoglutarato para formar oxaloacetato y L-glutamato resulta catalizada por la AST. Para su determinación es necesario acoplar una segunda reacción catalizada por la MDH, que promueve la conversión del oxaloacetato a malato con la oxidación de NADH a NAD^+ .

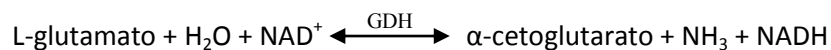


Para este ensayo se utilizó el kit comercial AST-GOT BR (*Linear Chemicals*) siguiendo las instrucciones del fabricante y adaptándolo para su uso en Cobas Mira S.

Una unidad de actividad AST se definió como la cantidad de enzima necesaria para consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.7.5.9 Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2)

El L-glutamato se desamina convirtiéndose a α -cetoglutarato en una reacción reversible, catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH). Durante esta reacción se oxidan o reducen los cofactores NADH y NAD^+ dependiendo de la dirección en que esta se produzca.



El método descrito por (Hochachka *et al.*, 1978) adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche) nos permitió determinar la actividad GDH en la dirección de aminación del α -cetoglutarato. La mezcla de reacción se describe en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Mezcla de reacción para determinación de la actividad GDH en autoanalizador Cobas Mira S

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	500 mM	25	50 mM
	Acetato de amonio ¹	2,5 M		250 mM
	α -cetoglutarato ²	250 mM	5	5 mM
	NADH ²	10 mM	2,5	0,1 mM
	ADP ¹	30 mM	8,3	1 mM
	H ₂ O destilada		186,2	
	Extracto crudo		23	
	Total		250	

¹ Imidazol-HCl y acetato de amonio (Sigma) se prepararon en conjuntamente en la misma sola solución. En esta solución se preparó también el ADP (Sigma). Estos reactivos se guardaron en alícuotas a -20 °C hasta su utilización.

² Las soluciones de α -cetoglutarato y de NADH (Sigma) se prepararon antes de cada ensayo.

Una unidad de actividad GDH se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADH por minuto.

3.8 EXTRACCIÓN DE RNA

Se aisló el RNA total de muestras de hígado y músculo esquelético del experimento 1 (apartado 3.3.2) y de hígado del experimento 2 (apartado 3.3.3). La extracción se realizó utilizando los kits comerciales *RNeasy[®] tissue Mini Kit* y *RNeasy[®] fibrous tissue Mini Kit* (QIAGEN, Sussex, UK) para hígado y músculo respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, USA) se determinó la concentración de RNA en las muestras a 260 nm y la pureza de las mismas mediante la relación 260/280, la cual debía ser superior a 1,9.

Para determinar la integridad del RNA aislado se utilizó el kit *Agilent 2100 bioanalyzer* (Agilent Technologies). Los valores se expresan en unidades de *RNA integrity number* (RIN), que indica la calidad del RNA eucariótico total en relación a las subunidades ribosomales 18S y 28S. Este parámetro oscila entre 1 y 10, donde 1 representa una muestra de RNA totalmente degradada y 10 una muestra íntegra. En este estudio, se utilizaron muestras de RNA con un RIN superior o igual a 9 para la generación del transcriptoma y de 8 para el análisis de expresión mediante *microarrays*.

3.9 Transcripción inversa

Para cuantificar los niveles de expresión se realizó previamente la transcripción inversa del mRNA a cDNA. La transcripción inversa es catalizada mediante la enzima retrotranscriptasa (RT). Se mezcló 1 µg de RNA total con la enzima MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*; Promega), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs; Promega) y hexámeros nucleotídicos aleatorios (Invitrogen) y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. Para prevenir la degradación del RNA, en la mezcla de reacción se incluyó inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega) (Tabla 3.22).

Tabla 3.22. La mezcla de reacción incluyó los siguientes reactivos y concentraciones:

Reactivo	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
<i>First-Strand buffer</i> *	5X	4 µl	1X
dNTPs	10 mM	1 µl	0,5 mM
Hexámeros aleatorios	62,5 ng/µl	2,5 µl	7,81 ng/µl
RNAsin	40 U/µl	0,5 µl	1 U/µl
RNA total		1 µg	1 µg
MMLV-RT	200 U/µl	1 µl	10 U/µl
H ₂ O		qsp 20 µl	

* *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), de Promega.

3.10 PCR cuantitativa (RT-qPCR)

A fin de cuantificar el número de copias de un transcrito se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa del cDNA (RT-qPCR), esta técnica permite seguir en tiempo real el progreso de una PCR convencional y establecer de esta manera una relación numérica entre el número de copias de DNA generadas y el número de ciclos que han transcurrido. Esta técnica utiliza un marcador fluorescente que permite la detección y cuantificación del DNA de doble cadena conforme a un aumento de la señal generada por un fluoróforo utilizado como agente intercalante del DNA, que en nuestro caso fue el SYBR *Green* (Applied Biosystems). La fluorescencia determinada se normalizó respecto a la fluorescencia de una referencia pasiva (6-carboxi-X-rodamina) presente en la mezcla de SYBR Green.

Tabla 3.23. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

Gen	Sentido	Secuencia (5'-3')	Antisentido	Anti sentido (5'-3')	tamaño (pb)	Nº de acceso /isotig
SREBP-1 dorada	JS1406	CAGCAGCCCCGAACACCTACA	JS1407	TTGTGGTCAGCCCTGGAGTTG	127	JQ277709.1
SREBP-1a Hámster	JS1613	CCTCCTGCCTCCGAGTTTCC	JS1614	GAAGGAAGGCTAGAATACCCC	78	U09103.1
PFKFB	JS1507	TCGTGATGGTGGGACTGCCG	JS1508	CTCGCGTTGTGCGGCTGAAG	170	U84724.1
HMGCR	JS1601	ACTGATGGCTGCTCTGGCTG	JS1602	GGGACTGAGGGATGACGCAC	137	isotig04254
PPARγ	JS1603	TGCGAGGGCTGTAAGGGTTT C	JS1604	GTTTCTCCTTCCGCTGGG	196	AY590304.1
LIPC	JS1605	CCTGGGGCTCACATCTCTGG	JS1606	GGTGAAGGTGGATGGCGTC	169	isotig06762/ EU254479.1
G6PD	RT_G6PD_F	TGATGATCCAACAGTTCCTA	RT_G6PD_R	GCTCGTTCCTGACACTGA	200	JX073711.1
GK	JyA-GK-F1	TGTGTACGCTCTCAACTCGAC C	JyA-GK-R1	AGGATCTGCTCTACCATGTGGAT	89	AF169368.1
FASN	JS-qFAS-F	GTAGAGGACACGCCCATCGA T	JS-qFAS-R	TGCGTATGACCTCTTGGTGTGCT	116	IFXJFUR021856 H
ACC1tv1	RT_ACC1TV1_F	CCCAACTTCTTCTACCACAG	RT_ACC1TV1_R	GAAGTGGAACTCTACTACAC	219	JX073712.1
ACC1tv1+v2	RT_ACC1TV1_F	CCCAACTTCTTCTACCACAG	RT_ACC1TV2_R	GTCCAGCAATGGAGCAGACA	144	JX073713.1
ACC2	RT_ACC2_F	TGACATGAGTCTGTGCTGG	RT_ACC2_R	GCCTCAGTTCGTATGATGGT	233	JX073714.1
ELOVL5	JS-qFAE-F	GGGATGGCTACTGCTCGACA	JS-qFAE-R	CAGGAGAGTGAGGCCAGAT	154	isotig05622/AY 660879.1/GQ1 62823.1
CPT1a	JS-qCPT1A-F	GAAGGGCAGATAAAGAGGG GC	JS-qCPT1A-R	GCATCGATCGTGCATTACGC	152/154	isotig08486/ JQ308822.1
ACSL1	JS-qCoAligase-F	AGAAAGTACAGGCGAGTCTG GG	JS-qCoAligase-R	CCAGTGCAGCTCGTAGGAACGT	99	isotig06712
FADSD6	JS1615	CACTATGCTGGAGAGGATGC C	JS1616	TATTTCCGTCCTGGCTGGGC	130	GQ162822.1/ AY055749.1
MVD	JS1705	CTTTGCTGCCTTTGCTGAACT AACC	JS1706	ACCTTGCTCTCCCGTAGTG	156	Isotig 07708
FDPS	JS1707	GCTCTGCTCTGTTCGGG	JS1708	GACGACTACTGGACTGTTACGG	130	Isotig07443
UQCR11A	J-A1509	TATTCTGAGGGCGTGGGTGC	J-A1510	TCGAGAAATAAGCGCCAGTCTGT	93	Isotig18697
COX5B1	J-A1513	CCTTCTGCGTTCCTCACTA	J-A1514	CATGAAGGAGGCAAATATGAATG C	112	Isotig17429
NDUFB8	J-A1511	ATATCCCCACAAGGCGAGG GC	J-A1512	AGGTCAGGGTGGTCCCACTTGT	99	isotig17415
ATP5B	J-A1507	GGGCAGGGTCAGTCAAATCG TCAG	J-A1508	CAACATCTCCGCTTACACAGGCT	197	isotig06994
COQ10	J-A1505	CCAGCAAAACGACTCCACTCC TC	J-A1506	CCCACAGGAGCCCAAGTTTCT	119	Isotig04623
NDUFS1	JS1709	ACCATTGCTCAGAACGCCAG AAC	JS1710	GGCTTTCTTTAGGCAGGTCAGCT	193	isotig07210
COX6A2	JS1703	GGGTTGCTGTGAGGGTTGTG G	JS1704	CATCCCTGGTGTACTGTCTGC	165	Isotig18107
COX8B	JS1701	TGGAGGGAGTTGGGCTGAC G	JS1702	GAGGAGGAGGATGAAGAAGAGG G	89	Isotig17999
MT-ND2	ASA1.05Fw	CACACTCTGGCCCTTTCAGC A	ASA1.05Rv	TGTGACGATGGCCGGGGTAAT	199	Isotig12445
ATP5D	ASA0511-Fw	TTCACTTTCGCTCCCGACA	ASA0511-Rv	GAAGGATGCCAAACGCGCCA	94	Isotig05109
SLC25A6	J-A1503	CTGTGTTTCGCTACCCCTC G	J-A1504	CTTCACCAACAGCTCCAGGC	108	Isotig13418
ABCG2	J-A1501	CCTCAGCAGCAGCGATTACG AAGA	J-A1502	GCTCTGCTTTGGTCTGTCTGTAGTA G	119	Isotig03145
EF1α	AS-EF1Fw	CCCGCTCTGTGCTTCCG	AS-EF1Rv	CAGCAGTGTGGTCCGTTAGC	135	AF184170
β-actina	qBActin.F	CTGGCATCACACTTCTACAA CGAG	qBActin.R	GCGGGGGTGTGAAGGTCTC	138	X89920.1
18S	JDRT18s	TTACGCCATGTTGCTCTGAG	JDRT18as	AGGATTCTGCATGATGGTCACC	106	AM490061

Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron mediante las herramientas bioinformáticas OligoAnalizar 1.2 y Oligo Explorer 1.2 (Gene Link) utilizando secuencias publicadas en los bancos de

datos genómicos públicos y los datos transcriptómicos obtenidos en el transcurso esta tesis (Tabla 3.23).

A continuación se muestra la mezcla de reacción utilizada para la qPCR (Tabla 3.24):

Tabla 24. Mezcla de reacción de qPCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen	Concentración final
Muestra de cDNA*		3,2 μ l	
Oligonucleotido sentido	10 μ M	1,6 μ l	0,4 mM
Oligonucleotido antisentido	10 μ M	1,6 μ l	0,4 mM
Power SYBR Green	2 X	20 μ l	1 X
Agua libre de DNAsas		13,6 μ l	
Volumen total		40 μ l	

* Muestra de cDNA diluida 10 veces en agua libre de DNAsas.

El volumen de reacción fue de 18 μ l, realizando la determinación de cada muestra por duplicado. Se utilizó un *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con el programa de amplificación que se describe a continuación:

1. 50 °C durante 2 minutos.
2. 95 °C durante 10 segundos.
3. 95 °C durante 15 segundos.
4. 62 °C durante 1 minuto.
5. Pasos 3 y 4 repetidos durante 40 ciclos.
6. Curva de *melting* con incrementos sucesivos de 0,3 °C a partir de 60 °C hasta 95 °C.

El umbral, o *threshold*, se define como el nivel de fluorescencia emitido durante la reacción de PCR en el cual el proceso de amplificación comienza a detectar moléculas amplificadas. En este sentido el ciclo umbral (Ct), representa el ciclo en el cual se sobrepasa el nivel umbral de detección de moléculas amplificadas durante la reacción de PCR.

Previo a la realización de qPCR comparativas para el análisis de genes de interés se evaluó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos mediante curvas estándar realizadas a partir diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/20, 1/40) de una muestra de cDNA. Para validar el proceso de amplificación, el producto de PCR de cada dilución se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % valorando la presencia de una única banda del tamaño esperado.

Para determinar la cantidad de mRNA de un gen en la muestra se utilizó el método relativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que define la proporción entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct de un gen reportero que teóricamente no cambia bajo las condiciones de estudio (Pfaffl, 2001).

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Gen endógeno})$$

En este método se toma una muestra como referencia para efectuar la comparación con las demás muestras, obteniendo así el valor $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra X}) - \Delta Ct (\text{muestra de referencia})$$

Debido a que el proceso de amplificación presenta un comportamiento exponencial, los valores son transformados a una escala lineal que permita realizar una comparación entre distintos valores mediante una función logarítmica que resulta en la ecuación:

$$\text{Valor de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Se cuantificaron hasta 3 genes endógenos *elongation factor 1 α* (EF1 α), β -actina y la subunidad 18S ribosomal (18s). Para obtener una mejor representatividad de los niveles de expresión de los genes analizados se realizó la media geométrica de la expresión de los genes endógenos utilizados y posteriormente se utilizó este valor para obtener el ΔCt .

3.11 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

A fin de obtener un amplio espectro de secuencias de *S. aurata* que nos permitiese identificar genes potenciales de interés para el estudio del metabolismo nutricional se realizó un análisis transcriptómico mediante secuenciación 454 de bibliotecas de cDNA a partir de muestras de juveniles de dorada en ayuno durante 23 días y de peces alimentados con las dietas correspondientes al experimento 1 (apartado 3.3.2) durante el mismo periodo de tiempo. Las dietas utilizadas presentaban diferencias en la composición de macronutrientes, para de esta manera tener una máxima representación, abundancia y diversidad de transcritos relevantes en estudios nutricionales de dorada.

Se extrajo el RNA total de cada muestra y se generó un *pool* por cada tejido (hígado y músculo esquelético) mezclando 1 μg de RNA proveniente de muestras de seis peces de cada grupo de doradas alimentadas y de 8 peces en ayuno. Las bibliotecas de cDNA de doble cadena se sintetizaron a partir del RNA total de cada *pool* de tejido mediante el *kit MINT-Universal cDNA synthesis kit* (Evrogen, Moscú, Rusia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tecnología nos permitió obtener cDNAs acoplados a una secuencia adaptadora adicional presente en los extremos que

fue de utilidad en el proceso de secuenciación. Por lo general las bibliotecas de cDNA resultan deficientes en transcritos poco abundantes, por ello, a fin de proporcionar una base de datos de secuencias EST de amplia cobertura se normalizaron las bibliotecas de cDNA antes de ser secuenciadas. Este proceso se llevó a cabo con el kit *TRIMMER cDNA normalization* (Evrogen, Moscú, Rusia). Este kit permite normalizar secuencias largas de cDNA, desde 0,5 a 4,5 kb.

Las bibliotecas de cDNA normalizadas fueron secuenciadas utilizando la plataforma 454 *Genome Sequencer FLX System* (Roche), basada en el método de pirosecuenciación en el que los transcritos se fraccionan en fragmentos de entre 300 y 800 bp. Posteriormente a cada fragmento generado se ligan adaptadores específicos en los extremos 3' y 5', que son utilizados durante la purificación, amplificación y secuenciación. Simultáneamente se pueden determinar más de 10^6 secuencias individuales, con un promedio de 400 pb, en 10 horas mediante la aplicación informática del sistema.

Para cada tejido de forma independiente se realizaron dos procesos de secuenciación (*run 1* y *run 2*) en el CCiTUB. La cobertura del *run 1* fue limitada en cuanto a número total de lecturas y al tamaño de secuencias ensambladas, por lo que fue necesario realizar un segundo proceso (*run 2*), que nos permitiese ampliar la cantidad de secuencias. El *run 2* nos proporcionó un mayor número de secuencias con una longitud mayor, permitiéndonos ampliar los datos transcriptómicos. Modificaciones en el protocolo de una nueva versión del kit de secuenciación fueron las posibles causas que limitaron los datos proporcionados por el *run 1*. Sin embargo, a pesar de la limitada cobertura del *run 1*, la calidad de los datos obtenidos nos permitió utilizarlos para ampliar las secuencias del *run 2*.

3.11.1 Ensamblado de secuencias y anotación

Se realizó el ensamblado de las secuencias utilizando el *software GS de novo Assembler* (Roche) y gracias al *software Cutadapt* (Martin, 2011) fueron eliminadas secuencias sin sentido y los adaptadores. En este trabajo fueron generados tres ensamblajes distintos lo que nos permitió obtener distintas aproximaciones del transcriptoma de dorada: 1) datos de secuencias obtenidas de músculo esquelético; 2) secuencias de hígado; y 3) ensamblaje incrementado utilizando tanto las secuencias de músculo como las de hígado (transcriptoma híbrido).

La anotación génica de secuencias únicas de cada ensamblaje se realizó mediante la comparación con secuencias disponibles en bases de datos públicas utilizando el software GPRO (Futami *et al.*, 2011) y las herramientas BLASTx y BLASTn del NCBI. Se estableció como umbral de significancia en el valor esperado (E-value) $< 1e-4$. A cada secuencia se le asignó el nombre y la

función propia de acuerdo a la puntuación obtenida entre los 10 mejores emparejamientos del alineamiento BLAST.

Adicionalmente, utilizando el software GPRO, se ejecutó un análisis GO (Ashburner *et al.*, 2000), permitiendo agrupar las anotaciones de acuerdo a tres conceptos en biología molecular: función en procesos biológicos, función molecular de los productos génicos y presencia en componentes celulares. Por último, a fin de establecer la asociación de los transcritos con distintas rutas metabólicas en los que están implicados se vincularon las secuencias únicas con rutas metabólicas KEGG (Kanehisa, 1997) mediante el software GPRO.

3.12 MICROARRAYS

Para analizar cambios en los niveles de expresión del transcriptoma de *S. aurata* sometidos a ayuno o alimentados con dietas que difieren en la composición de nutrientes, se realizó un análisis de expresión mediante la técnica de *Microarrays*. Esta tecnología permite analizar los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente de forma comparativa entre distintas condiciones experimentales. Las secuencias obtenidas mediante el análisis transcriptómico híbrido de dorada fueron utilizadas para diseñar *microarrays* de oligonucleótidos. La validación de los niveles de expresión de genes identificados como posibles biomarcadores en el metabolismo nutricional del array se llevó a cabo mediante RT-qPCR.

3.12.1 Fabricación, hibridación y análisis de *microarrays*

El proceso de fabricación, hibridación y normalización de los datos de los *microarrays* se llevaron a cabo en la empresa Bioarray S.L. (Elche, Alicante). Se diseñaron *microarrays* de oligonucleótidos específicos de *S. aurata* a partir de las secuencias del transcriptoma híbrido previamente ensamblado, lo que nos permitió trabajar con secuencias representativas para estudios nutricionales de esta especie.

El *microarray* estaba constituido por sondas impresas en portaobjetos 8 x 60k de diseño personalizado (Agilent, ID 068650) para análisis de dos colores. Este tipo de microchip contiene 8 matrices por 60.000 funciones (60.000 puntos de sonda y un número de lugares reservados para controles internos de calidad) que permite la identificación y cuantificación de genes expresados de 16 muestras (4 muestras por 4 condiciones de alimentación: ayuno y alimentación con las dietas HLL, MHL y LLH). La plataforma utilizada para elaborar los *microarrays* fue eArray (Agilent Technologies), con 3 sondas de 60 nucleótidos para cada una de las anotaciones obtenidas.

A partir del RNA total extraído de cada muestra se produjo RNA complementario marcado con cianina fluorescente (Cy3 o Cy5) utilizando el *Quick Amp Labeling Kit, two-color* (Agilent Technologies). El cRNA marcado se hibridó con las sondas impresas en el *array*, permitiéndonos comparar los niveles de expresión en cada condición de estudio de acuerdo a la intensidad de fluorescencia de cada muestra, siendo proporcional a la cantidad de transcrito específico.

La intensidad de fluorescencia del *microarray* se determinó en dos canales capaz de detectar marcajes con Cy3 y Cy5, mediante un escáner láser confocal. De esta forma se generaron imágenes en formato TIFF de dos canales que fueron analizados con la aplicación *Feature Extraction* (Agilent Technologies). Para obtener resultados precisos y reproducibles fue necesario realizar la normalización de los datos de fluorescencia con estándares internos y genes de expresión constitutiva, además de normalizar el efecto de la intensidad de las señales fluorescentes e interferencias por marcaje recíproco.

Los datos se analizaron mediante el paquete informático Bioconductor (Luo y Brouwer, 2013) aplicado en el entorno R.

3.12.2 Análisis Funcional

Se consideraron genes diferencialmente expresados y con un valor P ajustado $< 0,05$. El valor P ajustado para test multiple fue determinado por el procedimiento de Benjamini and Hochberg, (1995) para controlar el nivel de falsos positivos, utilizando el paquete DESeq2 de Bioconductor. Se realizó el análisis de términos GO de estas secuencias generando diagramas mediante el software y Blast2GO (Gotz *et al.*, 2008).

Para el análisis de rutas metabólicas específicas, se realizó búsqueda sistemática de secuencias únicas que presentasen términos GO o descripción asociados con lípidos, lipoproteínas, triglicéridos, ácidos biliares, colesterol, cadena respiratoria, fosforilación oxidativa y translocación de ADP/ATP. Se consideraron aquellas secuencias únicas con P *adjusted* $< 0,05$, e-value $< 10^{-10}$ y HSP/Hit > 30 . Se filtraron las secuencias anotadas en base al mismo GI (número de identificación génica) o descripción utilizando la fórmula $(HSP/Query/100) \times (HSP/Hit/100) \times (Similarity/100) \times (1/e-value)$ del paquete informático GPRO (Futami *et al.*, 2011).

3.12.3 Validación de genes

Se validaron genes que mostraron expresión diferencial significativa entre las condiciones nutricionales estudiadas como posibles biomarcadores del metabolismo energético en juveniles de dorada mediante RT-qPCR.

3.13 WESTERN BLOT

Para la identificación de proteínas específicas se utilizó la técnica *Western blot*, basada en la utilización de anticuerpos. Previamente se separaron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecíl sulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE) y transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Amersham Hybond-P PVDF Membrane*, UK).

3.13.1 Determinación de proteína: Método de Bradford

Se determinó la proteína total en un extracto crudo mediante el método de Bradford (1976), adaptado al autoanalizador Cobas Mira S. Este método está basado en la formación de complejos entre las proteínas presentes y el colorante azul *Coomassie brilliant blue G-250*. Se realizó el ensayo a 30 °C, mezclando 5 µl de extracto crudo en un volumen final de 250 µl usando el reactivo *Protein assay* (Bio-Rad), diluido 1:5. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm utilizando una recta patrón obtenida con muestras de concentración conocida (entre 0,125 a 1 mg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA) como referencia.

3.13.2 Electroforesis de proteína

La electroforesis SDS-PAGE permite separar las cadenas polipeptídicas en función del tamaño molecular. Para llevar a cabo esta técnica es necesario desnaturalizar previamente las proteínas y que tengan el mismo signo de carga eléctrica para que puedan separarse bajo la aplicación de un campo eléctrico únicamente en función de su tamaño. Para la completa desnaturalización de las proteínas además de altas temperaturas, se utiliza SDS y β-mercaptoetanol. El SDS es capaz de romper las interacciones hidrofóbicas de las proteínas, desnaturalizando la estructura terciaria y secundaria y cargándolas negativamente. El β-mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro entre cisteínas.

La electroforesis se realiza en un gel de polímero sintético de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel de acrilamida en su interior actúa como una red que opone resistencia al paso de las proteínas sometidas a la acción de un campo eléctrico. De esta manera, las proteínas de mayor tamaño tienen mayor dificultad para atravesar la matriz, mientras que las más pequeñas lo hacen más rápido. En este sentido, la cantidad de acrilamida utilizada en el gel es otro factor a

considerar durante la electroforesis ya que a mayor concentración las proteínas presentan mayor dificultad para atravesar la matriz y por eso migran a una menor velocidad favoreciendo la correcta separación de proteínas pequeñas.

3.13.2.1. Preparación de las muestras

1. Se agregó la cantidad necesaria de tampón de carga de proteína 4X (Tabla 3.25) a la muestra.
2. Se hirvieron las muestras en el baño seco *AccuBlot Digital Dry Bath (Labnet International Inc.)* a una temperatura >100 °C durante 5 minutos.

Tabla 3.25. Tampón de carga de proteína 4 X

Reactivo	
Tris HCL pH 6,8	0,25 M
SDS	8 %
Glicerol ¹	40 %
β-mercaptoetanol	20 %
Azul de bromofenol ²	0,04 %

¹ El glicerol proporciona densidad a las muestras.

² El colorante permite visualizar el frente electroforético.

3.13.2.2 Preparación del gel

El gel se prepara en posición vertical y está constituido por dos partes de distinta composición de acrilamida. En la parte inferior se encuentra el gel separador, que a efectos de la preparación es el primero en realizarse y que posee una concentración de acrilamida al 10 % proporcionando poros del tamaño adecuado para separar correctamente las proteínas en la muestra en un rango de separación de 20 - 250 kDa. Una vez solidifica el gel separador con ayuda de una película de isopropanol que se retira posteriormente, se procede a la preparación del gel apilador, que se deposita en la parte superior. Éste presenta una concentración de acrilamida del 4 % que permite el alineamiento de las proteínas y se sella con un peine que genera los pocillos donde serán cargadas las muestras.

En la tabla 26 se muestra las cantidades de cada uno de los reactivos utilizados en la preparación del gel para la electroforesis, teniendo en cuenta que tanto el persulfato de amonio como el TEMED se añaden en el último momento, ya que son los encargados de catalizar la reacción.

Tabla 26. Mezclas de reactivos para preparar gel de acrilamida

Soluciones	Gel separador 10 % de acrilamida	Gel apilador 4 % de acrilamida
Acrilamida/bisacrilamida ¹	3,3 ml	1,3 ml
Tampón A ²	-	2,5 ml
Tampón B ³	2,5 ml	-
SDS al 10 %	100 µl	100 µl
Persulfato amónico ⁴ al 10 %	75 µl	75 µl
TEMED ⁵	7,5 µl	6 µl
H ₂ O	4 ml	6 ml

¹ 30 % Acrilamida/Bis Acrilamida, 37.5:1 (Bio Rad Cat. 161-0158)

² Tris HCl 0,5 M, pH 6,8 (Bio Rad Cat. 161-0799)

³ Tris HCl 1,5 M, pH 8,8 (Bio Rad Cat. 161-0798)

⁴ Persulfato amónico

⁵ TEMED (Bio Rad Cat. 161-0800)

3.13.2.3 Electroforesis

Una vez montada la cubeta para realizar la electroforesis y en presencia de tampón de electroforesis (Tabla 3.27) se cargan las diferentes muestras de proteínas en cada pocillo, y el marcador de peso molecular que nos permitirá la identificación de las proteínas. El marcador utilizado fue el *Precision Plus Protein Kaleidoscope Estándar (Bio Rad)*, con marcadores de tamaño 10, 15, 20, 25 37, 50, 100, 150 y 250 kDa. Se realizó la electroforesis a temperatura ambiente aplicando 20 mA por gel.

Tabla 3.27. Composición del Tampón de electroforesis

Solución	Concentración
Tris HCl pH 8.3	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1 %

3.13.3 Transferencia de proteína a membrana

Una membrana de PVDF es utilizada como soporte para transferir las proteínas del gel mediante electroelución a 90 V durante al menos 2 horas en tampón de transferencia (Tabla 3.28).

Tabla 3.28. Tampón de transferencia de proteínas

Solución	Concentración
Tris HCl	0,025 M
Glicina	0,192 M
Metanol	20 %

3.13.3.1 Protocolo:

1. Descartar la parte apiladora del gel y colocar el gel separador 10 minutos en tampón de transferencia.
2. Sobre un *cassette* de transferencia (Biorad) sumergido en tampón de transferencia colocar una esponja, dos rectángulos de papel *Whatman* (Schleicher & Schuell, England) y encima de estos el gel separador.
3. Humedecer en metanol al 100 % durante 10 segundos un rectángulo de membrana de transferencia.
4. Lavar la membrana de transferencia en agua destilada durante 5 minutos
5. Incubar la membrana de transferencia en tampón de transferencia de proteínas durante 10 minutos.
6. Sobre el gel separador colocar la membrana de transferencia de proteínas y encima de ésta dos papeles *Whatman* y una esponja. Nota: Importante eliminar las burbujas de aire entre el gel y la membrana antes de colocar la esponja.
7. Una vez se termine de preparar el *cassette* de transferencia se introduce en la cubeta llena de tampón de transferencia y se realiza la transferencia aplicando un voltaje de 90 V durante 2 horas, manteniendo la temperatura a 4 °C.

3.13.3.2 Tinción y lavado del gel de electroforesis:

Una vez finalizada la transferencia de proteínas se tiñen las proteínas presentes en el gel con azul de *Comassie* para lo cual se incuba en solución de tinción (Tabla 3.29) durante al menos 30 minutos. Una vez teñido, el gel se transfiere a una solución de destinción (Tabla 3.30) para eliminar la coloración inespecífica.

Tabla 3.29. Solución de tinción de proteínas

Solución	Concentración
Metanol	40 %
Acido acético glacial	7 %
Azul <i>Comassie</i>	0,025 %

Tabla 3.30. Solución de destinción

Solución	Concentración
Metanol	40 %
Acido acético glacial	7 %

3.13.4 Bloqueo de la membrana

Las membranas fueron bloqueadas para evitar la unión de anticuerpos a espacios sin proteínas transferidas y reducir el ruido de fondo.

- Previo al bloqueo es necesario lavar durante 5 minutos la membrana en tampón TBS 1X (Tabla 3.31).
- Colocar la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con 50 ml de solución de bloqueo (Tabla 3.32).
- Lavar la membrana en solución de lavado (Tabla 3.33) durante 5 minutos.

Tabla 3.31. Solución de bloqueo

Solución	Concentración
Tween	0,1 %
Leche en polvo descremada	5 %
TBS	1 X

Tabla 3.32. TBS 1 X

Solución	Concentración
Tris HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Tabla 3.33. Solución de lavado

Solución	Concentración
TBS	1 X
Tween 20	0,1 %

3.13.5 Inmunodetección

La inmunodetección está basada en la incubación de la membrana con dos anticuerpos. En primer lugar se incuba con el anticuerpo primario, de unión específica a la proteína de interés. Posteriormente un anticuerpo secundario capaz de unirse al anticuerpo primario y que tiene asociado la enzima peroxidasa, permite la visualización de la banda con la proteína de interés mediante la catálisis de la oxidación del luminol en medio alcalino y la consecuente emisión de quimioluminiscencia.

La inmunodetección se realiza mediante el equipo ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, UK).

3.13.5.1. Protocolo:

- Diluir el anticuerpo primario en solución de bloqueo.
- Incubar la membrana en solución con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en agitación.

- Retirar el anticuerpo primario. La solución puede conservarse a -20 °C para ser reutilizada en experimentos posteriores.
- Lavar 3 veces la membrana durante 10 minutos con 50 ml de solución de lavado, en agitación.
- Incubar la membrana con anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.
- Retirar el anticuerpo secundario.
- Lavar 3 veces la membrana, durante 10 minutos, con 50 ml de solución de lavado en agitación.
- Preparar la solución de detección siguiendo las indicaciones del proveedor del *kit ImmunStar HRP Substrate* (Bio-Rad). Mezclar en partes iguales la solución *Luminol/Enhancer* y el tampón de la peroxidasa.
- Incubar la membrana en la solución de detección durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
- Retirar el exceso de solución y la membrana se introduce en una bolsa de plástico, se expone y revela durante un máximo de 45 minutos.

3.13.6 Stripping

El *Stripping* de la membrana busca la separación de los anticuerpos tratándola con una solución específica que a altas temperaturas promueve la separación de proteínas. Este procedimiento se realiza en caso de ser necesaria una segunda detección de otra proteína con un anticuerpo distinto y así evitar señales que interfieran.

- Incubar la membrana en 5 ml de solución de Stripping (Tabla 3.34)
- Incubar a 60 °C al menos durante 30 minutos.
- Lavar dos veces con solución de lavado durante 10 minutos.
- Bloquear e incubar la membrana con el nuevo anticuerpo.

Tabla 3.34. Solución de *Stripping*

Solución	Concentración
B-Mercaptoetanol	100 mM
SDS	2 %
Tris HCL (pH 6,7)	62,5 mM

3.13.7 Anticuerpos utilizados

Anti SREBP-1 (H-160) Santa Cruz Biotechnology, Inc. # sc-8984: Anticuerpo policlonal de conejo dirigido a SREBP-1.

Anti Actin Antibody Sigma A2066: Anticuerpo policlonal de conejo anti-actina.

Anti Rabbit IgG HRP Linked Antibody, Cell Signaling Technology #7074s: Anticuerpo secundario.

3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Se utilizó el programa SPSS 23.0 para Windows (SPSS Inc.). La comparación de grupos se llevó a cabo mediante *ANOVA* de una o dos vías y se identificaron diferencias entre grupos mediante la aplicación del *post-hoc test* de *Student-Newman-Keuls*. Para comparar medias entre dos grupos se realizó el test *t-Student*. En ambos casos se consideraron que las diferencias eran significativas cuando el nivel de significancia fue $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE *SPARUS AURATA*

A fin de obtener un amplio espectro de secuencias transcriptómicas de interés para realizar estudios nutricionales en dorada, juveniles de esta especie fueron distribuidos en siete acuarios con agua de mar, como se describe en el apartado 3.3.2. Tras un período de aclimatación a nuestras instalaciones, los peces de cinco de los siete acuarios fueron alimentados con cada una de las cinco dietas descritas en la Tabla 3.1 durante un período de 23 días. Las dietas, isoenergéticas, fueron diseñadas a fin de variar la proporción de cada uno de los macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos), con niveles por encima y por debajo de los utilizados actualmente en dietas comerciales. Los peces de los dos acuarios restantes fueron sometidos a ayuno durante el mismo período de tiempo.

Al término del período experimental los peces se sacrificaron como se describe en Materiales y métodos, apartado 3.6, y se recolectaron muestras de hígado y músculo esquelético que permitieron la obtención de un amplio número de secuencias y la obtención de transcriptomas de hígado y músculo esquelético, así como el correspondiente a la combinación de las secuencias de ambos tejidos (transcriptoma que se denominó híbrido).

4.1.1 Calidad e integridad del RNA

Una vez extraído el RNA de los tejidos, tal como se describe en el apartado 3.12 de materiales y métodos, espectrofotométricamente se determinó la concentración, pureza de cada muestra e integridad (RIN) mediante el uso del *Kit Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies)*. Para aumentar la cobertura del transcriptoma hepático se realizó un *pool* de RNA mezclando 4-5 muestras de RNA de hígado de cada condición (ayuno y alimentación con las cinco dietas experimentales) que presentasen valores $RIN \geq 9$. Los valores de RIN individualizados se muestran en la tabla 4.1. En el caso de músculo esquelético se utilizó un *pool* de RNA total obtenido de músculo esquelético de 6 peces alimentados con cada una de las cinco dietas utilizadas y de 8 peces en ayuno, el valor RIN determinado para estas muestras fue 9,5 o superior (Sáez, 2015).

Tabla 4.1. Pureza e integridad (RIN) de las muestras de RNA total de hígado de juveniles de *S. aurata* utilizadas en el análisis transcriptómico.

Muestra	Acuario	Dieta	[RNA] ng/ μ l	260/280	260/230	RIN
H2	Ac11	MLH	397,0	2,10	2,04	9,00
H4	Ac11	MLH	731,7	2,12	2,24	9,40
H5	Ac11	MLH	989,7	2,11	1,96	9,70
H6	Ac11	MLH	1142,5	2,13	2,33	9,00
H9	Ac12	HLL	2015,6	2,06	1,76	9,00
H10	Ac12	HLL	1331,0	2,12	2,21	10,00
H11	Ac12	HLL	1998,4	2,09	2,09	10,00
H40	Ac12	HLL	620,6	2,12	2,05	9,50
H13	Ac13	LHL	510,1	2,10	2,35	9,00
H14	Ac13	LHL	363,1	2,11	2,25	9,30
H15	Ac13	LHL	281,7	2,12	1,27	9,50
H17	Ac13	LHL	312,9	2,14	1,78	9,00
H19	Ac14	MHL	255,6	2,10	1,88	9,20
H21	Ac14	MHL	701,0	2,09	2,17	9,00
H22	Ac14	MHL	577,5	2,08	2,12	9,60
H23	Ac14	MHL	393,9	2,10	2,19	9,70
H24	Ac14	MHL	419,7	2,08	2,12	9,90
H26	Ac15	LLH	369,7	2,11	2,11	9,10
H29	Ac15	LLH	481,2	2,02	1,56	9,30
H30	Ac15	LLH	428,5	1,98	1,59	9,00
H41	Ac15	LLH	857,3	1,98	1,36	9,60
H43	Ac16	Ayuno	531,5	2,10	2,27	9,50
H44	Ac16	Ayuno	786,7	2,14	2,31	9,50
H37	Ac17	Ayuno	755,1	2,14	2,30	10,00
H38	Ac17	Ayuno	666,1	2,13	2,23	10,00
H45	Ac17	Ayuno	1029,2	2,14	2,33	9,50

4.1.2 Obtención de bibliotecas de cDNA, análisis transcriptómico por pirosecuenciación 454 FLX y ensamblado de secuencias

A partir de cada *pool* de RNA total de hígado y de músculo esquelético se construyeron sendas bibliotecas de cDNA para cada tejido, la cuales fueron normalizadas para incrementar la presencia de transcritos poco frecuentes según lo descrito en la sección 3.11. Una vez normalizadas las bibliotecas fueron secuenciadas de manera independiente utilizando en ambos casos la plataforma GS FLX 454 (Roche). A fin de mejorar la cantidad y calidad de lecturas de secuencia se hicieron dos procesos de secuenciación independientes para cada tejido o *runs*.

En la tabla 4.2 se muestra el resumen de los procesos de secuenciación de cada tejido, así como los resultados del ensamblado de secuencias correspondientes a los transcriptomas de hígado, músculo esquelético e híbrido (hígado + músculo). Para hígado se obtuvieron 812.770 lecturas totales que corresponden a 298,9 Mpb con un tamaño promedio de 368 nucleótidos, mientras que

para músculo se obtuvo un número ligeramente inferior de lecturas y de pb totales (691.433 y 275.9 Mpb respectivamente) con un tamaño promedio de nucleótidos algo superior (399 pb).

En la figura 4.1 se muestra la distribución de lecturas o secuencias repetidas de ambos *runs* de hígado. En el *run 2* se observan 469.240 lecturas únicas que representan el 98,87 % del total, mientras que en el *run 1* hay 317.530 lecturas únicas correspondientes al 93,89 % de secuencias obtenidas debido a la mayor presencia de secuencias repetidas. Posteriormente se filtraron las secuencias obtenidas en cada uno de los *runs* para cada tejido mediante la eliminación de secuencias cebadoras y adaptadoras. De este proceso resultaron un total de 699.991 secuencias de elevada calidad en muestras de hígado y 555.031 para las de músculo, que representaron un total de 261,6 Mpb y 244,1 Mpb respectivamente, con una longitud promedio de secuencias de 374 pb para hígado, 441 pb para músculo y 404 pb para el transcriptoma híbrido.

Tabla 4.2. Resumen de los datos de secuenciación 454 y ensamblado de las secuencias.

	Hígado	Músculo	Híbrido
Secuenciación 454			
Número de lecturas	812.770	691.433	1.504.203
Mb Totales	298,9	275,9	574,8
Longitud promedio	368	399	382
Post- limpieza/Procesamiento			
Número de lecturas de alta calidad	699.991	555.031	1.255.022
Total Mb de alta calidad	261,6	244,7	506,3
Longitud promedio de lecturas de alta calidad (pb)	374	441	404
Ensamblado			
Lecturas ensambladas	389.338	383.320	1.007.795
Número de <i>Singletons</i>	43.460	30.302	102.569
Número de <i>Contigs</i>	13.313	12.333	23.956
Longitud promedio de <i>Contigs</i>	934	1.056	901
N50 <i>Contig</i>	1.195	1.364	1.322
Número de <i>Isotigs</i>	11.545	10.599	19.530
Longitud promedio de <i>Isotigs</i>	1.208	1.390	1.330
N50 <i>Isotig</i>	1.315	1.491	1.536
Número de <i>Isogroups</i>	10.033	9.189	15.954
Número de secuencias únicas	55.026	40.922	25.392

Para ensamblar las secuencias se utilizó el *software GS de novo Assembler* (Roche). En hígado se utilizaron para el ensamblaje 389.338 secuencias, dando lugar a un total de 55.026 secuencias únicas que corresponden a 11.545 *isotigs* más 23 *contigs* y 43.460 *singletons* que no se agruparon en *isotigs*. Para el músculo esquelético se ensamblaron 383.320 lecturas que generaron 40.922

secuencias únicas distribuidas en 10.599 *isotigs* más 23 *contigs* y 30.302 *singletons* no agrupados en *isotigs*. En el transcriptoma híbrido se obtuvo un mayor número de *singletons* (102.569), que generaron 25.392 secuencias únicas de 19.530 *isotigs* más 72 *contigs* y 5.790 *singletons* no utilizados en la formación de *isotigs*.

Por otra parte, la N50 (longitud en pb para la que el conjunto de secuencias ensambladas de longitud igual o superior corresponde, al menos, a la mitad de la suma total de pb ensambladas) de los *contigs* del transcriptoma de hígado, músculo e híbrido fue de 1.195 pb, 1.364 pb y 1.322 pb respectivamente, mientras que para los *isotigs* fue de 1.315 pb, 1.491 pb y 1.536 pb.

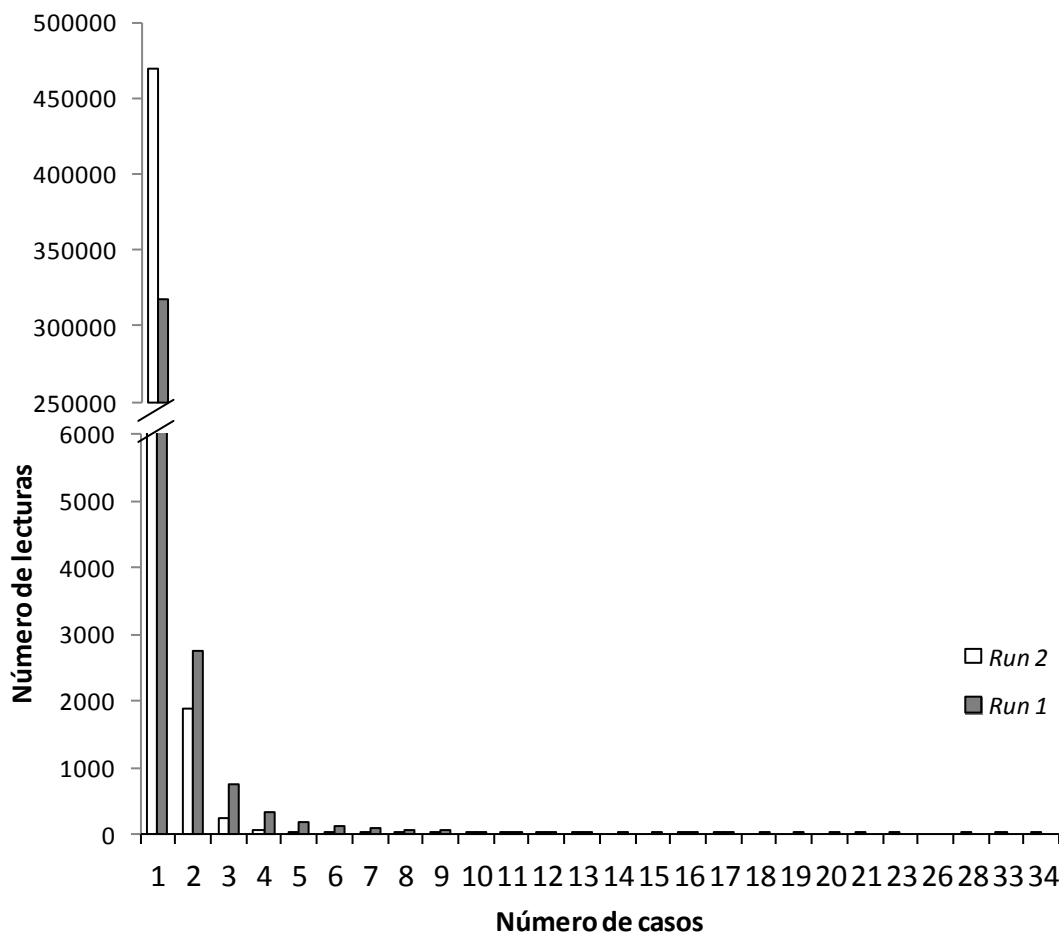


Figura 4.1. Distribución de secuencias idénticas obtenidas mediante secuenciación 454 en dos *run* de muestras de hígado de *S. aurata*.

En cuanto a la distribución de las secuencias ensambladas en función del tamaño (Figura 4.2), el rango de mayor concentración de secuencias en ambos tejidos se encuentra entre los 401 y 800 pb de longitud, que representan el 38 % en hígado y el 35 % en músculo del total de secuencias ensambladas. Un pequeño porcentaje de secuencias (12,6 % en hígado y 7,6 % en músculo) están por debajo de 400 pb de longitud, mientras que la mayor proporción de secuencias (49 % en hígado y 57,5 % en músculo) superan los 800 pb. La concentración de las secuencias de longitud superior a

600 pb disminuye progresivamente por lo que sólo 38 secuencias en hígado y 80 en músculo superan los 3000 pb.

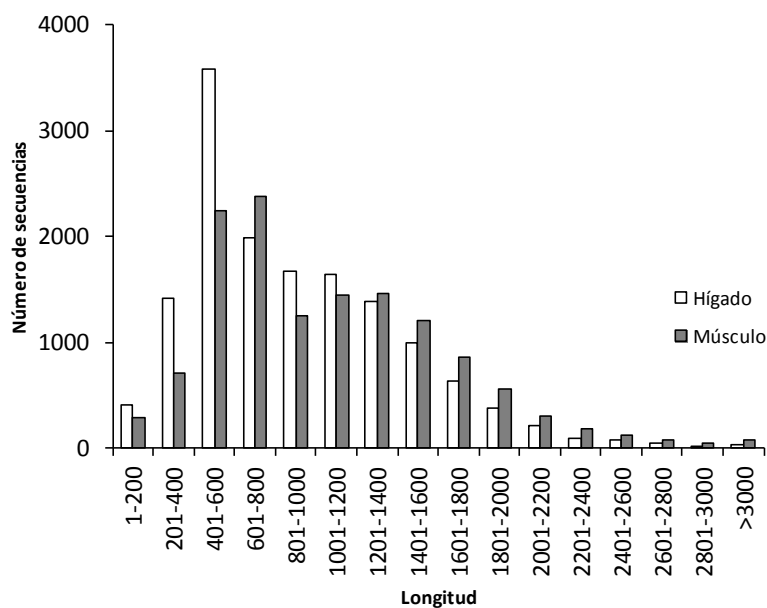


Figura 4.2. Distribución de la longitud de las secuencias ensambladas para hígado y músculo de *S. aurata*.

4.1.3 Anotación de secuencias y ontología génica

Mediante el *software* GPRO (Futami *et al.*, 2011) se anotaron 21.093 secuencias que corresponden al 83 % de las secuencias únicas totales del transcriptoma híbrido. De estas secuencias, 13.769 se anotaron utilizando la información existente en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (nr) y el resto de secuencias (7.324) se anotaron mediante la base de datos de nucleótidos del NCBI (nt). De las secuencias anotadas se analizó la distribución por especies. La especie que presentó un mayor número de secuencias representadas en el transcriptoma híbrido de *S. aurata* fue *Stegates partitus* con un 23,5 % de las secuencias, seguido por *Larimichthys crocea* (16,3 %), *Neolamprologus brichardi* (7,5 %), *Sparus aurata* (3,6 %), *Takifugu rubripes* (3,5%), *Cynoglossus semilaevis* (3,5 %) y *Kryptolebias marmoratus* (3,4%), entre otras especies de peces teleosteos (Fig. 4.3).

Ontología génica o GO (acrónimo de *Gene Ontology* en inglés) es un sistema de clasificación de los productos génicos ampliamente utilizado en estudios transcriptómicos y que permite agruparlos en función de tres criterios biológicos: función molecular, procesos biológicos y componentes o localización subcelular. Mediante esta nomenclatura se asignaron las categorías GO a las secuencias anotadas para *S. aurata*. En la figura 4.4 se resume el número de anotaciones asociadas a GO en los transcriptomas de hígado, músculo esquelético e híbrido. En relación a las anotaciones clasificadas de acuerdo con el criterio de componentes celulares (Fig. 4.4a) se observa que la mayoría de las secuencias corresponden a *componentes intracelulares* y *de membrana*, aunque otras

denominaciones también están presentes, tales como *membrana plasmática*, *espacio extracelular*, *sistema de endomembranas*, *matriz extracelular*, *membrana de Golgi*.

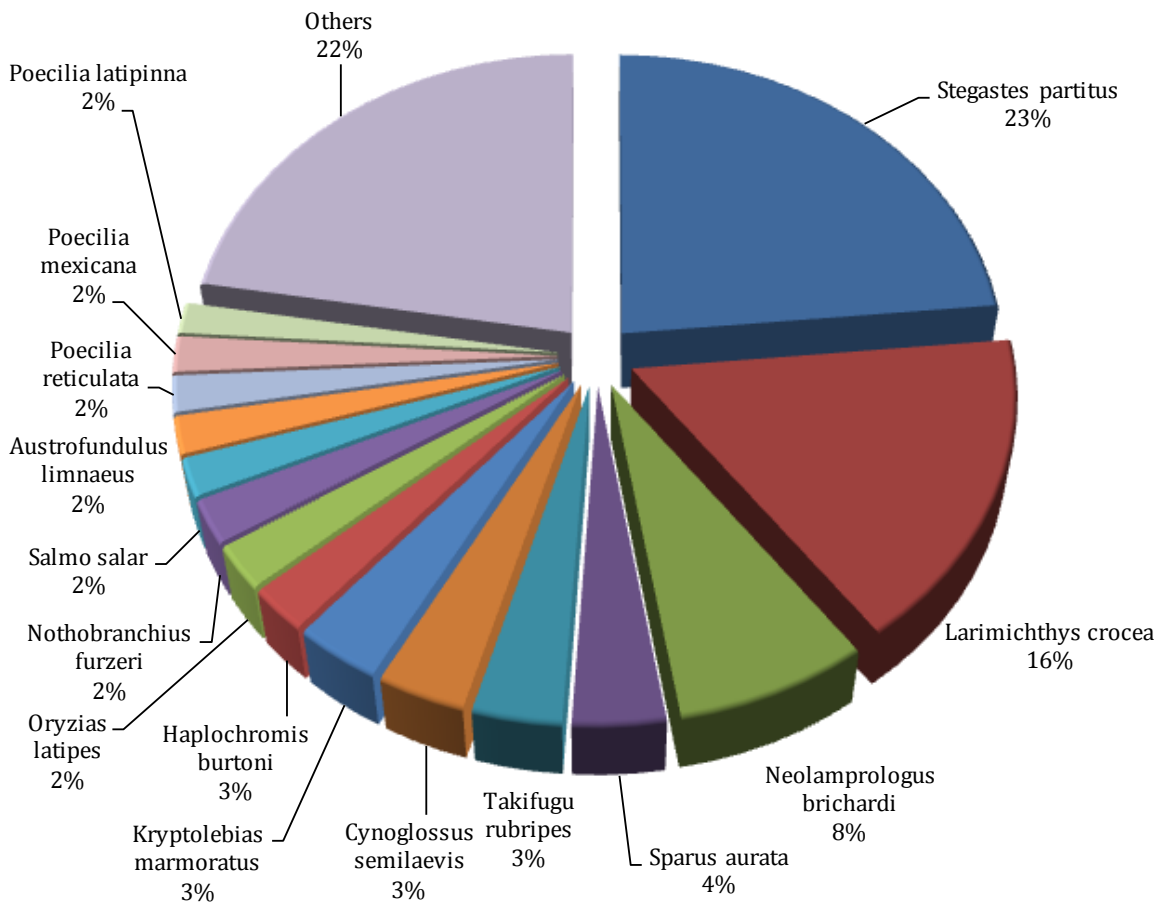


Figura 4.3. Distribución por especies de las secuencias utilizadas para anotar las secuencias del transcriptoma híbrido de dorada.

En las anotaciones vinculadas a procesos biológicos (Fig. 4.4b) las categorías más abundantes fueron las siguientes: *procesos metabólicos de compuestos que contienen nucleótidos*, *expresión génica*, *transporte* y *transducción de señales*. En la mayoría de los casos se observa un mayor número de secuencias asociadas a estas categorías en el transcriptoma de hígado con respecto al de músculo. Sin embargo, las categorías *respuesta a hormona y estímulos*, *ciclo celular mitótico* y *morfogénesis* se encuentra una mayor representación en el transcriptoma de músculo respecto al de hígado.

Por último, en cuanto a funciones moleculares (Fig. 4.4c) observamos que las categorías más representativas son: *unión a nucleótidos*, *actividad hidrolasa*, *unión a proteínas*, *actividad transferasa*, *unión a ácidos nucleicos* y *actividad oxido-reductasa*. En todos los casos se observa una mayor cantidad de secuencias en hígado que en músculo a excepción de las correspondientes a

constituyentes estructurales del citoesqueleto, constituyentes estructurales de la matriz extracelular y andamio de complejos proteicos, cuyas secuencias están sobrerrepresentadas en músculo.

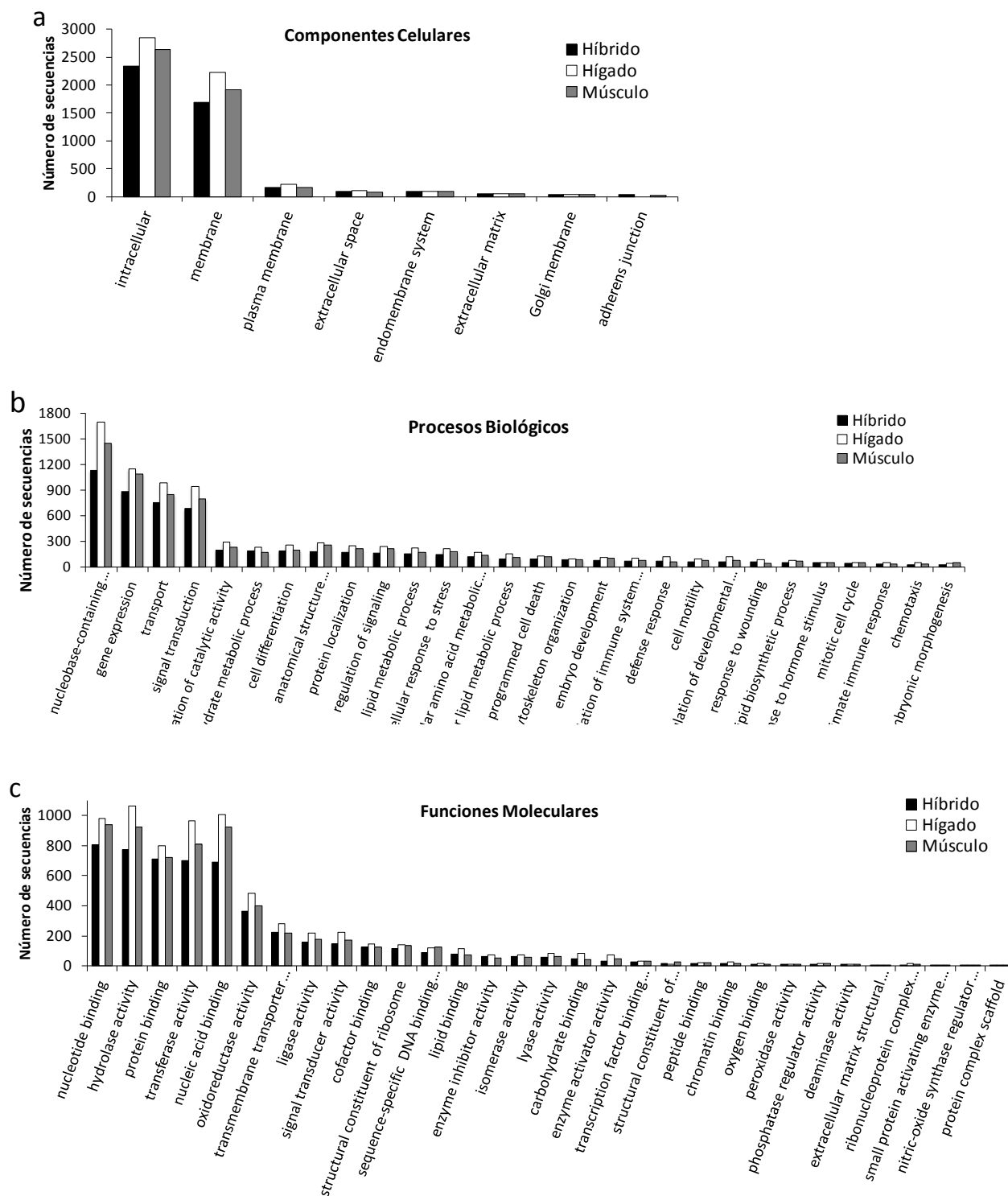


Figura 4.4. Clasificación funcional de las secuencias anotadas (GO). (a) Componentes celulares nivel 4, (b) procesos biológicos nivel 4 y (c) funciones moleculares nivel 3.

4.1.4 Rutas metabólicas KEGG

Mediante el software *GPRO* se asociaron las secuencias del transcriptoma anotadas con códigos de enzimas (EC), los cuales pueden ser asociados a rutas metabólicas utilizando la base de datos KEGG-*PATHWAY* (Kanehisa, 1997). En la figura 4.5 se indican las rutas metabólicas KEGG en las que participan secuencias presentes en el transcriptoma desarrollado a partir de muestras de músculo, hígado o híbrido para *S. aurata*. Un total de 584 secuencias en el transcriptoma híbrido y 681 secuencias en el transcriptoma de músculo fueron asignadas a 73 rutas metabólicas, mientras que en el transcriptoma de hígado encontramos 802 secuencias asociadas a 78 rutas metabólicas. La ruta con mayor representatividad es *el metabolismo de las purinas* con 93 secuencias del transcriptoma híbrido, 134 del de hígado y 120 del de músculo, seguido por la *glucólisis/gluconeogénesis* (49 secuencias del transcriptoma híbrido, 61 en el de hígado y 41 en el de músculo) y la *fosforilación oxidativa* (41 secuencias del transcriptoma híbrido, 51 del transcriptoma de hígado y 48 del de músculo).

En general la mayoría de las rutas metabólicas se encuentran más representadas en hígado que en músculo (46 rutas). Diez rutas son exclusivas de hígado (*Primary bile acid biosynthesis, Steroid biosynthesis, Riboflavin metabolism, Thiamine metabolism, Tyrosine metabolism, Mucin type O-Glycan biosynthesis, Fluorobenzoate degradation, Lipopolysaccharide biosynthesis, Phosphonate and phosphinate metabolism* y *Xylene degradation*). La ruta *Glucólisis/Gluconeogénesis* es la que presenta mayor diferencia en cuanto al número de secuencias asociadas presentes en los dos tejidos (20 secuencias más en hígado que en músculo). Sin embargo, 22 rutas se encuentran mejor representadas en músculo y 5 de estas son exclusivas de tejido muscular: *beta-Alanine metabolism, Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series, Benzoate degradation, Linoleic acid metabolism, Phenylalanine y Tyrosine and tryptophan biosynthesis*. Destaca la ruta de *señalización de mTOR*, donde el porcentaje de secuencias asociadas al transcriptoma de músculo es un 36 % superior que en el de hígado.

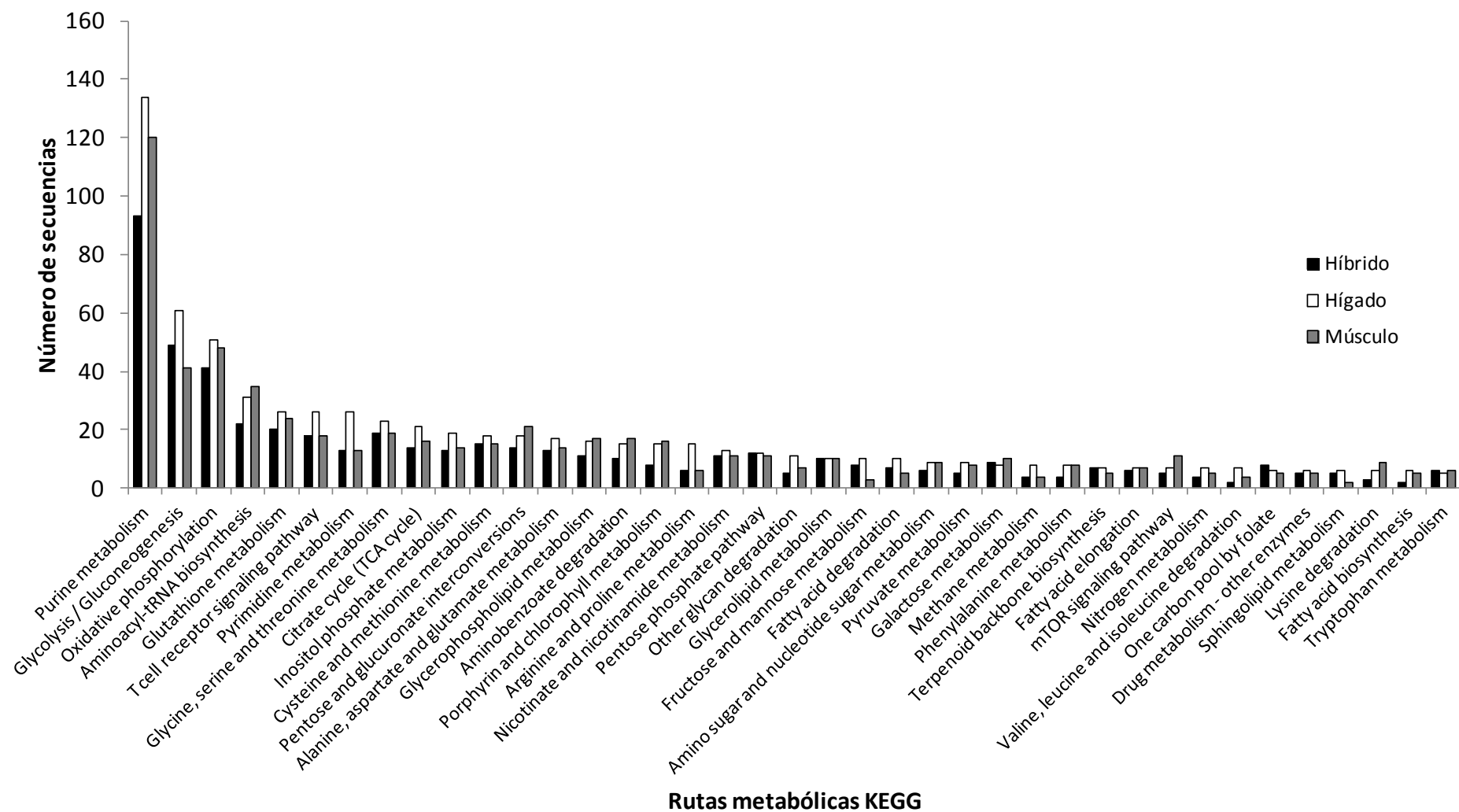


figura 4.5. Rutas metabólicas KEGG representadas en el transcriptoma de *S. aurata* con al menos 6 anotaciones en alguno de los tejidos.

4.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN HÍGADO DE DORADA

4.2.1. Metabolitos en suero e hígado

A fin de caracterizar de manera general el estado nutricional de juveniles de dorada sometidos durante 23 días a distintas condiciones nutricionales se determinaron los valores de glucosa y triglicéridos en suero y de glucógeno en hígado. El valor de glucosa en suero, determinada 24 horas después de la última ingesta, en todos los grupos de peces alimentados se encuentra alrededor de 100 mg/dl, a diferencia de los peces en situación de ayuno que presentan una marcada hipoglucemia (Fig. 4.6a). Sin embargo, aún cuando todos los grupos de peces alimentados presentan un comportamiento similar, la glucemia en los peces alimentados con la dieta de mayor contenido en carbohidratos (LLH) fue significativamente superior a la del resto de los grupos de peces a excepción de los alimentados con a la dieta LHH, que presentaban un valor estadísticamente similar a la de los otros grupos de peces alimentados.

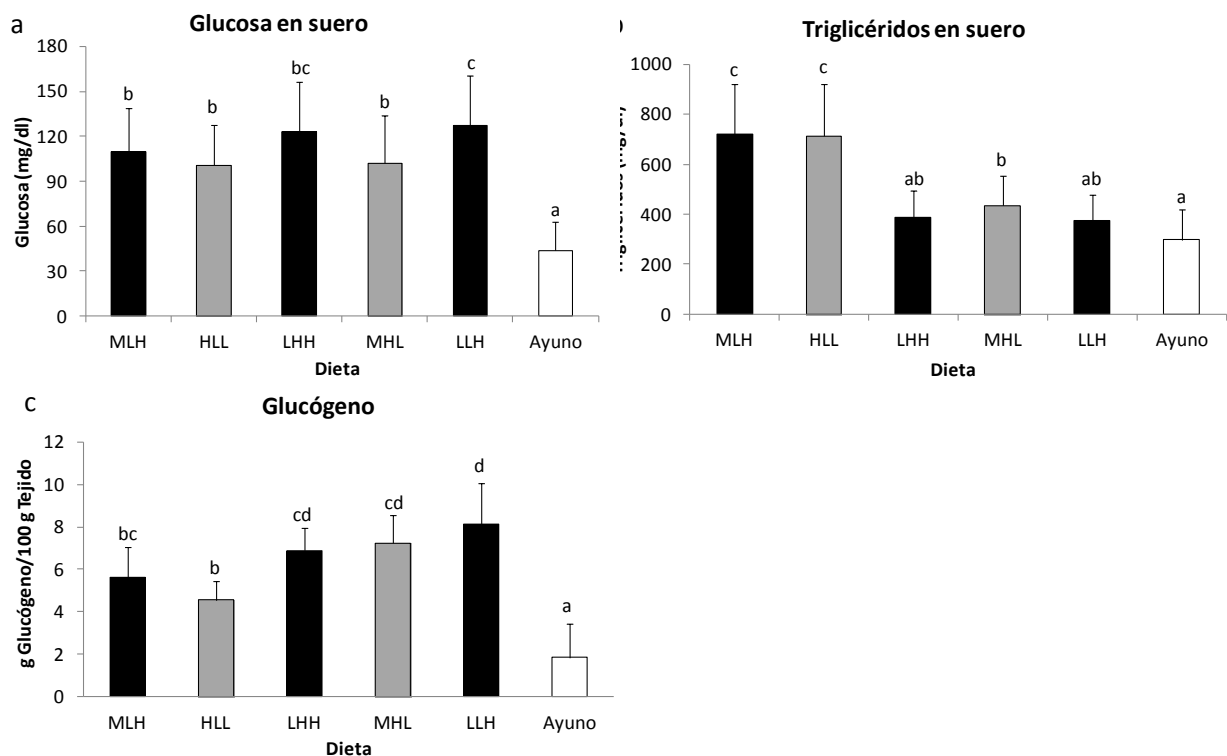


Figura 4.6. Metabolitos analizados. (a) Glucosa en suero, (b) triglicéridos en suero y (c) glucógeno en hígado de doradas en ayuno o alimentadas 23 días con dietas de diferente composición. Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar (DE). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones.

Con respecto a los triglicéridos en suero (figura 4.6b) observamos que, al igual que con la glucosa, los peces en ayuno presentaron una media significativamente más baja que el resto de grupos. La media más alta se observa en los peces alimentados con las dietas MLH y HLL (esta última corresponde a la dieta de mayor contenido proteico). Ambos grupos presentan diferencias significativas con respecto a los grupos de peces alimentados con las dietas restantes. Así mismo en los peces alimentados podemos apreciar que aquellos a los que se les suministro la dieta LHH y la LLH presentan los valores más bajos de triglicéridos en suero.

Por otra parte se determinó el valor de glucógeno en hígado y al igual que para los otros parámetros los valores más bajos correspondieron a los peces en situación de ayuno. En cuanto a los peces alimentados podemos indicar que el comportamiento de este metabolito es similar al indicado para la glucosa en sangre. Sin embargo, la variabilidad es mucho menor, lo que permite discriminar mejor las diferencias entre las distintas dietas. En este sentido el grupo con los valores de glucógeno más bajos de entre los peces alimentados correspondió al de los alimentados con la dieta de mayor contenido proteico (HLL), mientras que la media más alta se observa en peces alimentados con la dieta de mayor contenido en carbohidratos (LLH).

4.2.2. Efecto de la composición de la dieta sobre la actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario en hígado de *S. aurata*

Diversas actividades enzimáticas que intervienen en el metabolismo intermediario en hígado de dorada se vieron significativamente afectadas tanto por la composición de la dieta como por el ayuno. En referencia a las enzimas del metabolismo de proteínas y aminoácidos se observa que para las transaminasas AST (Fig. 4.7a) y ALT (Fig. 4.7b), en ambos casos los valores más elevados corresponden a los peces alimentados con dietas que contienen la mayor cantidad de proteína (HLL), mientras que el valor menor corresponde al ayuno en el caso de la AST o a los alimentados con la dieta de contenido en carbohidratos más elevado para la ALT. La GDH (Fig. 4.7c) presentó la particularidad de que los peces en situación de ayuno presentaron un valor superior al del resto de grupos en estudio, mientras que los peces alimentados no presentaron diferencias significativas entre si.

Por otro lado, se observó un incremento de la actividad correspondiente a las enzimas glucolíticas PK (Fig. 4.7d), PFK-1 (Fig. 4.7e) y GK (Fig. 4.7f) en los peces alimentados con las dietas con mayor contenido en carbohidratos (LLH y MLH). Por el contrario, los peces alimentados con la dieta con mayor contenido en proteínas (HLL) presentaron el valor más bajo de los peces alimentados. El efecto del ayuno en estas enzimas se evidencia claramente, ya que los peces sometidos a ayuno presentaron una fuerte disminución en los valores de actividad para estas enzimas.

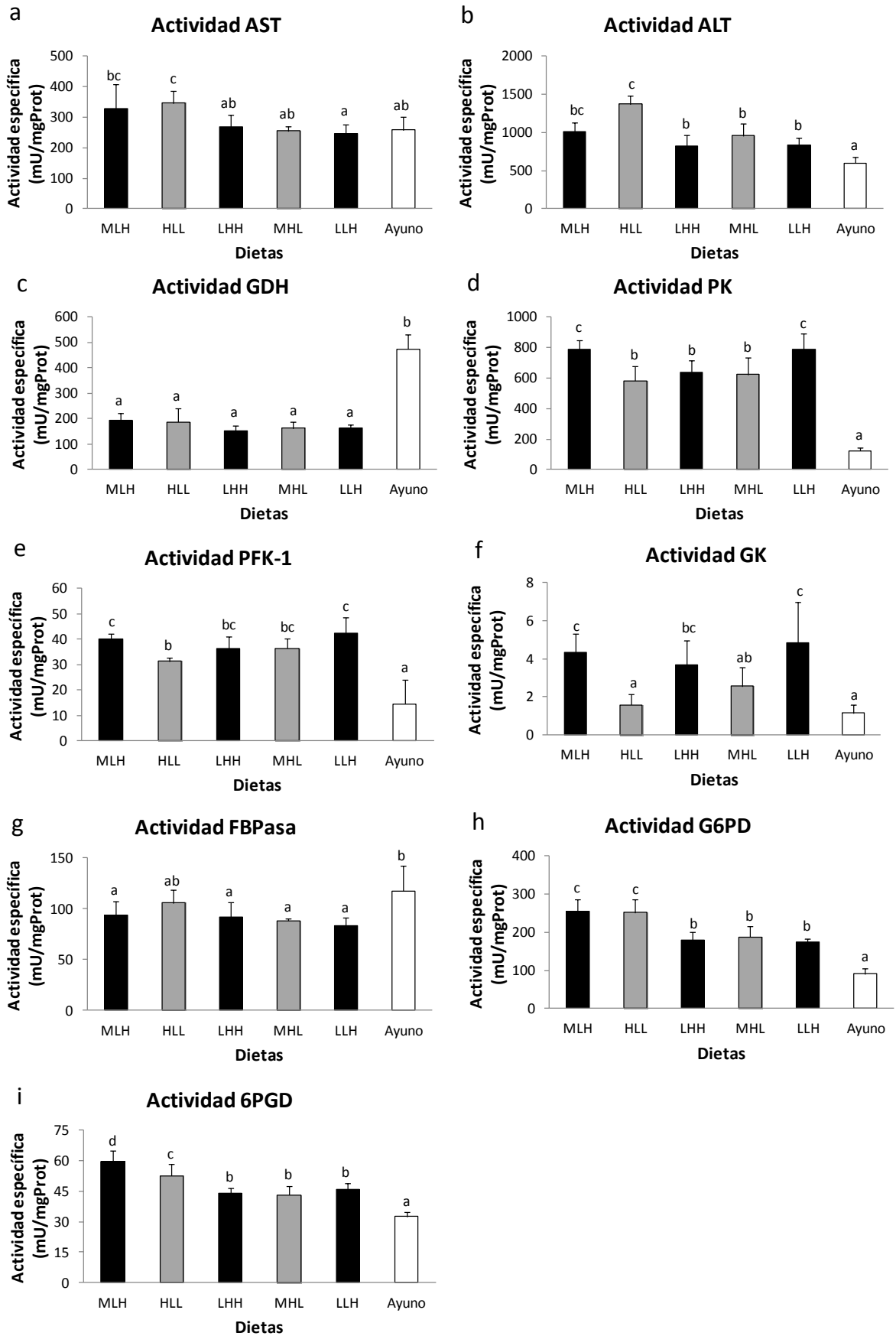


Figura 4.7. Efecto de la composición de la dieta y el ayuno en la actividad de enzimas que intervienen en de diversas rutas del metabolismo intermediario en hígado de dorada. (a) AST, (b) ALT, (c) GDH, (d) PK, (e) PFK-1, (f) GK, (g) FBPasa, (h) G6PD y (i) 6PGD. Los valores de actividad enzimática en mU/mg Proteína y se expresan por el valor de la media \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones analizadas.

De la vía metabólica opuesta a la glucólisis, la gluconeogénesis, evaluamos la actividad correspondiente a la enzima FBPasa (Fig. 4.7g) y observamos un claro incremento en el valor de actividad en los peces en ayuno. Aún cuando parece no haber diferencias estadísticas entre los peces alimentados con las diferentes dietas, se observan valores ligeramente superiores en los peces alimentados con la dieta más rica en proteína y de menor contenido en carbohidratos (HLL).

En relación a los valores de actividad de dos enzimas de la vía de las pentosas fosfato (Fig. 4.7h y 4.7i), los peces alimentados que mostraron los valores más elevados fueron los alimentados con las dietas MLH y HLL. La actividad de las enzimas G6PD y 6PGD en los peces alimentados con las restantes dietas no presentaron diferencias significativas entre sí, si bien sus valores fueron más bajos que los indicados para las dietas MLH y HLL. Los valores de actividad G6PD y 6PGD en los peces sometidos a ayuno fueron significativamente inferiores a los indicados para los peces alimentados con las diferentes dietas.

4.3 ANÁLISIS POR *MICROARRAYS* DEL EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE DORADA

4.3.1 Expresión diferencial de genes en hígado de dorada mediante el uso de *microarrays*

Para identificar genes biomarcadores y poder evaluar la expresión diferencial de genes en hígado de juveniles de *S. aurata* sometidos a ayuno o alimentados con dietas que difieren en la composición de nutrientes se realizó un análisis mediante la tecnología de *microarrays*. Para ello se construyeron *microchips* de matrices de 8 por 60.000 funciones con sondas específicas de 60 nucleótidos diseñadas a partir de las secuencias únicas del transcriptoma híbrido de dorada previamente descrito (apartado 4.1.2). Se analizó la expresión utilizando RNA procedente de 4 muestras por condición (peces en ayuno o alimentados durante 23 días con las dietas HLL, MHL y LLH); previamente se determinó la concentración, pureza e integridad del RNA utilizado, cuyos valores se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Pureza e integridad (RIN) de las muestras de RNA total procedentes del hígado de *S. aurata* utilizada para los *microarrays*.

Muestra	Dieta	Ratio 28S/18S	RIN	[RNA] ng/ μ l	260/280	260/230
LH1	HLL	1,5	9,5	2.015,6	2,06	1,76
LH2	HLL	1,3	9,1	1.331	2,12	2,21
LH3	HLL	1,5	9,5	1.998,4	2,09	2,09
LH4	HLL	1,3	8,7	620,6	2,12	2,05
LM1	MHL	1,3	8,5	255,6	2,10	1,88
LM2	MHL	1,1	8	701	2,09	2,17
LM3	MHL	1,2	8,8	577,5	2,08	2,12
LM4	MHL	1,2	8,8	393,9	2,10	2,19
LL1	LLH	1,3	9	369,7	2,11	2,11
LL2	LLH	1,2	8,1	481,2	2,02	1,56
LL3	LLH	1	8	428,5	1,98	1,59
LL4	LLH	1,5	9,2	857,3	1,98	1,36
LA1	Ayuno	1,2	8,5	755,1	2,14	2,30
LA2	Ayuno	1,2	8,6	666,1	2,13	2,23
LA3	Ayuno	1,3	8,7	531,5	2,10	2,27
LA4	Ayuno	1,4	9,1	786,7	2,14	2,31

Los resultados de los *microarrays* fueron normalizados y ajustados a un modelo lineal utilizando el paquete bioinformático *Bioconductor* lo que nos permitió obtener valores de expresión. Las diferencias estadísticas en la expresión fueron establecidas mediante un valor *P* ajustado inferior a 0,05. En la tabla 4.4 se muestra el número de anotaciones con expresión diferencial observadas en

las comparaciones realizadas. La mayor cantidad de secuencias expresadas diferencialmente la encontramos al comparar peces sometidos a ayuno con peces alimentados con las distintas dietas (más de 4.200 anotaciones totales, un 48 % de las cuales están infraexpresadas y un 52 % sobreexpresadas). Específicamente, la comparación entre genes expresados en los peces en ayuno y los alimentados con la dieta HLL (de mayor contenido proteico) es la que presentó mayores diferencias. Adicionalmente, se determinaron las secuencias con expresión diferencial que se presentaban en común al efectuar las comparaciones entre el ayuno y la alimentación con las dietas HLL, MHL y LLH (Ayuno vs Alimentación), resultando un total de 2.799 secuencias con expresión diferencial (65 % al comparar Ayuno vs MHL, 66,3 % entre Ayuno vs LLH y 60,4 % en Ayuno vs HLL).

Al comparar entre si la expresión diferencial correspondiente a los genes de peces alimentados con cada una de las dietas en estudio, observamos que las dos dietas que muestran un perfil más parecido en el número de secuencias expresadas son las dietas LLH y MHL, no existiendo secuencias expresadas diferencialmente con un P ajustado $< 0,05$. Así mismo, las dietas HLL (la de mayor cantidad de proteínas) y LLH (de mayor cantidad de carbohidratos) fueron las dos dietas con las que los peces mostraron mayor cantidad de secuencias expresadas diferencialmente al compararlas entre si, un total de 249 secuencias de las cuales un 55,8 % (139 anotaciones) tienen un menor nivel de expresión cuando la dieta que se suministró a los peces fue la LLH.

Tabla 4.4. Resumen del número de anotaciones con expresión diferencial en hígado de dorada al comparar las diferentes condiciones de alimentación, valores filtrados con valor P ajustado $< 0,05$.

Valor P ajustado $< 0,05$	MHL vs. HLL	LLH vs. HLL	LLH vs. MHL	Ayuno vs. MHL	Ayuno vs. LLH	Ayuno vs. HLL	Ayuno Vs. Alimentado
Incremento de expresión génica	73	110	0	2.243	2.218	2.387	1.483
Disminución de expresión génica	110	139	0	2.064	2.004	2.246	1.316
Total	183	249	0	4.307	4.222	4.633	2.799

4.3.2 Análisis funcional

Se analizó la expresión diferencial de genes de las distintas condiciones experimentales de acuerdo a las funciones descritas en los términos GO (Procesos Biológicos, Funciones Moleculares y Componentes Celulares). Se consideraron los genes expresados diferencialmente con un valor P ajustado inferior a 0,05.

4.3.2.1 Análisis por microarrays de la expresión diferencial de genes en peces alimentados vs peces en ayuno

Se analizaron las diferencias en la expresión diferencial de genes entre los peces alimentados y los peces en ayuno. Debido a las diferencias tan marcadas entre estas condiciones, para mostrar y analizar adecuadamente la información de las anotaciones de manera individual, establecimos que en al menos una de las dietas la sobreexpresión (Tabla 4.5) o la infraexpresión génica (Tabla 4.6) fuese mayor o igual a 7 veces. El primer dato relevante que se desprende de estas tablas es que en los peces alimentados con la dieta HLL el patrón de expresión es completamente distinto al que muestran los alimentados con las otras dos dietas, las cuales llevaron a que los patrones de expresión fueran similares para la mayoría de sus genes. Así, la primera anotación de la tabla 4.5 *PREDICTED: solute carrier family 22 member 6-like isoform X1 (SLC22A6)*, en la dieta HLL está sobreexpresada 235,63 veces mientras que en hígado de peces alimentados con las dietas LLH y MHL lo está 198,16 y 159,76 veces respectivamente. Para la segunda anotación (*PREDICTED: calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2-A-like (SLC25A25)*) cuando la dieta de alimentación era HLL está sobreexpresada 28,59 veces mientras que con la ingesta de las dietas LLH y MHL lo está 72,45 y 57,70 veces respectivamente.

Por otro lado en la Figura 4.8 se muestra el análisis GO de genes asociados a procesos biológicos que se encuentran sobreexpresados en condición de ayuno. Este gráfico se desarrolló utilizando el programa *BLAST2GO* (Gotz *et al.*, 2008) considerando aquellos términos con al menos 99 anotaciones. Se puede apreciar que el término GO con mayor representación es el correspondiente a *procesos metabólicos* (246 anotaciones), *procesos metabólicos de proteínas* y de *macromoléculas celulares*. Cabe señalar que el análisis GO de los genes infraexpresados no cambió en función de la composición de la dieta, aunque el número de anotaciones totales es inferior.

En cuanto a funciones moleculares de genes infraexpresados en el ayuno (Figura 4.9), observamos que los términos con mayor representación corresponden a *unión* (149 anotaciones) y *actividades catalíticas* (143 anotaciones). Las anotaciones del término *actividades catalíticas* presentan un *nodescore* mayor, por lo que el término se representa con un octágono. Todos los términos representados son generales y no presentan diferencias con los términos representados en el gráfico de genes sobreexpresados en el ayuno.

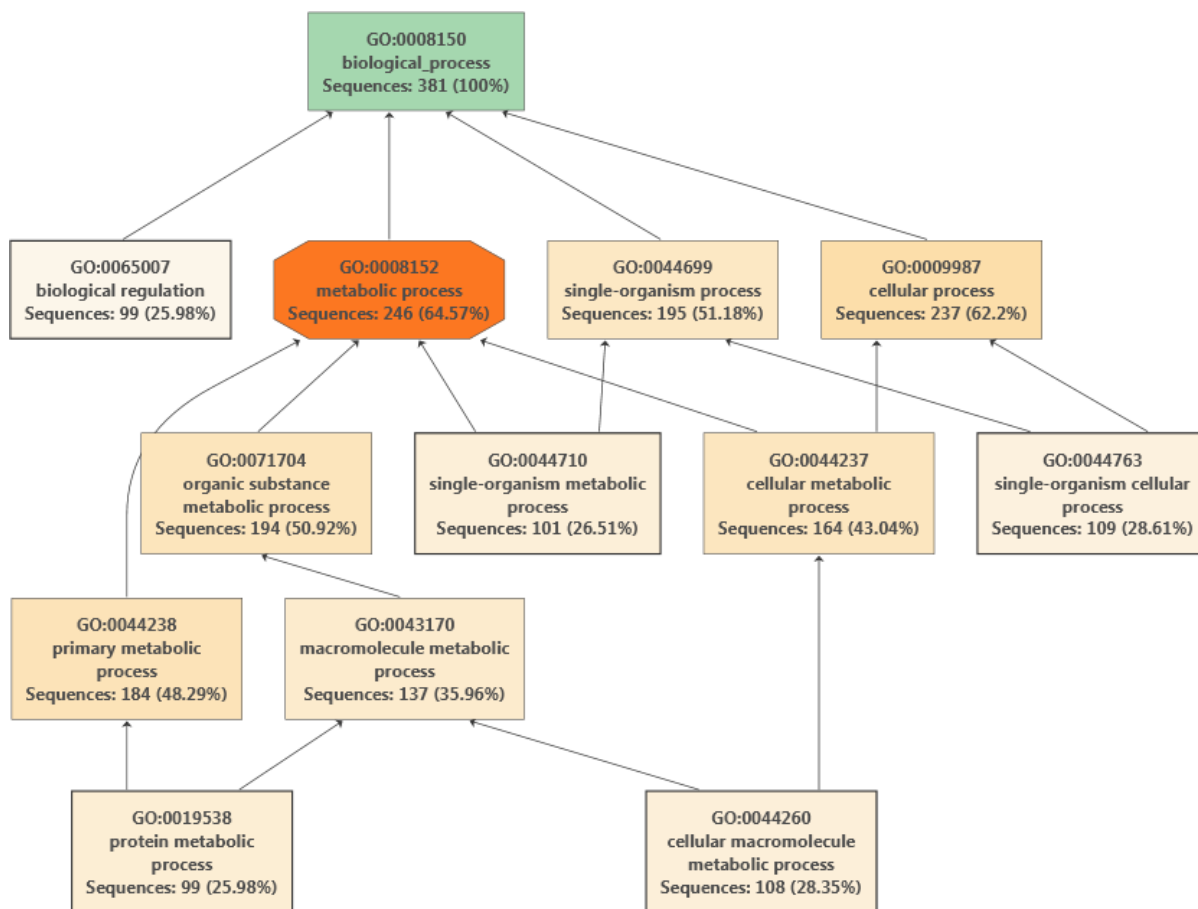


Figura 4.8. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a Procesos Biológicos que se encuentran sobreexpresados en condición de ayuno con al menos 99 anotaciones.

Tabla 4.5. Genes sobreexpresados al menos 7 veces en el ayuno con respecto a alguna de las tres dietas estudiadas (HLL, MHL, LLH).

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de inducción	Veces de inducción	Veces de inducción
			HLL	LLH	MHL
isotig10837	PREDICTED: solute carrier family 22 member 6-like isoform X1	SLC22A6	235,63	198,16	159,76
isotig07071	PREDICTED: calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2-A-like	SLC25A25	28,59	72,45	57,70
isotig07025	PREDICTED: glutaminase liver isoform, mitochondrial	GLS2	24,71	64,90	55,73
isotig07211	PREDICTED: proline dehydrogenase 1, mitochondrial-like	PRODH	71,57	49,25	60,36
isotig08470	PREDICTED: protein phosphatase 1K, mitochondrial-like isoform X2	PPM1K	59,46	45,16	26,57
isotig13418	PREDICTED: ADP/ATP translocase 3	SLC25A6	48,90	44,87	60,09
isotig08944	PREDICTED: L-threonine 3-dehydrogenase, mitochondrial-like	TDH	11,80	41,02	42,21
isotig18107	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial isoform X2	COX6A2	35,01	36,25	86,71
isotig09382	PREDICTED: L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	L2HGDH	9,02	22,73	18,89
isotig03597	Cytochrome P450 2G1	Cyp2g1	57,42	18,21	17,25
isotig03118	PREDICTED: Larimichthys crocea ADP-ribosylation factor 4 (arf4), mRNA	ARF4	30,95	17,99	28,89
isotig07684	PREDICTED: diacylglycerol O-acyltransferase 1, partial	DGAT1	48,58	17,90	14,94
isotig01678	PREDICTED: aconitate hydratase, mitochondrial-like isoform X2	ACO2	15,16	16,73	20,19
isotig01679	PREDICTED: GTP cyclohydrolase 1-like	GCH1	15,30	16,57	20,35
isotig09663	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized oxidoreductase YjmC-like	YjmC	25,36	16,47	7,21
isotig17429	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B1	11,31	15,00	16,44
isotig10319	cytochrome c	CYCS	11,33	14,79	18,74
isotig18188	hepcidin 4 precursor	HAMP4	9,84	14,67	9,71
isotig04623	Coenzyme Q-binding protein COQ10, mitochondrial	COQ10	19,64	14,36	18,94
isotig07876	PREDICTED: carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform isoform X2	CPT1B	19,27	12,71	11,13
isotig08816	PREDICTED: nuclear receptor coactivator 7-like isoform X1	NCOA7	6,73	11,96	10,15
isotig10583	PREDICTED: diablo homolog, mitochondrial-like isoform X1	DIABLO	6,62	10,97	9,62
isotig13700	Angiopoietin-related protein 4	ANGPTL4	30,39	10,56	29,96
isotig08762	PREDICTED: transmembrane protein 255B-like isoform X1	TMEM255B	17,82	10,41	6,08
isotig03630	PREDICTED: cytochrome P450 2K1-like isoform X2	CYP2K1	11,72	10,17	9,26
isotig09274	PREDICTED: Stegastes partitus sterol O-acyltransferase 2 (soat2), mRNA	SOAT2	30,57	9,89	10,82
IFXJFUR02FWSNU	hepcidin 2 precursor	HAMP2	4,18	9,81	4,89
isotig18838	PREDICTED: three finger toxin MALT0070C-like	MALT	16,37	9,52	11,53
isotig03783	PREDICTED: cytochrome P450 3A30-like isoform X1	CYP3A30	6,57	9,08	6,38
isotig14932	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: GMP reductase 1	GMPR	7,36	9,01	9,07
isotig18331	PREDICTED: saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein 2-like	PSBP2	14,64	8,91	16,57
isotig14175	PREDICTED: Stegastes partitus ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 16 (adams16), mRNA	ADAMTS16	7,56	7,62	8,37
isotig13061	PREDICTED: Notothenia coriiceps serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (sgk1), transcript variant X3, mRNA	SGK1	2,68	7,25	5,66
isotig04980	PREDICTED: complement C1q-like protein 2	C1QL2	5,47	7,17	4,58

isotig06691	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPST	4,21	7,04	7,40
isotig11734	PREDICTED: regulator of cell cycle RGCC-like isoform X2	RGCC	7,58	6,93	7,04
isotig15254	PREDICTED: Stegastes partitus nucleus accumbens-associated protein 1-like (LOC103373299), mRNA	NACC1	6,43	6,65	7,58
isotig12633	PREDICTED: Larimichthys crocea isocitrate dehydrogenase , mitochondrial-like (LOC104937776), mRNA	IDH2	7,73	6,60	5,73
isotig05713	PREDICTED: transmembrane protein 205-like	TMEM205	9,52	6,43	4,22
isotig01166	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: fatty acyl-CoA hydrolase precursor, medium chain-like	CES1	8,97	6,14	5,01
isotig06797	PREDICTED: Stegastes partitus carbonic anhydrase VA, mitochondrial (ca5a), transcript variant X4, mRNA	CA5A	9,22	6,05	7,61
isotig18415	PREDICTED: type-4 ice-structuring protein LS-12-like	AFP4	12,92	5,85	8,67
isotig17220	PREDICTED: patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 isoform X3	PNPLA2	10,33	5,29	6,62
isotig15044	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial-like	COX4I2	5,70	5,16	8,03
isotig03145	PREDICTED: Stegastes partitus ATP-binding cassette sub-family G member 2-like (LOC103363888), mRNA	ABCG2	4,95	4,78	8,25
isotig11122	Oplegnathus fasciatus klf9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11	KLF9	7,07	4,60	4,62
IFXFUR01EXMLJ	PREDICTED: Notothenia coriiceps arginase, non-hepatic 1-like (LOC104957428), partial mRNA	ARG2-A	8,92	4,33	6,55
isotig11565	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 1	IGFBP1	17,49	4,23	4,28
isotig08312	Arginase, non-hepatic 2	ARG2	7,72	3,98	6,22
isotig03245	PREDICTED: Stegastes partitus solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (slc40a1), transcript variant X1, mRNA	SLC40A1	16,69	3,65	3,82
isotig15329	PREDICTED: cartilage intermediate layer protein 2-like isoform X1	CILP2	8,95	3,40	4,65
isotig04060	PREDICTED: pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 2, mitochondrial-like	PK2	7,17	2,90	4,10

Tabla 4.6. Genes infraexpresados al menos 7 veces en el ayuno con respecto a alguna de las tres dietas estudiadas (HLL, MHL, LLH).

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de	Veces de	Veces de
			represión HLL	represión LLH	represión MHL
isotig04185	PREDICTED: mid1-interacting protein 1-B-like	MID1IP1	-209,97	-186,88	-120,37
isotig05622	PREDICTED: elongation of very long chain fatty acids protein 5	ELOVL5	-100,20	-44,26	-69,59
isotig19254	Epinephelus coioides complement C1q-like adipose specific protein mRNA, partial cds	ADIPOQ	-72,00	-32,45	-41,97
isotig16230	hepcidin, partial	HAMP	-58,55	-44,06	-65,52
isotig02762	PREDICTED: solute carrier family 25 member 48	SLC25A48	-31,74	-22,58	-25,84
isotig18360	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: type III iodothyronine deiodinase	DIO3	-26,33	-15,75	-44,67
isotig00925	PREDICTED: AP-1 complex subunit sigma-2 isoform X8	AP1S2	-26,10	-18,28	-21,30
isotig15896	PREDICTED: transketolase-like	TKTL1	-25,94	-8,38	-9,36
isotig05383	head-kidney alpha-type globin	hk_HBA	-25,70	-29,56	-29,07
isotig18695	RecName: Full=Hemoglobin subunit beta; AltName: Full=Beta-globin; AltName: Full=Hemoglobin beta chain	HBB	-25,51	-24,51	-26,55
isotig06523	PREDICTED: fibroblast growth factor 19	FGF19	-24,99	-22,86	-25,91
isotig11380	PREDICTED: Stegastes partitus acetyl-CoA carboxylase (LOC103370386), transcript variant X8, mRNA	ACC1-8	-24,03	-10,65	-3,26
isotig18044	PREDICTED: nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3-like	NMNAT3	-23,49	-21,61	-29,13
isotig03948	PREDICTED: NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial-like	ME3	-22,95	-13,69	-7,67

Resultados

isotig03925	PREDICTED: solute carrier family 41 member 1 isoform X2	SLC41A1	-22,43	-13,37	-24,44
isotig07703	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM	-21,58	-9,66	-16,52
isotig13108	PREDICTED: Notothenia coriiceps mammalian ependymin-related protein 1-like (LOC104965688), mRNA	EPDR1	-18,52	-12,66	-13,47
isotig12844	PREDICTED: Neolamprologus brichardi kinectin-like (LOC102780240), mRNA	KTN1	-17,13	-4,03	-6,92
isotig07427	PREDICTED: alpha-enolase isoform X2	ENO1	-16,78	-18,58	-12,27
isotig16133	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	ALDH3B1	-16,00	-10,27	-5,99
isotig17948	PREDICTED: retinol-binding protein 2 isoform X1	RBP2	-15,43	-11,64	-7,74
isotig17519	PREDICTED: protein EFR3 homolog B isoform X3	EFR3B	-15,22	-13,65	-15,16
isotig07590	PREDICTED: pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 2, mitochondrial-like isoform X2	PDK2	-15,22	-10,34	-11,17
isotig13935	PREDICTED: F-box only protein 2-like	FBXO2	-14,26	-7,92	-9,23
isotig01405	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: type II iodothyronine deiodinase	DIO2	-12,30	-13,75	-16,00
isotig15233	PREDICTED: abhydrolase domain-containing protein 2-A	ABHD2	-11,17	-10,33	-8,42
isotig06726	PREDICTED: angiopoietin-related protein 3	ANGPTL3	-11,10	-8,13	-8,59
IFXJFUR02HCZEH	Sparus aurata growth hormone receptor type I (GHR-I) gene, complete cds	GHR	-10,48	-5,70	-8,67
isotig15280	PREDICTED: Stegastes partitus prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (pmepa1), mRNA	PMPEA1	-10,30	-7,30	-10,65
isotig09597	PREDICTED: Stegastes partitus solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2 (slc7a2), transcript variant X2, mRNA	SLC7A2	-9,86	-5,41	-8,16
isotig06406	PREDICTED: beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase-like isoform X1	BCO2	-9,77	-7,46	-7,74
isotig05665	PREDICTED: acyl-CoA desaturase-like	SCD	-9,62	-4,28	-2,08
isotig01218	PREDICTED: cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-like	ALDH1L1	-8,35	-5,17	-5,32
IFXJFUR02HTEQB	Sparus aurata intestinal phospholipase A2 (int-PLA2) mRNA, complete cds	int-PLA2	-8,35	-8,59	-8,10
isotig17817	PREDICTED: Notothenia coriiceps GSK-3-binding protein-like (LOC104951239), mRNA	FRAT2	-8,13	-8,13	-9,35
isotig11042	PREDICTED: acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic isoform X2	ACSS2	-8,06	-2,75	-3,31
isotig08117	PREDICTED: reticulon-1-A-like isoform X4	RTN1	-7,99	-7,74	-8,14
isotig06373	Krueppel-like factor 10	KLF10	-7,75	-15,43	-13,37
isotig09167	PREDICTED: adenosine deaminase isoform X1	ADA	-7,72	-3,98	-4,08
isotig15307	PREDICTED: ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial-like isoform X2	ATP5J	-7,61	-8,15	-8,97
isotig14872	Cytidine deaminase	CDA	-7,12	-5,89	-4,66
isotig13901	PREDICTED: Notothenia coriiceps Kruppel-like factor 13 (klf13), mRNA	KLF13	-6,39	-4,78	-7,16
isotig07674	PREDICTED: glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like	GCDH	-5,68	-9,18	-8,44
isotig08286	PREDICTED: nef-associated protein 1-like	TRMO	-5,49	-7,12	-7,17
isotig03855	PREDICTED: sushi domain-containing protein 2 isoform X2	SUSD2	-5,41	-8,59	-7,10
isotig04748	Pagrus major ACTC gene for cardiac muscle alpha actin, complete cds	ACTC1	-5,33	-8,11	-5,10
isotig03227	PREDICTED: Maylandia zebra nicotinamide riboside kinase 2-like (LOC101477481), transcript variant X1, mRNA	NMRK2	-5,29	-13,26	-4,73
isotig04749	PREDICTED: pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor A-like	PPDPF	-5,23	-9,83	-6,84
isotig06504	PREDICTED: galectin-3-binding protein	LGALS3BP	-4,82	-7,24	-10,80
isotig08447	PREDICTED: thioredoxin-interacting protein-like	TXNIP	-3,95	-12,48	-11,17
isotig03869	Histone H1	HIS1	-3,92	-4,86	-8,97
isotig10454	heme oxygenase 1	HMOX1	-2,55	-8,39	-4,10

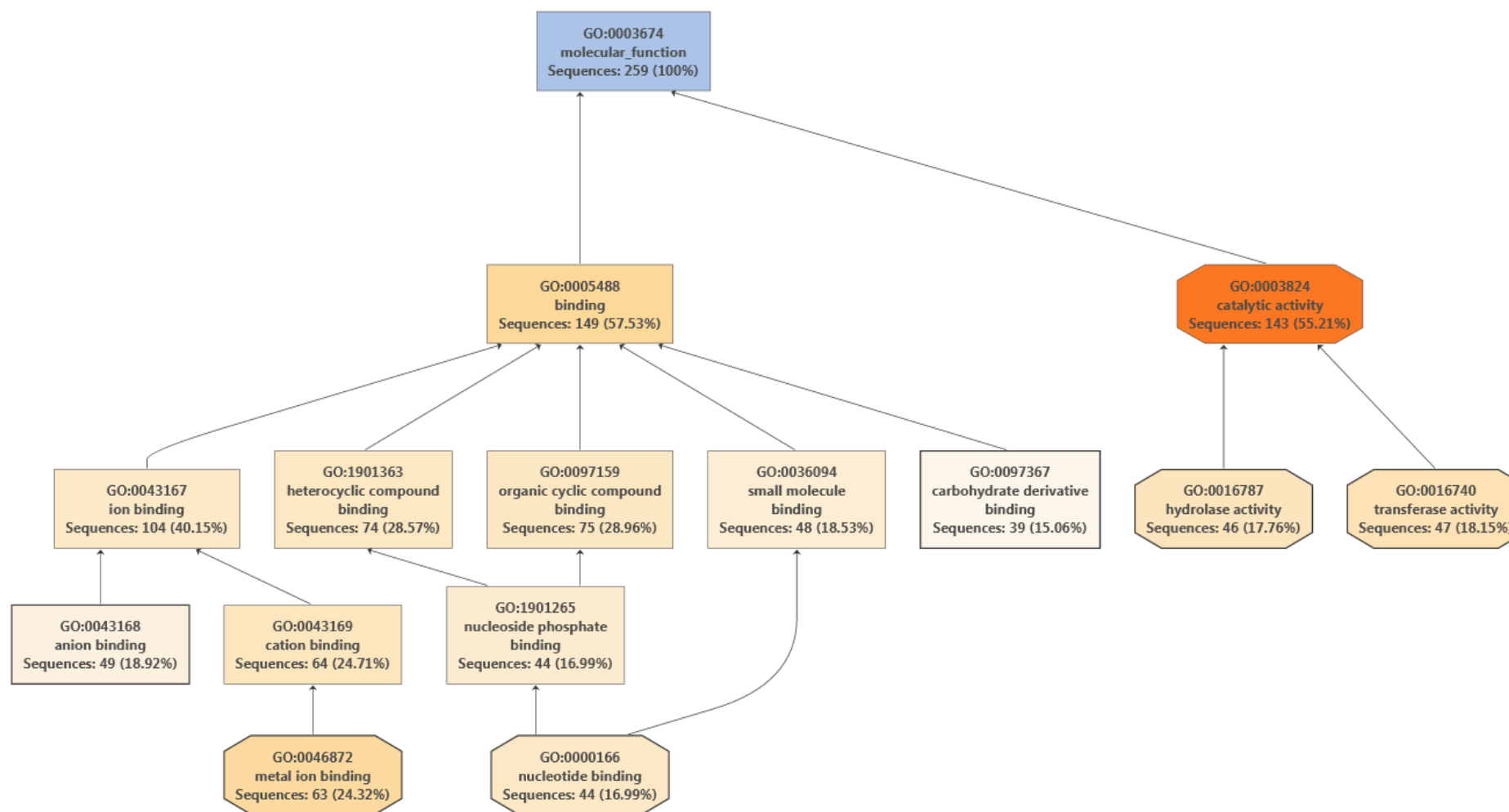


Figura 4.9. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a Funciones Moleculares que se encuentran infraexpresados en condición de ayuno con al menos 39 anotaciones en el ayuno respecto a peces alimentados.

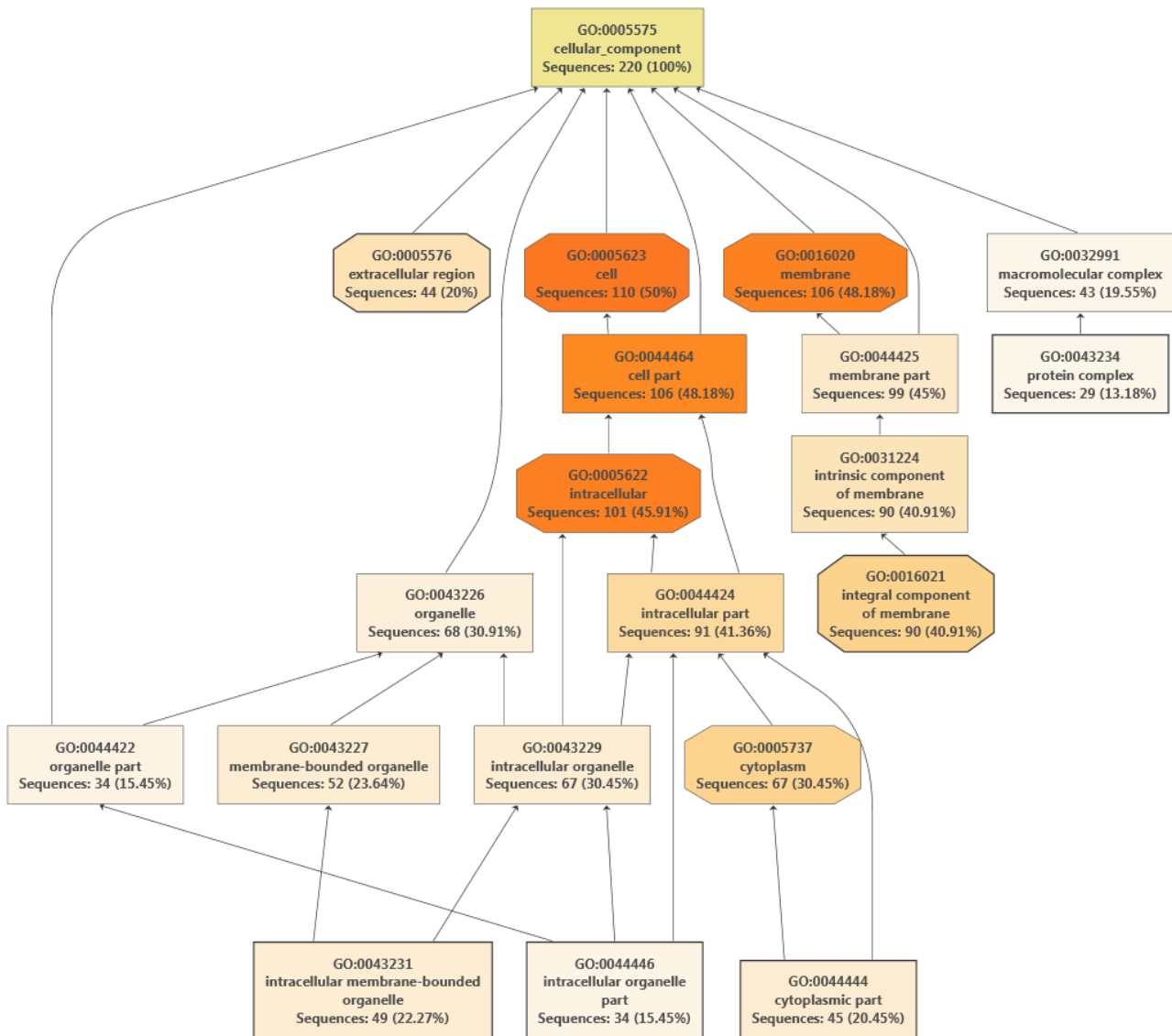


Figura 4.10. Gráfico representativo de los términos GO con genes asociados a Componentes Celulares que se encuentran infraexpresados en condición de ayuno con al menos 29 anotaciones en el ayuno respecto a peces alimentados.

En relación a las funciones relacionadas con componentes celulares podemos apreciar diferencias entre los genes infraexpresados (Figura 4.10) con respecto a los genes sobreexpresados (Figura 4.11) en situación de ayuno. Aunque a grandes rasgos el patrón de términos GO representados pareciera ser similar, podemos apreciar que en los genes sobreexpresados se encuentran los términos *complejo catalítico* como parte de *complejos macromoleculares* y en especial el término referente a núcleo como parte de *organelos con membranas intracelulares*, los cuales no se aprecian en los genes infraexpresados.

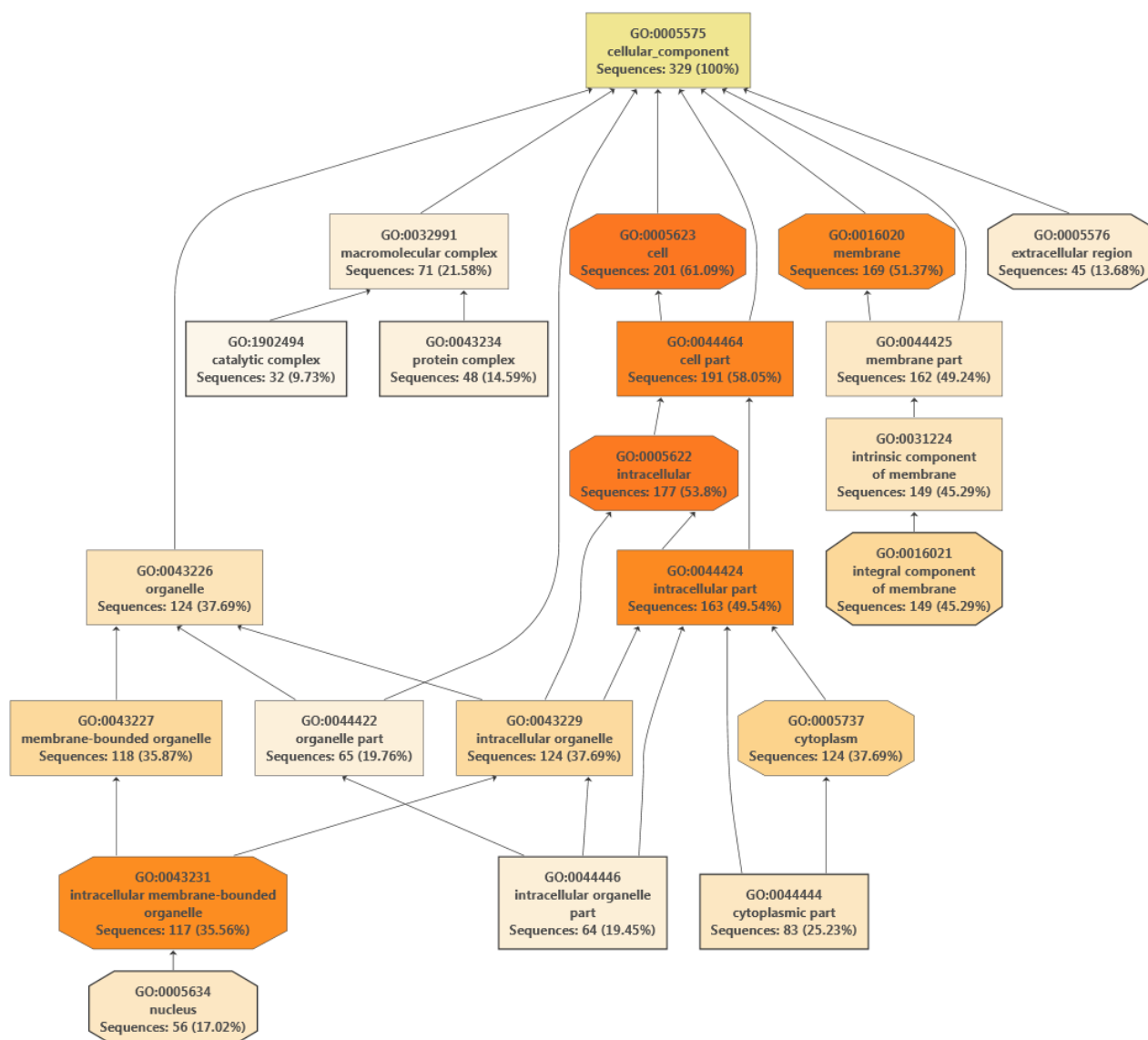


Figura 4.11. Gráfico representativo de los términos GO con genes asociados a Componentes Celulares que se encuentran sobreexpresados en condición de ayuno con al menos 29 anotaciones en el ayuno respecto a peces alimentados.

4.3.2.2 Análisis por *microarrays* de la expresión diferencial de genes en hígado de peces alimentados con las dietas HLL y LLH

Las dietas HLL y LLH son las dos más extremas en cuanto a la composición de macronutrientes, ya que en la LLH las proteínas se encuentran parcialmente sustituidas por carbohidratos en el aporte energético de la dieta. Por esta razón la comparación de la expresión génica entre los peces alimentados con estas dos dietas es relevante para entender la regulación nutricional del metabolismo intermediario en el hígado de dorada. En la tabla 4.7 se muestran los genes con al menos dos veces de sobreexpresión en hígado de doradas alimentadas con la dieta LLH con respecto a la alimentación con la dieta HLL. En la tabla 4.8 se muestran los genes infraexpresados en esta misma comparación. Podemos apreciar que el gen que muestra mayor sobreexpresión es un transportador que actúa a nivel mitocondrial (*solute carrier family 25 member 36-A-like*, SLC25A36) que entre otras funciones permite mantener el genoma mitocondrial y el potencial de membrana, seguido de un oncogen (*pim-2 oncogene*, PIM2) que actúa en el ciclo celular. Cabe resaltar que además de transportadores y reguladores del ciclo celular encontramos funciones relacionadas con la respuesta a estrés y apoptosis (*Growth/differentiation factor 15*, GDF15; *acidic mammalian chitinase-like*, CHIA; *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD isoform X2*, PYCARD; *acidic mammalian chitinase-like isoform X2*, CHIA2; *endocytosis alpha-2-HS-glycoprotein*, AHSG) y en la degradación de lípidos (*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2*, PNPLA2; *group XV phospholipase A2-like*, PLA2G15).

Por otro lado, las 5 primeras anotaciones que presentan mayor infraexpresión están relacionadas con la síntesis de lípidos y colesterol. Estas funciones son las más representativas de esta comparación, con 10 anotaciones (*major facilitator superfamily domain-containing protein 2a*, MFSD2A; *Farnesyl pyrophosphate Synthase*, FDPS; *diphosphomevalonate decarboxylase*, MVD; *acyl-CoA desaturase isoform X1*, SCD; *squalene synthase isoform X1*, FDFT1; *elongation of very long chain fatty acids protein 6*, ELOVL6; *lipocalin-like*, LCNL1; *acetyl-coenzyme A synthetase cytoplasmic isoform X2*, ACSS2; *long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2 isoform X2*, ACSBG2; *Acetyl CoA Carboxilase variant 2*, ACC1tv2), seguido de funciones relacionadas con la replicación y mantenimiento del DNA, con 7 anotaciones (*minichromosome maintenance complex component 6*, MCM6; *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA; *ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit*, RRM1; *DNA primase small subunit*, PRIM1; *flap endonuclease 1 isoform X1*, FEN1; *CTP synthase 1*, CTPS1; *origin recognition complex subunit 2-like isoform X3*, ORC2).

Tabla 4.7. Genes sobreexpresados al menos 2 veces en los peces alimentados con la dieta LLH con respecto a peces alimentados con la dieta HLL.

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de inducción
isotig07662	PREDICTED: Larimichthys crocea solute carrier family 25 member 36-A-like (LOC104920982), mRNA	SLC25A36	10,02
isotig19168	PREDICTED: Stegastes partitus pim-2 oncogene (pim2), mRNA	PIM2	9,15
isotig12081	PREDICTED: calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	SLC25A12	8,08
isotig15415	Growth/differentiation factor 15	GDF15	5,32
isotig03245	PREDICTED: Stegastes partitus solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (slc40a1), transcript variant X1, mRNA	SLC40A1	4,56
isotig00512	PREDICTED: alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	4,35
isotig11565	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 1	IGFBP1	4,13
isotig07346	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	PNPLA2	4,09
IFXJFUR02FMQH5	ileal fatty acid-binding protein	FABP6	3,88
isotig10454	heme oxygenase 1	HMOX1	3,29
isotig05360	C-lectin-B	CLEC1B	3,18
isotig16829	parvalbumin	PVALB	3,10
IFXJFUR02IL5RL	PREDICTED: group XV phospholipase A2-like	PLA2G15	3,05
isotig13382	PREDICTED: cGMP-dependent protein kinase 2-like	PRKG2	3,04
isotig09819	PREDICTED: E3 SUMO-protein ligase CBX4-like	CBX4	3,02
isotig03991	PREDICTED: acidic mammalian chitinase-like	CHIA	2,78
isotig04310	PREDICTED: exportin-1 isoform X1	XPO1	2,76
isotig11896	PREDICTED: Notothenia coriiceps ubiquitin specific peptidase 18 (usp18), mRNA	USP18	2,68
isotig08986	Low density lipoprotein receptor adapter protein 1-B	LDLRAP1	2,64
isotig17587	PREDICTED: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD isoform X2	PYCARD	2,60
isotig03990	PREDICTED: acidic mammalian chitinase-like isoform X2	CHIA2	2,52
isotig02830	PREDICTED: Neolamprologus brichardi prospero homeobox protein 1-like (LOC102799600), transcript variant X2, mRNA	PROX1	2,49
isotig07693	PREDICTED: zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1 isoform X1	ZZEF1	2,47
isotig04060	PREDICTED: pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 2, mitochondrial-like	PK2	2,47
isotig00582	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	TRIM21	2,45
isotig13936	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glutathione peroxidase 3-like, partial	GPX3	2,43
isotig06021	PREDICTED: Stegastes partitus solute carrier family 9, subfamily A (NHE7, cation proton antiporter 7), member 7 (slc9a7), mRNA	SLC9A7	2,14
IFXJFUR02JOTPL	PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein	HSC70	2,10
isotig00574	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39-like	TRIM39	2,09
isotig14839	PREDICTED: stimulated by retinoic acid gene 6 protein homolog	STRA6	2,07
isotig06315	PREDICTED: Stegastes partitus RAB4B, member RAS oncogene family (rab4b), transcript variant X2, mRNA	RAB4B	2,02

Tabla 4.8. Genes infraexpresados al menos 2 veces en los peces alimentados con la dieta LLH con respecto a peces alimentados con la dieta HLL.

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de represión
isotig06565	PREDICTED: major facilitator superfamily domain-containing protein 2A	MFSD2A	-13,18
isotig07443	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	-6,76
isotig07708	PREDICTED: diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	-4,35
isotig06385	PREDICTED: acyl-CoA desaturase isoform X1	SCD	-4,31
isotig06337	PREDICTED: squalene synthase isoform X1	FDFT1	-4,19
IFXFUR01CIE00	PREDICTED: Larimichthys crocea minichromosome maintenance complex component 6 (mcm6), transcript variant X1, mRNA	MCM6	-3,63
isotig07303	PREDICTED: elongation of very long chain fatty acids protein 6	ELOVL6	-3,25
isotig14458	PREDICTED: lipocalin-like	LCNL1	-3,25
isotig12296	PREDICTED: Larimichthys crocea KIAA1324 ortholog (kiaa1324), mRNA	KIAA1324	-3,11
isotig09919	PREDICTED: proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-3,01
isotig11042	PREDICTED: acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic isoform X2	ACSS2	-2,94
isotig10507	PREDICTED: ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	RRM1	-2,81
isotig10241	PREDICTED: DNA primase small subunit	PRIM1	-2,79
isotig07025	PREDICTED: glutaminase liver isoform, mitochondrial	GLS2	-2,63
isotig07826	PREDICTED: succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial isoform X1	OXCT1	-2,62
isotig08215	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	MAT1A	-2,54
isotig15260	PREDICTED: Notothenia coriiceps protein spire homolog 1-like (LOC104967053), transcript variant X4, mRNA	SPIRE1	-2,45
isotig03562	PREDICTED: long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2 isoform X2	ACSBG2	-2,41
isotig16772	PREDICTED: Larimichthys crocea mitogen-activated protein kinase 15 (mapk15), transcript variant X2, mRNA	MAPK15	-2,30
isotig06613	PREDICTED: mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	ALDH1L2	-2,29
isotig17610	PREDICTED: Larimichthys crocea leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (letm1), mRNA	LETM1	-2,29
isotig17181	PREDICTED: Stegastes partitus retinoblastoma binding protein 6 (rbbp6), transcript variant X5, mRNA	RBBP6	-2,27
isotig11725	PREDICTED: Larimichthys crocea abhydrolase domain containing 11 (abhd11), mRNA	ABHD11	-2,25
isotig14383	PREDICTED: flap endonuclease 1 isoform X1	FEN1	-2,22
isotig16347	PREDICTED: Poecilia mexicana metal transporter CNNM4-like (LOC106904269), transcript variant X2, mRNA	CNNM4	-2,17
isotig19368	PREDICTED: Larimichthys crocea lysosome membrane protein 2-like (LOC104918998), transcript variant X2, mRNA	SCARB2	-2,17
isotig06729	cytosolic alanine aminotransferase	cALT	-2,11
isotig10548	PREDICTED: CTP synthase 1	CTPS1	-2,11
isotig06967	PREDICTED: forkhead box protein O3-like	FOXO3	-2,10
isotig14264	PREDICTED: Larimichthys crocea dedicator of cytokinesis protein 7-like (LOC104918680), transcript variant X3, mRNA	DOCK7	-2,08
ACC1tv2	Acetil CoA Carboxilasa Variante 2	ACC1tv2	-2,08
isotig14979	PREDICTED: origin recognition complex subunit 2-like isoform X3	ORC2	-2,05
cALT2	Alanina aminotransferasa citosólica 2	cALT2	-2,05
isotig15115	PREDICTED: Stegastes partitus period circadian protein homolog 2-like (LOC103366709), transcript variant X10, mRNA	PER2	-2,03
cALT1	Alanina aminotransferasa citosólica 1	cALT1	-2,03

Mediante las figuras 4.12 y 4.13 comparamos la representatividad de términos GO en procesos biológicos de genes infraexpresados y sobreexpresados en el hígado de los peces tras la ingesta con la dieta LLH (alta en carbohidratos) con respecto a la HLL (alta en proteínas). La diferencia más notable que podemos establecer entre estas dos comparaciones es que entre los genes infraexpresados cuando la dieta es LLH hay una elevada representatividad de *procesos biosintéticos* (con un 65% de representación) mientras que en los genes sobreexpresados no aparece representado este término, pero sí el término *procesos metabólicos de proteínas*, como parte de *procesos metabólicos macromoleculares* y *procesos metabólicos primarios*.

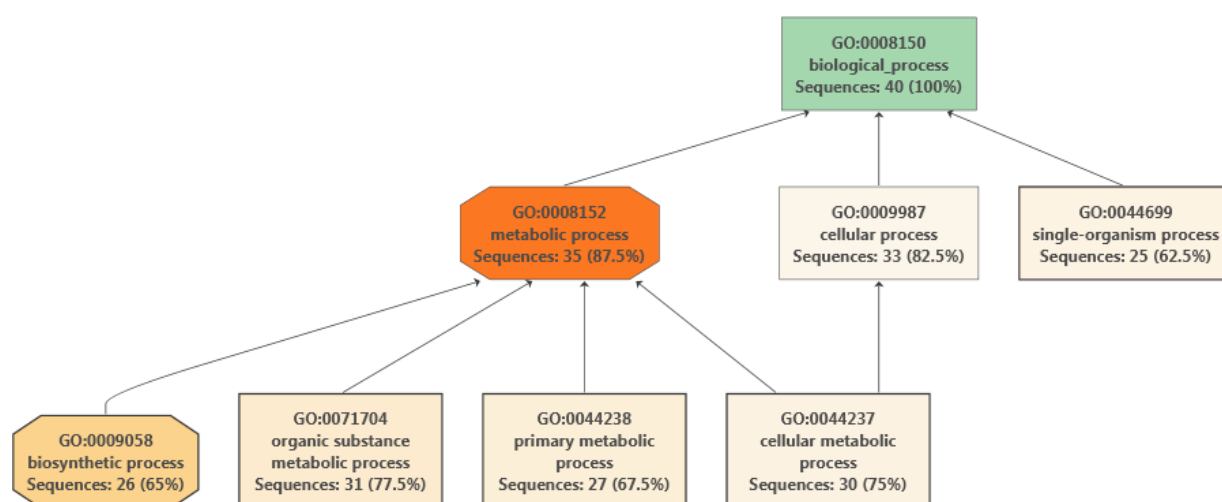


Figura 4.12. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a procesos biológicos que se encuentran infraexpresados con al menos 25 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

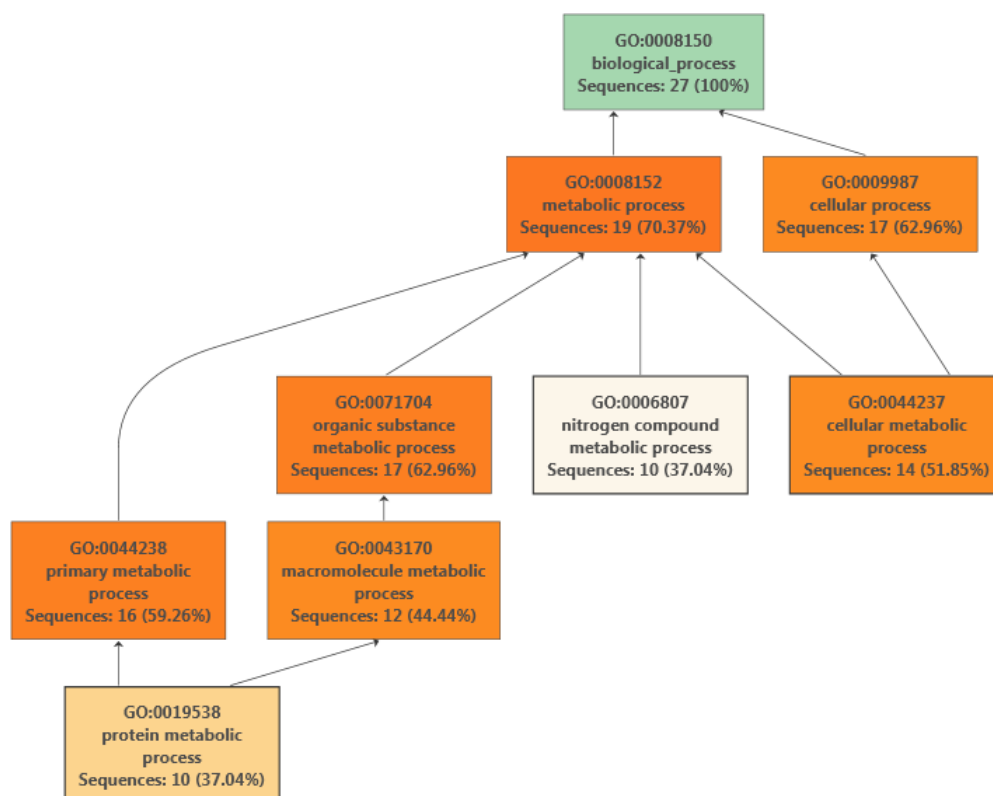


Figura 4.13. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a procesos biológicos que se encuentran sobreexpresados con al menos 10 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

Las funciones moleculares de genes con menor expresión en peces alimentados con la dieta LLH respecto a los que se les suministró la dieta HLL se muestran en la figura 4.14. Destaca la presencia abundante de términos relacionados con la *unión a ácidos nucleicos*, lo que podría estar relacionado con una mayor representación de anotaciones asociadas con la reparación y mantenimiento del DNA. Aún cuando en los genes sobreexpresados (figura 4.15) se observa similar composición de los términos *actividad catalítica* y *unión* a la observada en los genes de menor expresión, destaca la aparición de los términos *componentes estructurales de ribosoma* y *actividad hidrolasa*.

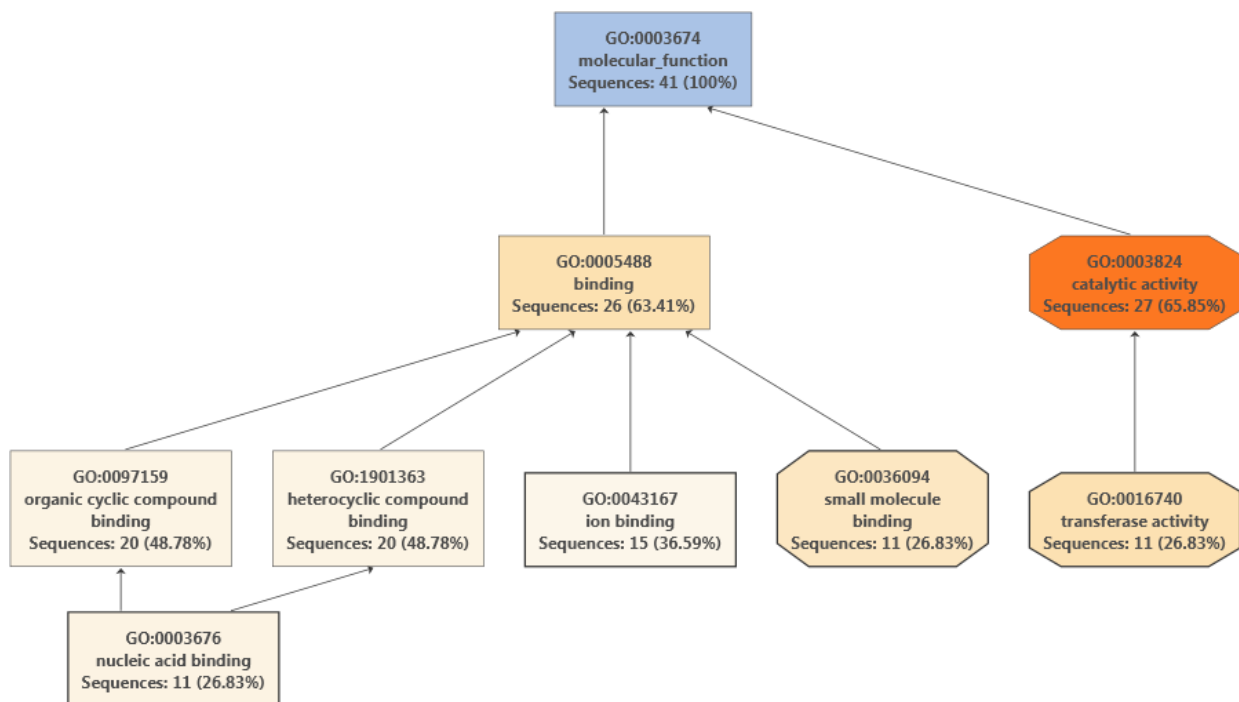


Figura 4.14. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a funciones moleculares que se encuentran infraexpresados con al menos 11 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

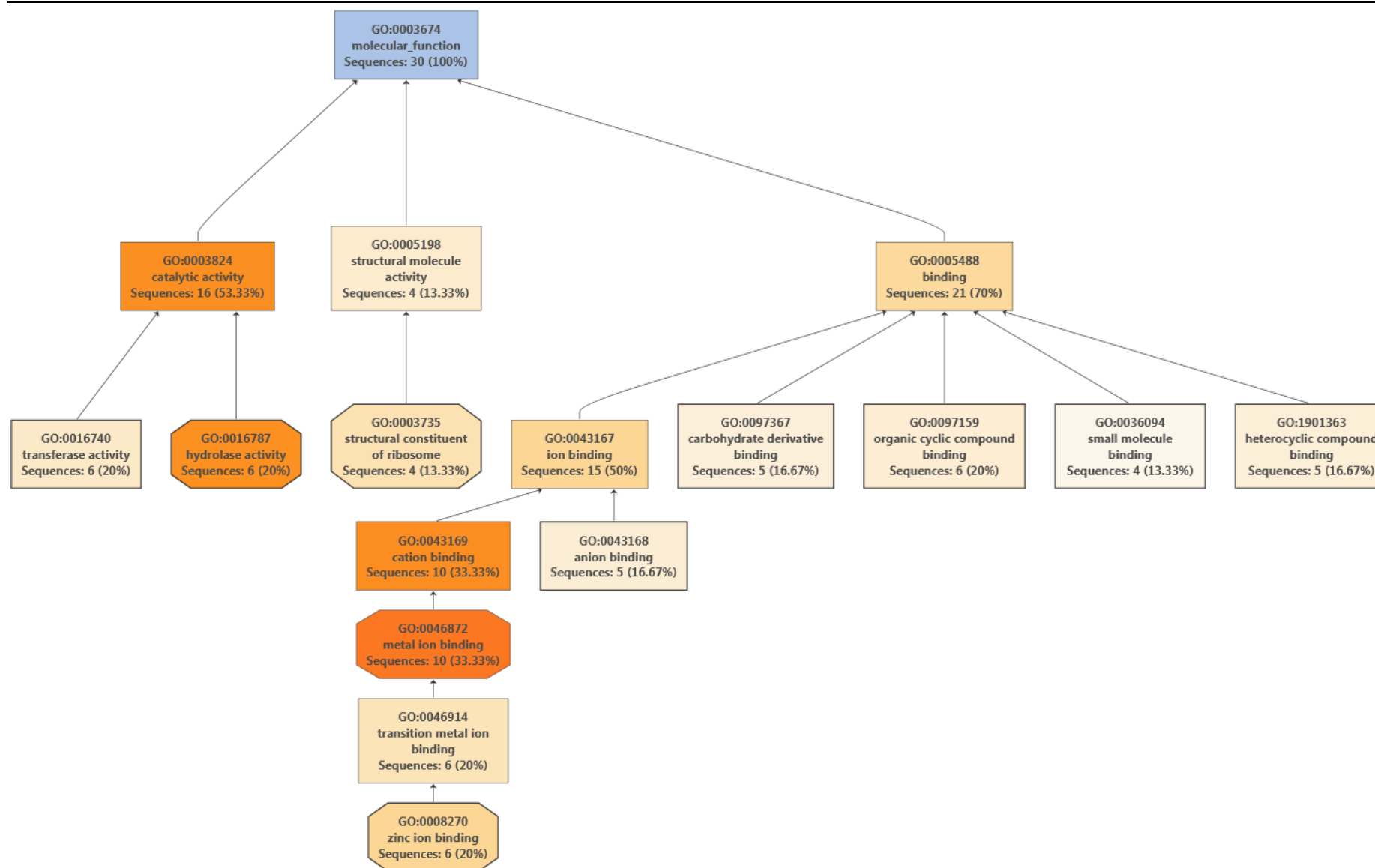


Figura 4.15. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a funciones moleculares que se encuentran sobreexpresados con al menos 4 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

El último aspecto relevante en la comparación de estas dos dietas es el análisis GO de componentes celulares que se muestra en las figuras 4.16 y 4.17 para genes infraexpresados y sobreexpresados respectivamente. Aún cuando la mayor parte de los genes relacionados con esta función no alteran su patrón de expresión, destaca la presencia del término *núcleo* en los genes con menor expresión en los peces alimentados con la dieta LLH mientras que para los genes con alta expresión tras la ingesta con esta dieta son relevantes los términos *región extracelular* y *citoplasma*.

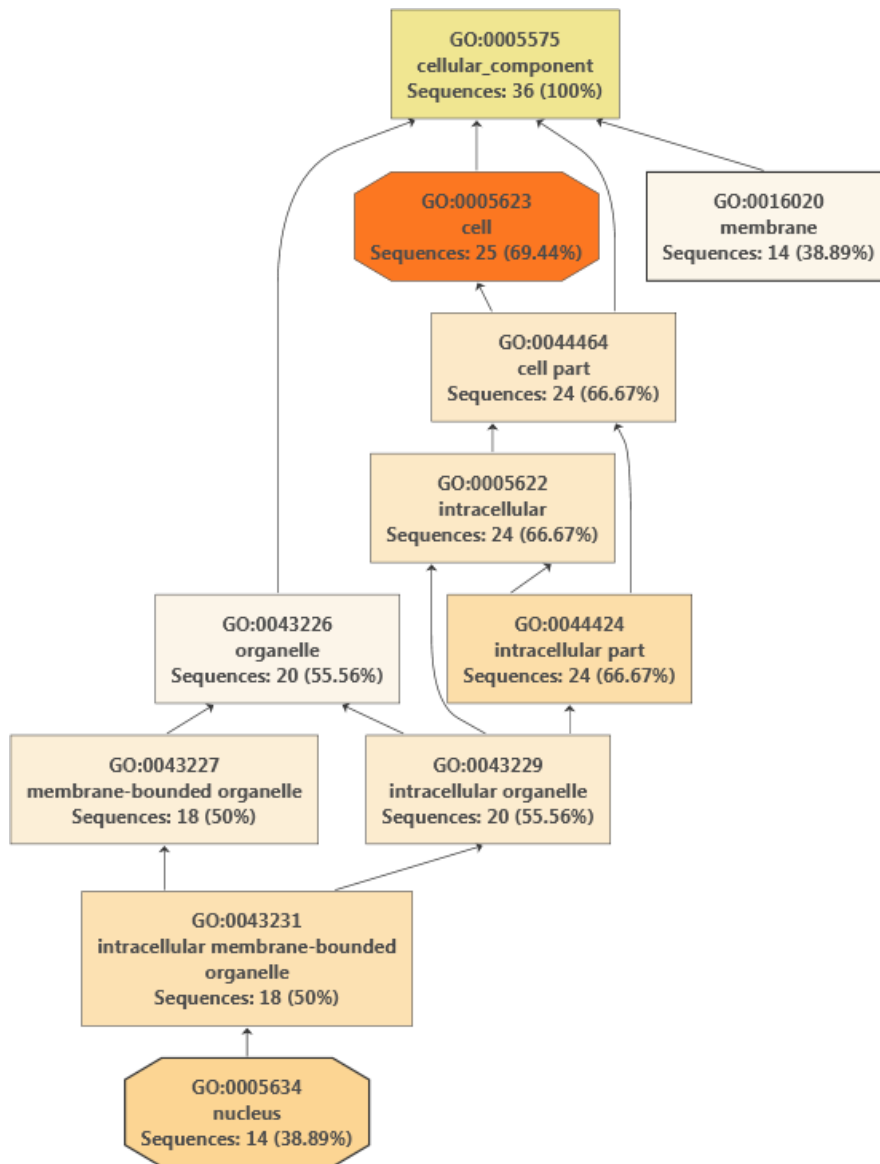


Figura 4.16. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a componentes celulares que se encuentran infraexpresados con al menos 14 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

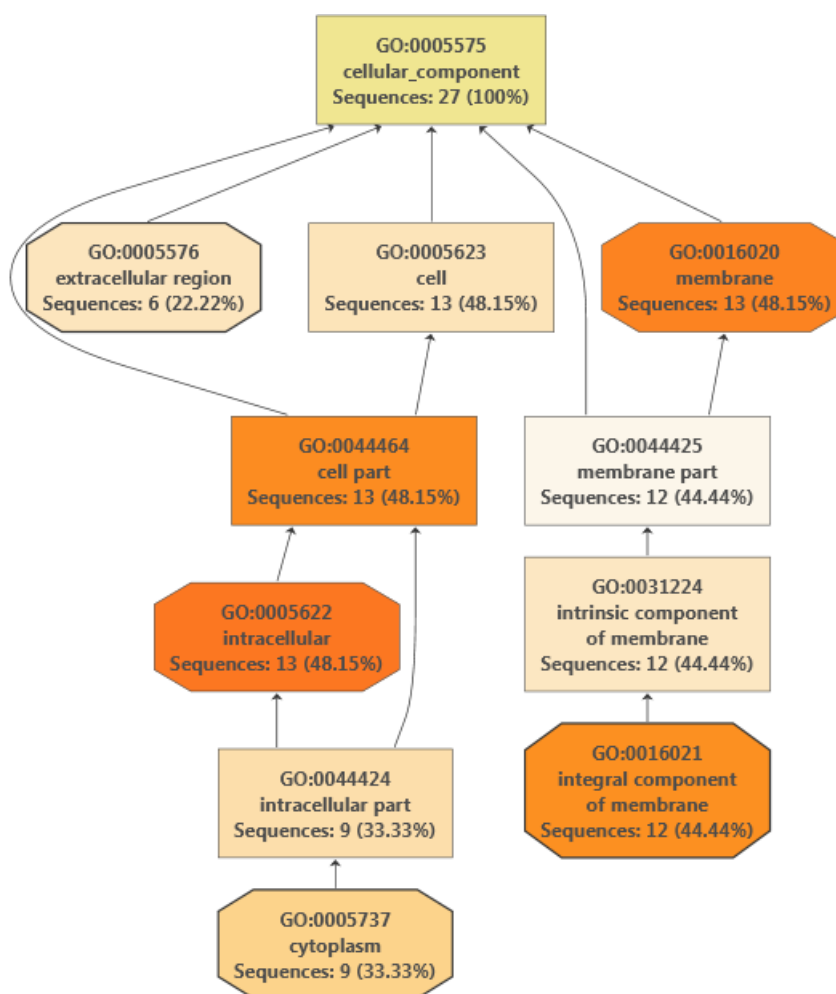


Figura 4.17. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a componentes celulares que se encuentran sobreexpresados con al menos 6 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta LLH respecto a la dieta HLL.

4.3.2.3 Análisis por *microarrays* de la expresión diferencial de genes en hígado de peces alimentados con las dietas HLL y MHL

La dieta HLL tiene una composición de macronutrientes similar a la que consume la dorada en su medio natural, mientras que la de MHL se asemeja a la de las dietas comerciales actuales. Así, la comparación de estas dos dietas puede ayudar a comprender las diferencias en la expresión génica, que a su vez podría ser de utilidad en la producción en acuicultura.

En la tabla 4.9 se muestran los genes sobreexpresados al menos 2 veces en el hígado de los peces alimentados con la dieta MHL con respecto a la HLL. A diferencia de las comparaciones con la dieta LLH (con menor cantidad de proteínas y mayor cantidad de carbohidratos), se observa una menor cantidad de genes con expresión diferencial. Al igual que para la dieta LLH, PIM2 está fuertemente sobreexpresado. Además, se observan varios genes relacionados con el ciclo celular, la

proliferación y supervivencia celular (*insulin-like growth factor-binding protein 1*, IGFBP1; *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4-like isoform X3*, DYRK4; *exportin-1 isoform X1*, XPO1; *filamin-A-interacting protein 1-like*, FILIP1L). También hay elevada representación de genes relacionados con procesos inflamatorios y respuesta inmune (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12-like, partial*, NLRP12; *insulin-like growth factor-binding protein 1*, IGFBP1; *ubiquitin specific peptidase 18*, USP18; *CD9 antigen-like isoform X2*, CD9; *T-cell-specific surface glycoprotein CD28*, CD28; *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (LOC100693633) transcript variant X2*, PYCARD; *complement component C3*, C3; *beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 7*, GCNT7). En la figura 4.18 se muestran los términos GO para procesos biológicos de genes sobreexpresados en hígado de peces alimentados con la dieta MHL, observándose que los términos *procesos celulares* y *regulación biológica* son los dos más representativos en número de secuencias, destacando la presencia del término *procesos metabólicos de proteínas*.

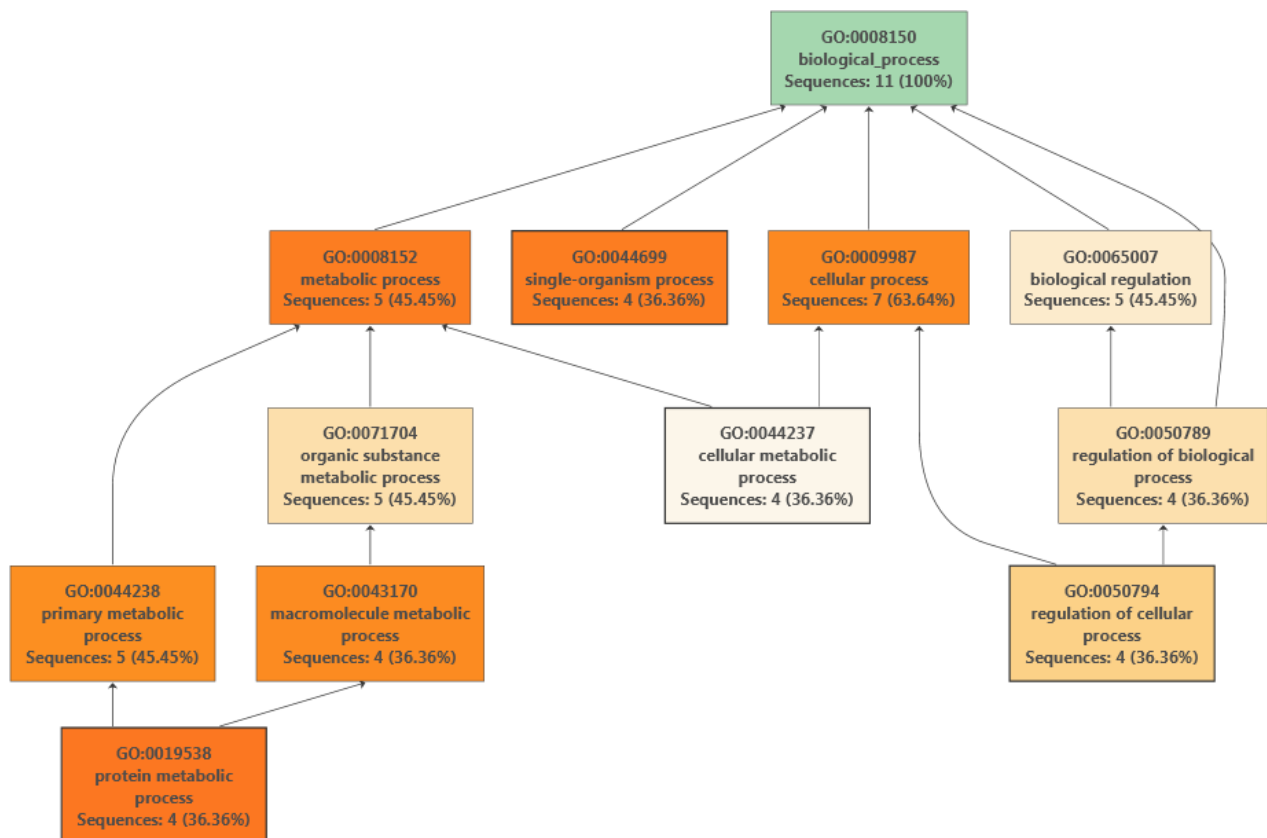


Figura 4.18. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a procesos biológicos que se encuentran sobreexpresados con al menos 4 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta MHL respecto a la dieta HLL.

Tabla 4.9. Genes sobreexpresados al menos 2 veces en hígado de peces alimentados con la dieta MHL con respecto a peces alimentados con la dieta HLL.

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de inducción
isotig04444	PREDICTED: reticulocalbin-3 isoform X2	RCN3	13,78
isotig19168	PREDICTED: Stegastes partitus pim-2 oncogene (pim2), mRNA	PIM2	5,39
isotig15582	PREDICTED: tetranectin-like	CLEC3B	5,01
isotig01027	PREDICTED: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12-like, partial	NLRP12	4,77
isotig03245	PREDICTED: Stegastes partitus solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (slc40a1), transcript variant X1, mRNA	SLC40A1	4,37
isotig11565	PREDICTED: insulin-like growth factor-binding protein 1	IGFBP1	4,10
isotig06536	PREDICTED: dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4-like isoform X3	DYRK4	4,07
isotig09663	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized oxidoreductase YjmC-like	YjmC	3,52
isotig02531	PREDICTED: Poecilia reticulata ATP-binding cassette sub-family C member 9 (LOC103460789), transcript variant X5, misc_RNA	ABCC9	2,97
isotig11896	PREDICTED: Notothenia coriiceps ubiquitin specific peptidase 18 (usp18), mRNA	USP18	2,68
isotig04310	PREDICTED: exportin-1 isoform X1	XPO1	2,62
isotig04132	PREDICTED: CD9 antigen-like isoform X2	CD9	2,52
isotig06794	T-cell-specific surface glycoprotein CD28	CD28	2,48
isotig03868	Histone H1	HIS1	2,46
isotig09819	PREDICTED: E3 SUMO-protein ligase CBX4-like	CBX4	2,45
isotig02389	PREDICTED: Oreochromis niloticus apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (LOC100693633), transcript variant X2, mRNA	PYCARD	2,36
isotig10437	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: histone H1.0-B	H1F0-b	2,36
isotig01097	complement component C3	C3	2,32
isotig09149	PREDICTED: Poecilia reticulata regulator of G-protein signaling 3 (rgs3), transcript variant X10, mRNA	RGS3	2,28
isotig05713	PREDICTED: transmembrane protein 205-like	TMEM205	2,25
isotig13936	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glutathione peroxidase 3-like, partial	GPX3	2,13
isotig15153	PREDICTED: beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 7	GCNT7	2,13
isotig12666	PREDICTED: Larimichthys crocea dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 (dhrs9), mRNA	DHRS9	2,08
isotig01764	PREDICTED: filamin-A-interacting protein 1-like	FILIP1L	2,05
isotig07959	PREDICTED: flavin reductase (NADPH)-like	BLVRB	2,02

Tabla 4.10. Genes infraexpresados al menos 2 veces en el hígado de peces alimentados con la dieta MHL con respecto a peces alimentados con la dieta HLL.

Nombre Sistemático	Anotación	Gen	Veces de represión
isotig07443	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	-15,48
isotig11300	PREDICTED: lanosterol synthase	LSS	-13,49
isotig07099	PREDICTED: lanosterol 14-alpha demethylase	CYP51A1	-9,68

Resultados

isotig04450	PREDICTED: isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1-like isoform X1	IDI1	-9,49
isotig06337	PREDICTED: squalene synthase isoform X1	FDFT1	-9,09
isotig07708	PREDICTED: diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	-7,62
isotig11380	PREDICTED: Stegastes partitus acetyl-CoA carboxylase (LOC103370386), transcript variant X8, mRNA	ACC1-8	-7,36
isotig04541	PREDICTED: Stegastes partitus ATP-citrate synthase-like (LOC103373140), mRNA	ACLY	-7,22
isotig08385	PREDICTED: squalene monooxygenase	SQLE	-7,17
isotig04540	ATP citrate lyase, isoform CRA_c	ACLY	-7,07
isotig07819	PREDICTED: methylsterol monooxygenase 1	MSMO1	-6,69
isotig03339	Siniperca chuatsi 7-dehydrocholesterol reductase (Dhcr7) mRNA, partial cds	DHCR7	-6,64
isotig07134	PREDICTED: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic-like isoform X1	HMGCS1	-6,28
isotig10167	PREDICTED: Larimichthys crocea fatty acid synthase (fasn), transcript variant X2, mRNA	FASN	-5,76
isotig15002	Retinol dehydrogenase 12	RDH12	-5,18
isotig05665	PREDICTED: acyl-CoA desaturase-like	SCD	-4,66
isotig05934	PREDICTED: lathosterol oxidase	SC5D	-4,30
isotig10506	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like	ACAT2	-3,75
isotig02324	Sparus aurata phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) mRNA, complete cds	PEMT	-3,69
IFXJFUR02F6HX2	PREDICTED: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	HMGCR	-3,44
isotig07303	PREDICTED: elongation of very long chain fatty acids protein 6	ELOVL6	-3,24
isotig13300	PREDICTED: probable ergosterol biosynthetic protein 28-like isoform X1	ERG28	-2,96
isotig12296	PREDICTED: Larimichthys crocea KIAA1324 ortholog (kiaa1324), mRNA	KIAA1324	-2,85
isotig05810	PREDICTED: Stegastes partitus chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (cxcl12), transcript variant X2, mRNA	CXCL12	-2,75
ACC1tv2	ACC1tv2	ACC1tv2	-2,66
isotig09919	PREDICTED: proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-2,57
isotig01930	PREDICTED: Stegastes partitus amino adipate-semialdehyde synthase (aass), transcript variant X2, mRNA	AASS	-2,47
isotig10241	PREDICTED: DNA primase small subunit	PRIM1	-2,40
isotig03562	PREDICTED: long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2 isoform X2	ACSBG2	-2,29
isotig09506	PREDICTED: calumenin	CALU	-2,26
isotig07025	PREDICTED: glutaminase liver isoform, mitochondrial	GLS2	-2,25
isotig08215	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	MAT1A	-2,23
isotig02770	PREDICTED: 45 kDa calcium-binding protein isoform X1	SDF4	-2,22
isotig14383	PREDICTED: flap endonuclease 1 isoform X1	FEN1	-2,20
isotig06327	PREDICTED: delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial-like	ALDH4A1	-2,18
isotig12369	PREDICTED: Larimichthys crocea phosphatidylserine decarboxylase (pisd), transcript variant X3, mRNA	PISD	-2,16
IFXJFUR02FPEWR	PREDICTED: cystathionine gamma-lyase	CTH	-2,11
isotig10548	PREDICTED: CTP synthase 1	CTPS1	-2,05
isotig05146	PREDICTED: replication factor C subunit 2	RFC2	-2,04
isotig14979	PREDICTED: origin recognition complex subunit 2-like isoform X3	ORC2	-2,02

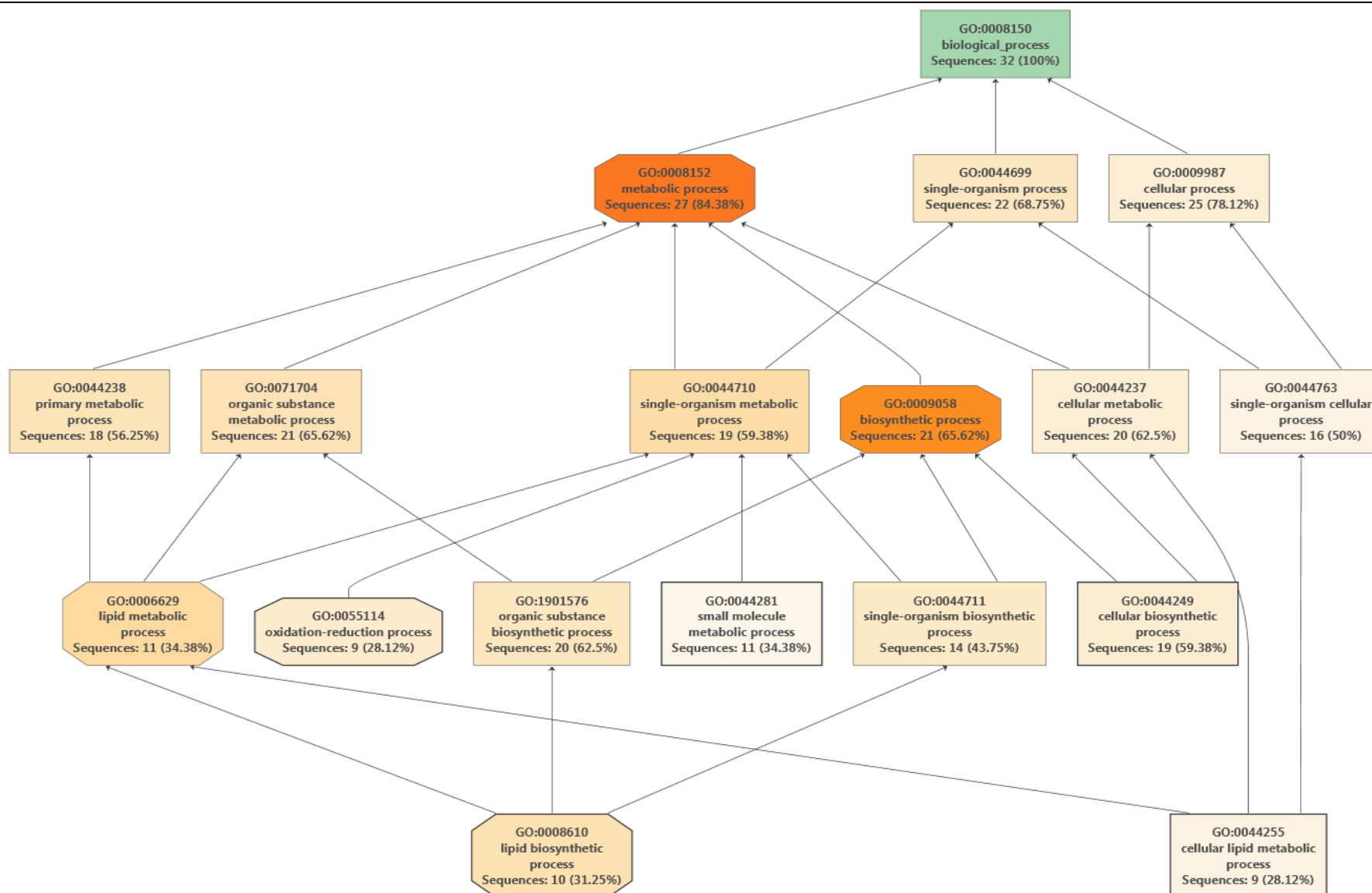


Figura 4.19. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a procesos biológicos que se encuentran infraexpresados con al menos 4 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta MHL respecto a la dieta HLL.

Los genes con menor expresión en hígado de las doradas alimentadas con la dieta MHL con respecto a la dieta HLL se muestran en la tabla 4.10. Se observa que la mayoría de los genes en esta lista están relacionados con la síntesis de lípidos y colesterol, ya que los 22 primeros *isotigs* (a excepción del gen *Retinol dehydrogenase 12*, RDH12, relacionado con la absorción de vitaminas liposolubles) están involucrados en estos procesos, incluyendo entre otros ACC1tv2, *long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2 isoform X2* (ACSBG2) y *phosphatidylserine decarboxylase (psd), transcript variant X3* (PISD). La figura 4.19 muestra los términos GO de procesos biológicos para todos los genes infraexpresados en esta comparación; se aprecia la presencia de los términos *proceso biosintético de lípidos* y *procesos metabólicos de lípidos celulares* como parte de *procesos metabólicos de lípidos*, con 11 secuencias que representan un 34,38 % del total.

Como en la comparación entre la dieta LLH y la dieta HLL, la dieta MHL presenta la replicación y reparación del DNA, con 6 secuencias (*proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), *DNA primase small subunit* (PRIM1), *flap endonuclease 1 isoform X1* (FEN1), *CTP synthase 1* (CTPS1), *replication factor C subunit 2* (RFC2), *origin recognition complex subunit 2-like isoform X3* (ORC2)), como segundo proceso más representado. En la figura 4.20 se observa que el término GO de funciones moleculares de *unión a compuestos heterocíclicos* (dentro del cual está representado el término *unión al DNA*) está bien representado con 16 secuencias. También observamos el término de *unión a nucleótidos*, en el cual se incluye entre otras el gen CTPS1, que permite la síntesis de citidin trifosfato (CTP), uno de los constituyentes del DNA.

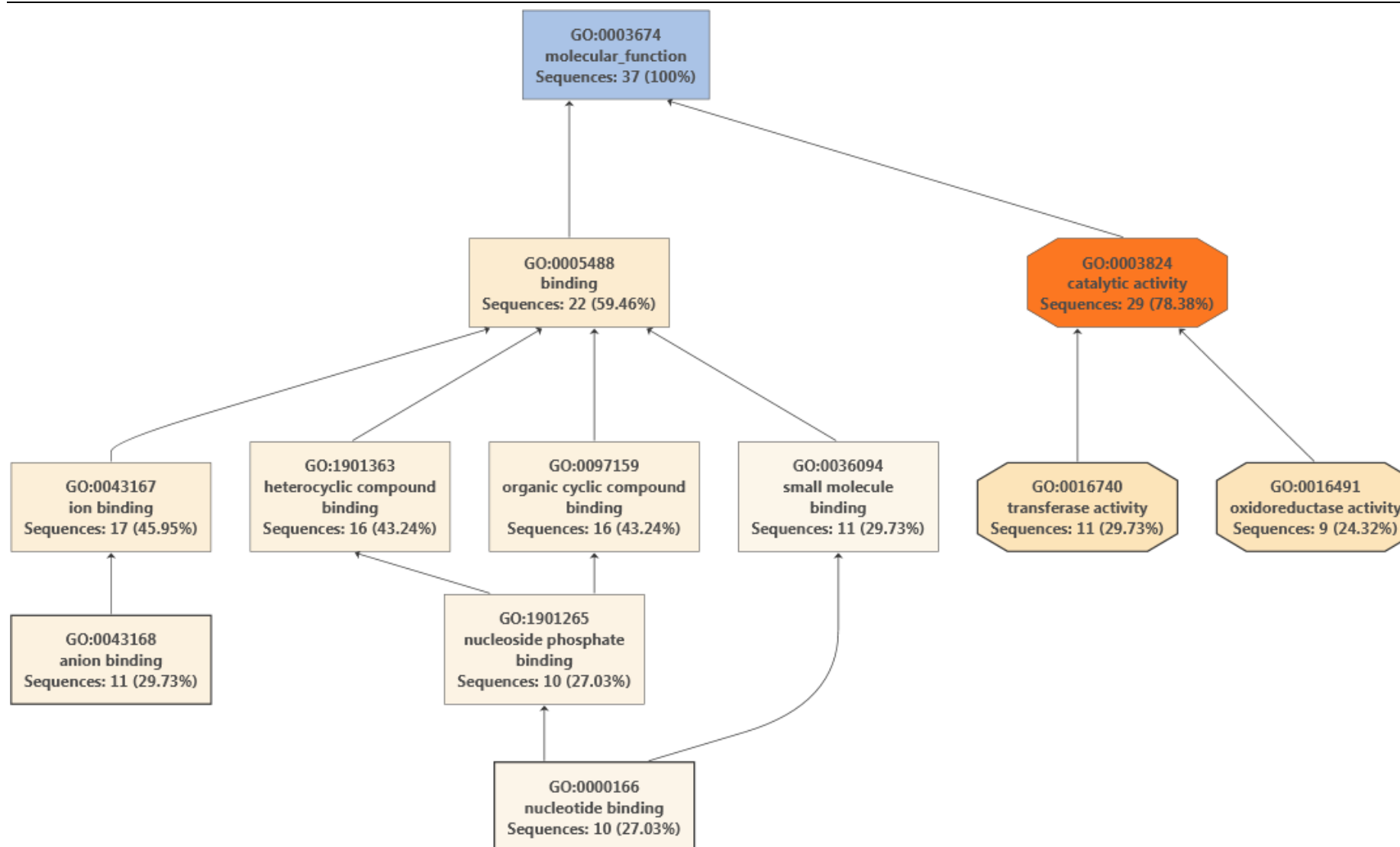


Figura 4.20. Gráfico representativo de los términos GO relacionados con genes asociados a funciones moleculares que se encuentran infraexpresados con al menos 4 anotaciones en hígado de peces alimentados con la dieta MHL respecto a la dieta HLL.

4.4 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN HIGADO Y MÚSCULO DE DORADA

Uno de los procesos mejor representados cuando analizamos las secuencias con mayor incremento en los peces sometidos a ayuno con respecto a los peces alimentados fue la cadena respiratoria. A fin de profundizar en la regulación nutricional de este proceso esencial en la generación de energía celular, se analizó el perfil de expresión de genes relacionados con la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa mediante *microarrays*. Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos para validar los resultados de expresión mediante RT-qPCR de varios genes relevantes y representativos de este proceso.

4.4.1 Expresión diferencial de genes de la cadena respiratoria en hígado y músculo de dorada mediante el uso de *microarrays*

En la figura 4.21 se muestra un mapa con el *cluster* jerárquico de genes con expresión diferencial superior a 2 veces entre condición de ayuno y de alimentación con las dietas HLL, MHL y LLH en hígado de dorada. Se observa que todos los genes representados se encuentran sobreexpresados en los peces en ayuno con respecto a los peces alimentados (13 genes). El gen *cytochrome c oxidase subunit 6A2, mitochondrial* (COX6A2) presentó el mayor decremento de expresión en los peces alimentados con respecto a los en ayuno (-87 veces para la dieta MHL, -35 veces para la dieta HLL y -36 veces cuando la ingesta era la dieta LLH). En este sentido observamos que 6 de los genes que se encuentran sobreexpresados en los peces en ayuno corresponden a diversas subunidades del complejo IV: COX6A2, *Cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1* (COX5B1), *cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial* (COX4I2), *cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial-like* (COX7A2), *cytochrome c oxidase subunit 8B, mitochondrial* (COX8B) y *cytochrome c oxidase subunit 6B1* (COX6B1). El citocromo c (CYCS), sustrato del complejo COX, también está sobreexpresado en los peces sometidos a ayuno.

Cuatro de los genes del complejo IV (COX6A2, COX5B1, COX4I2 Y COX7A2) están fuertemente sobreexpresados en el ayuno frente a los alimentados sin importar el tipo de dieta suministrada (con cambios que van de 4 a 87 veces de sobreexpresión en los peces ayunados). Adicionalmente al complejo IV, también encontramos fuertemente sobreexpresados en el ayuno los genes *ADP/ATP translocase 3* (SLC25A6) y *coenzyme Q-binding protein COQ10, mitochondrial* (COQ10). Adicionalmente, mostraron una sobreexpresión mayor a 2 en el hígado de peces en ayuno los genes *Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like* (UQCRH) y *Cytochrome b-c1 complex subunit*

10 isoform A (UQCR11A), ambos del complejo III, y el gen *NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 4* (NDUA4), del complejo I.

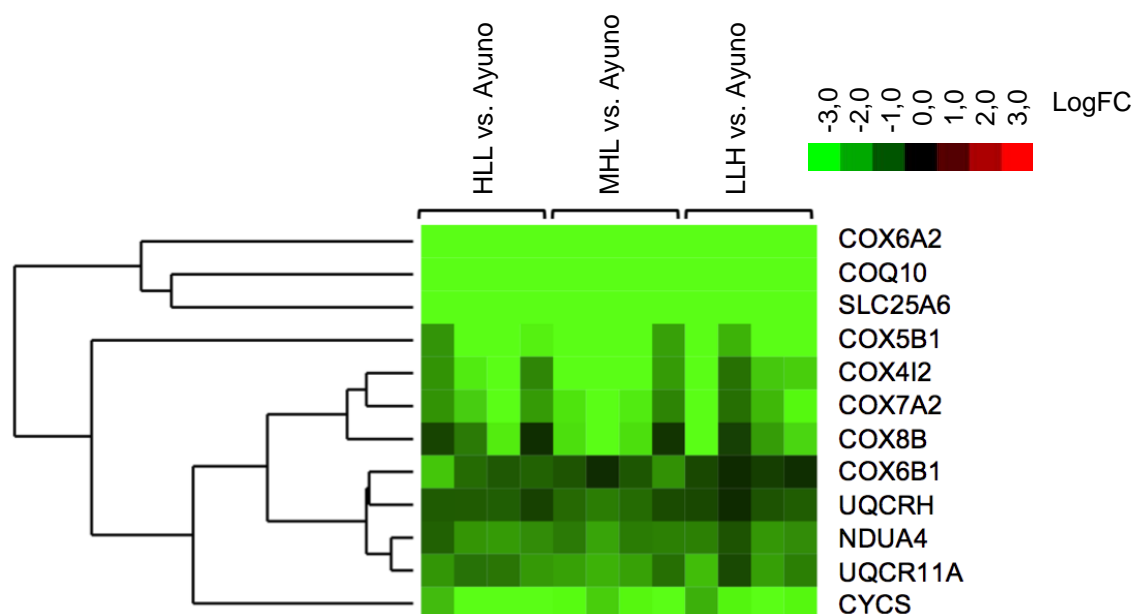


Figura 4.21 Genes de la cadena respiratoria expresados diferencialmente en hígado con al menos 2 veces de cambio y $P_{adjusted} < 0,05$ en peces alimentados con alguna de las dietas en estudio con respecto a la condición de ayuno. Análisis realizado mediante *microarrays*. El color verde indica un descenso en la expresión en peces alimentados con respecto a los peces en ayuno mientras que el color rojo representa un aumento en la expresión. Valores expresados como \log_2 (FC); FC: Veces de Cambio.

En músculo esquelético (Figura 4.22) se observa un mayor número de genes expresados diferencialmente al menos 2 veces, aunque la intensidad de los cambios es menor que en hígado. Encontramos 10 genes sobreexpresados en los peces alimentados con respecto a los sometidos a ayuno y 19 genes infraexpresados. De todos los genes analizados, el gen con menor expresión en peces alimentados, es el gen SLC25A6, que en los peces alimentados con la dieta HLL cambia -8,5 veces con respecto a los peces en ayuno.

El complejo I presentó la mayor cantidad de genes con cambios de al menos 2 veces en la expresión de músculo esquelético. De este complejo se observan 9 genes cuya expresión cambia al menos 2 veces, 6 de los cuales se encuentran sobreexpresados en los peces alimentados (*NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5*, MT-ND5; *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2*, MT-ND2; *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1*, MT-ND1; *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4*, MT-ND4; *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11*, NDUFA11; *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2*, NDUFA4L2) y 3 sobreexpresados en los peces en ayuno (*NDUA4*; *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial*, NDUFA10; *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3*, NDUFAF3). En hígado, de este complejo sólo observamos el gen NDUA4 sobreexpresado en los

peces en ayuno. Aunque ni en músculo esquelético ni en hígado se observan genes del complejo II con expresión diferencial, distinguimos en músculo esquelético la presencia de los genes *succinate dehydrogenase assembly factor 4, mitochondrial* (SDHAF4) (sobreexpresado en los peces alimentados) y *electron transfer flavoprotein subunit beta* (ETFB) (sobreexpresado en los peces en ayuno) que están relacionados con el ensamblaje y la provisión de sustratos alternativos al complejo II.

En músculo esquelético se observan 3 genes pertenecientes al complejo III (*cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial*, UQCRC1; *cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial*, UQCRC2; *ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1*, UQCC1) que presentan mayor expresión en los peces en ayuno, mientras que en hígado, tal como se describió anteriormente, se incrementó la expresión de los genes UQCR11A y UQCRH. Al igual que en hígado, en músculo esquelético se observan 6 genes del complejo IV. Sin embargo, en este último tejido, 2 de ellos están sobreexpresados en los peces alimentados (*COX6B1* y *cytochrome c oxidase subunit 6B1 isoform B*, COX6B1B) y 4 infraexpresados (*COX5B1*, *Cytochrome c oxidase subunit 5A isoform 2*, COX5A2; *mitochondrial inner membrane protein COX18*, COX18; *protein SCO1 homolog, mitochondrial*, SCO1).

Por último, mientras que en el hígado no se observaron genes con expresión diferencial superior a 2 que formen parte del complejo ATP sintasa, en el músculo se observaron 4 genes de este complejo proteico: 1 sobreexpresado en los peces alimentados (*ATP synthase F(0) complex subunit C3, mitochondrial*, ATP5G3) y 3 con mayor expresión en los peces en ayuno (*ATPase inhibitor, mitochondrial*, ATPIF1; *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial*, ATP5A1; *ATP synthase subunit e isoform 1, mitochondrial*, ATP5I1).

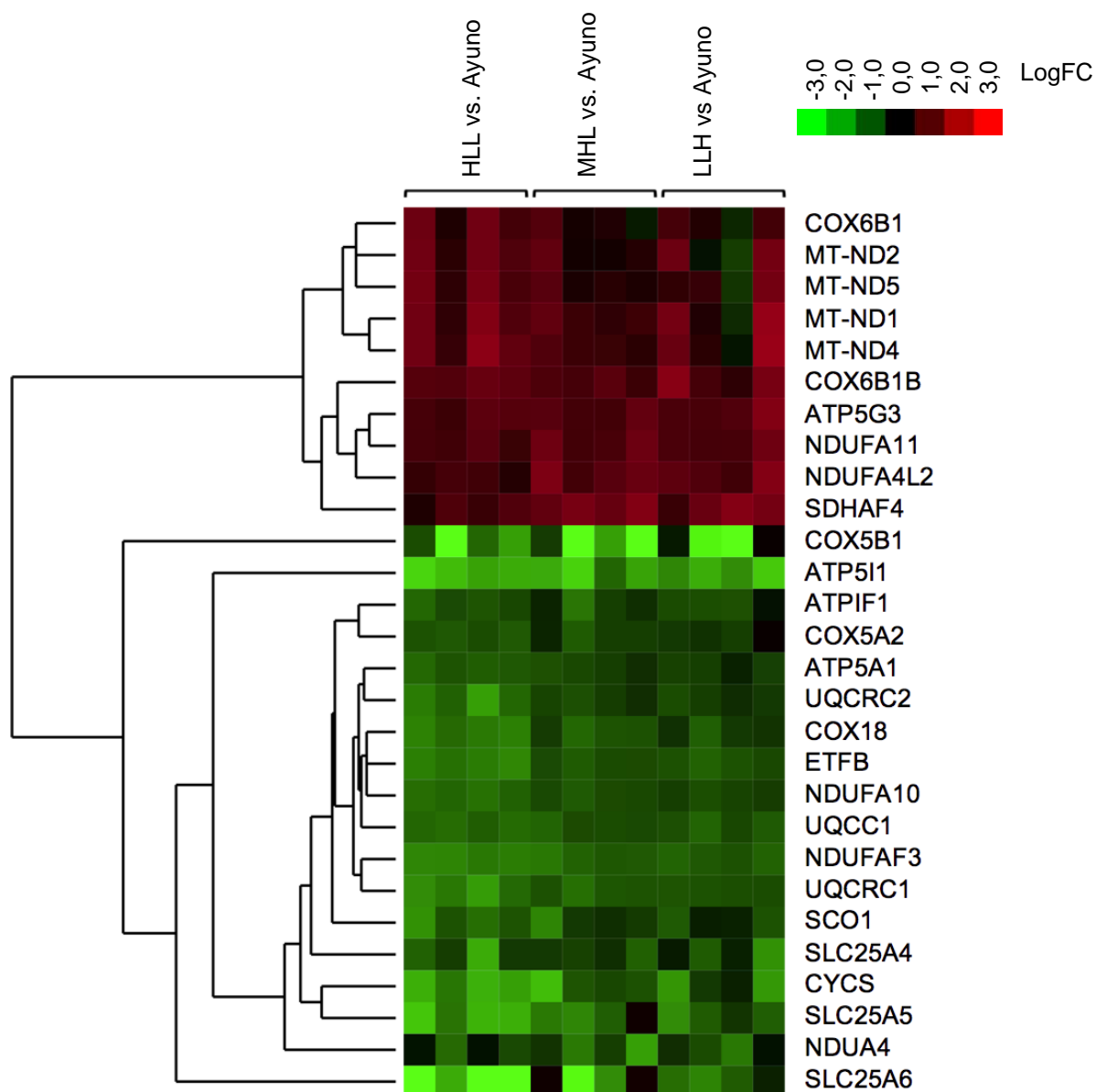


Figura 4.22: Genes de la cadena respiratoria expresados diferencialmente en músculo esquelético con al menos 2 veces de cambio y $P_{adjusted} < 0,05$ en alguna de las dietas con respecto al ayuno. Análisis realizado mediante *microarrays*. El color verde indica un descenso en la expresión en peces alimentados con respecto a los peces en ayuno mientras que el color rojo un aumento en la expresión. Valores expresados como \log_2 (FC); FC : Veces de Cambio.

4.4.2 Validación por RT-qPCR de la expresión diferencial de genes de la cadena respiratoria en hígado y músculo esquelético de dorada

A fin de validar los resultados obtenidos mediante *microarrays*, en la figura 4.23 se muestran los niveles de expresión génica, analizados mediante RT-qPCR, de varios genes representativos de la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa y translocación de ADP/ATP a través de la membrana mitocondrial interna.

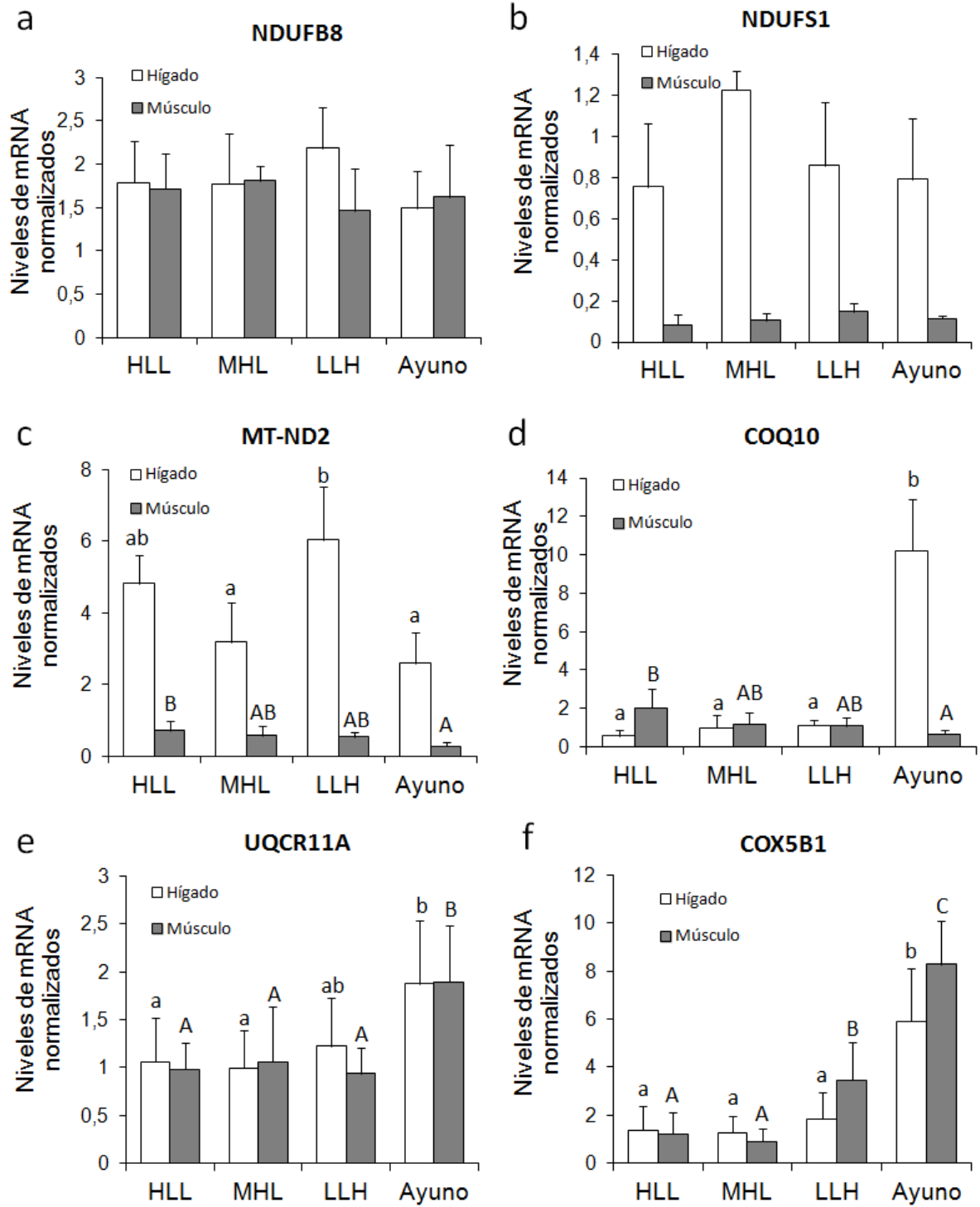
Tal como se observaba en el análisis de expresión por *microarrays*, los genes COQ10, UQCR11A (complejo III), COX6A2, COX5B1 (complejo IV) y SLC25A6 (translocación de ADP y ATP), presentaron una marcada sobreexpresión en el hígado de los peces sometidos a ayuno con respecto a los peces alimentados. En músculo esquelético la sobreexpresión en los peces en ayuno respecto a los alimentados correspondió a los genes UQCR11A, COX5B1 y SLC25A6, siendo el nivel de expresión en los peces alimentados con la dieta MHL similar al de los peces en ayuno. A diferencia de lo observado en hígado, el gen COQ10 presenta una tendencia contraria en músculo esquelético, cuyo valor más bajo corresponde a los peces en situación de ayuno y con diferencias significativas respecto al que muestran los peces alimentados con la dieta HLL.

Los genes del complejo I *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial* (NDUFB8) y *NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like* (NDUFS1) no presentaron diferencias significativas ni en músculo ni en hígado entre las distintas condiciones experimentales analizadas. Un tercer gen de este complejo (MT-ND2, figura 4.23c), codificado a nivel mitocondrial, mostró diferencias significativas en ambos tejidos. Tanto en hígado como en músculo, los peces en ayuno presentaron el valor más bajo, con diferencias significativas al de los peces alimentados en función de la dieta suplementada (peces alimentados con la dieta HLL en músculo esquelético y con la dieta LLH en hígado).

Las dos subunidades de la ATP sintasa analizadas mediante RT-qPCR (*ATP synthase subunit beta, mitochondrial*, ATP5B; *ATP synthase subunit delta, mitochondrial*, ATP5D) no presentaron diferencias estadísticas ni en músculo ni en hígado. La alta variabilidad que presentó la determinación de la expresión del gen COX8B no permitió establecer diferencias significativas en hígado, aún cuando los peces en ayuno mostraron una tendencia a presentar valores superiores.

Por último, se determinó la expresión del gen *ATP-binding cassette sub-family G member 2-like* (ABCG2). Diversos estudios han demostrado que ABCG2 juega un rol crucial en la detoxificación celular y el daño producido por el estrés oxidativo, incluyendo el transporte celular de porfirinas relacionadas con la cadena respiratoria (Kubota *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). En nuestros estudios

se observa que, tanto en hígado como en músculo, la expresión de este gen está fuertemente incrementada en los peces sometidos a ayuno respecto a los alimentados con las dietas HLL y la MHL, mientras que con respecto a los peces alimentados con la dieta LLH el valor de expresión es similar.



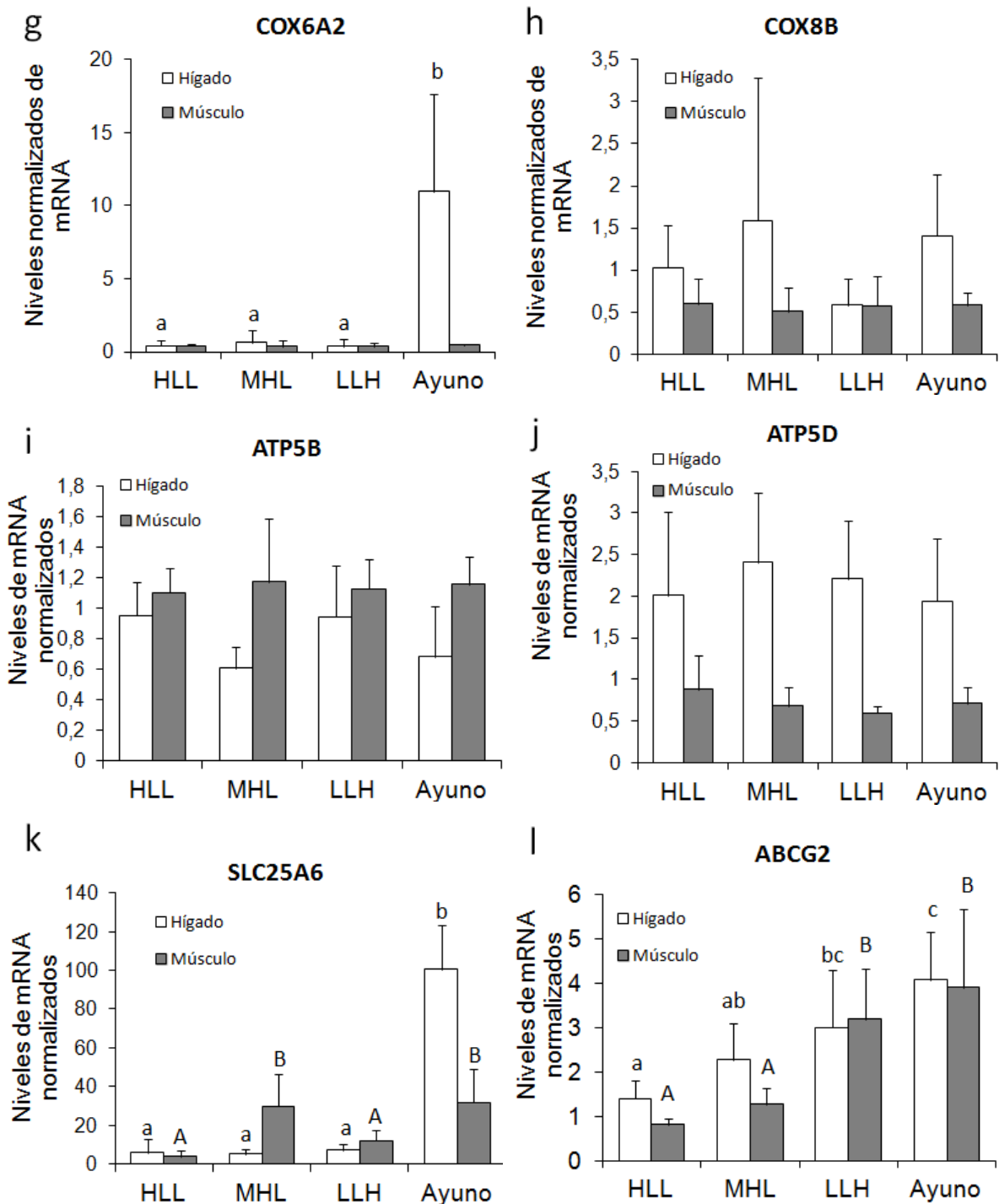


Figura 4.23. Análisis de expresión mediante RT-qPCR. (a) *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial*, (b) *NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like*, (c) *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2*, (d) *Coenzyme Q-binding protein COQ10, mitochondrial*, (e) *cytochrome b-c1 complex subunit 10 isoform A*, (f) *Cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1*, (g) *cytochrome c oxidase subunit 6A2, mitochondrial*, (h) *cytochrome c oxidase subunit 8B, mitochondrial*, (i) *ATP synthase subunit beta, mitochondrial*, (j) *ATP synthase subunit delta, mitochondrial*, (k) *ADP/ATP translocase 3*, (l) *ATP-binding cassette sub-family G member 2-like*. Los niveles de mRNA fueron normalizados en relación a la media de los niveles del RNA ribosomal 18S y el *elongation factor 1α*. Los valores se expresan como la media \pm DE de las determinaciones en hígado y músculo esquelético (5 - 6 peces). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.5 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN HÍGADO DE DORADA

El análisis por *microarrays* en hígado de dorada mostró que una parte importante de los genes que muestran una expresión diferencial en función de la composición de la dieta o el estado nutricional, están implicados en procesos metabólicos vinculados al metabolismo de lípidos. Por esta razón, abordamos el análisis de este proceso metabólico en la dorada. Tras evaluar el perfil general de la expresión de los genes vinculados al metabolismo de lípidos, la expresión diferencial de varios genes fue validada mediante RT-qPCR.

4.5.1 Evaluación de la expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico en hígado de dorada mediante el uso de *microarrays*

Al igual que para los genes de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, se analizó el perfil general de expresión mediante la búsqueda sistemática de genes relacionados con el metabolismo lipídico en nuestra base de datos de *microarrays*.

En la figura 4.24 se muestran los genes con cambios significativos y en los que la expresión en hígado fuese igual o superior a 2 veces en al menos una de las dietas con respecto al ayuno. De un total de 61 genes con expresión diferencial > 2 veces, 11 (18 %) muestran una distinta tendencia en función de la composición de la dieta. Se observa 1 *cluster* con 11 genes, en la parte superior de la figura, en los que el ayuno promueve una sobreexpresión respecto a los peces alimentados con la dieta MHL y un decremento en los peces alimentados con la dieta HLL: *farnesyl pyrophosphate Synthase* (FDPS), *diphosphomevalonate decarboxylase* (MVD), *7-dehydrocholesterol reductase* (DHCR7), *squalene synthase isoform X1* (FDFT1), *squalene monoxygenase* (SQLE), *isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1-like isoform X1* (IDI1), *hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic-like isoform X1* (HMGCS1), *probable ergosterol biosynthetic protein 28-like isoform X1* (ERG28), *delta (14)-sterol reductase isoform X1* (TM7SF2), *3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase isoform X2* (EBP) y *acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like* (ACAT2). Estos 11 genes están involucrados en la ruta de síntesis de colesterol, además del gen *methylsterol monoxygenase 1* (MSMO1) que presentó una intensidad menor en el cambio debido a la composición de la dieta.

La mayoría de los genes cuyo patrón de expresión no varía en función de la composición de la dieta, presentan incrementos significativos en la expresión en los peces alimentados con respecto a los sometidos a ayuno. Tres de los genes con incrementos importantes de expresión en los peces alimentados (especialmente con la dieta HLL) intervienen en la vía de producción de PUFAs: dos elongasas de ácidos grasos de cadena muy larga, *elongation of very long chain fatty acids protein 5*

(ELOVL5) y *elongation of very long chain fatty acids protein 6* (ELOVL6), que incrementan 100 y 22 veces, respectivamente y la *acyl-CoA desaturase isoform X1* (SCD-X1) que incrementa 127 veces tras la ingesta con la dieta HLL. En la ruta de síntesis de lípidos se encontraron en total 13 genes: *cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-like* (ALDH1L1), *Acetyl-CoA Carboxilasa 1 transcript variant 2* (ACC1tv1), ELOVL5, ELOVL6, *elongation of very long chain fatty acids protein 4-like isoform X1* (ELOVL4), SCD-X1, *acyl-CoA desaturase-like* (SCD), *fatty acid delta-6 desaturase splice variant 5* (FADSD6), *very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3* (HACD3), *2-acylglycerol O-acyltransferase 2* (MOGAT2), *glycerol-3-phosphate acyltransferase 3* (GPAT3), *1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma* (AGPAT3) y *diacylglycerol O-acyltransferase 1* (DGAT1). Aunque la mayoría de estos genes se sobreexpresan en los peces alimentados, 4 de ellos (ELOVL4, HACD3, AGPAT3 y DGAT1) están infraexpresados con respecto a los peces ayunados.

Los genes *patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 isoform X3* (PNPLA2-X3) y *carnitine O-palmitoyltransferase 1 muscle isoform isoform X2* (CPT1B), implicados en la degradación de triglicéridos y de ácidos grasos respectivamente fueron dos de los genes cuya expresión presentó mayor incremento en los peces en ayuno. Adicionalmente, se muestran otros 14 genes relacionados con procesos degradativos de lípidos, 6 con mayor expresión tras el ayuno (*patatin-like phospholipase domain-containing protein 2*, PNPLA2, *mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein isoform X2*, SLC25A20; *group XIIA secretory phospholipase A2*, PLA2G12A; *trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial isoform X2*, HADHA; *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, HADH y *phytanoyl-CoA dioxygenase peroxisomal isoform X1*, PHYH), y 8 infraexpresados en los peces en ayuno (*phospholipase A2*, PLA2; *N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase*, NAAA; *Phospholipase A2 major isoenzyme*, PLA2G1B; *hepatic triacylglycerol lipase-like isoform X2*, LIPC; *lambda-crystallin homolog isoform X2*, CRYL1, *inactive pancreatic lipase-related protein 1-like isoform X1*, PNLIPRP1, *group XV phospholipase A2*, PLA2G15, y *alkaline ceramidase 2*, ACER2).

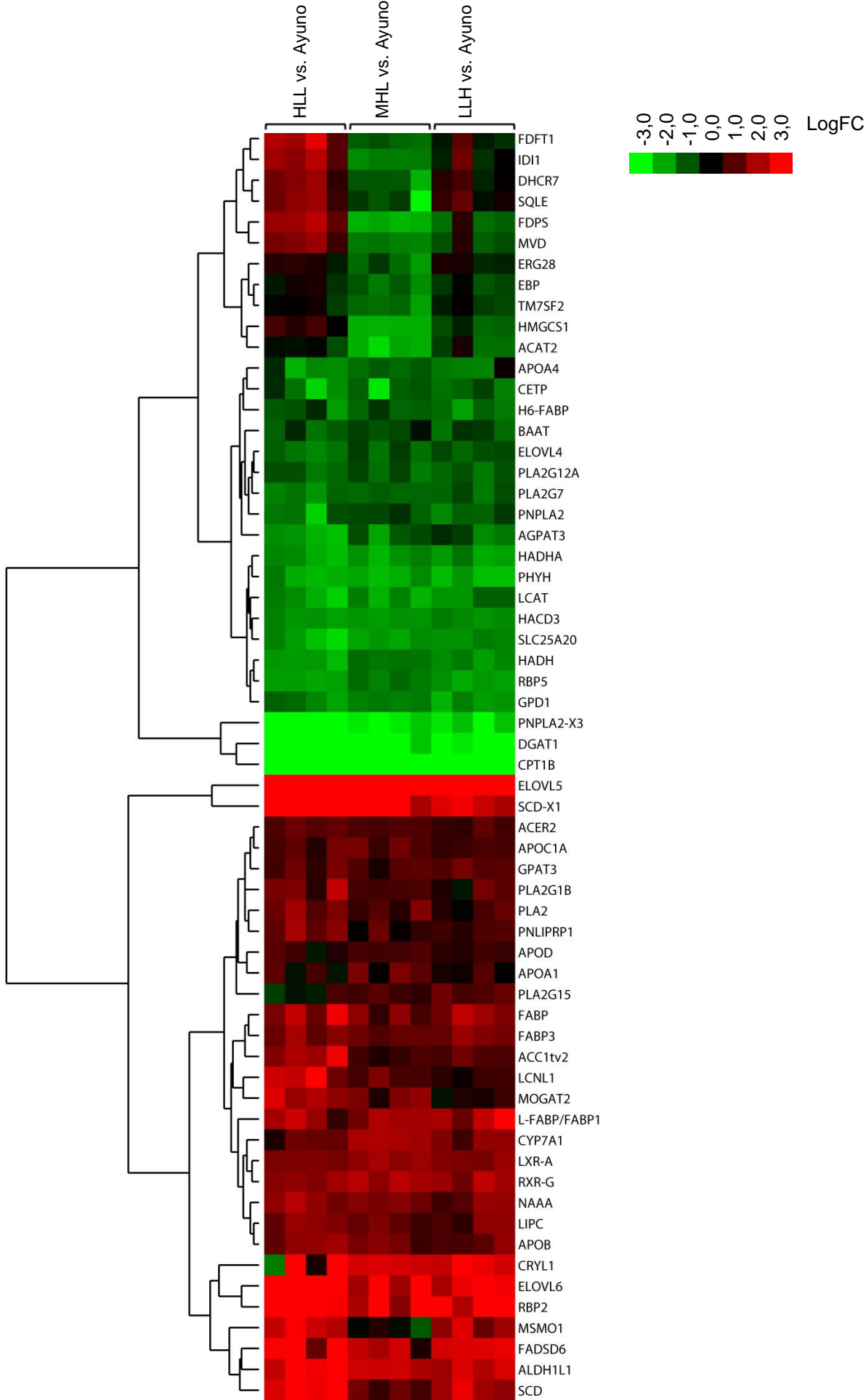


Figura 4.24: Genes del metabolismo lipídico expresados diferencialmente en hígado con al menos 2 veces de cambio y $P_{adjusted} < 0,05$ en peces alimentados con alguna de las dietas con respecto al ayuno. Análisis realizado mediante *microarrays*. El color verde indica un descenso en la expresión génica en peces alimentados con respecto a los peces en ayuno mientras que el color rojo un aumento en la expresión. Valores expresados como \log_2 (FC); FC: Veces de Cambio.

El transporte de lípidos tanto a nivel celular como sistémico, está fuertemente incrementado en los peces alimentados. Se observan 9 genes sobreexpresados involucrados en diversos mecanismos de captación y movilización de lípidos: *apolipoprotein B* (APOB), *apolipoprotein A-I* (APOA1), *apolipoprotein C-I acidic form-like* (APOC1A), *apolipoprotein D-like* (APOD), *lipocalin-like* (LCNL1), *fatty acid-binding protein* (FABP), *liver-basic fatty acid binding protein* (L-FABP/FABP1), *fatty acid binding protein 3 muscle and heart* (FABP3) y *retinol-binding protein 2 isoform X1* (RBP2). Sin embargo, también se aprecian 5 genes relacionados con el transporte y movilización de lípidos en los que la expresión está aumentada en los peces en ayuno: *apolipoprotein A IV* (APOA4), *cholesterol ester transfer protein isoform X2* (CETP), *phosphatidylcholine-sterol acyltransferase* (LCAT), *fatty acid binding protein H6 isoform* (H6-FABP) y *retinol-binding protein 5* (RBP5).

Por último se observaron 6 genes que no fueron clasificados en las categorías anteriores pero que están igualmente relacionados con el metabolismo lipídico. Los factores de transcripción *oxysterols receptor lxr-alpha isoform X2* (LXR-A) y *retinoic acid receptor rxr-gamma-B* (RXR-G), la *glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] cytoplasmic* (GPD1), que vincula el metabolismo de la glucosa con el metabolismo de lípidos, y la *cholesterol 7-alpha-monooxygenase* (CYP7A1), que actúa en la degradación de colesterol y síntesis de ácidos biliares, se encuentran sobreexpresados en los peces alimentados. Por el contrario, *bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase-like* (BAAT), proteína relacionada con la modificación de ácidos biliares y la regulación de FFA (absorción e hidrólisis), y *platelet-activating factor acetylhydrolase isoform X2* (PLA2G7), que inactiva procesos celulares mediante la deacetilación de fosfolípidos, estaban sobreexpresados en los peces en ayuno.

4.5.2 Validación por RT-qPCR de la expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico en hígado de dorada

Mediante RT-qPCR se analizó la expresión de diversos genes del metabolismo lipídico en el hígado de doradas alimentadas con dietas que varían en la composición de macronutrientes y peces sometidos a ayuno durante un período de 23 días.

Debido a la preponderancia del anabolismo lipídico en peces alimentados con respecto a los peces en ayuno, evaluamos la expresión hepática de 6 genes clave que intervienen en la síntesis de ácidos grasos (Figura 4.25 a-f). En los peces alimentados con la dieta HLL observamos que la expresión de todos estos genes está claramente más elevada que en el resto de los grupos de peces

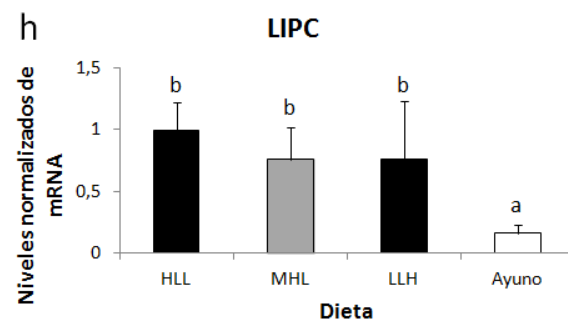
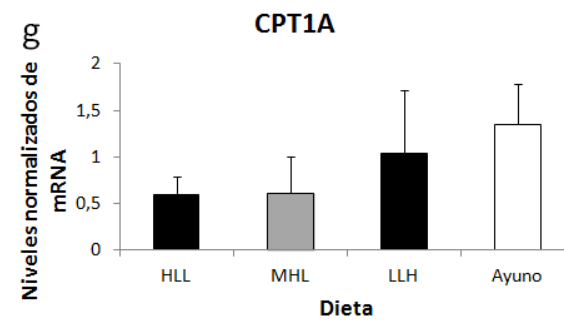
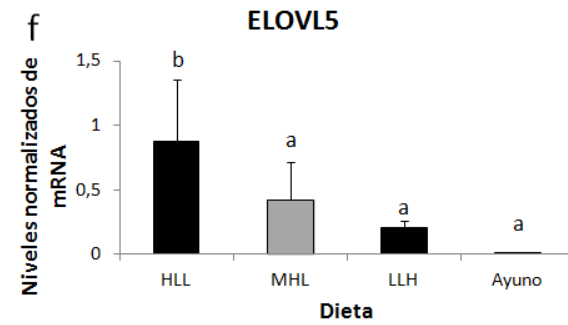
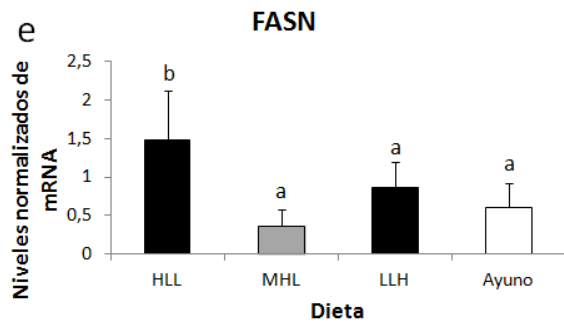
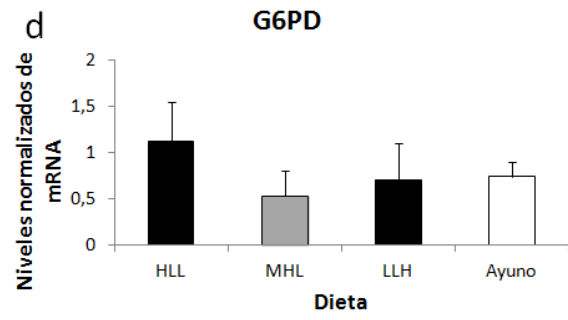
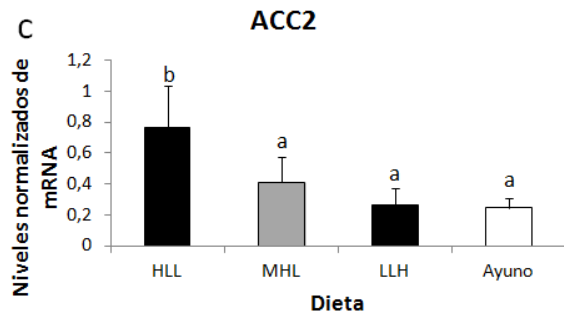
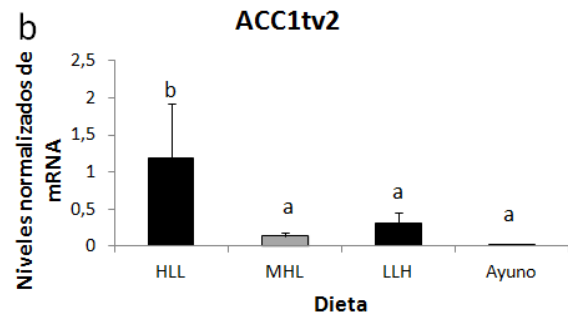
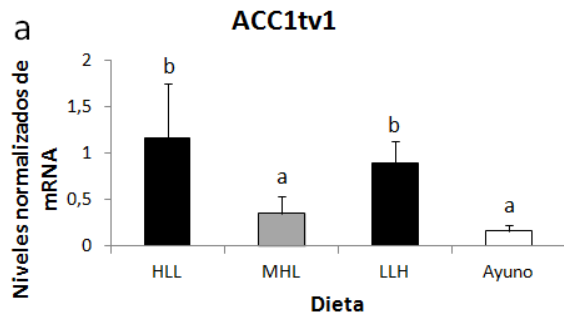
en estudio. Se observan diferencias estadísticas entre los peces alimentados con la dieta HLL y el resto de los grupos a excepción de lo visto en la expresión de ACC1tv1 (Figura 1a), para la cual no se observaron diferencias entre los peces alimentados con las dietas HLL y LLH, y de la G6PD (Figura 4.25d), para la que no se encontraron diferencias estadísticas entre ninguno de los grupos experimentales. Para 4 genes el valor mínimo correspondió al grupo de peces en ayuno. En el caso de la ELOVL5, cuyo valor de expresión máximo correspondió a los peces alimentados con la dieta HLL, la expresión en los peces en ayuno fue aproximadamente un 1 % de la indicada en los alimentados con dicha dieta. En cuanto a la expresión de la G6PD y, de manera más pronunciada en la *fatty acid synthase* (FASN), el valor más bajo se pudo apreciar en los peces alimentados con la dieta MHL.

Se evaluaron 2 genes involucrados en la degradación de ácidos grasos: *Carnitine O-palmitoyltransferase 1a* (CPT1A) y LIPC. Si bien en la CPT1A (Figura 4.25g) no pudimos apreciar diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales, observamos que este gen mantiene una tendencia distinta al patrón de expresión de los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, ya que el valor más bajo lo encontramos en los peces alimentados con la dieta HLL (43,64 % del valor máximo observado en los peces en ayuno). No obstante, la LIPC (Figura 4.25h) presenta el valor mínimo en el grupo de peces sometidos a ayuno (22,16 % del valor máximo correspondiente a los peces alimentados con la dieta HLL).

Aunque el gen *long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 isoform X2* (ACSL1) (figura 4.25i) no presentó diferencias estadísticas, mostró una tendencia a presentar los valores más bajos en los peces alimentados con la dieta MHL, mientras que el valor más elevado se observó en los peces alimentados con la dieta LLH.

Se determinó la expresión de dos factores de transcripción íntimamente relacionados con la expresión de genes del metabolismo lipídico: SREBP-1 y PPAR γ . SREBP-1 no mostró diferencias estadísticas entre ninguno de los grupos de peces en estudio. La expresión más elevada del factor PPAR γ se observó en los peces alimentados con la dieta LLH, con diferencias significativas únicamente con respecto a los peces alimentados con la dieta MHL.

Por último, se analizaron dos genes relacionados con la síntesis de colesterol (MVD y FDPS) y, al igual que los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, los peces alimentados con la dieta HLL presentaban un incremento significativo respecto al resto de grupos. Los peces alimentados con la dieta MHL presentaron niveles más bajos de expresión para los genes MVD y FDPS que los peces en ayuno, verificando la tendencia observada en los datos de *microarrays*.



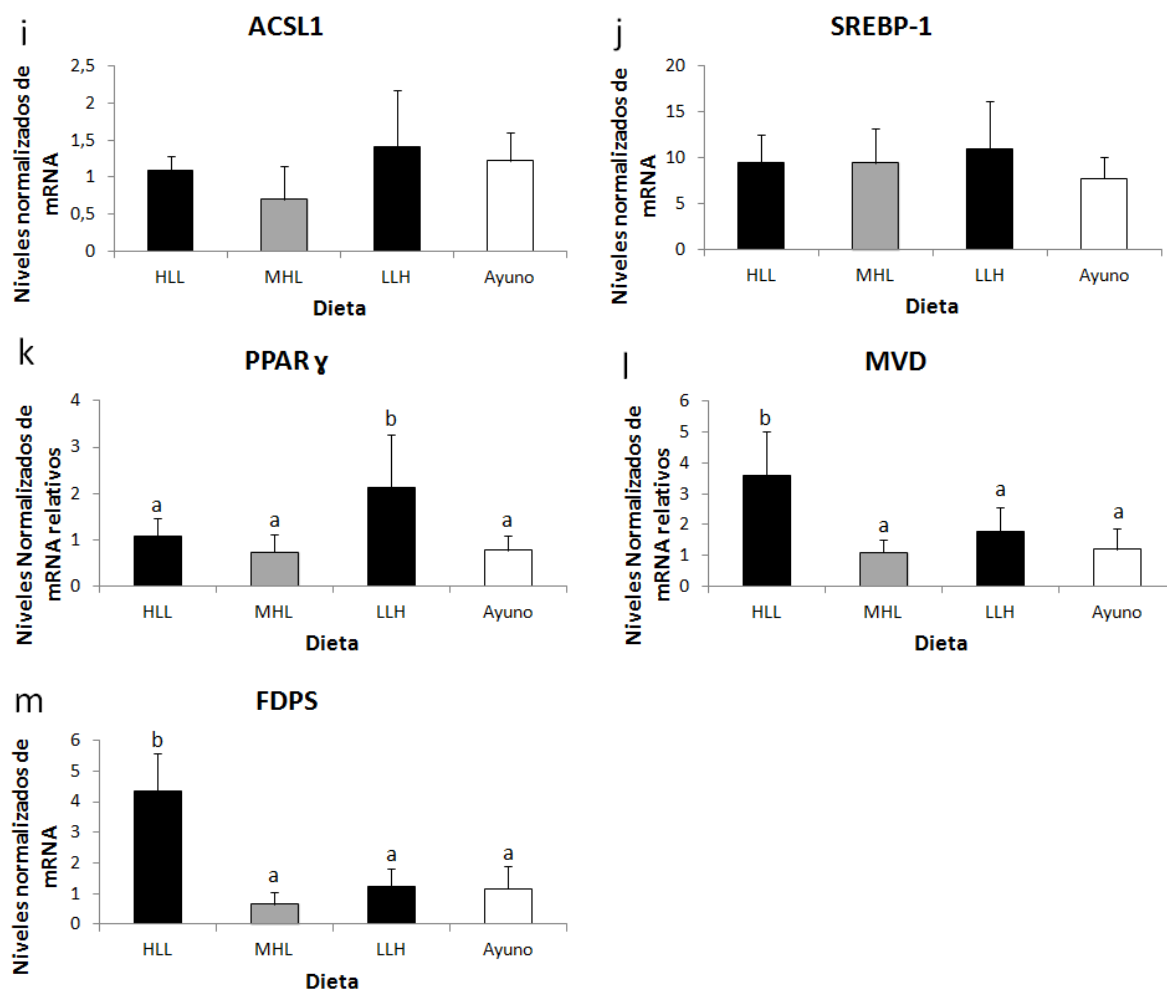


Figura 4.25. Análisis mediante RT-qPCR de los genes del metabolismo de lípidos en hígado de doradas en ayuno o alimentados con dietas de diferente composición de macronutrientes. (a) ACC1tv1 (b) ACC1tv2 (c) ACC2 (d) G6PD (e) FASN (f) ELOVL5 (g) CPT1A (h) LIPC (i) ACSL1 (j) SREBP-1 (k) PPAR γ (l) MVD (m) FDPS. Los niveles de mRNA fueron normalizados en relación a la media de los niveles del RNA ribosomal 18S, el *elongation factor 1 α* y β -Actina. Los valores se expresan como media \pm DE de las determinaciones de hígado (5 peces). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.6 EFECTO METABÓLICO DE LA SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE SREBP-1a EN HÍGADO DE DORADA

Previamente se ha descrito que SREBP-1 es un importante regulador de la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos, incluyendo algunas especies de peces (Dong *et al.*, 2017). Adicionalmente, en nuestro laboratorio se había observado que el fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster se une a los promotores de GK y PFKFB de dorada, promoviendo fuertemente su transcripción (Metón *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2008). Por otra parte, resultados obtenidos por nuestro grupo indican que la sustitución parcial de proteínas por carbohidratos en las dietas suministradas a dorada promueve un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento (Fernández *et al.*, 2007; Sáez, 2015), así como, en base a los estudios de *microarrays* desarrollados en esta tesis doctoral, un decremento en el perfil de expresión de genes del metabolismo lipídico en hígado (Sección 4.5).

Estos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de si mediante la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada, sería posible, por una parte incrementar la metabolización de carbohidratos de la dieta y, por otra parte, derivar dichos carbohidratos hacia la síntesis de lípidos, promoviendo un efecto de ahorro de proteína. Para ello, se prepararon nanopartículas de quitosán-TTP acompañado con un plásmido de expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster (pSG5-SREBP-1a). Estas partículas fueron administradas por vía intraperitoneal y 72 horas después se evaluaron los cambios en distintos parámetros metabólicos y en la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo de carbohidratos y lípidos en hígado.

4.6.1. Obtención de nanopartículas de quitosán-TTP complejadas con DNA plasmídico y administración intraperitoneal a juveniles de *S. aurata*

Los plásmidos pSG5 (control) y pSG5-SREBP-1a fueron encapsulados con quitosán-TTP tal y como se describe en el apartado 3.5 de materiales y métodos. Mediante microscopía de fuerza atómica se determinó que las nanopartículas obtenidas tienen una morfología redondeada (Figura 4.26). El tamaño de las nanopartículas osciló entre los 163 nm y los 326 nm (media = $224,0 \pm 62,3$ nm) y el potencial Z promedio fue de $32,98 \pm 1,16$ mV (n= 6) (tabla 4.11).

Tabla 4.11. Tamaño y potencial Z de las nanopartículas de DNA Quitosán-TPP.

Diámetro medio (nm)	Potencial Z (mV)
(n=6)	
190	32,5
326	31,9
163	35,2
248	33,0
169	33,0
248	32,3
Media = 224,0	Media = 32,98
DE = 62,3	DE = 1,16

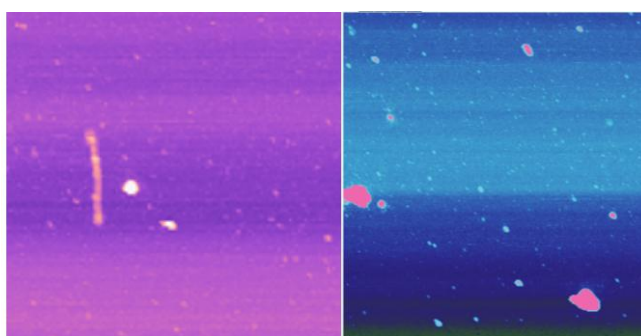


Figura 4.26. Imágenes de las nanopartículas de DNA quitosán-TPP obtenidas por microscopía de fuerza atómica. (a) Nanopartículas con el plásmido pSG5 (control), (b) nanopartículas con el plásmido pSG5-SREBP-1a.

Las nanopartículas liofilizadas fueron reconstituídas en solución salina a una concentración de 1 mg DNA/ml. Por vía intraperitoneal se administraron 10 μ g de plásmido por cada gramo de pez a juveniles de dorada previamente alimentados con las dietas HLL y LLH durante un período de 15 días. Tras 72 horas post-inyección, período en el que se continuó con la dieta respectiva, los peces fueron sacrificados y se extrajeron muestras de sangre e hígado (La última ingesta fue 24 horas antes del sacrificio).

A fin de verificar la expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster en el hígado de las doradas tratadas con nanopartículas de quitosán-TTP-pSG5-SREBP-1a, se aisló el RNA total de este tejido. Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión génica a nivel de mRNA en los peces tratados en relación a los peces control, tratados con nanopartículas de quitosán-TTP-pSG5 (figura 4.27b). Se observó que la expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster es muy superior en los peces tratados con pSG5-SREBP-1a independientemente de la dieta suministrada. En los peces alimentados con las dietas HLL y LLH los niveles de mRNA de SREBP-1a fueron 5,7 y 2,9 veces

superiores, respectivamente, que en los peces control. Consistentemente, SREBP-1a promovió un incremento similar en los niveles de proteína SREBP-1a inmunodetectada para ambas dietas (Figura 4.27a).

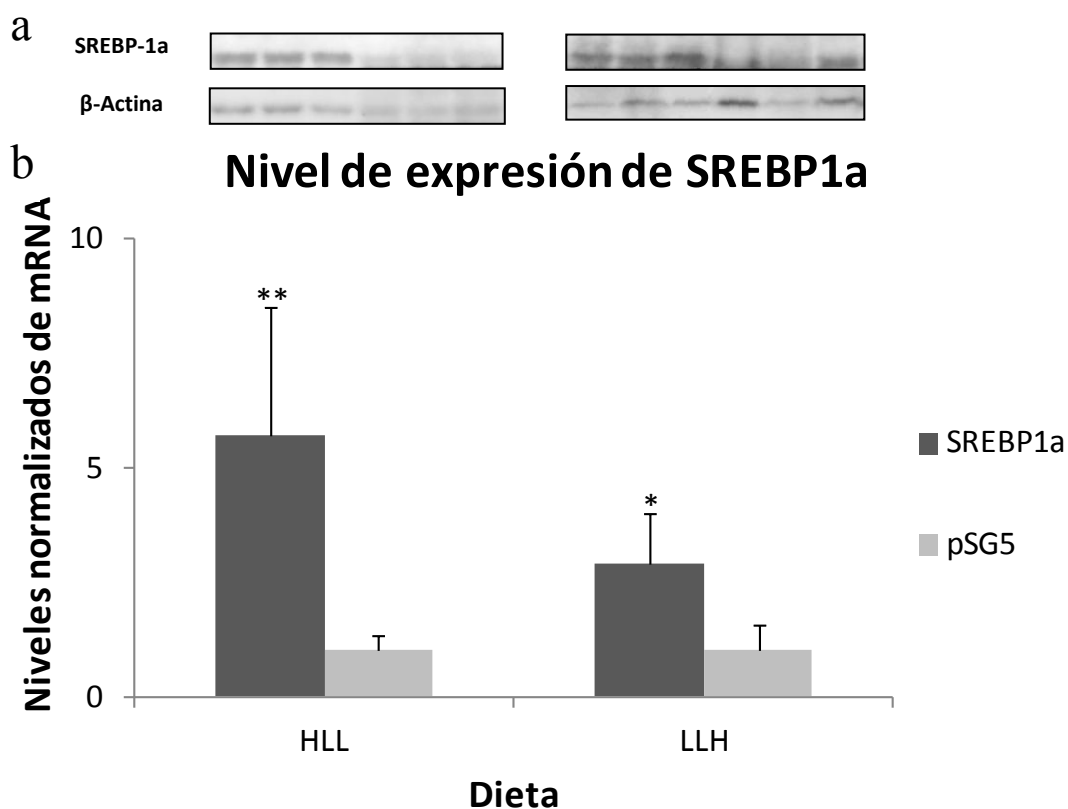


Figura 4.27. (a) Proteína inmunodetectable por *Western Blot* de 3 peces tratados con el plásmido pSG5-SREBP-1a y 3 peces tratados con el plásmido pSG5 (control) alimentados con las dietas HLL y LLH (b) Nivel de sobreexpresión de SREBP-1a de hámster en peces alimentados con las dietas HLL y LLH, 72 horas después del tratamiento con nanopartículas de DNA-quitosán acomplejadas con el el plásmido pSG5-SREBP-1a o pSG5 (control). Los niveles de mRNA fueron normalizados en relación a la media de los niveles del RNA ribosomal 18S y el *elongation factor 1 α* . Los valores representados corresponden a la media \pm DE (n = 7). Los asteriscos indican el nivel de significancia (*) $P < 0,05$ (**) $P < 0,01$ (***) $P < 0,001$ para prueba *t-Student*.

4.6.2. Efecto metabólico de la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada

En el suero obtenido de los peces tratados se determinó los niveles de glucosa, colesterol total y triglicéridos. En la figura 4.28 se puede observar que la glucemia no se ve afectada por la sobreexpresión de SREBP-1a tras 72 horas del tratamiento con las nanopartículas. Sin embargo, tanto los triglicéridos como el colesterol se ven incrementados 1,4 y 1,2 veces respectivamente en los peces alimentados con la dieta HLL, y 1,6 y 1,3 veces en los alimentados con la LLH (estadísticamente significativo en esta última dieta). Un ANOVA de dos vías (Tabla 4.12) indica que las diferencias son debidas únicamente al tratamiento y no a la dieta o a la interacción entre tratamiento y dieta (colesterol $P < 0,001$; triglicéridos $P < 0,01$).

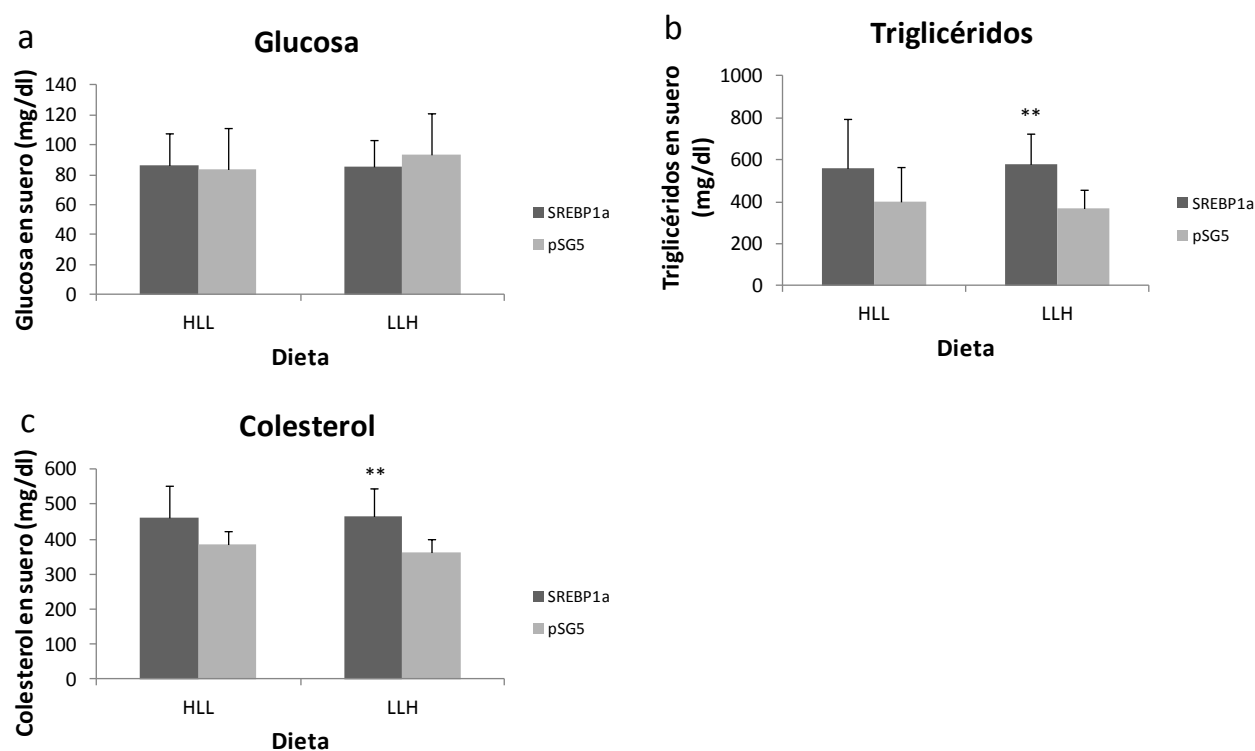


Figura 4.28. Metabolitos en suero de doradas alimentadas con las dietas HLL y LLH y tratadas con nanopartículas de DNA quitosán-TTP acomplejadas con un plásmido de expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster o pSG5 vacío. Los valores representados corresponden a la media \pm DE ($n = 9$). Los asteriscos indican el nivel de significancia (*) $P < 0,05$ (**), $P < 0,01$ (***), $P < 0,001$ para la prueba *t-student*.

Posteriormente, se determinó la actividad de varias enzimas que catalizan reacciones del metabolismo intermediario en hígado. Mediante un análisis ANOVA de dos vías (tabla 4.12) evaluamos el efecto producido tanto por el tratamiento como por la dieta y se observó que la dieta produce cambios en los niveles de actividad de la mayoría de las enzimas estudiadas (8 de 9 enzimas, a excepción de G6PD, se vieron significativamente afectadas por la dieta). En dos enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (GK y FBPa) la inyección intraperitoneal de nanopartículas de DNA quitosán-TTP con un plásmido de expresión que contiene SREBP-1a produce cambios significativos en los niveles de expresión génica de ambas enzimas en paralelo a los cambios producidos por la dieta.

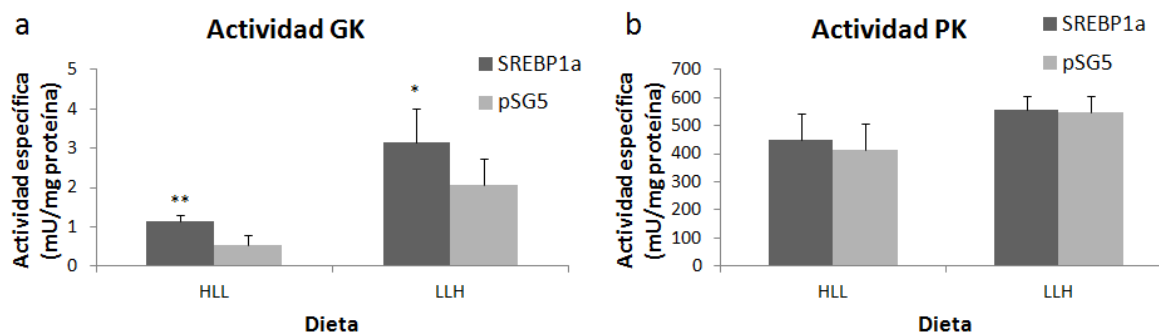
La GK aumenta marcadamente su actividad en peces alimentados con ambas dietas (1,5 veces de aumento en los peces alimentados con la dieta LLH y 2 veces para la dieta HLL) como consecuencia de la inyección intraperitoneal del plásmido de expresión de SREBP-1a (Figura 4.29a). Por el contrario, asociado a la expresión de SREBP-1a se observa un descenso en la actividad de FBPa de un 22,7 % en los peces que consumieron la dieta LLH y un 29,1% en aquellos alimentados con la dieta HLL (Figura 4.29d).

Tabla 4.12. ANOVA de dos factores: Efecto de dieta y tratamiento con nanopartículas DNA quitosán-TTP acompañados con el plásmido pSG5-SREBP-1a o pSG5 vacío sobre los niveles de metabolitos en suero y sobre la actividad de distintas enzimas del metabolismo intermediario en hígado de dorada. (*) $P < 0,05$ (**) $P < 0,01$ (***) $P < 0,001$ NS: No significativo.

Metabolito / Enzima	Interacción	Dieta	Tratamiento
Glucosa	NS	NS	NS
Triglicéridos	NS	NS	**
Colesterol	NS	NS	***
GK	NS	***	**
AST	NS	***	NS
ALT	NS	***	NS
PFK-1	NS	***	NS
PK	NS	***	NS
G6PD	**	NS	NS
6PGD	NS	**	*
FBPasa	NS	**	**
GDH	NS	***	NS

El ANOVA de dos factores muestra que los niveles de actividad de la enzima G6PD no se ven afectados ni como consecuencia del tratamiento ni por el tipo de dieta suministrada a los peces. Sin embargo, en la la figura 4.29e se observa que en los peces alimentados con la dieta HLL el tratamiento con las nanopartículas produce un incremento significativo (prueba *t-student*; $P < 0,05$) en los niveles de actividad, que pasa de 270,6 mU/mg proteína a 354,4 mU/mg proteína. Este último valor es similar al encontrado en los peces alimentados con la dieta LLH.

El tratamiento con las nanopartículas que contienen el plásmido de expresión de SREBP-1a no promovió diferencias significativas en los valores de actividad de otras enzimas evaluadas.



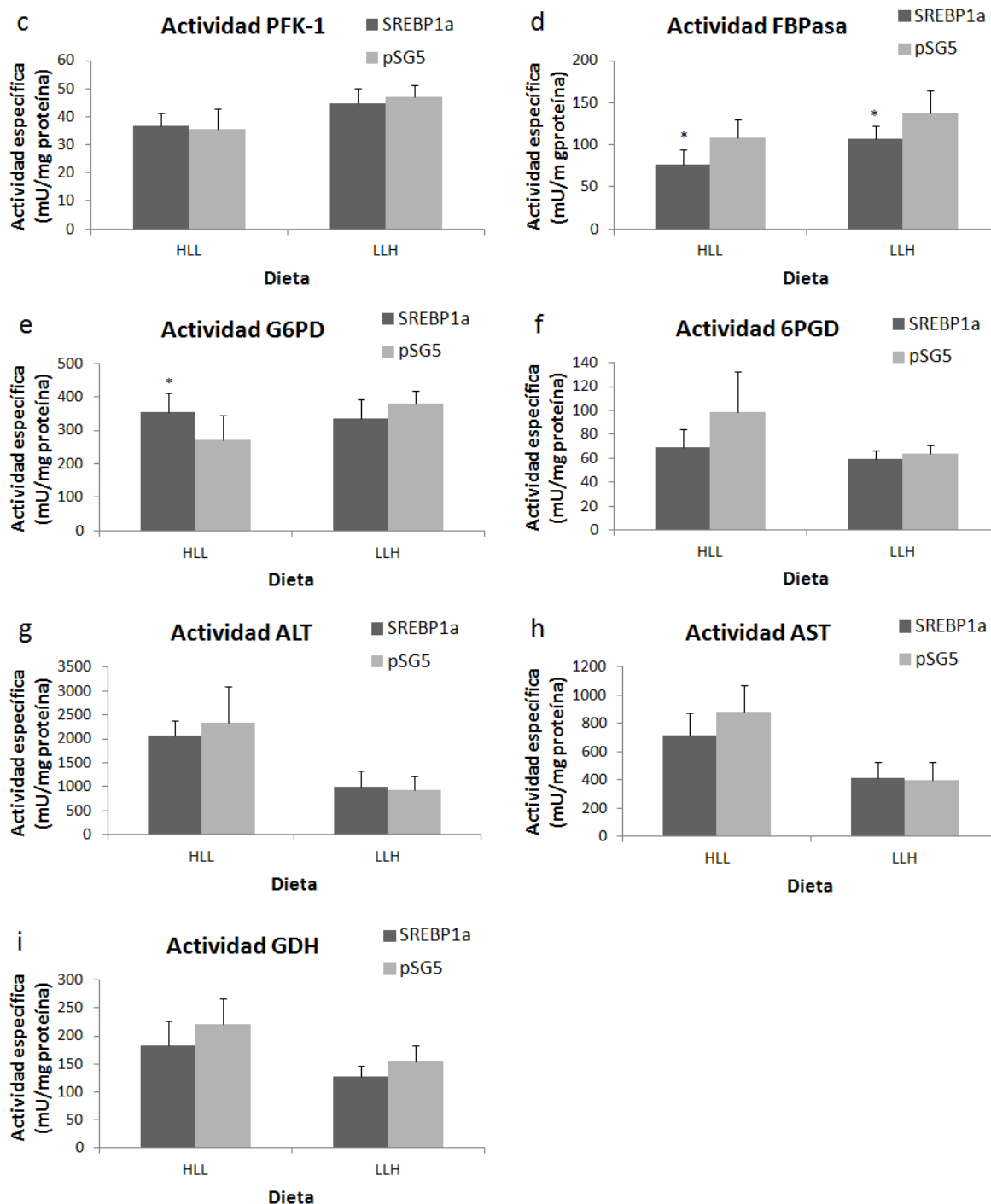


Figura 4.29. Efecto de la sobreexpresión de SREBP-1a 72 horas tras la inyección intraperitoneal de nanopartículas DNA quitosán-TTP sobre la actividad de enzimas del metabolismo intermediario en hígado de doradas alimentadas con la dieta HLL y LLH. (a) GK, (b) PK, (c) PFK-1, (d) FBPasa, (e) G6PD, (f) 6PGD, (g) ALT (h) AST (i) GDH. Los valores de actividad se expresan en mU/mg Proteína como la media \pm DE ($n = 8$). Los asteriscos indican el nivel de significancia (*) $P < 0,05$ (**), $P < 0,01$ (***), $P < 0,001$ para la prueba *t-student*.

4.6.3 Expresión diferencial de genes del metabolismo lipídico y de carbohidratos tras la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada

Mediante RT-qPCR se analizó el efecto de la sobreexpresión de SREBP-1a sobre la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y glucosa en el hígado de dorada.

Tabla 4.13. ANOVA de dos factores: Efecto de dieta y tratamiento con nanopartículas DNA quitosán-TTP acomplejados con el plásmido pSG5-SREBP-1a o pSG5 vacío sobre los niveles de mRNA de varios genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y lípidos en hígado de dorada. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$; NS: No significativo.

Gen	Interacción	Dieta	Tratamiento
PFKFB	NS	**	*
G6PD	NS	NS	*
GK	***	***	***
ACC1tv1	***	***	***
ACC1tv2	*	**	**
FASN	NS	NS	**
ACC2	NS	NS	***
ELOVL5	NS	*	***
FADSD6	NS	***	*
HMGCR	NS	*	**

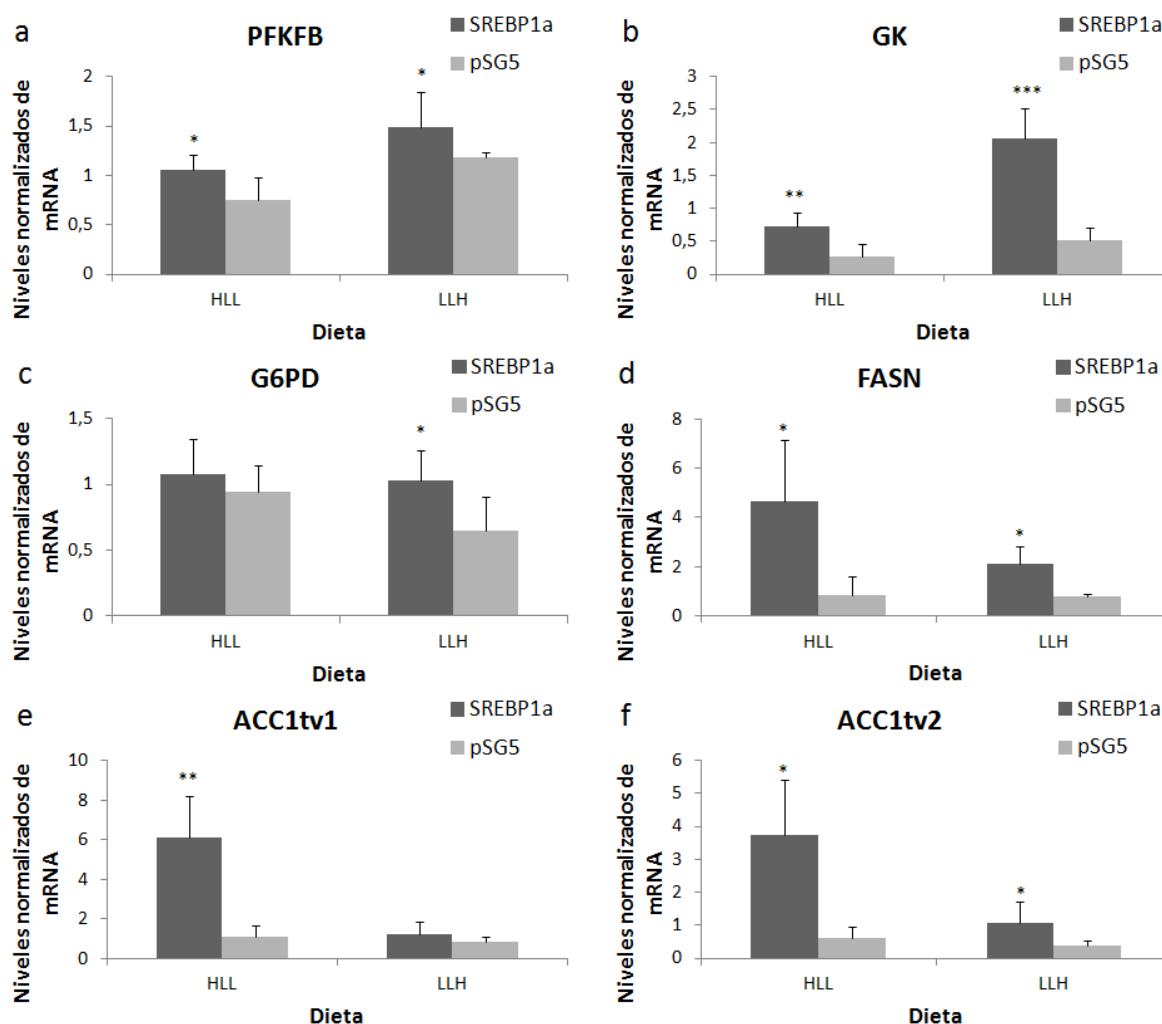
El ANOVA de dos factores indica que el tratamiento con SREBP-1a promueve cambios en la expresión de todos los genes analizados. En 7 de ellos (todos menos G6PD, FASN y ACC2), las variaciones se deben también a la dieta, mientras que en el caso de la GK, ACC1tv1, ACC1tv2 la dieta y el tratamiento interaccionan para producir el efecto observado (Tabla 4.13).

En la figura 4.30 se muestra el incremento generalizado que produce la sobreexpresión de SREBP-1a en la expresión de genes del metabolismo de lípidos y carbohidratos en hígado de dorada. A excepción de la expresión de los genes ACC1tv1 en los peces alimentados con la dieta LLH, G6PD y FADSD6 en los peces alimentados con la dieta HLL, el incremento en la expresión correspondiente al de los restantes genes presenta diferencias significativas debidas al tratamiento para ambas dietas.

Los tres genes en los que presentaron mayores incrementos en la expresión como consecuencia de la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de dorada fueron: ACC1tv2 (6,2 veces de incremento en los peces alimentados con la dieta HLL y 2,8 veces en los alimentados con la dieta LLH), ACC1tv1 (5,6 con la dieta HLL y 1,5 veces con la dieta LLH) y FASN (5,5 con la dieta HLL y 2,6 veces con la dieta LLH). Los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (así como los

genes lipídicos) también presentaron cambios tras la inyección intraperitoneal de SREBP-1a. GK, incrementó 2,8 veces en los peces alimentados con la dieta HLL y 3,9 veces en las doradas alimentadas con la dieta LLH, mientras que PFKFB incrementó 1,4 veces y 1,26 en los peces alimentados con las dietas HLL y LLH respectivamente.

Con respecto a los cambios producidos por la dieta, se observa que la expresión de los genes relacionados con el metabolismo lipídico, a excepción de los genes HMGCR y FADSD6, incrementa en los peces alimentados con la dieta HLL respecto a los peces alimentados con la dieta LLH. Sin embargo, los genes involucrados en la vía glucolítica/gluconeogénica (GK, PFKFB) presentan, como era de esperar, niveles mayores de mRNA en los peces alimentados con la dieta LLH respecto a aquellos alimentados con la dieta HLL.



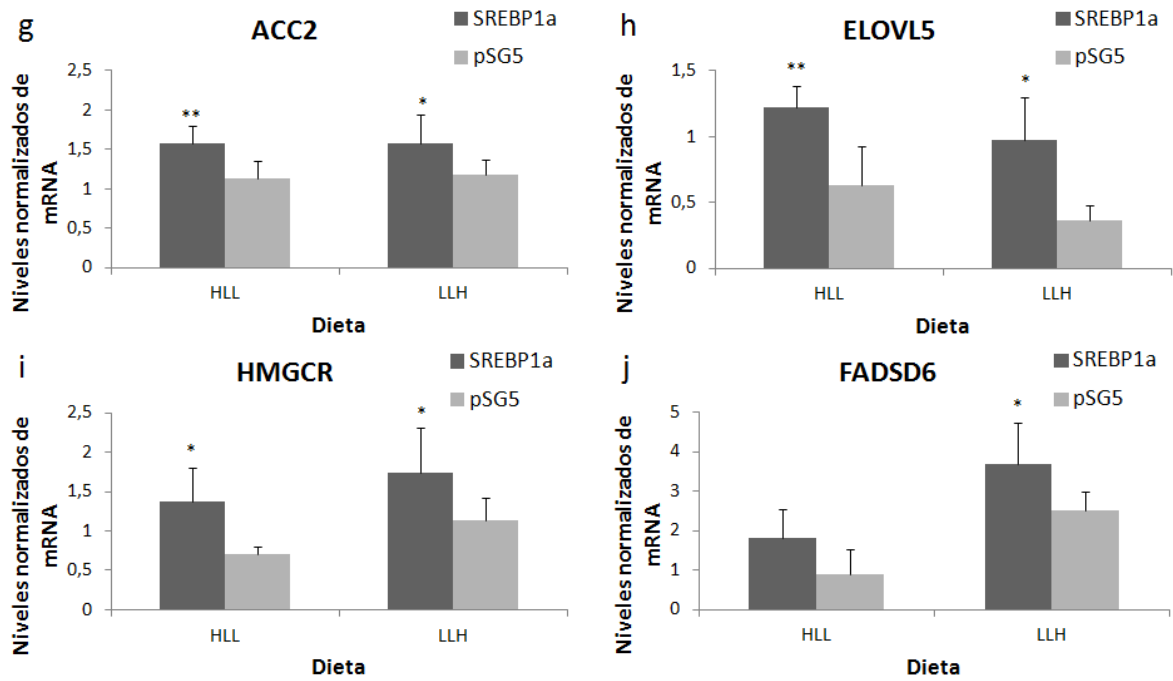


Figura 4.30. Efecto de la sobreexpresión de SREBP-1a mediante inyección intraperitoneal de nanopartículas DNA quitosán-TTP sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y carbohidratos en hígado de doradas alimentadas con la dieta HLL y LLH, 72 horas después del tratamiento. (a) PFKFB, (b) GK, (c) G6PD, (d) FASN, (e) ACC1tv1, (f) ACC1tv2, (g) ACC2 (h) ELOVL5 (i) HMGCR (j) FADSD6. Los niveles de mRNA fueron normalizados en relación a la media de los niveles del RNA ribosomal 18S, el *elongation factor 1 α* y β -Actina. Los valores se expresan como la media \pm DE (n = 6). Los asteriscos indican el nivel de significancia (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$ para prueba *t-Student*.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 TRANSCRIPTOMA DE HÍGADO Y MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA

A diferencia de los transcriptomas desarrollados hasta la fecha, en este trabajo se presenta la primera biblioteca de secuencias obtenidas por NGS originada a partir de muestras de hígado de dorada y en el que adicionalmente, para maximizar la presencia de transcritos con interés nutricional, se incorporaron muestras que provenían de peces alimentados con distintas dietas y de peces sometidos a ayuno. En el transcriptoma de hígado se obtuvo un total de 660.166 lecturas de alta calidad, con una longitud promedio de 343 pb, que sirvieron para ensamblar 389.338 secuencias. Estos valores resultaron similares a los reportados por otros trabajos en los que se describen procesos de ensamblaje por *reads* independientes para distintos tejidos o tipos de muestras (García de la Serrana *et al.*, 2012; Yúfera *et al.*, 2012; Calduch-Giner *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013), con valores que van desde los 258.102 lecturas de alta calidad en muestras del arco branquial (García de la Serrana *et al.*, 2012) a 867.856 lecturas en muestras de larvas de dorada (Yúfera *et al.*, 2012) y con una longitud de entre 290 pb en muestras de sangre y 349 pb en muestras de riñón (Calduch-Giner *et al.*, 2013).

Al comparar estos datos con el transcriptoma de músculo, utilizado en este trabajo y descrito con mayor profundidad por Sáez (2015), encontramos que en hígado el número de secuencias es superior (547.544 secuencias) pero con una longitud promedio inferior (416 pb en músculo esquelético). Estos resultados pueden servir como primera aproximación al análisis diferencial entre el transcriptoma de ambos tejidos desarrollado con mayor profundidad en este trabajo. El hígado es un órgano con mayor actividad metabólica que el músculo, por lo que sería de esperar un mayor número de secuencias en hígado que en músculo. Por otra parte, la calidad de las extracciones de RNA procedente de músculo fue ligeramente superior (Sáez, 2015), lo que podría explicar la menor longitud en las secuencias de hígado. En este sentido, debemos considerar que debido a la gran cantidad de procesos metabólicos desarrollados en el hígado, los extractos hepáticos contienen más impurezas que los de músculo esquelético, por lo que la posibilidad de degradación del RNA es mayor. Sin embargo, el hecho de haber realizado un segundo *run* en hígado nos permitió incrementar la calidad de las secuencias obtenidas, consiguiendo así un resultado de más de 450.000 secuencias únicas y escasa cantidad de secuencias repetidas.

El músculo esquelético ha sido utilizado como material de partida también en el desarrollo de transcriptomas previamente descritos para dorada. El primero de ellos es el más representativo de este tejido, ya que se realizaron 5 *runs* independientes con muestras provenientes de adultos y juveniles (alimentados, en ayuno y sometidos a distintas temperaturas), logrando ensamblar

1.157.833 secuencias con una longitud de isotigs de 454 pb (García de la Serrana *et al.*, 2012). En nuestro estudio aunque el número de secuencias que se ensamblaron para músculo esquelético fue menor, 383.320 secuencias, se generaron 10.599 *isotigs* con una longitud media superior, de 1.390 pb. En otro de los trabajos que utilizó el músculo esquelético de dorada como material de partida, se logró un ensamblaje independiente para este tejido de 314.628 secuencias correspondientes a 7.808 *contigs* con un tamaño medio de 968 pb (Calduch-Giner *et al.*, 2013), datos similares pero ligeramente inferiores a los observados en nuestro estudio.

A fin de evitar la pérdida de información relevante, incrementar la representatividad de secuencias y la calidad del ensamblaje, se obtuvo un transcriptoma híbrido integrando los *runs* de hígado y músculo esquelético. Esta metodología es utilizada también en dos de los transcriptomas de dorada desarrollados previamente, en los que *runs* independientes de muestras provenientes de distintos tejidos y diferentes condiciones fueron integrados para generar una única biblioteca de secuencias con una gran cantidad de lecturas ensambladas, 113.927 *contigs* (en el que se utilizaron adicionalmente 82.000 secuencias procedentes de las bases de datos de acceso público para el momento del ensamblaje) (Calduch-Giner *et al.*, 2013) y 580.011 posibles transcritos (Sarropoulou *et al.*, 2016). En nuestros estudios la integración de los distintos *runs* de cada tejido permitió incrementar a 1.007.795 el número de secuencias ensambladas, cantidad de secuencias superior a la suma de las secuencias ensambladas para cada tejido por separado. Así mismo, se logró incrementar la cantidad de *contigs* a 23.956, que se agruparon en 19.530 *isotigs*, que a su vez generaron 15.954 *isogrupos*. Las secuencias únicas de nuestro estudio tienen una longitud media mayor a la presentada en otros trabajos en dorada. Por ejemplo, el tamaño promedio de los *isotigs* aquí presentado fue de 1.330 pb en contraposición por lo descrito por Calduch-Giner *et al.* (2013) cuya longitud promedio de los *contigs* (no agrupados por *isotigs*) fue de 762 pb.

Así mismo, es relevante señalar que esta colección de secuencias del transcriptoma híbrido, a diferencia de las de otros proyectos, puede resultar de mayor interés para realizar estudios nutricionales de aplicación en acuicultura, debido a que en nuestro caso provienen de muestras de hígado y músculo de peces alimentados con cinco dietas que difieren en la cantidad de macronutrientes y de peces sometidos a ayuno. Por un lado el hígado es el órgano responsable de metabolizar los nutrientes procedentes de la dieta, mientras que el músculo esquelético aprovecha los nutrientes para el crecimiento.

El incremento en la información disponible en bases de datos públicas es cada vez mayor, gracias a lo cual en el presente trabajo se logró la anotación del 83 % de las secuencias únicas, mientras que trabajos previos reportan anotaciones del 24 % de *isotigs* de muestras de músculo de

dorada (García de la Serrana *et al.*, 2012), el 66 % de *contigs* (≥ 100 pb) de larva (Yúfera *et al.*, 2012), el 41 y 48 % de *contigs* (≥ 100) en vertebra y arco branquial (Vieira *et al.*, 2013) y el 51 % de *contigs* y *singletons* de distintos tejidos (Calduch-Giner *et al.*, 2013). Sin embargo, las variaciones entre los distintos estudios, no deben ser consideradas como un reflejo exacto del estado de las bases de datos en el momento de anotar los transcriptomas, ya que el tipo y longitud de secuencia ensamblada utilizada en cada estudio es distinta. Mientras algunos estudios consideran solamente los *isotigs*, otros incluyen *contigs* y hasta *singletons*, por lo que mientras más bajo sea el nivel de agrupación de las secuencias ensambladas y su tamaño (*Singletons* < *Contings* < *Isototigs*) se puede originar una sobreestimación en el proceso de anotación, ya que por ejemplo dos *singletons* distintos anotados de forma independiente pueden formar parte de un único RNA. En nuestro estudio, la sobreestimación de la proporción de secuencias anotadas es, por lo tanto, menor a la de otros trabajos (Yúfera *et al.*, 2012; Calduch-Giner *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013) en los que la anotación se realizó con *contigs* y *singletons*.

De las secuencias que componen el transcriptoma híbrido se han ensamblado 15.954 isogrupos, lo que representa alrededor de la mitad de las secuencias de proteínas esperadas para dorada, teniendo en cuenta que este pez posiblemente posea entre 25.000 y 30.000 genes (Crollius and Weissenbach, 2005; Hashiguchi *et al.*, 2007). Las anotaciones realizadas con secuencias de dorada sólo representan el 4 % del total de anotaciones. Aunque este valor no es extrapolable a la cantidad de las secuencias de dorada presentes en las bases de datos, debido a factores como la longitud el algoritmo utilizado ha podido considerar como mejor anotación la correspondiente a otra especie cercana filogenéticamente. En este sentido, se observó que la gran mayoría de secuencias anotadas se realizó por homología con especies de peces. Las tres primeras especies acumulan alrededor del 47 % de anotaciones (seguidas en cuarto lugar por *Sparus aurata*) y son *Stegates partitus*, *Larimichthys crocea* y *Neolamprologus brichardi*, de las cuales la secuencia del genoma correspondiente está disponible en el NCBI desde junio del 2014, diciembre del 2014 y enero del 2014, respectivamente (NCBI).

Los términos GO permiten caracterizar los distintos transcriptomas y así poder establecer diferencias basadas en el número de anotaciones involucradas en un determinado proceso. En líneas generales no hay grandes diferencias entre los tres ensamblajes realizados (hígado, músculo o híbrido), ya que tanto para los GO relacionados con componentes celulares, procesos biológicos o funciones moleculares, observamos un comportamiento similar entre los tres transcriptomas. Las anotaciones relacionadas con componentes celulares en su gran mayoría corresponden a los términos *intracelular* y *membrana*. En tres de los trabajos transcriptómicos realizados previamente se muestran los términos GO por componentes celulares, aunque el nivel en la representación no es

homogéneo. Como en nuestros estudios, se ha reportado previamente una mayor proporción de términos tales como *cell*, *organelle* (Yúfera *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2013), *intracellular membrane-bounded organelle* e *intracellular non-membrane-bounded organelle* (García de la Serrana *et al.*, 2012). Estos datos señalan, como era de esperar, que en la mayoría de tejidos y células, gran parte de los productos génicos estructurales están destinados a estructuras internas de la célula y la membrana celular.

En el transcriptoma híbrido de dorada, observamos que existen 4 o 5 términos que agrupan la mayoría de secuencias asociadas a procesos biológicos y funciones moleculares. En el caso de procesos biológicos, estos términos fueron: *nucleotide-containing compound metabolic process*, *gene expresión*, *transport* y *signal transduction*; mientras que para funciones moleculares encontramos: *nucleotide binding*, *hydrolase activity*, *protein binding*, *transferase activity* y *nucleic acid binding*. Solamente se pudo establecer una comparación directa entre los términos GO de funciones moleculares con los indicados en el trabajo de García de la Serrana *et al.* (2012), en el que se reporta que los mismos términos previamente mencionados acumulan la mayoría de secuencias. En el resto de los trabajos realizados con anterioridad en dorada se reportó de igual manera que de 2 a 4 términos (por ejemplo, términos GO vinculados a procesos biológicos tales como: *celular process*, *metabolic process* y *biological regulation*) suelen agrupar la mayoría de las secuencias, por lo que describen funciones básicas de la célula (Vieira *et al.*, 2013).

Sin embargo, en los trabajos donde se realizan transcriptomas específicos de tejido, es posible encontrar diferencias en la proporción de secuencias asociadas a determinadas funciones más específicas del tejido. Por ejemplo, (Vieira *et al.*, 2013) reportaron que en el transcriptoma de vértebra, el término *synapse*, que no está presente en el transcriptoma de arcos branquiales, permite establecer una clara relación con la función del tejido nervioso. En concordancia con la plasticidad y complejidad del metabolismo hepático, el transcriptoma de hígado que nosotros obtuvimos presenta mayor presencia de términos GO asociados a procesos biológicos y funciones moleculares relacionados con el metabolismo intermediario y actividad enzimática.

A pesar de que el hígado presenta una mayor capacidad metabólica que el músculo esquelético (por lo que generalmente los términos GO tienen mayor representación en hígado), se observó que algunos procesos están mejor representados en el músculo esquelético. Durante el crecimiento el músculo esquelético desarrolla una respuesta adaptativa que incluye reparación de tejidos, organización del citoesqueleto y procesos de remodelación (Calduch-Giner *et al.*, 2010), lo que explicaría el hecho de que en el transcriptoma de músculo esquelético fuera más abundantes que en hígado términos GO asociados a estos procesos biológicos y funciones moleculares. La

función principal del músculo es estructural, proceso en el que un componente principal son las proteínas, lo que permitiría entender que también estén mejor representados en este tejido términos como *protein localization* y *response to organic nitrogen*.

Al igual que con los términos GO, en la clasificación de los productos génicos mediante rutas metabólicas KEGG (Kanehisa, 1997) se observó que en el transcriptoma de hígado de dorada hay una mayor representación de vías metabólicas, lo que confirma una mayor actividad metabólica en este tejido. Entre las vías metabólicas con mayor representación en los tres transcriptomas obtenidos, encontramos la glucólisis/gluconeogénesis y la fosforilación oxidativa, dos de las principales rutas metabólicas implicadas en la generación de energía celular. La importancia relativa entre estas dos rutas en ambos tejidos es diferente. La glucólisis/gluconeogénesis presentó un 33 % más de secuencias en hígado que en músculo, lo que está en relación con el papel del hígado en el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea.

No obstante, se observó que de un total de 15 rutas relacionadas con los lípidos, 9 están mejor representadas en hígado que en músculo esquelético y sólo 2 se encontraron exclusivamente en este último tejido. El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de lípidos, donde no sólo se sintetizan y degradan, sino que además tiene un importante rol en la metabolización de los lípidos provenientes de la dieta. Es por ello que en el transcriptoma de hígado se evidenció la presencia exclusiva de las rutas de síntesis de ácidos biliares, proceso involucrado en la asimilación de lípidos de la dieta, o de síntesis de colesterol, siendo el hígado el principal órgano colesterogénico capaz de regular los niveles de colesterol a nivel sistémico (Berg *et al.*, 2008).

5.2 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y EL AYUNO SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN HÍGADO DE DORADA

Son diversos los estudios que se han llevado a cabo en peces y particularmente en dorada con el fin de establecer la composición óptima de macronutrientes en la dieta para favorecer el crecimiento somático (Fernández *et al.*, 1999; Bou *et al.*, 2014; Sáez, 2015). Uno de los objetivos de nuestro estudio fue la evaluación de parámetros metabólicos en doradas alimentadas con dietas isocalóricas que variaban en la proporción de macronutrientes (proteínas, lípidos o carbohidratos). Entre las dietas diseñadas y utilizadas en los experimentos presentados en esta tesis, la que se ajusta en mayor medida a la proporción de macronutrientes presentes en la dieta consumida por la dorada en su ambiente natural es la que denominamos HLL, que se caracteriza por ser la que presenta la mayor cantidad de proteína (incorporada como componente principal de la harina de pescado). Adicionalmente y como consecuencia de la adaptación natural de las doradas a dietas ricas en proteínas, la dieta HLL sirvió como patrón óptimo de crecimiento de las doradas, ya que de todas la

dietas estudiadas fue la que presentó valores más altos en los parámetros de crecimiento (Sáez, 2015).

Los valores de glucemia en peces carnívoros como la dorada son fuertemente afectados por la dieta. La ingesta de dietas ricas en carbohidratos promueve una hiperglucemia postprandial prolongada, cuyo comportamiento es similar a la presentada por humanos con diabetes tipo 2 (Wright *et al.*, 1998; Moon, 2001). En mamíferos, los niveles basales de glucosa se recuperan pocas horas después de la ingesta, contrastando con diversas especies de peces en los que se observan niveles elevados de glucosa de forma sostenida después de horas e incluso días (Polakof *et al.*, 2012). Los carbohidratos en la dieta de lubina y *Dentex dentex* promueven elevados niveles de glucosa hasta 16 y 18 horas después de la ingesta respectivamente (Peres and Oliva-Teles, 2002; Pérez-Jiménez *et al.*, 2015), mientras que la dorada recupera los niveles basales de glucosa en un tiempo similar al observado en lubina (Oliva-Teles, 1999). En nuestro trabajo se observó que doradas alimentadas con dietas de distinta composición de nutrientes presentan variaciones en los niveles de glucosa pasadas 24 horas de la última ingesta. Las dietas HLL y MHL son las que llevaron a que los valores de glucemia basal fueran más bajos. Estas dos dietas son las que presentan menor proporción de carbohidratos y por lo tanto no favorecieron el acúmulo de glucosa en sangre, a diferencia de los grupos alimentados con dietas de alto contenido en carbohidratos (dieta LLH), que reflejan niveles de glucemia significativamente superiores. Un efecto similar se ha reportado en trucha arcoíris, donde peces alimentados con dietas ricas en carbohidratos presentan niveles superiores de glucosa respecto a peces alimentados con dietas proteicas (Skiba-Cassy *et al.*, 2013).

Los carbohidratos de la dieta pueden ser metabolizados mediante la glucólisis y el ciclo de Krebs para la generación de energía celular o bien pueden ser almacenados como reserva energética en forma de glucógeno, principalmente en el hígado. En este sentido, si observamos alteraciones significativas en la glucosa basal como consecuencia de una mayor proporción de carbohidratos en la dieta y de la acumulación concomitante de glucosa no utilizada, cabría esperar una correlación con los valores de glucógeno hepático en los peces alimentados con las distintas dietas, tal como se ha observado previamente en lubina y dorada (Enes *et al.*, 2011). Aunque este vínculo entre glucemia basal, glucógeno hepático y niveles de carbohidratos en la dieta parece tener sentido para la mayoría de grupos analizados, en los peces alimentados con la dieta MHL no es así. A pesar de que se pudo relacionar los niveles de glucosa en suero con la cantidad de carbohidratos en la dieta, los peces alimentados con esta dieta presentaron valores de glucógeno hepático comparables con los de los peces alimentados con dietas altas en carbohidratos. Una de las características de esta dieta, es la sustitución de parte de la proteína por lípidos en mayor medida que por carbohidratos, lo cual

favorece el crecimiento (Sáez, 2015) debido a la previamente descrita predilección e importancia de los lípidos sobre los carbohidratos para la obtención de energía en peces (Tocher, 2003).

Los lípidos pueden incluso jugar un papel en el metabolismo de carbohidratos. En carpa pueden ser utilizados para la síntesis de glucosa *de novo* (Li *et al.*, 2016a), mientras que en *Dentex dentex* alimentados con mayor cantidad de lípidos a expensas de carbohidratos, se observa una menor acumulación de glucógeno hepático (Pérez-Jiménez *et al.*, 2015). En dorada observamos que los lípidos parecen promover la acumulación de glucógeno mediante la utilización de los carbohidratos de la dieta para su síntesis, ya que los lípidos podrían proporcionar la energía suficiente para el funcionamiento normal del organismo.

Los triglicéridos en el suero sanguíneo están influenciados en mayor medida por los cambios en la dieta a largo plazo y al igual que el glucógeno hepático reflejan el estado nutricional y energético del organismo. El hígado sintetiza triglicéridos como respuesta a un alto nivel energético, siendo almacenados en tejidos periféricos como el tejido adiposo, mecanismo propuesto recientemente para tilapia (He *et al.*, 2015). En peces, los triglicéridos en sangre parecen estar influenciados en mayor medida por la ingesta de proteínas (Tocher, 2003; Dai *et al.*, 2013, 2016), aunque se ha indicado que los carbohidratos pueden adicionalmente potenciar este proceso en trucha (Dai *et al.*, 2016) y *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2015). Contrariamente a los niveles de glucemia y glucógeno hepático, los niveles más elevados de triglicéridos en suero sanguíneo se observaron en los peces alimentados con la dieta de mayor contenido proteico (HLL) y en los alimentados con una dieta de contenido medio en proteína (MLH), lo que concuerda con el papel lipogénico de las proteínas de la dieta en peces.

Así mismo, los valores más bajos de triglicéridos (considerando únicamente los peces alimentados) se encontraron en las doradas alimentadas con las dietas con mayor contenido en carbohidratos, aunque los peces alimentados con la dieta MHL (que tiene niveles medios de proteína y bajos de carbohidratos) presentaron una cantidad de triglicéridos similar a la mostrada por peces alimentados con las dietas de alto contenido en carbohidratos, lo cual puede estar relacionado con el papel que juegan los lípidos (y en particular los PUFAs y el colesterol) inhibiendo el proceso lipogénico en peces (Diez *et al.*, 2007; Panserat *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016a). Sin embargo, debido al alto porcentaje de lípidos que presentaron los peces alimentados con las dietas LLH y MHL (Sáez, 2015), es posible que exista de manera adicional un proceso de acumulación en el tejido adiposo tal como se ha reportado en estudios con tilapia (He *et al.*, 2015).

Con el fin de comprender mejor los efectos de la dieta sobre los procesos fisiológicos involucrados en el metabolismo y la homeostasis energética en la dorada, se analizó la actividad de

distintas enzimas que catalizan reacciones de diferentes vías del metabolismo intermediario. En líneas generales los niveles de actividad siguen un patrón similar a lo descrito anteriormente para el efecto de la composición de la dieta en la dorada (Metón *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*, 2007; Anemaet *et al.*, 2008; González *et al.*, 2016). Las transaminasas AST y ALT juegan un papel fundamental en la utilización de aminoácidos para la generación de energía en peces, produciendo esqueletos de carbono capaces de entrar al ciclo de Krebs. Es por ello que peces alimentados con alto contenido proteico suelen presentar niveles hepáticos elevados de actividad para estas enzimas (Metón *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*, 2007; Anemaet *et al.*, 2008; González *et al.*, 2016), en concordancia con los datos aquí presentados. No obstante, los peces alimentados con la dieta con mayor contenido en carbohidratos (LLH) presentaron niveles similares de actividad las doradas alimentadas con dietas de bajo o medio contenido en carbohidratos (MHL y LHH).

Los procesos vinculados con la degradación y homeostasis de la glucosa son de importancia vital para el organismo. Debido a la poca capacidad que tienen los peces para metabolizar los carbohidratos en la dieta y regular la glucosa sanguínea, estos procesos han sido objeto de un intenso estudio (Metón *et al.*, 1999a, 1999b, 2003, 2004; Caseras *et al.*, 2002; Hemre *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2007; Pérez-Jiménez *et al.*, 2015). Los datos que observamos corroboran lo anteriormente descrito con respecto a los niveles de actividad de enzimas glucolíticas como la GK, la PFK-1 y la PK, cuyos niveles de actividad en el hígado de dorada están relacionados con el contenido de carbohidratos en la dieta (Metón *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*, 2007; Enes *et al.*, 2008a, 2008b, 2009; González *et al.*, 2016).

De estas enzimas, la que parece presentar una regulación más acorde con los niveles de carbohidratos en la dieta es la GK, ya que se observaron más diferencias significativas entre los grupos de peces alimentados con diferentes dietas y se constató el patrón de disminución de la actividad conforme disminuye la proporción de carbohidratos en la dieta. Esta observación concuerda con la fuerte dependencia de la glucosa observada en los niveles de actividad y expresión de GK reportado previamente en dorada (Enes *et al.*, 2008b; Bou *et al.*, 2014). De hecho, la dieta HLL, que presenta la menor incorporación de carbohidratos y es rica en proteínas, promovió valores similares de actividad GK a los observados en peces sometidos a ayuno.

Al evaluar los niveles de actividad de las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato (G6PD y 6PGD), se observa un comportamiento similar al observado en los triglicéridos en suero. Cabe señalar que estas enzimas contribuyen en la síntesis de ácidos grasos mediante la generación del NADPH necesario en este proceso. Los mayores niveles de actividad de 6PGD y G6PD se encontraron en los peces que recibieron las dietas MLH, lo que sugiere que ante una presencia limitada de lípidos en la

dieta, los carbohidratos pueden ser derivados hacia rutas lipogénicas para suplir dicha deficiencia nutricional.

De manera similar a lo observado previamente en peces (Metón *et al.*, 1999b, 2003; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012; Skiba-Cassy *et al.*, 2013) tras un período de ayuno de 23 días los valores correspondientes a los metabolitos sanguíneos y al glucógeno hepático disminuyeron de manera significativa, lo que es indicativo de la disminución de reservas energéticas del organismo. En condiciones de ayuno prolongado el organismo adapta su metabolismo para la preservación de la vida, por lo que ante la ausencia de nutrientes, es de esperar que las enzimas encargadas de su metabolización estén inhibidas a fin de favorecer otros procesos que permitan mantener la homeostasis de metabolitos esenciales. En este sentido, las actividades enzimáticas evaluadas, a excepción de la GDH y FBPasa, presentaron niveles más bajos en peces ayunados con respecto a los peces alimentados, por lo que ante estas condiciones la vía glucolítica, la ruta de las pentosas fosfato y la transaminación de aminoácidos se encontrarían disminuídas. Entre los peces alimentados la actividad GDH también presentó variaciones ligeras como consecuencia de la dieta suministrada. Es de resaltar que esta enzima presentó valores de actividad muy superiores en los peces sometidos a ayuno, como se ha observado en *Danio rerio*, en donde se produce un incremento sostenido en la expresión de esta enzima conforme transcurre el tiempo de ayuno (Tian *et al.*, 2015), y en *Dentex dentex* donde se constata un incremento en los niveles de actividad GDH (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012). Este hecho puede estar relacionado con la necesidad de utilización de los aminoácidos de las proteínas endógenas, provenientes de los tejidos del organismo, como recurso para mantener la vida en situaciones de ayuno prolongado.

Así mismo, aunque la glucosa no es el sustrato principal para la obtención de energía en animales carnívoros, es un metabolito esencial para distintos procesos y fuente primordial de energía de órganos esenciales como el cerebro (Berg *et al.*, 2008), por lo que el mantenimiento de la glucemia es un proceso de vital importancia para la preservación de la vida. Es por ello que enzimas de la vía gluconeogénica, como la FBPasa, son importantes debido a que permiten la síntesis de glucosa y su liberación a la circulación sistémica. Es de destacar, que los peces sometidos a ayuno presentaron el valor de actividad enzimática más elevado, lo que está en concordancia con la necesidad de preservar los niveles de glucosa sistémicos y con observaciones similares realizadas previamente (Metón *et al.*, 1999b, 2003; Tian *et al.*, 2015). Por otro lado, los peces alimentados con la dieta HLL (alto contenido en proteínas pero bajo en lípidos y carbohidratos), presentaron un valor de actividad FBP intermedio entre los correspondientes a peces en ayuno y los de los peces alimentados. La poca capacidad que tienen los carbohidratos para modular los niveles de actividad de esta enzima en peces ha sido ampliamente reportada (Metón *et al.*, 1999b; Fernández *et al.*,

2007; Moreira *et al.*, 2008), sin embargo los valores de actividad FBPasa fueron elevados en doradas alimentadas con dietas con mayor contenido en proteínas (Enes *et al.*, 2008a), sugiriendo que las proteínas en la dieta juegan un papel de mayor relevancia en la producción de glucosa en el hígado que los carbohidratos.

5.3 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y EL AYUNO SOBRE EL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE DORADA

De las dietas evaluadas se seleccionaron las tres (HLL, MHL, LLH) que contenían la máxima incorporación de alguno de los macronutrientes con la finalidad de evaluar las variaciones en la expresión génica mediante el uso de *microarrays* de oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias únicas del transcriptoma híbrido.

La expresión diferencial de genes entre peces en ayuno y los alimentados permitió establecer que estos últimos presentan una expresión mayor de genes relacionados con la homeostasis de hierro (*hepcidin*, *heme oxigenase*, *hemoglobin*), el metabolismo energético (enzimas del metabolismo lipídico), proliferación celular y estrés (antígeno nuclear de proliferación celular, histonas y receptores de hormona de crecimiento) e inmunidad innata (lectinas, componentes del complemento). Estos cambios transcriptómicos son similares a los observados en salmones transgénicos que expresan la hormona de crecimiento y que fueron evaluados mediante la tecnología de *microarrays* (Rise *et al.*, 2006), lo que indicaría una relación directa entre los cambios metabólicos sistémicos producto del ayuno prolongado en dorada y una respuesta inhibitoria del crecimiento del organismo.

Las diferencias observadas en cuanto a número de secuencias expresadas diferencialmente están en concordancia con lo discutido anteriormente en cuanto a metabolitos y actividades enzimáticas, ya que las dietas MHL y LLH no difieren significativamente entre sí. Por otro lado, estas dos dietas presentan un número importante de genes expresados diferencialmente con respecto a la dieta HLL. Dicha diferencia incrementa conforme disminuye la incorporación de proteínas en la dieta (183 genes expresados diferencialmente entre las dietas HLL y MHL vs 249 genes entre las dietas HLL y LLH). Así mismo, si se compara la expresión diferencial de genes entre los peces alimentados con las diferentes dietas, es de resaltar que la dieta HLL promovió un número mayor de genes expresados diferencialmente respecto a otras dietas. Todas estas observaciones confirman el importante papel que tienen las proteínas de la dieta en peces carnívoros.

Es sabido que en dorada las proteínas de la dieta inducen cambios metabólicos importantes, entre los que destacan procesos relacionados con la proliferación celular, el crecimiento y síntesis

(Sáez, 2015), lo que puede explicar parte de las diferencias existentes entre los mapas GO de los peces alimentados con las distintas dietas. En este sentido, se observó la presencia de términos como *procesos biosintéticos*, *unión a ácidos nucleicos* y *núcleo* en los genes sobreexpresados en los peces alimentados con la dieta HLL respecto a los alimentados con las dietas MHL y LLH. Genes como PCNA y PRIM1 están involucrados en la síntesis del DNA y se encuentran infraexpresados en los peces alimentados con las dietas de menor contenido proteico (MHL y LLH). Así mismo, encontramos que la lipogénesis es uno de los procesos más afectados por la composición de la dieta, ya que una amplia proporción de genes del metabolismo lipídico mostraron una marcada sobreexpresión en los peces alimentados con la dieta con mayor contenido en proteínas.

Sin embargo, en los peces alimentados con la dieta con menor contenido proteico se observa la sobreexpresión de genes relacionados con términos de la regulación de procesos celulares. En este sentido destaca el oncogen PIM2, que se observó sobreexpresado tanto en los peces alimentados con la dieta de alto contenido en carbohidratos como en los alimentados con alto contenido en lípidos. PIM2 juega un papel central en la regulación del ciclo celular manteniendo la célula en la fase G1 del ciclo e incluso promoviendo la apoptosis (Levy *et al.*, 2012). Sin embargo, la función de este oncogen no está limitada exclusivamente a la regulación del ciclo celular, ya que desempeña un papel en el control bioenergético de la célula y particularmente en la promoción de la glucólisis (Hammerman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015), por lo que harían falta estudios más específicos para dilucidar el rol de PIM2 y su regulación nutricional en dorada.

La ubiquitinización ocurre normalmente en la célula con la finalidad primordial de degradar las proteínas. Se ha descrito su implicación en otros procesos, tales como la respuesta inmune, endocitosis, transducción de señales y reparación del DNA. Sin embargo, es de resaltar la vinculación de la ubiquitina a autofagia selectiva, en donde promueve la degradación de componentes celulares de manera específica (Kirkin *et al.*, 2009). Los datos de nuestros *microarrays* indicaron que los peces alimentados con la dieta con alto contenido en carbohidratos sobreexpresan genes vinculados con la ubiquitinización (TRIM39, TRIM21, USP18 y CBX4), dos de los cuales también están sobreexpresados en los peces alimentados con la dieta con alto contenido en lípidos (USP18 y CBX4). Estos resultados podrían indicar que la ubiquitinización pudiese favorecer en hígado el reciclaje de aminoácidos en un contexto con baja disponibilidad de aminoácidos en la dieta.

Otra evidencia que apoyaría esta hipótesis es la presencia del término *procesos metabólicos de proteínas* en los genes sobreexpresados en los peces en ayuno. En este sentido, se encontró una marcada sobreexpresión de 6 genes involucrados en la degradación de aminoácidos en los peces sometidos a ayuno: la glutaminasa hepática (GLS2), la prolina deshidrogenasa (PRODH), la treonina

deshidrogenasa (TDH), la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH) y dos arginasas (ARG2 y ARG2A). La degradación de aminoácidos genera cetoácidos que sirven de sustrato del ciclo de Krebs para la formación de energía. En trabajos recientes con cultivos celulares se ha vinculado la degradación de aminoácidos con la sobreexpresión de genes del ciclo de Krebs, como la citrato sintasa y la aconitasa 2, y con un incremento en la fosforilación oxidativa (Johnson *et al.*, 2014). De manera similar, observamos en dorada la sobreexpresión de la isocitrato deshidrogenasa (IDH2) y la aconitato hidratasa (ACO2) en situación de ayuno. Así mismo, los productos de las enzimas GLS2 y PRODH entran al ciclo de Krebs en forma de α -cetoglutarato mediante la desaminación del glutamato por la acción de la GDH. Estos datos sugieren una relación entre un incremento marcado de actividad GDH hepática en los peces en ayuno y la generación de energía hepática mediante la degradación de proteínas y activación del ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

Tres evidencias soportan esta hipótesis: 1) que la degradación de proteínas en los peces carnívoros para obtener energía es un proceso metabólico relevante en peces alimentados; 2) que en el músculo esquelético de peces bajo estas mismas condiciones no se observó incremento en la actividad GDH (Sáez, 2015); y 3) la marcada sobreexpresión de genes implicados en la degradación de aminoácidos en hígado de doradas bajo ayunos prolongados. El papel de los procesos de degradación de proteínas en los peces en ayuno no solamente puede ser importante en la obtención de energía celular mediante la incorporación de sustratos al ciclo de Krebs en peces en ayuno prolongado, sino que puede colaborar a la obtención de esqueletos carbonados que sirvan en la síntesis hepática de otros compuestos esenciales (como la glucosa) que son exportados hacia otros tejidos.

Uno de los términos GO de componentes celulares que destacó entre los genes sobreexpresados en peces sometidos a ayuno fue el referente a complejos catalíticos, como parte de complejos macromoleculares. Esta categoría incluye las proteínas de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa, proceso que juega un papel importante en la generación de energía celular y en el que participan un importante número de genes tanto nucleares como mitocondriales. Entre dichos genes se observó 5 proteínas con una muy elevada sobreexpresión en el hígado de los peces en ayuno (COX6A2, COX5B, CYS, COQ10 y COX412). A fin de profundizar en este proceso de vital importancia en la generación de energía celular, y que ha sido vinculado a la degradación de proteínas (Johnson *et al.*, 2014), se decidió realizar una búsqueda sistemática de los diferentes genes involucrados en este proceso presentes en el transcriptoma híbrido de dorada y comparar su regulación transcripcional en hígado y músculo de dorada por el ayuno y la composición de la dieta.

El análisis mediante *microarrays* y la validación mediante RT-qPCR confirman que son varios los genes implicados en la fosforilación oxidativa en el hígado de dorada que presentan un marcado incremento como consecuencia del ayuno prolongado (13 genes con $FC \geq 2$ y $P_{adj} < 0,05$). De manera similar, estudios en rata señalan que el ayuno incrementa el consumo de oxígeno en el hígado (Matsumura and Thurman, 1983), mientras que en hígado de ratón y fibroblastos humanos incrementa la actividad del complejo IV o COX (Casas *et al.*, 2000; Marini *et al.*, 2016). De hecho, el complejo IV cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua, último paso de la cadena de transporte de electrones y el limitante de este proceso (Kadenbach, 2003; Hüttemann *et al.*, 2012). Es de resaltar que la mayoría de los genes de la fosforilación oxidativa que presentaron una marcada sobreexpresión en ayuno pertenecen a este complejo, incluyendo su sustrato (CYS). Entre de los genes del complejo IV, COX6A2 y COX5B fueron los más sensibles a la falta de alimento, por lo que pueden ser relevantes en la regulación de la fosforilación oxidativa en hígado de dorada y en particular en la actividad del complejo IV. En este sentido, se ha descrito que la expresión de COX5B, que incrementa la actividad del complejo IV (Waterland *et al.*, 1991), es inhibida por la glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Hodge *et al.*, 1990), mientras que ratones doble *knockout* para COX6A2 son más sensibles ante la falta de alimento y pierden más peso en ayuno que ratones control (Quintens *et al.*, 2013).

En hígado de doradas sometidas a ayuno no sólo se encontraron sobreexpresados representantes del complejo IV sobreexpresados, sino que también destaca la marcada expresión de las proteínas CYCS, COQ10 y SLC25A6, también involucradas en la fosforilación oxidativa. Consistentemente con la marcada sobreexpresión del complejo IV, los niveles de mRNA de CYCS, transportador de electrones entre los complejos III y IV, están también incrementados. COQ10 es una proteína mitocondrial que se une a una región hidrofóbica de la ubiquinona (Murai *et al.*, 2014). Su delección causa deficiencia respiratoria disminuyendo la habilidad de oxidar NADH y succinato, mientras que su sobreexpresión restaura el transporte de electrones en la cadena respiratoria en levadura (Barros *et al.*, 2005; Cui and Kawamukai, 2009; Allan *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2016), por lo que COQ10 parece tener un papel importante en el transporte de la ubiquinona a la cadena de transporte de electrones. Por otra parte, SLC25A6 es una ADP/ATP translocasa perteneciente a una familia de proteínas integrales de membrana esenciales en la generación de energía celular acoplando la fosforilación oxidativa con el intercambio de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interna.

En músculo esquelético, la regulación de la expresión de genes de la fosforilación oxidativa como consecuencia del ayuno prolongado, mostró una tendencia a la sobreexpresión, aunque con menor intensidad que lo observado en hígado (ningún gen presentó $FC > 4$). Además, se observó un

número importante de genes infraexpresados de manera significativa, a diferencia de lo observado en hígado. Estas diferencias indican que ante ayunos prolongados, la regulación de la fosforilación oxidativa en ambos tejidos está sometida a un control diferencial debido a los distintos requerimientos tisulares.

Por otra parte, el papel de la composición de la dieta parece tener mayor importancia en el músculo esquelético que en el hígado, aún cuando previamente se ha descrito que en trucha arcoíris la sustitución parcial de proteína y lípidos por almidón en la dieta provoca un incremento de genes de la fosforilación oxidativa (Cláudia Figueiredo-Silva *et al.*, 2012). Del mapa jerárquico mostrado en la figura 4.22, se desprende que la dieta con alto contenido en proteínas promueve una mayor intensidad en la infraexpresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa que las otras dos dietas. Este efecto es particularmente notable en los genes CYCS, SLC25A6, ATP5IB y SLC25A5. Por otro lado, la expresión incrementada del complejo IV, limitante de la cadena respiratoria, en los peces alimentados con la dieta LLH podría indicar una fosforilación oxidativa incrementada en el músculo esquelético como consecuencia de la incorporación de carbohidratos en la dieta.

La respuesta diferencial en la expresión de genes de la fosforilación oxidativa en dorada ante situaciones de ayuno ha sido estudiada previamente en hígado, músculo esquelético y músculo cardíaco de dorada (Bermejo-Nogales *et al.*, 2015). Los autores encontraron que los genes de la fosforilación oxidativa están infraexpresados tras un ayuno de 10 días en hígado, mientras que en músculo esquelético están sobreexpresados, aunque con un FC < 2 en la mayoría de los casos. Las diferencias observadas respecto a nuestros datos pueden explicarse por los diferentes períodos de ayuno evaluados (10 días *versus* 23 días en el presente estudio). Muchas especies de peces están adaptadas a largos períodos de ayuno durante su ciclo vital para afrontar eventos como la migración, reproducción y disponibilidad de alimentos (Day *et al.*, 2014). Así, en dorada la adaptación metabólica al ayuno a largo plazo incluye el agotamiento gradual del glucógeno hepático, requiriéndose más de 18 días para observar niveles apenas detectables (Metón *et al.*, 1999b, 2003). Por lo tanto, ante ayunos prolongados la activación de la fosforilación oxidativa en el hígado de dorada podría tener mayor importancia que en el músculo esquelético debido a que puede estar vinculada a necesidades más intensas de energía y requerimientos tales como la síntesis de glucosa, cuerpos cetónicos o algunos lípidos debido al agotamiento de las reservas de glucógeno del organismo.

Algunos estudios sugieren que ante situaciones que representen estrés para el organismo, uno de los posibles mecanismos de defensa para disminuir los efectos adversos de agentes nocivos para la célula, como las especies reactivas del oxígeno, sería la disminución de la expresión de la

expresión de genes mitocondriales, como los de la fosforilación oxidativa y particularmente el complejo IV (Srinivasan and Avadhani, 2012). Sin embargo, nuestros datos sugieren que frente a un ayuno prolongado, éste no sería el mecanismo utilizado por la dorada para sortear el estrés celular, sino que en el hígado predominaría la necesidad de generar energía (o incluso de sintetizar metabolitos esenciales), razón por la que la actividad del complejo IV hepático se incrementaría aún a expensas de poder contribuir al estado de estrés generalizado que produce el ayuno.

Posiblemente, la maquinaria celular podría activar otros sistemas para paliar el estrés celular generado por el ayuno. En este sentido, cabe destacar la marcada sobreexpresión de varias proteínas transportadoras que observamos en los peces en ayuno frente a los peces alimentados, entre las cuales se encuentra la proteína ABCG2. ABCG2 juega un papel crucial en la detoxificación celular y el daño producido por el estrés oxidativo, incluyendo la excreción de porfirinas relacionadas con la cadena respiratoria (Kubota *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). La sobreexpresión de este transportador podría mitigar parte de los efectos producidos por el estrés debido a la liberación de porfirinas desde las mitocondrias al citosol. Así mismo, es de destacar que este gen también presentó variaciones en la expresión, tanto en hígado como en músculo entre los peces alimentados con dietas de distinta composición de macronutrientes. Esto podría estar relacionado con datos previos que vinculan el incremento de ABCG2 en hígado de ratones con procesos de detoxificación de diversos compuestos de origen vegetal (Jonker *et al.*, 2002), tal como podría estar ocurriendo en este caso con la dieta de mayor contenido en carbohidratos, cuyo origen es principalmente vegetal. Aunque se requiere profundizar en los mecanismos de detoxificación celular en dorada y, en particular, el papel que juega ABCG2, nuestros resultados sugieren que este gen es un posible biomarcador de estrés nutricional.

5.4 REGULACIÓN NUTRICIONAL DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN HÍGADO DE DORADA

El metabolismo de lípidos, y en particular su síntesis, fue uno de los procesos metabólicos en el que se observaron mayores diferencias en la expresión de genes hepáticos como consecuencia del estado nutricional, tanto en los peces en ayuno respecto a los alimentados, como entre los peces alimentados con dietas de distinta composición de macronutrientes. Por esta razón se decidió profundizar y analizar en detalle este proceso, que interviene no sólo en el metabolismo energético sino en otras funciones importantes del organismo. Una de las principales funciones de los lípidos en el organismo es la de servir como reserva energética, por lo que en ayuno se promueve la catálisis de lípidos como fuente energética (Berg *et al.*, 2008), mientras que la lipogénesis disminuye a fin de ahorrar energía. Esta observación concuerda con los patrones de expresión de genes del metabolismo de lípidos, en el que 2 *clusters* de genes sobreexpresados en los peces alimentados

albergan la práctica totalidad de genes implicados en síntesis de ácidos grasos y colesterol (21 de 25 genes). Por el contrario, sólo unos pocos genes implicados en la catálisis de lípidos mostraron sobreexpresión durante el ayuno en hígado. Esto sugiere que, en el ayuno prolongado parece tener mayor importancia la inhibición de la lipogénesis que la activación de la catálisis para obtener energía. Nuestros resultados, concuerdan con lo observado previamente no sólo en dorada (Benedito-Palos *et al.*, 2014), sino también en otras especies de peces (Drew *et al.*, 2008). De hecho, la ruta anabólica de lípidos es una ruta de mucha demanda energética, por lo que el organismo priorizaría el ahorro energético como mecanismo primario de supervivencia.

La síntesis de ácidos grasos es uno de los procesos de síntesis de lípidos mejor estudiados en peces a nivel transcripcional, de cuya principal enzima limitante de la vía, la ACC, parcialmente clonada de dorada previamente por nuestro grupo (Caballero-Solares *et al.*, 2015), se conocen secuencias correspondientes a tres isoformas (dos sintéticas y una reguladora), que fueron incluidas en el diseño de los *microarrays*. Los peces alimentados presentan una mayor expresión que los peces en ayuno en las tres isoformas. No obstante, parece que el efecto de la dieta resulta ser más pronunciado sobre la isoforma ACC1tv2, por lo que es posible que esta isoforma sea preponderante en la regulación nutricional de la síntesis de ácidos grasos en los peces alimentados y particularmente en el papel lipogénico de las proteínas sobre los carbohidratos y los lípidos. De manera consistente con nuestros resultados, estudios en pez cebra reportaron una disminución de ACC1 en peces alimentados con dietas en las que se sustituye de manera parcial las proteínas por los carbohidratos (Seilliez *et al.*, 2013).

En el análisis de *microarrays* la expresión del complejo multiproteico encargado de la síntesis de ácidos grasos (FASN) presentó incrementos significativos en los peces alimentados con las dietas HLL/LLH respecto a los peces ayunados (FC 6,82 y 2,38 respectivamente), así como en los peces alimentados con la dieta HLL respecto a los peces alimentados con la dieta MHL (FC = 5,76). Mediante RT-qPCR, se pudo verificar que entre los peces alimentados, el grupo alimentado con alto contenido en lípidos fue el que presentó menor expresión de FASN, lo que indicaría que los lípidos en la dieta y en particular algunas especies de PUFAs, provenientes en su mayoría de aceites de pescado, podrían inhibir la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, efecto ampliamente descrito en mamíferos así como en otras especies de peces (Panserat *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016a; Véron *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2017).

La síntesis de ácidos grasos requiere NADPH, el cual puede ser aportado por enzimas como la G6PD y la 6PGD, cuyos niveles de actividad fueron mayores en hígado de peces alimentados, que consistentemente presentaron mayor contenido de triglicéridos sanguíneos. Sin embargo, los datos

de expresión indican que la enzima ALDH1L1 podría tener también relevancia en la generación de NADPH para la síntesis de ácidos grasos, ya que sus niveles de expresión mostraron una marcada sobreexpresión en los peces alimentados respecto a los peces ayunados. Al igual que las otras enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, este gen presentó una mayor expresión en los peces alimentados con la dieta HLL respecto a los peces alimentados con las otras dietas, lo que corrobora y concuerda con el efecto lipogénico de las proteínas descrito previamente en peces (Dai *et al.*, 2016).

Entre los procesos de síntesis de lípidos observamos que el ahorro energético en los peces en ayuno cobra particular relevancia en procesos relacionados con la formación de moléculas de mayor complejidad, ya que el proceso de formación de PUFAs mediante elongación y desaturación concentró los genes que mostraron mayores cambios en los niveles de expresión (ELOVL5, ELOVL6 y SCD-X1). En la elongación de ácidos grasos intervienen distintas enzimas, siendo fundamentales las ELOVL, las cuales producen distintas especies de PUFAs (Jakobsson *et al.*, 2006). En mamíferos se han descrito 7 ELOVL (Jakobsson *et al.*, 2006), de las cuales en dorada hasta la fecha sólo se conocen 5: ELOVL5 (Agaba *et al.*, 2004), ELOVL1b, ELOVL4, ELOVL6 y ELOVL7 (Benedito-Palos *et al.*, 2014). Son pocos los estudios nutricionales llevados a cabo en peces que hayan intentado dilucidar la regulación de estas enzimas, enfocándose la mayoría de ellos a la fuente lipídica de la dieta y las diferentes especies de PUFAs presentes en los tejidos (Tocher *et al.*, 2003; Diez *et al.*, 2007; Morais *et al.*, 2011; Van Hoestenbergh *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2017). Sin embargo, el trabajo llevado a cabo por Benedito-Palos *et al.* (2014) describió el efecto de un ayuno de 10 días sobre las elongasas descritas en dorada, mostrando que ELOVL5, ELOVL4 y ELOVL6 presentan una importante disminución en los niveles de expresión en hígado en comparación con peces alimentados. Estos resultados son similares a los cambios descritos en el presente estudio entre los peces alimentados y los peces bajo ayuno prolongado para ELOVL5 y ELOVL6, aunque no fue el caso para la ELOVL4, que se mostró sobreexpresada en los peces en ayuno.

De las ELOVLs estudiadas en este trabajo, ELOVL4 es la que menor nivel de expresión presenta en el hígado de dorada (Benedito-Palos *et al.*, 2014), aún cuando datos reportados en *Rachycentron canadum* parecen indicar que esta enzima podría ser fundamental para el mantenimiento de ciertos ácidos grasos, como el ácido docohexanoico, de vital importancia para tejidos nerviosos (Monroig *et al.*, 2011), y podría servir para compensar parcialmente la ausencia de ELOVL2 en especies de peces marinos (Monroig *et al.*, 2011, 2012). Esto podría explicar que bajo ayuno prolongado ELOVL4 vea incrementada su expresión en el hígado, aún cuando la vía lipogénica esté fuertemente inhibida debido a la necesidad de mantener los niveles de ciertos ácidos grasos importantes para el organismo. Consistentemente, observamos que otra enzima lipogénica

aumentada en el ayuno es la HACD3, que cataliza el tercer paso de la ruta de elongación de ácidos grasos, reacción en la que se deshidrata 3-hidroxiacil-CoA para formar trans-2,3-enoil-CoA.

En la formación de PUFAs, la incorporación de dobles enlaces en los ácidos grasos también está regulada por el estado nutricional en distintas especies de peces (Panserat *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2011, 2012; Benedito-Palos *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016b) y nuestros datos apuntan en esa misma dirección. En nuestros estudios, el ayuno prolongado produce una reducción de los niveles de expresión de SCD, SCD-X1 y FADSD6 en hígado de dorada similar a lo reportado en trabajos anteriores (Benedito-Palos *et al.*, 2014). Sin embargo, la regulación como consecuencia de la composición de la dieta parece seguir un patrón diferente. Al igual que el resto de genes lipogénicos, los valores de expresión en cada una de estas enzimas son superiores en los peces alimentados con la dieta de alto contenido proteico, mientras que el contenido lipídico de la dieta parece ser el segundo factor de relevancia en la regulación transcripcional de estos genes. FADSD6 y SCD están agrupados de acuerdo a su nivel de expresión en el mapa jerárquico mostrado en la figura 4.24, presentando niveles de expresión menores en los peces alimentados con la dieta de alto contenido lipídico. La presencia de lípidos en la dieta podría estar inhibiendo estas rutas. Por otro lado, la enzima SCD-X1 presenta mayor nivel de actividad en los peces alimentados con alto contenido lipídico en comparación con los alimentados con alto contenido en carbohidratos, siguiendo un patrón de regulación similar a la ELOVL5. SCD-X1 y ELOVL5 son reguladas a nivel transcripcional de manera similar, posiblemente por la presencia de los sustratos necesarios para su actividad. Estas observaciones estarían en concordancia con el papel regulador de la fuente de lípidos y la presencia de ciertos ácidos grasos, como el docohexanoico, en la vía de producción de ácidos grasos insaturados en distintas especies de peces (Leaver *et al.*, 2008; Monroig *et al.*, 2011; Morais *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016b; Véron *et al.*, 2016).

La generación de glicerolípidos (mono, di y triglicéridos) fue otra de las rutas que presentó cambios importantes en los niveles de expresión génica como consecuencia del estado nutricional. El primer paso de este proceso es llevado a cabo por la enzima GPAT3, que cataliza la unión de un ácido graso a la posición sn-1 del glicerol-3-fosfato (aunque también es capaz de formar diglicéridos mediante la unión de un ácido graso a la posición sn-2). El incremento de la expresión de GPAT3 observado en hígado de doradas alimentadas estaría en concordancia con el incremento de la síntesis de ácidos grasos producido por la alimentación. La enzima MOGAT2 participa también en la formación de diglicéridos mediante la adición de un ácido graso a un 2-monoacilglicerol y, como con GPAT3, observamos una mayor expresión en los peces alimentados frente a los peces en ayuno. Sin embargo, las enzimas AGPAT3 y DGAT1, que sintetizan pasos sucesivos formando ácido fosfatídico y triglicéridos (Dircks Lori, 1999), respectivamente, presentaron un incremento en la expresión en los

peces ayunados respecto a todos los grupos de peces alimentados. Esto podría ser debido a un mecanismo adaptativo con el fin de mantener niveles mínimos de di y triglicéridos sistémicos. Estudios en salmón indican la importancia del ácido fosfatídico como mensajero celular y establecieron diferencias en la expresión de AGPAT entre distintas familias de peces que varían en el fenotipo de acumulación de grasa (Morais *et al.*, 2011). Debido al notable incremento de DGAT1 en los peces ayunados, no podemos descartar que este gen se encuentre mediando otros procesos celulares en el hígado, como reportan trabajos anteriores y en los que la silenciación de este gen en células hepáticas en cultivo produce altos niveles de factores de crecimiento y mayores tasas de proliferación, que asemejan un estado indiferenciado (Chang *et al.*, 2016).

Los procesos catalíticos que conducen a la degradación de lípidos no parecen estar tan marcadamente influenciados por el estado nutricional del organismo, como si parece ocurrir con la lipogénesis. Sin embargo, se observó que los peces ayunados presentaron diferencias en la expresión de genes relacionados con la digestión de triglicéridos, sobreexpresando dos isoformas de PNPLA2, que cataliza el paso inicial en la degradación de triglicéridos. También se observó la infraexpresión de un gen que inhibe este proceso, PNLIPRP1. Por otra parte, la LIPC presentó un incremento en su expresión en los peces alimentados, lo que es consistente con la función metabólica que desempeña en el hígado, la degradación de triglicéridos presentes en remanentes de quilomicrones y LDLs. En este sentido, nuestros datos complementan la información proporcionada por Benedito-Palos *et al.* (2014), en la que se indicó un incremento de la expresión de la *adipose triglyceride lipase* en hígado de peces sometidos a ayuno y se confirmó la sobreexpresión de LIPC en peces alimentados.

La digestión de triglicéridos es seguida por la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. En nuestros estudios, en contraste con lo observado en trabajos previos (Benedito-Palos *et al.*, 2014), encontramos que la expresión de CPT1B, al contrario de la de CPT1A, está fuertemente regulada por el ayuno en hígado de dorada. En concordancia con un incremento en los niveles de expresión de CPT1B observamos un incremento de expresión del transportador de carnitina/acílcarnitina SLC25A20, necesario para que los ácidos grasos activados por esta enzima puedan entrar a la matriz mitocondrial para ser degradados. Una vez en la matriz mitocondrial, continúa el proceso de oxidación, para el que se observó un incremento en la expresión de las enzimas HADH y HADHA similar a lo descrito previamente (Benedito-Palos *et al.*, 2014). Sin embargo, el gen CRYL1, que pertenece también a la familia de las hidroxiacil-CoA hidroxilasas y con una función similar en hígado de humanos (Chen *et al.*, 2003), presenta una regulación completamente distinta a las otras hidroxilasas descritas en dorada, por lo que esta enzima podría estar jugando una función diferenciada en esta especie.

En paralelo a la β -oxidación de ácidos grasos, la α -oxidación es un proceso que permite la degradación inicial en el peroxisoma de moléculas de cadena larga, PUFAs, o ácidos grasos inusuales (Madsen *et al.*, 1999), que son posteriormente transportados a la mitocondria para que sean completamente degradados mediante β -oxidación. En este trabajo reportamos por primera vez la regulación transcripcional de este proceso, ya que la PHYH mostró estar fuertemente regulada a nivel transcripcional como consecuencia del ayuno prolongado en dorada. La regulación de la transcripción por la composición de la dieta de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos no presentó cambios importantes, a diferencia de lo indicado para trucha arcoíris donde se reportó un incremento significativo de la expresión de CPT1 en peces alimentados con PUFAs (Morash *et al.*, 2009).

Además de los ácidos grasos, otro de los productos de la degradación de triglicéridos es el glicerol-3-fosfato, que mediante la acción de la enzima GPD1 es transformado a dihidroxiacetona fosfato, el cual es un intermediario de la vía glucolítica-gluconeogénica que puede ser utilizado tanto para la síntesis de glucosa como para la generación de energía. En concordancia con el incremento observado en la expresión de genes implicados en la degradación de triglicéridos y la oxidación de ácidos grasos en los peces ayunados, se observó una tendencia similar en la expresión de GPD1, enzima que permite la entrada del glicerol a la vía glucolítica en forma de dihidroxiacetona-fosfato. Sin embargo, entre los peces alimentados con distintas dietas, este gen presentó un patrón de expresión distinto al de las enzimas de degradación de triglicéridos y ácidos grasos (PNPLA2 y CPT1B), ya que presentó menor expresión en los peces alimentados con la dieta de alto contenido en carbohidratos (LLH). Por lo tanto, el glicerol-3-fosfato podría ser utilizado principalmente para generar glucosa vía gluconeogénesis en los peces alimentados con dietas de bajo contenido en carbohidratos.

La familia de las *acyl CoA synthetases*, también conocidas como *CoA ligases*, permite activar los ácidos grasos que entran en la célula para poder ser degradados, remodelar fosfolípidos o producir ésteres de ácidos grasos capaces de regular diferentes procesos celulares (Soupene and Kuypers, 2008). En mamíferos se describen 5 isoformas de *very long chain acyl CoA synthetases* (ACSL), siendo la más abundante en hígado de rata la ACSL1, que presenta un incremento significativo en los niveles de mRNA tras el ayuno, probablemente en un proceso relacionado con el incremento en la degradación de ácidos grasos (Mashek *et al.*, 2006). De manera similar, la expresión de ACSL4 incrementa junto a la β -oxidación en embriones de bacalao atlántico salvaje respecto a embriones de peces de cultivo (Frederico Ceccon Lanes *et al.*, 2013). Mediante una búsqueda sistemática en el transcriptoma obtenido para dorada se detectó la presencia de 5 genes relacionados con esta familia de proteínas, entre los que ACSL1 no presentó variaciones en los niveles de mRNA asociados al

estado nutricional de las doradas tanto si se analizaron a través de los datos de *microarrays* como mediante RT-qPCR. Sin embargo, ACSBG2 presentó un incremento significativo entre todos los grupos de peces alimentados respecto a los peces ayunados y lo que es más relevante, este incremento fue también significativo en los peces alimentados con la dieta alta en proteínas respecto a los otros dos grupos de peces alimentados. El análisis del patrón de expresión de esta familia de genes sustentaría la preponderancia que tienen los procesos sintéticos de lípidos en el hígado de dorada sobre los procesos catabólicos, siendo más relevantes en los peces alimentados con dietas de un alto contenido en proteínas.

Los principales componentes estructurales y reguladores de la función de las membranas celulares son los fosfolípidos, cuyos ácidos grasos estructurales pueden ser modificados mediante un proceso de remodelación en el que intervienen distintas fosfolipasas y enzimas como la LPCAT y la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT). En este estudio no encontramos regulación transcripcional de las enzimas LPCAT ni PEMT como consecuencia del ayuno en el hígado de dorada, a diferencia de lo reportado por Benedito-Palos *et al.* (2014). Sin embargo, en nuestro trabajo se observó la regulación transcripcional de distintas fosfolipasas que podrían estar cumpliendo funciones tales como la obtención de energía celular o la liberación de moléculas capaces de activar diferentes procesos celulares. Esta última hipótesis estaría reforzada por las diferencias de expresión de las enzimas ACER2 y NAAA entre los peces ayunados y alimentados. La primera de estas enzimas regula los niveles de esfingosina y con ellos la proliferación celular (Xu *et al.*, 2006) mientras que la segunda degrada las N-aciletalaminas, moléculas bioactivas con capacidad antiinflamatoria y neuroprotectora (Tsuboi *et al.*, 2005). La expresión disminuida de NAAA parece ser relevante en salmones con tendencia magra (Morais *et al.*, 2011).

Por otro lado, a pesar de que el proceso de remodelación de fosfolípidos parece no jugar un papel importante en el ayuno prolongado, este proceso parece estar jugando un papel más relevante en los peces alimentados, ya que se observó diferencias en la expresión de PEMT entre los peces alimentados con dietas de distinta composición en lípidos y proteínas. La expresión de esta enzima disminuyó significativamente en los peces alimentados con la dieta MHL respecto a los alimentados con la dieta HLL.

El hígado juega un papel importante en la digestión de los lípidos de la dieta mediante la producción de ácidos biliares que son excretados al duodeno y permiten la solubilización de los lípidos ingeridos. La expresión de genes implicados en la digestión de los lípidos de la dieta presentó alteraciones importantes como consecuencia del estado nutricional de las doradas, aunque los datos de nuestro estudio no son concluyentes. Por un lado la proteína CYP7A1, encargada de degradar

colesterol y de producir ácidos biliares, se encuentra sobreexpresada en los peces alimentados, y en mayor nivel en los peces alimentados con la dieta rica en lípidos, de acuerdo con lo esperado para este proceso. Sin embargo, la proteína BAAT, implicada en la modificación de ácidos biliares en hígado, presentó un comportamiento opuesto, por lo que será necesario profundizar más en la regulación de este proceso, poco estudiado en peces.

En cuanto al transporte de lípidos a nivel sistémico y el transporte inverso de colesterol, en nuestros estudios también se observaron cambios importantes como consecuencia del estado nutricional. La mayoría de las Apo se encuentran incrementadas en los peces alimentados destacando la ApoB, que a diferencia de nuestro estudio en dorada, en tilapia parece no estar regulada (He *et al.*, 2015). Este incremento de las Apos en doradas alimentadas estaría en concordancia con los mayores niveles de triglicéridos sanguíneos producto del incremento de la síntesis hepática o de la mayor ingesta de lípidos. Por otro lado, las enzimas LCAT y CETP se encuentran incrementadas en el hígado de los peces ayunados. De manera similar, destacó el marcado incremento de la expresión que presentó la proteína SOAT2 en los peces ayunados. SOAT2 está involucrada en la absorción de colesterol proveniente de la dieta, lo que resalta la relevancia del colesterol y del proceso de captación por el hígado.

La expresión de proteínas implicadas en la captación de colesterol, el proceso de síntesis de colesterol fue otro de los procesos que presentó un gran número de proteínas reguladas por el estado nutricional, lo que refuerza la importancia que tiene el colesterol en el desarrollo de los peces. Las doradas alimentadas con dietas de bajo contenido de lípidos (HLL y LLH) presentaron un incremento en la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de colesterol, mientras que la presencia de un alto contenido de lípidos en la dieta tiene un efecto represor de esta vía. La regulación transcripcional de los genes del metabolismo de colesterol como consecuencia de la composición de la dieta, podría estar relacionada con la regulación negativa que producen altos niveles de colesterol en la dieta. Siendo el hígado el principal órgano colesterogénico, se ha descrito que los peces muestran incrementos en la expresión de genes vinculados con la síntesis de colesterol como consecuencia de la sustitución en la dieta del aceite de pescado por grasas de origen vegetal o una mayor inclusión de carbohidratos (Leaver *et al.*, 2008; Panserat *et al.*, 2008, 2009; Castro *et al.*, 2015). Podría estar jugando un papel importante en la regulación de este proceso SREBP-2, factor de transcripción que regula en mayor medida la transcripción de genes de colesterol y que según se ha descrito presenta un mecanismo de autorregulación (Sato *et al.*, 1996).

Es importante señalar el papel que tiene el colesterol como precursor de moléculas con importantes funciones biológicas, como ácidos biliares, vitamina D y hormonas esteroideas (Castro *et*

al., 2015), moléculas clave en múltiples procesos, como la diferenciación celular o el crecimiento. En este sentido, podemos relacionar el marcado incremento que presenta la dieta de alto contenido en proteínas con la expresión de genes relacionados con la síntesis de colesterol, con cambios a nivel sistémico que favorecerían el mayor crecimiento de los peces alimentados con esta dieta (Sáez, 2015).

En la familia de transportadores celulares lipofílicos podemos encontrar las FABPs, lipocalinas y transportadores del retinol (RBP), genes que podrían estar jugando un papel importante en otros procesos más allá del transporte (Flower, 1996). En dorada observamos que la mayoría de estas proteínas (5 de 7) se encuentran sobreexpresadas en los peces alimentados, lo que se relacionaría con una mayor disponibilidad de ácidos grasos o moléculas lipofílicas en los peces alimentados. En este sentido destacó la importante sobreexpresión en los peces alimentados que presentó la proteína RBP2. Aunque el retinol no es un ácido graso, es una molécula lipofílica considerada como una vitamina esencial para el normal funcionamiento de diferentes procesos, incluyendo la transcripción de genes mediante receptores nucleares del ácido retinoico.

Son múltiples los factores de transcripción involucrados en la regulación del metabolismo de lípidos en vertebrados. Reforzando la idea anterior del aparentemente importante rol que desempeña el retinol en la regulación de procesos celulares en el hígado, se observó que RXR γ fue uno de los factores de transcripción con expresión diferencial entre los peces ayunados y alimentados. Niveles similares también fueron detectados para LXR α -2, por lo que ambos productos génicos pudiesen ser necesarios para transactivar genes del metabolismo lipídico de manera conjunta formando heterodímeros (Hong and Tontonoz, 2014). Sin embargo, la regulación a nivel de mRNA de factores de transcripción no es del todo concluyente y en este aspecto puede encontrarse actualmente información contradictoria.

Por ejemplo, en nuestro trabajo se evaluaron los niveles de expresión de SREBP-1 mediante RT-qPCR, no encontrándose diferencias debidas al estado nutricional. Sin embargo, en salmón se ha reportado que la cantidad y el origen de los lípidos pueden modificar los niveles de mRNA de este factor de transcripción (Morais *et al.*, 2011). En hígado de pez cebra Seiliez *et al.* (2013) detectaron cambios en los patrones de expresión debidos a la regulación postprandial, pero no como consecuencia de la composición de la dieta. Es sabido que para que algunos factores de transcripción puedan cumplir su rol regulador es necesaria la unión a otras moléculas o sufrir modificaciones post-traduccionales que les permitan unirse a los elementos de respuesta en el DNA.

5.5 EFECTO METABÓLICO DE LA SOBREEXPRESIÓN HEPÁTICA DE SREBP-1a EN DORADA

Con el fin de promover un incremento en la utilización de los carbohidratos de la dieta para fines energéticos y biosintéticos y favorecer un efecto de ahorro de proteína en peces en cultivo, llevamos a cabo la sobreexpresión hepática de SREBP-1a en dorada. Por una parte, es bien sabido que SREBP-1 es un factor de transcripción clave en la activación de numerosos genes lipogénicos (Horton, 2002; Eberlé *et al.*, 2004), mientras que previamente nuestro grupo de investigación demostró que en dorada el fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster transactiva la expresión de genes clave en la glucólisis por unión a los promotores de GK y PFKFB (Metón *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2008).

En base a estos antecedentes y considerando el bajo nivel de expresión para genes lipogénicos observado en los estudios de *microarrays* realizados en doradas en ayuno o alimentadas con una dieta pobre en proteínas pero rica en carbohidratos (LLH), hipotetizamos que la sobreexpresión del fragmento nuclear de SREBP-1a en hígado de dorada podría forzar la utilización de los carbohidratos de la dieta vía glucólisis y dirigir los productos de su oxidación hacia la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Setenta y dos horas después de la administración de nanopartículas de quitosán-TTP acomplejadas con un plásmido de expresión con el fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster a doradas alimentadas con dos dietas de diferente composición, se confirmó la sobreexpresión de SREBP-1a en hígado de doradas mediante la determinación del incremento de los niveles de mRNA y de la proteína inmunodetectable presente en extractos proteicos hepáticos.

Así mismo, el tratamiento con SREBP-1a incrementó la expresión de GK y PFKFB en hígado de dorada, confirmando observaciones *in vitro* previamente por realizadas por nuestro grupo para ambos genes (Metón *et al.*, 2006; Egea *et al.*, 2008). Es de resaltar que los niveles de mRNA de estas enzimas fueron mayores en los peces alimentados con la dieta con más carbohidratos, posiblemente como resultado de un efecto sinérgico de SREBP-1a sobre los promotores de GK y PFKFB y con algún otro factor involucrado en vías de señalización mediadas quizás por la respuesta celular a insulina y cuya expresión esté incrementada en los peces alimentados con la dieta rica en carbohidratos. Nuestros resultados confirman observaciones previas que relacionan SREBP-1 y la transactivación de genes glucolíticos (Foretz *et al.*, 1999; Gosmain *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Rome *et al.*, 2008).

Nuestras observaciones sugieren que el incremento de los niveles de mRNA de GK y PFKFB en hígado de doradas que sobreexpresan SREBP-1a favorecería el flujo glucolítico a través de mecanismos que incluirían, por una parte, el incremento de actividad de una enzima marcadamente limitante de la glucólisis en los peces, como es la GK, y, por otra parte, favoreciendo la vía glucolítica a través del ciclo de sustratos fructosa-6-fosfato/fructosa-1,6-bisfosfato, mediante el incremento de

la expresión de PFKFB e inhibición alostérica de FBPasa-1. Estudios previos mostraron que el ayuno y la alimentación con dietas ricas en carbohidratos promueve en dorada un incremento en los niveles hepáticos de mRNA y actividad quinasa de PFKFB, que a su vez conllevan a un incremento en los niveles de F-2,6-P₂ (Metón *et al.*, 1999a, 2000). Así, el incremento en la expresión de PFKFB en los peces tratados con SREBP-1a podría inhibir la gluconeogénesis hepática por disminución de la actividad FBPasa-1, tal y como observamos de manera independiente de la composición de la dieta. Dado que es bien conocido el papel de F-2,6-P₂ como potente activador alostérico de PFK-1 e inhibidor de FBPasa-1 (Okar *et al.*, 2004), nos causó sorpresa no observar un incremento en la actividad PFK-1 en el hígado de las doradas tratadas. Todo y que se ha comprobado que F-2,6-P₂ activa PFK-1 purificada de hígado de dorada *in vitro* (Mediavilla *et al.*, 2008), es posible que su efecto se vea contrarrestado por la presencia en hígado de doradas tratadas con SREBP-1a de otras moléculas que puedan actuar como inhibidores alostéricos de la enzima, como ATP, ADP y citrato. De hecho, la PFK-1 de hígado de dorada muestra una elevada susceptibilidad a la inhibición por ATP (Mediavilla *et al.*, 2008), efecto que podría explicar la ausencia de actividad PFK-1 incrementada tras la sobreexpresión de SREBP-1a.

Por otro lado, en este trabajo se verificó que el incremento que SREBP-1a es capaz de producir en hígado de dorada un incremento en la expresión de genes de la vía de síntesis de ácidos grasos y colesterol, efecto ampliamente demostrado previamente en mamíferos (Horton, 2002; Eberlé *et al.*, 2004). De manera similar al efecto sinérgico mostrado por el tratamiento con SREBP-1a y los carbohidratos de la dieta sobre los niveles de mRNA de genes implicados en la glucólisis-gluconeogénesis, las proteínas podrían ejercer un efecto sinérgico con SREBP-1a sobre algunos genes de la vía de síntesis de ácidos grasos. De este modo, se observó una mayor expresión de genes de la vía de síntesis de ácidos grasos en los peces alimentados con la dieta de alto contenido proteico (HLL), lo que confirmaría el papel de las proteínas de la dieta sobre la regulación de la síntesis de lípidos mediante vías como mTOR, tal como se ha propuesto que ocurre en trucha (Lansard *et al.*, 2010; Skiba-Cassy *et al.*, 2013).

Finalmente, la activación de la glucólisis y de la síntesis de ácidos grasos y colesterol mediada por SREBP-1a probablemente es la base que promovió que las doradas tratadas con nanopartículas para sobreexpresar SREBP-1a mostrasen niveles séricos incrementados de triglicéridos y colesterol, de manera más marcada incluso en los peces alimentados con la dieta de alto contenido en carbohidratos. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de SREBP-1a podría favorecer la síntesis de ácidos grasos y colesterol a partir de los carbohidratos de la dieta, efecto que por lo tanto permitiría sustituir, al menos parcialmente, proteína por carbohidratos en la dieta de doradas en cultivo. Por lo tanto, se vería favorecida la utilización de los carbohidratos con fines energéticos y de

biosíntesis y se promovería un efecto de ahorro de proteínas en peces en cultivo, abaratando los costos de producción y haciendo posible una acuicultura más sostenible y con menor impacto medioambiental.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La secuenciación masiva 454 de RNA total de hígado y músculo esquelético de doradas en ayuno o alimentadas con 5 dietas de diferente composición durante 23 días generó 660.166 lecturas de alta calidad de hígado y 547.544 de músculo esquelético. Las lecturas fueron ensambladas de forma independiente para cada tejido y de forma conjunta, generando así un transcriptoma incrementado denominado híbrido. Los transcriptomas de hígado, músculo esquelético e híbrido contienen respectivamente 55.026, 40.922 y 25.392 secuencias únicas, que incluyen 11.545, 10.599 y 19.530 *isotigs* (10.033, 9.189 y 15.954 isogrupos), además de 23, 23 y 72 *contigs* huérfanos > 500 pb y 43.458, 30.300 y 5.790 *singletons*. Del total de secuencias únicas de hígado, músculo esquelético y transcriptoma híbrido, 19.494, 17.935 y 21.093, respectivamente, fueron anotadas utilizando las bases de datos nt y nr del NCBI.
2. Se asignaron términos GO a 3.076, 2.854 y 6.286 secuencias únicas de los transcriptomas de hígado, músculo esquelético e híbrido. La mayor abundancia de términos GO se observaron en el transcriptoma de hígado y se encontraban relacionados con la capacidad y plasticidad metabólica de este tejido, mientras que el músculo esquelético se caracterizó por presentar términos como *respuesta a hormona y estímulos, ciclo celular mitótico, morfogénesis, constituyentes estructurales del citoesquelético, constituyentes estructurales de la matriz extracelular y andamio de complejos proteicos*.
3. La composición de la dieta y el estado nutricional alteró diversos parámetros del metabolismo intermediario de dorada. Tras 23 días de ayuno disminuyeron los niveles de glucosa y triglicéridos en suero, y a nivel hepático los niveles de glucógeno y la actividad de las enzimas ALT, GK, PK, PFK-1, G6PD y 6PGD, mientras que incrementaron los valores de actividad GDH y FBPasa. Dietas de alto contenido en carbohidratos promovieron incrementos en la glucemia, el glucógeno hepático y la actividad de enzimas glucolíticas en hígado. Por el contrario, dietas ricas en proteína promovieron incremento de los triglicéridos en suero y de las actividades enzimáticas hepáticas ALT, AST y GDH.
4. Mediante el uso de *microarrays* se determinó que 2.799 secuencias únicas del transcriptoma híbrido están expresadas diferencialmente entre los peces en ayuno y los alimentados con cualquiera de las dietas utilizadas. Las dos dietas que promovieron un mayor número de secuencias únicas expresadas diferencialmente (249) entre los peces alimentados fueron la HLL y la LLH. Las funciones celulares y vías metabólicas con más genes afectados por el ayuno y la composición de la dieta fueron transportadores celulares, fosforilación oxidativa,

metabolismo de lípidos, degradación de aminoácidos, ciclo de Krebs, metabolismo del hierro y reguladores del ciclo celular y de la integridad del DNA.

5. El ayuno prolongado promueve un incremento de la expresión hepática de proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa, particularmente del complejo citocromo c oxidasa, como COX6A2, COX5B1, COX4I2, COX7A2, COX8B y COX6B1. La expresión de los genes implicados en la fosforilación oxidativa se vió menos afectada por el ayuno en músculo esquelético; aunque entre los peces alimentados, la dieta LLH promovió una tendencia al incremento de la expresión de aquellos genes que se habían mostrado sobreexpresados en el ayuno. Mediante RT-qPCR se verificó que la expresión de los genes COX6A2, SLC25A6 y COQ10 en hígado y COX5B1 y SLC25A6 en músculo esquelético resultan indicadores sensibles de ayuno prolongado en dorada.
6. La expresión en hígado y músculo esquelético del gen ABCG2, involucrado en procesos de detoxificación celular, también es un biomarcador sensible a cambios nutricionales que promuevan incrementos en la fosforilación oxidativa, como el ayuno o la alimentación con dietas de distinta composición de macronutrientes.
7. El ayuno prolongado promueve una disminución en la expresión de genes del metabolismo de lípidos en hígado de dorada, como: ELOVL5, ELOVL6 y SCD-X1, genes que codifican enzimas de la vía de elongación y producción de ácidos grasos insaturados; ALDH1L1, enzima implicada en la producción de NADPH; ACC1tv2, enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos; LXR α y RXR γ , factores de transcripción; y FABP1, LCLN1 y RBP2, proteínas transportadoras de moléculas lipofílicas.
8. Los principales genes hepáticos relacionados con el metabolismo lipídico sobreexpresados en condición de ayuno fueron: PNPLA2-X3 y PNPLA2, genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de triglicéridos; CPT1B, SLC25A20, HADHA y HADH, que participan en la β -oxidación de ácidos grasos; PHYH, involucrado en la α -oxidación de ácidos grasos; DGAT1, que interviene en la síntesis de triglicéridos; y CETP y LCAT, relacionados con el transporte inverso del colesterol.
9. Entre los peces alimentados, aquellos a los que se les administró la dieta HLL presentaron una expresión hepática incrementada de genes involucrados en la síntesis de lípidos y decrementada para genes implicados en la degradación de lípidos. La dieta MHL, de mayor contenido lipídico, promovió una menor expresión de genes de síntesis de colesterol, como ACAT2, ERG28, EBP, TM7SF2, HMGCS1, FDFT1, IDI1, FDPS, MVD, DHCR7 y SQLE.

10. La expresión de los genes ELOVL5, SCD-X1 y ACC1 (síntesis de ácidos grasos), FDPS y MVD (síntesis de colesterol) y PNPLA2-X3 y CPT1B (degradación de lípidos), fueron biomarcadores sensibles al estado nutricional.
11. Se obtuvieron nanopartículas de quitosán-TTP acomplejadas con un plásmido de expresión del fragmento nuclear de SREBP-1a de hámster. Las nanopartículas presentaron $224,0 \pm 62,3$ nm de diámetro y un potencial Z de $32,98 \pm 1,16$ nm. Setenta y dos horas después de la administración intraperitoneal de las nanopartículas de quitosán-TPP-DNA se produjo un incremento significativo de los niveles de mRNA y proteína inmunodetectable de SREBP-1a en hígado de dorada.
12. La sobreexpresión de SREBP-1a *in vivo* favoreció el incremento de colesterol y triglicéridos en suero y los niveles hepáticos de mRNA que codifica enzimas implicadas en glucólisis-gluconeogénesis (GK y PFKFB), lo que a su vez promovió un incremento de la actividad GK y un descenso en la actividad FBPasa. Adicionalmente, la sobreexpresión de SREBP-1a incrementó la expresión hepática de enzimas de la vía de las pentosas fosfato (G6PD), síntesis de ácidos grasos (ACC1tv1, ACC1tv2, ACC2 y FASN), elongación e insaturación de ácidos grasos (ELOVL5 y FADSD6) y síntesis de colesterol (HMGCR). Los incrementos observados presentaron un efecto sinérgico por la interacción entre la composición de la dieta y el tratamiento con SREBP-1a para la expresión de GK (dietas ricas en carbohidratos) y ACC1tv1 y ACC1tv2 (dietas ricas en proteína).

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

A

- Agaba M, Tocher DR, Dickson CA, Dick JR, Teale AJ. 2004. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Marine Biotechnology* **6**: 251–261.
- Alimuddin, Kiron V, Satoh S, Takeuchi T, Yoshizaki G. 2008. Cloning and over-expression of a masu salmon (*Oncorhynchus masou*) fatty acid elongase-like gene in zebrafish. *Aquaculture* **282**: 13–18.
- Allan CM, Hill S, Morvaridi S, Saiki R, Johnson JS, Liao WS, Hirano K, Kawashima T, Ji Z, Loo JA, et al. 2013. A conserved START domain coenzyme Q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**: 776–791.
- Altmann CR, Bell E, Sczyrba A, Pun J, Bekiranov S, Gaasterland T, Brivanlou a H. 2001. Microarray-based analysis of early development in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **236**: 64–75.
- Anderson ED, Mourich D V, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular marine biology and biotechnology* **5**: 114–122.
- Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F, Baanante I V. 2008. A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 2833–2844.
- APROMAR. 2016. La Acuicultura en España 2016 | APROMAR. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. : 1–89.
- Ashburner M, Ball C a, Blake J a, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis a P, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* **25**: 25–29.

B

- Baanante IV, García de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F. 1991. Regulation of fish glycolysis—gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P₂ and PFK-2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **100**: 11–17.
- Babaei S, Sáez A, Caballero-Solares A, Fernández F, Baanante I V., Metón I. 2017. Effect of dietary macronutrients on the expression of cholecystokinin, leptin, ghrelin and neuropeptide Y in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* **240**: 121–128.
- Babin PJ, Vernier JM. 1989. Plasma lipoproteins in fish. *Journal of lipid research* **30**: 467–489.
- Ballantyne JS. 2001. Amino acid metabolism. *Fish Physiology* **20**: 77–107.
- Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 42627–42635.
- Benedito-Palos L, Calduch-Giner JA, Ballester-Lozano GF, Pérez-Sánchez J. 2013. Effect of ration size on fillet fatty acid composition, phospholipid allostasis and mRNA expression patterns of lipid regulatory genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The British journal of nutrition* **109**: 1175–1187.
- Benedito-Palos L, Ballester-Lozano G, Pérez-Sánchez J. 2014. Wide-gene expression analysis of lipid-relevant genes in nutritionally challenged gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gene* **547**: 34–42.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289–300.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2008. *Bioquímica*. Editorial Reverté, S.A.: La Llagosta.

- Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J. 2015. Unraveling the molecular signatures of oxidative phosphorylation to cope with the nutritionally changing metabolic capabilities of liver and muscle tissues in farmed fish (D Mishmar, Ed). *PLoS ONE* **10**: e0122889.
- Bibiano Melo JF, Lundstedt LM, Metón I, Baanante IV, Moraes G. 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **145**: 181–187.
- Borchard G, Junginger HE. 2001. Modern drug delivery applications of chitosan. *Advanced drug delivery reviews* **52**: 103.
- Bou M, Todorčević M, Fontanillas R, Capilla E, Gutiérrez J, Navarro I. 2014. Adipose tissue and liver metabolic responses to different levels of dietary carbohydrates in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **175**: 72–81.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brauge C, Corraze G, Médale F. 1995. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Physiology* **111**: 117–124.
- Brosnan JT. 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of nutrition* **133**: 2068S–2072S.

C

- Caballero-Solares A, Viegas I, Salgado MC, Siles AM, Sáez A, Metón I, Baanante I V, Fernández F. 2015. Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* **444**: 79–87.
- Calder PC. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **77**: 327–335.
- Calduch-Giner JA, Davey G, Saera-Vila A, Houeix B, Talbot A, Prunet P, Cairns MT, Pérez-Sánchez J. 2010. Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC Genomics* **11**: 193.
- Calduch-Giner JA, Bermejo-Nogales A, Benedito-Palos L, Estensoro I, Ballester-Lozano G, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. 2013. Deep sequencing for de novo construction of a marine fish (*Sparus aurata*) transcriptome database with a large coverage of protein-coding transcripts. *BMC genomics* **14**: 178.
- Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* **63**: 125–132.
- Cao L, Naylor R, Henriksson P, Leadbitter D, Metian M, Troell M, Zhang W. 2015. China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science* **347**: 133–135.
- Casas F, Pineau T, Rochard P, Rodier A, Daury L, Dauça M, Cabello G, Wrutniak-Cabello C. 2000. New molecular aspects of regulation of mitochondrial activity by fenofibrate and fasting. *FEBS letters* **482**: 71–74.
- Caseras A, Metón I, Fernández F, Baanante I V. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1493**: 135–141.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante I V. 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The British journal of nutrition* **88**: 607–614.
- Castaño JG, Nieto A, Felú JE. 1979. Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 5576–5579.
- Castro C, Corraze G, Pérez-Jiménez A, Larroquet L, Cluzeaud M, Panserat S, Oliva-Teles A. 2015. Dietary carbohydrate and lipid source affect cholesterol metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *British Journal of Nutrition* **114**: 1143–1156.

- Castro C, Corraze G, Firmino-Diógenes A, Larroquet L, Panserat S, Oliva-Teles A. 2016. Regulation of glucose and lipid metabolism by dietary carbohydrate levels and lipid sources in gilthead sea bream juveniles. *British Journal of Nutrition* **116**: 19–34.
- Cerdà J, Manchado M. 2013. Advances in genomics for flatfish aquaculture. *Genes & nutrition* **8**: 5–17.
- Chang B-E, Hsieh S-L, Kuo C-M. 2001. Molecular cloning of full-length cDNA encoding delta-9 desaturase through PCR strategies and its genomic organization and expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Molecular Reproduction and Development* **58**: 245–254.
- Chang S, Sung PS, Lee J, Park J, Shin E-C, Choi C. 2016. Prolonged silencing of diacylglycerol acyltransferase-1 induces a dedifferentiated phenotype in human liver cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20**: 38–47.
- Chen J, Yu L, Li D, Gao Q, Wang J, Huang X, Bi G, Wu H, Zhao S. 2003. Human CRYL1, a novel enzyme-crystallin overexpressed in liver and kidney and downregulated in 58% of liver cancer tissues from 60 Chinese patients, and four new homologs from other mammals. *Gene* **302**: 103–113.
- Cláudia Figueiredo-Silva A, Saravanan S, Schrama JW, Kaushik S, Geurden I. 2012. Macronutrient-induced differences in food intake relate with hepatic oxidative metabolism and hypothalamic regulatory neuropeptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology & Behavior* **106**: 499–505.
- Corbeil S, Kurath G, Lapatra SE. 2000. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish & Shellfish Immunology* **10**: 711–723.
- Coutteau P, Geurden I, Camara MR, Bergot P, Sorgeloos P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* **155**: 149–164.
- Cowey CB. 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* **124**: 1–11.
- Crockett EL, Sidell BD. 1993. Substrate selectivities differ for hepatic mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation in an Antarctic fish, *Notothenia gibberifrons*. *The Biochemical journal* **289**: 427–33.
- Crollius HR, Weissenbach J. 2005. Fish genomics and biology. *Genome Research* **15**: 1675–1682.
- Cruz-García L, Sánchez-Gurmaches J, Monroy M, Gutiérrez J, Navarro I. 2015. Regulation of lipid metabolism and peroxisome proliferator-activated receptors in rainbow trout adipose tissue by lipolytic and antilipolytic endocrine factors. *Domestic Animal Endocrinology* **51**: 86–95.
- Cui TZ, Kawamukai M. 2009. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Journal* **276**: 748–759.

D

- Dai W, Panserat S, Mennigen J, Terrier F, Dias K, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2013. Postprandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signaling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **216**: 4483–4492.
- Dai W, Panserat S, Kaushik S, Terrier F, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2016. Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **310**: R74-86.
- Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. 2010. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials* **31**: 8188–8197.
- Dave G, Johansson-Sjöbeck ML, Larsson A, Lewander K, Lidman U. 1975. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* **52**: 423–430.
- Davenport J, Black K, Burnell G, Cross T, Culloty S, Ekaratne S, Furness B, Mulcahy M, Thetmeyer H. 2003. *Aquaculture: the ecological issues*. The British Ecological Society.
- Day RD, Tibbetts IR, Secor SM. 2014. Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **184**: 497–512.

- Dias J, Alvarez MJ, Diez A, Arzel J, Corraze G, Bautista JM, Kaushik SJ. 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **161**: 169–186.
- Diez A, Menoyo D, Pérez-Benavente S, Calduch-Giner JA, Vega-Rubin de Celis S, Obach A, Favre-Krey L, Boukouvala E, Leaver MJ, Tocher DR, et al. 2007. Conjugated linoleic acid affects lipid composition, metabolism, and gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Nutrition* **137**: 1363–1369.
- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* **30**: 418–426.
- Dircks Lori SSH. 1999. Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis. *Progress in Lipid Research* **38**: 461–479.
- Dong X, Tan P, Cai Z, Xu H, Li J, Ren W, Xu H, Zuo R, Zhou J, Mai K, et al. 2017. Regulation of FADS2 transcription by SREBP-1 and PPAR- α influences LC-PUFA biosynthesis in fish. *Scientific Reports* **7**: 40024.
- Drakenberg K, Sara VR, Falkmer S, Gammeltoft S, Maake C, Reinecke M. 1993. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regulatory Peptides* **43**: 73–81.
- Drew RE, Rodnick KJ, Settles M, Wacyk J, Churchill E, Powell MS, Hardy RW, Murdoch GK, Hill RA, Robison BD. 2008. Effect of starvation on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Physiological genomics* **35**: 283–295.

E

- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fougère F. 2004. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**: 839–848.
- Egea M, Metón I, Córdoba M, Fernández F, Baanante I V. 2008. Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* **155**: 359–367.
- Eichhorn ME, Luedemann S, Strieth S, Pappan A, Ruhstorfer H, Haas H, Michaelis U, Sauer B, Teifel M, Enders G, et al. 2007. Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer biology & therapy* **6**: 920–929.
- Ekdahl K, Ekman P. 1985. Fructose-1,6-bisphosphatase from rat liver. A comparison of the kinetics of the unphosphorylated enzyme and the enzyme phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 14173–14179.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. 2008a. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* **274**: 101–108.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. 2008b. Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **149**: 80–86.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish physiology and biochemistry* **35**: 519–39.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. 2011. Dietary Carbohydrate Utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science* **19**: 201–215.
- Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. 1998. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical research* **15**: 1332–1339.

F

- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. *Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*: 1–224.
- Farber SA, Olson ES, Clark JD, Halpern ME. 1999. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipase A2 activity during zebrafish embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 19338–19346.

- Fernández F, Miquel AG, Guinea J, Martínez R. 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The effect of diet composition and ration size. *Aquaculture* **166**: 67–84.
- Fernández F, Miquel AG, Martínez R, Serra E, Guinea J, Narbaiza FJ, Caseras A, Baanante I V. 1999. Dietary chromic oxide does not affect the utilization of organic compounds but can alter the utilization of mineral salts in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Journal of Nutrition* **129**: 1053–1059.
- Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, Baanante I V. 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343**: 1–10.
- Flower DR. 1996. The lipocalin protein family : structure and function. *Biochemical Journal* **318**: 1–14.
- Fontagnéa S, Geurdenb I, Escaffrea A-M, Bergota P. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* **161**: 213–223.
- Foretz M, Guichard C, Ferré P, Foufelle F. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 12737–12742.
- Foufelle F, Ferré P. 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *The Biochemical journal* **366**: 377–391.
- Frederico Ceccon Lanes C, Tilahun Bizuayehu T, Manuel de Oliveira Fernandes J, Kiron V, Babiak I. 2013. Transcriptome of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) Early Embryos from Farmed and Wild Broodstocks. *Marine Biotechnology* **15**: 677–694.
- Freedland RA. 1967. Effect of progressive starvation on rat liver enzyme activities. *The Journal of nutrition* **91**: 489–495.
- Frøyland L, Madsen L, Eckhoff KM, Lie Ø, Berge RK. 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and Acyl-CoA oxidase activities in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* **33**: 923–930.
- Frøyland L, Lie Ø, Berge RK. 2000. Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* **6**: 85–89.
- Furlong EEM, Andersen EC, Null B, White KP, Scott MP. 2001. Patterns of Gene Expression During *Drosophila* Mesoderm Development. *Science* **293**: 1629–1633.
- Furuichi M, Yone Y. 1981. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **47**: 761–764.
- Furuichi M, Yone Y. 1982. Effect of insulin on blood sugar levels of fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **48**: 1289–1291.
- Futami R, Muñoz-Pomer A, Viu JM, Domínguez-Escribà L, Covelli L, Bernet GP, Sempere JM, Moya A, Llorens C. 2011. GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases. *Biotechnologia Bioinformatics*: 1–5.

G

- García de Frutos P, Baanante I V. 1994. 6-Phosphofructo 2-Kinase/Fructose 2,6-bisphosphatase in liver of the teleost *Sparus aurata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**: 461–468.
- García de Frutos P, Baanante I V. 1995. The muscle isoform of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase of the teleost *Sparus aurata*: relationship with the liver isoform. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **321**: 297–302.
- García de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F, Baanante I V. 1990. Fructose 2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*: Influence of nutritional state. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **96**: 63–65.
- García de Frutos P, Bonamusa L, Baanante I V. 1991. Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* **98**: 329–331.

- García de la Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston IA. 2012. Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC Genomics* **13**: 181.
- Gartner C, López BL. 2010. Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Revista Facultad de Ingeniería de Antioquia* **53**: 20–29.
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Becker K. 2006. Effect of dietary protein/carbohydrate ratio on activities of hepatic enzymes involved in the amino acid metabolism of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **32**: 275–282.
- Gentleman R, Carey V, Bates D, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, et al. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* **5**: R80.
- Geurden I, Radünz-Neto J, Bergot P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* **131**: 303–314.
- Geurden I, Coutteau P, Sorgeloos P. 1997. Effect of a Dietary Phospholipid Supplementation on Growth and Fatty Acid Composition of European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax* L) and Turbot (*Scophthalmus Maximus* L) Juveniles From Weaning Onwards. *Fish Physiology and Biochemistry* **16**: 259–272.
- Glenn TC. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources* **11**: 759–769.
- Goetz FW, MacKenzie S. 2008. Functional genomics with microarrays in fish biology and fisheries. *Fish and Fisheries* **9**: 378–395.
- Gong Y, Chen W, Han D, Zhu X, Yang Y, Jin J, Liu H, Xie S. 2017. Effects of food restriction on growth, body composition and gene expression related in regulation of lipid metabolism and food intake in grass carp. *Aquaculture* **469**: 28–35.
- Gong Z, Yan T, Liao J, Lee SE, He J, Hew CL. 1997. Rapid identification and isolation of zebrafish cDNA clones. *Gene* **201**: 87–98.
- González JD, Silva-Marrero JI, Metón I, Caballero-Solares A, Viegas I, Fernández F, Miñarro M, Fàbregas A, Ticó JR, Jones JG, et al. 2016. Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism. *Marine Biotechnology* **18**: 85–97.
- Gormaz JG, Fry JP, Erazo M, Love DC. 2014. Public Health Perspectives on Aquaculture. *Current Environmental Health Reports* **1**: 227–238.
- Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, Roques M, Vidal H. 2004. Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes* **53**: 321–329.
- Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H, Lefai E. 2005. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *The Journal of Lipid Research* **46**: 697–705.
- Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J, Conesa A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* **36**: 3420–3435.
- Gutiérrez J, Plisetskaya EM. 1991. Insulin binding to liver plasma membranes of coho salmon during smoltification. *General and Comparative Endocrinology* **82**: 466–475.

H

- Hammerman PS, Fox CJ, Thompson CB. 2004. Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends in Biochemical Sciences* **29**: 586–592.
- Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK, Chang K-C. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Letters* **290**: 73–76.
- Hashiguchi Y, Furuta Y, Kawahara R, Nishida M. 2007. Diversification and adaptive evolution of putative sweet taste receptors in threespine stickleback. *Gene* **396**: 170–179.

- He A-Y, Ning L-J, Chen L, Chen Y-L, Xing Q, Li J, Qiao F, Li D-L, Zhang M-L, Du Z-Y. 2015. Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low- and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiological Reports* **3**: e12485.
- Hemre GI, Mommsen TP, Kroghdal Å. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* **8**: 175–194.
- Henderson RJ, Sargent JR. 1985. Fatty acid metabolism in fish. In *Nutrition and Feeding in Fish*, Cowey CB, Mackie AM, Bell JG (eds). Academic Press: London, England; 349–364.
- Hochachka PW, Guppy M, Guderley HE, Storey KB, Hulbert WC. 1978. Metabolic biochemistry of water- vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. *Canadian Journal of Zoology* **56**: 736–750.
- Hodge MR, Singh K, Cumsy MG. 1990. Upstream activation and repression elements control transcription of the yeast COX5b gene. *Molecular and cellular biology* **10**: 5510–5520.
- Van Hoestenbergh S, Roelants I, Vermeulen D, Goddeeris BM. 2013. Total Replacement of Fish Oil with Vegetable Oils in the Diet of Juvenile Jade Perch. *Journal of Agriculture Science and Technology* **3**: 385–398.
- Hong C, Tontonoz P. 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **13**: 433–444.
- Horton JD. 2002. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochemical Society transactions* **30**: 1091–1095.
- Houldsworth J, Attardi G. 1988. Two distinct genes for ADP/ATP translocase are expressed at the mRNA level in adult human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 377–381.
- Huang H, Xue L, Shi J, Zhao Y. 2017. Changes in activities and mRNA expression of lipoprotein lipase and fatty acid synthetase in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), during fasting. *Aquaculture Research* **48**: 3493–3504.
- Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. 2012. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Advances in experimental medicine and biology* **748**: 237–264.
- I**
- Ishii T, Okahata Y, Sato T. 2001. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et biophysica acta* **1514**: 51–64.
- J**
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* **45**: 237–249.
- Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. 2001a. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced drug delivery reviews* **47**: 83–97.
- Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MJ. 2001b. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **73**: 255–267.
- Jenkins BJ, Daly TM, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB, Bergman LW. 2016. Characterization of a Plasmodium falciparum Orthologue of the Yeast Ubiquinone-Binding Protein, Coq10p. (G Snounou, Ed). *PLoS one* **11**: e0152197.
- Jiang M, Ryu J, Kiraly M, Duke K, Reinke V, Kim SK. 2001. Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 218–223.
- Jin M, Monroig Ó, Lu Y, Yuan Y, Li Y, Ding L, Tocher DR, Zhou Q. 2017. Dietary DHA/EPA ratio affected tissue fatty acid profiles, antioxidant capacity, hematological characteristics and expression of lipid-related genes but not growth in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *PLoS ONE* **12**: e0176216.

Johnson MA, Vidoni S, Durigon R, Pearce SF, Rorbach J, He J, Brea-Calvo G, Minczuk M, Reyes A, Holt IJ, et al. 2014. Amino acid starvation has opposite effects on mitochondrial and cytosolic protein synthesis. *PLoS ONE* **9**: e93597.

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RPJO, Rosing H, et al. 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15649–15654.

K

Kadenbach B. 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **1604**: 77–94.

Kanehisa M. 1997. A database for post-genome analysis. *Trends in Genetics* **13**: 375–376.

Kaushik SJ, Seiliez I. 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research* **41**: 322–332.

Ke R, Mignardi M, Hauling T, Nilsson M. 2016. Fourth Generation of Next-Generation Sequencing Technologies: Promise and Consequences. *Human Mutation* **37**: 1363–1367.

Keogh K, Kenny DA, Cormican P, McCabe MS, Kelly AK, Waters SM. 2016. Effect of Dietary Restriction and Subsequent Re-Alimentation on the Transcriptional Profile of Bovine Skeletal Muscle (PJ Hansen, Ed). *PLoS ONE* **11**: e0149373.

Keppeler D, Decker K. 1974. Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer H (ed). Academic Press: New York; 1127–1131.

Kim S-Y, Kim H, Kim T-H, Im S-S, Park S-K, Lee I-K, Kim K-S, Ahn Y-H. 2004. SREBP-1c Mediates the Insulin-dependent Hepatic Glucokinase Expression. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 30823–30829.

Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. 2009. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* **34**: 259–269.

Kubota M, Shimmura S, Miyashita H, Kawashima M, Kawakita T, Tsubota K. 2010. The anti-oxidative role of ABCG2 in corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **51**: 5617–5622.

L

Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2010. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: Role of TOR. *Amino Acids* **39**: 801–810.

Lárez Velásquez C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química* **1**: 15–21.

Leaver MJ, Villeneuve LA, Obach A, Jensen L, Bron JE, Tocher DR, Taggart JB. 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* **9**: 299.

Lee C-Y. 1982. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Methods in Enzymology* **89**: 252–257.

Lee M, Nah JW, Kwon Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. 2001. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research* **18**: 427–431.

Levy D, Davidovich A, Zirkin S, Frug Y, Cohen AM, Shalom S, Don J. 2012. Activation of cell cycle arrest and apoptosis by the proto-oncogene Pim-2. *PLoS ONE* **7**: e34736.

Li A, Yuan X, Liang X-F, Liu L, Li J, Li B, Fang J, Li J, He S, Xue M, et al. 2016a. Adaptations of lipid metabolism and food intake in response to low and high fat diets in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* **457**: 43–49.

Li S, Yuan Y, Wang T, Xu W, Li M, Mai K, Ai Q. 2016b. Molecular cloning, functional characterization and nutritional regulation of the putative elongase elov15 in the orange-spotted grouper (*epinephelus coioides*). *PLoS ONE* **11**: e0150544.

Lo J, Lee S, Xu M, Liu F, Ruan H, Eun A, He Y, Ma W, Wang W, Wen Z, et al. 2003. 15,000 Unique Zebrafish EST Clusters and Their Future Use in Microarray for Profiling Gene Expression Patterns During Embryogenesis. *Genome Research* **13**: 455–466.

Lu JJ, Langer R, Chen J. 2009. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Molecular pharmaceutics* **6**: 763–771.

Luo W, Brouwer C. 2013. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* **29**: 1830–1831.

M

MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP. 1998. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release* **56**: 259–272.

Madsen L, Rustan AC, Vaagenes H, Berge K, Dyrøy E, Berge RK. 1999. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids* **34**: 951–963.

Mao S, Sun W, Kissel T. 2010. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**: 12–27.

Marandel L, Seiliez I, Véron V, Skiba-Cassy S, Panserat S. 2015. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiological genomics* **47**: 253–263.

Mardis ER. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics Human Genetics* **9**: 387–402.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y, Chen Z, et al. 2005. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* **437**: 376–380.

Marini C, Bianchi G, Buschiazzo A, Ravera S, Martella R, Bottoni G, Petretto A, Emionite L, Monteverde E, Capitanio S, et al. 2016. Divergent targets of glycolysis and oxidative phosphorylation result in additive effects of metformin and starvation in colon and breast cancer. *Scientific Reports* **6**: 19569.

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10.

Masanori N, Ikeda S. 1972. Carbohydrate Metabolism in Fish-III. Effect of Dietary Composition on Metabolism of Glucose-U-14C and Glutamate-U-14C in Carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **38**: 137–143.

Mashek DG, Li LO, Coleman RA. 2006. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J. Lipid Res* **47**: 2004–2010.

Matsumura T, Thurman RG. 1983. Measuring rates of O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: stop-flow experiments with perfused liver. *Am J Physiol* **244**: G656–G659.

McGoogan BB, Gatlin DM. 2000. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* **182**: 271–285.

Mediavilla D, Meton I, Baanante I V. 2008. Purification and Kinetic Characterization of 6-Phosphofructo-1-kinase from the Liver of Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*). *Journal of Biochemistry* **144**: 235–244.

Metón I, Caseras A, Mediavilla D, Fernandez F, Baanante I V. 1999a. Molecular cloning of a cDNA encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from liver of *Sparus aurata*: nutritional regulation of enzyme expression. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure And Expression* **1444**: 153–165.

- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante I V. 1999b. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The British journal of nutrition* **82**: 223–232.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante I V. 2000. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1491**: 220–228.
- Metón I, Fernández F, Baanante I V. 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **225**: 99–107.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante I V. 2004. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **138**: 145–153.
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante I V. 2006. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* **147**: 3446–3456.
- Miller KM, Maclean N. 2008. Teleost microarrays: development in a broad phylogenetic range reflecting diverse applications. *Journal of Fish Biology* **72**: 2039–2050.
- Miller MB, Tang YW. 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **22**: 611–633.
- Minoru Kanehisa and Susumu Goto. 1999. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* **27**: 29–34.
- Möellering H, Bergmeyer H. 1984. D-Gluconate (D-glucono- δ -lactone) and D-gluconate 6-phosphate. In *Methods in enzymatic analysis*, Bergmeyer HU, , Bergmeyer J, , Graßl M (eds). Verlag Chemie, Weinheim; 220–227.
- Monroig Ó, Webb K, Ibarra-Castro L, Holt GJ, Tocher DR. 2011. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture* **312**: 145–153.
- Monroig Ó, Wang S, Zhang L, You C, Tocher DR, Li Y. 2012. Elongation of long-chain fatty acids in rabbitfish *Siganus canaliculatus*: Cloning, functional characterisation and tissue distribution of Elovl5- and Elovl4-like elongases. *Aquaculture* **350–353**: 63–70.
- Moon TW. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **129**: 243–249.
- Morais S, Pratoomyot J, Taggart JB, Bron JE, Guy DR, Bell JG, Tocher DR. 2011. Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC genomics* **12**: 255.
- Morais S, Castanheira F, Martinez-Rubio L, Conceição LEC, Tocher DR. 2012. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1821**: 660–671.
- Morash AJ, Bureau DP, McClelland GB. 2009. Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **152**: 85–93.
- Moreira IS, Peres H, Couto A, Enes P, Oliva-Teles A. 2008. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* **274**: 153–160.
- Morrey JD, Motter NE, Taro B, Lay M, Fairman J. 2008. Efficacy of cationic lipid-DNA complexes (CLDC) on hepatitis B virus in transgenic mice. *Antiviral research* **79**: 71–79.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. 1996. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharmaceutical Research* **13**: 701–709.

Murai M, Matsunobu K, Kudo S, Ifuku K, Kawamukai M, Miyoshi H. 2014. Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by photoaffinity labeling. *Biochemistry* **53**: 3995–4003.

N

Navarro I, Gutiérrez J, Planas J. 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* **102**: 401–407.

Navarro I, Leibush B, Moon TW, Plisetskaya EM, Banos N, Méndez E, Planas J V, Gutiérrez J. 1999. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **122**: 137–153.

Navarro I, Rojas P, Capilla E, Albalat A, Castillo J, Montserrat N, Codina M, Gutiérrez J. 2002. Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**: 205–216.

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* **405**: 1017–1024.

Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 15103–15110.

NCBI. Genome.

Nimesh S, Thibault MM, Lavertu M, Buschmann MD. 2010. Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum. *Molecular Biotechnology* **46**: 182–196.

O

Ohkubo N, Matsubara T. 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. *Marine Biology* **140**: 187–196.

Okar DA, Wu C, Lange AJ. 2004. Regulation of the regulatory enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Advances in Enzyme Regulation* **44**: 123–154.

Oliva-Teles HPPGA. 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **179**: 415–423.

Ortega A. 2008. *Cultivo de Dorada (Sparus aurata)*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura : Consejo Superior de Investigaciones Científicas: Madrid.

P

Palmer TN, Ryman BE. 1972. Studies on oral glucose intolerance in fish. *Journal of Fish Biology* **4**: 311–319.

Panserat S, Médale F, Brèque J, Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Nutritional Biochemistry* **11**: 22–29.

Panserat S, Perrin A, Kaushik S. 2002a. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of nutrition* **132**: 137–141.

Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2002b. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochimica et biophysica acta* **1579**: 35–42.

Panserat S, Kolditz C, Richard N, Plagnes-Juan E, Piumi F, Esquerré D, Médale F, Corraze G, Kaushik S. 2008. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *British Journal of Nutrition* **100**: 953–967.

- Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerré D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, et al. 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* **294**: 123–131.
- Peres H, Oliva-Teles A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* **205**: 287–299.
- Pérez-Jiménez A, Cardenete G, Hidalgo MC, García-Alcázar A, Abellán E, Morales AE. 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**: 1145–1157.
- Pérez-Jiménez A, Abellán E, Arizcun M, Cardenete G, Morales AE, Hidalgo MC. 2015. Nutritional and metabolic responses in common dentex (*Dentex dentex*) fed on different types and levels of carbohydrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **184**: 56–64.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45.
- Plisetskaya EM. 1998. Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. In *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 3–11.
- Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW. 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **182**: 1015–1045.
- Poupard G, André M, Durliat M, Ballagny C, Boeuf G, Babin PJ. 2000. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. *Cell and tissue research* **300**: 251–261.

Q

- Qian X, Ba Y, Zhuang Q, Zhong G. 2014. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics : a journal of integrative biology* **18**: 98–110.
- Quintens R, Singh S, Lemaire K, De Bock K, Granvik M, Schraenen A, Vroegrijk IOCM, Costa V, Van Noten P, Lambrechts D, et al. 2013. Mice Deficient in the Respiratory Chain Gene *Cox6a2* Are Protected against High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance (P Dzeja, Ed). *PLoS ONE* **8**: e56719.

R

- Ramos EA, Relucio JL V., Torres-Villanueva CAT. 2005. Gene Expression in Tilapia Following Oral Delivery of Chitosan-Encapsulated Plasmid DNA Incorporated into Fish Feeds. *Marine Biotechnology* **7**: 89–94.
- Reinecke M, Björnsson BT, Dickhoff WW, McCormick SD, Navarro I, Power DM, Gutiérrez J. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. In *General and Comparative Endocrinology* 20–24.
- Richardson S. 1999. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International Journal of Pharmaceutics* **178**: 231–243.
- Rise ML, Douglas SE, Sakhrani D, Williams J, Ewart KV, Rise M, Davidson WS, Koop BF, Devlin RH. 2006. Multiple microarray platforms utilized for hepatic gene expression profiling of GH transgenic coho salmon with and without ration restriction. *Journal of Molecular Endocrinology* **37**: 259–282.
- Rome S, Lecomte V, Meugnier E, Rieusset J, Debard C, Euthine V, Vidal H, Lefai E. 2008. Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiological Genomics* **34**: 327–337.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén PL. 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* **242**: 84–89.

S

- Sáez A. 2015. Análisis transcriptómico y de microarrays para la identificación de genes biomarcadores de la utilización de los nutrientes de la dieta en músculo esquelético de dorada (*Sparus aurata*). Universidad de Barcelona.
- Sáez MI, Vizcaíno AJ, Alarcón FJ, Martínez TF. 2017. Comparison of lacZ reporter gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following oral or intramuscular administration of plasmid DNA in chitosan nanoparticles. *Aquaculture* **474**: 1–10.
- Sánchez-Gurmaches J, Cruz-García L, Ibarz A, Fernández-Borrás J, Blasco J, Gutiérrez J, Navarro I. 2013. Insulin, IGF-I, and muscle MAPK pathway responses after sustained exercise and their contribution to growth and lipid metabolism regulation in gilthead sea bream. *Domestic Animal Endocrinology* **45**: 145–153.
- Sánchez A, Villa MCR De. 2008. A Tutorial Review of Microarray Data Analysis. *Universitat de Barcelona*: 1–55.
- Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Pandima Devi M, Selvamurugan N. 2011. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **48**: 234–238.
- Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR. 1989. The lipids. In *Fish Nutrition*, Halver JE (ed). Academic Press: New York; 153–218.
- Sarropoulou E, Kotoulas G, Power DM, Geisler R. 2005. Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology. *Physiological Genomics* **23**: 182–191.
- Sarropoulou E, Tsalafouta A, Sundaram AYM, Gilfillan GD, Kotoulas G, Papandroulakis N, Pavlidis M. 2016. Transcriptomic changes in relation to early-life events in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *BMC Genomics* **17**: 506.
- Šašik R, Woelk CH, Corbeil J. 2004. Microarray truths and consequences. *Journal of Molecular Endocrinology* **33**: 1–9.
- Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. 1996. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 26461–26464.
- Schatzlein AG, Zinselmeyer BH, Elouzi A, Dufes C, Chim YTA, Roberts CJ, Davies MC, Munro A, Gray AI, Uchegbu IF. 2005. Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers. *Journal of Controlled Release* **101**: 247–258.
- Seiliez I, Panserat S, Lansard M, Polakof S, Plagnes-Juan E, Surget A, Dias K, Larquier M, Kaushik S, Skiba-Cassy S. 2011. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **300**: R733–R743.
- Seiliez I, Médale F, Aguirre P, Larquier M, Lanneretonne L, Alami-Durante H, Panserat S, Skiba-Cassy S. 2013. Postprandial regulation of growth- and metabolism-related factors in zebrafish. *Zebrafish* **10**: 237–248.
- Shen S, Callaghan D, Juzwik C, Xiong H, Huang P, Zhang W. 2010. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: A potential role in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **114**: 1590–1604.
- Shewfelt RL, McDonald RE, Hultin HO. 1981. Effect of Phospholipid Hydrolysis on Lipid Oxidation in Flounder Muscle Microsomes. *Journal of Food Science* **46**: 1297–1301.
- Skiba-Cassy S, Panserat S, Larquier M, Dias K, Surget A, Plagnes-Juan E, Kaushik S, Seiliez I. 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* **109**: 1359–1372.
- Soupene E, Kuypers FA. 2008. Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Experimental biology and medicine (Maywood)* **233**: 507–521.
- Srinivasan S, Avadhani NG. 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **53**: 1252–1263.
- Staal GEJ, Van Berkel TJC, Nijessen JG, Koster JF. 1975. Normalisation of red blood cell pyruvate kinase in pyruvate kinase deficiency by riboflavin treatment. *Clinica Chimica Acta* **60**: 323–327.

T

- Tacon AGJ, Cowey CB. 1985. Protein and Amino Acid Requirements. In *Fish Energetics* Springer Netherlands: Dordrecht; 155–183.
- Tian J, He G, Mai K, Liu C. 2015. Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41**: 773–787.
- Tiku PE, Gracey AY, Macartney AI, Beynon RJ, Cossins AR. 1996. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science (New York, N.Y.)* **271**: 815–818.
- Tocher DR. 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* **11**: 107–184.
- Tocher DR, Bell JG, McGhee F, Dick JR, Fonseca-Madrigal J. 2003. Effects of dietary lipid level and vegetable oil on fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) over the whole production cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* **29**: 193–209.
- Tocher DR, Zheng X, Schlechtriem C, Hastings N, Dick JR, Teale AJ. 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* **41**: 1003–1016.
- Torrejon C, Jung UJ, Deckelbaum RJ. 2007. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Actions and molecular mechanisms. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **77**: 319–326.
- Tranulis MA, Dregni O, Christophersen B, Krogdahl Å, Borrebaek B. 1996. A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **114**: 35–39.
- Tranulis MA, Christophersen B, Borrebaek B. 1997. Glucokinase in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Brockmann Bodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **116**: 367–370.
- Trinh KY, O’Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. 1998. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *The Journal of biological chemistry* **273**: 31615–31620.
- Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. 1996. Immune responses to transgene–encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication–defective adenovirus vectors. *Nature Medicine* **2**: 545–550.
- Tsuboi K, Sun Y-X, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. 2005. Molecular Characterization of N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase, a Novel Member of the Choloylglycine Hydrolase Family with Structural and Functional Similarity to Acid Ceramidase. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 11082–11092.

V

- Véron V, Panserat S, Le Boucher R, Labbé L, Quillet E, Dupont-Nivet M, Médale F. 2016. Long-term feeding a plant-based diet devoid of marine ingredients strongly affects certain key metabolic enzymes in the rainbow trout liver. *Fish Physiol Biochem* **42**: 771–785.
- Vieira FA, Thorne MAS, Stueber K, Darias M, Reinhardt R, Clark MS, Gisbert E, Power DM. 2013. Comparative analysis of a teleost skeleton transcriptome provides insight into its regulation. *General and Comparative Endocrinology* **191**: 45–58.

W

- Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, Zernicka-Goetz M. 2004. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell* **6**: 133–144.

- Wang Y, Lu Y, Zhang Y, Ning Z, Li Y, Zhao Q, Lu H, Huang R, Xia X, Feng Q, et al. 2015. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. *Nature Genetics* **47**: 625–631.
- Waterland RA, Basu A, Chance B, Poyton RO. 1991. The Isoforms of Yeast Cytochrome-C Oxidase Subunit-V Alter the In vivo Kinetic Properties of the Holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 4180–4186.
- Wilson RP. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124**: 67–80.
- Wilson RP, Poe WE. 1987. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. *The Journal of nutrition* **117**: 280–285.
- Winegar RA, Monforte JA, Suing KD, O'loughlin KG, Rudd CJ, MacGregor JT. 1996. Determination of Tissue Distribution of an Intramuscular Plasmid Vaccine Using PCR and *In Situ* DNA Hybridization. *Human Gene Therapy* **7**: 2185–2194.
- Wright JJR, O'Hali W, Yang H, Han X-X, Bonen A. 1998. GLUT-4 Deficiency and Severe Peripheral Resistance to Insulin in the Teleost Fish Tilapia. *General and Comparative Endocrinology* **111**: 20–27.
- Wu J, Nantz MH, Zern MA. 2002. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**: d717–d725.

X

- Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, Taha T, Obeid LM, Mao C. 2006. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *The FASEB Journal* **20**: 1813–1825.

Y

- Yang Z, Cheng W, Hong L, Chen W, Wang Y, Lin S, Han J, Zhou H, Gu J. 2007. Adenine Nucleotide (ADP/ATP) Translocase 3 Participates in the Tumor Necrosis Factor–induced Apoptosis of MCF-7 Cells. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 4681–4689.
- Yúfera M, Halm S, Beltran S, Fusté B, Planas J V., Martínez-Rodríguez G. 2012. Transcriptomic Characterization of the Larval Stage in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) by 454 Pyrosequencing. *Marine Biotechnology* **14**: 423–435.

Z

- Zhang XH, Yu HL, Wang FJ, Han YL, Yang WL. 2015. Pim-2 modulates aerobic glycolysis and energy production during the development of colorectal tumors. *International Journal of Medical Sciences* **12**: 487–493.

8. ANEXOS

8 Anexos

A.

González JD, **Silva-Marrero JI**, Metón I, Caballero-Solares A, Viegas I, Fernández F, Miñarro M, Fàbregas A, Ticó JR, Jones JG and Baanante IV. 2016. Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism. *Marine Biotechnology* 18: 85–97.

B.

Silva-Marrero JI, Sáez A, Caballero-Solares A, Viegas I, Almajano MP, Fernández F, Baanante IV and Isidoro Metón. 2017. Transcriptomic analysis of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) for the discovery of mitochondrial oxidative phosphorylation biomarkers of the nutritional condition. Artículo en segunda revisión para publicación.

Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism

Juan D. González, Jonás I. Silva-Marrero, Isidoro Metón, Albert Caballero-Solares, Ivan Viegas, Felipe Fernández, Montserrat Miñarro, et al.

Marine Biotechnology

An International Journal Focusing on Marine Genomics, Molecular Biology and Biotechnology

ISSN 1436-2228

Volume 18

Number 1

Mar Biotechnol (2016) 18:85-97

DOI 10.1007/s10126-015-9670-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism

Juan D. González¹ · Jonás I. Silva-Marrero¹ · Isidoro Metón¹ ·
Albert Caballero-Solares² · Ivan Viegas^{4,5} · Felipe Fernández² · Montserrat Miñarro³ ·
Anna Fàbregas³ · Josep R. Ticó³ · John G. Jones⁴ · Isabel V. Baanante¹

Received: 24 February 2015 / Accepted: 15 September 2015 / Published online: 16 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Alanine aminotransferase (ALT) catalyses a transamination reaction that links carbohydrate and amino acid metabolism. In this study, we examined the effect of silencing cytosolic ALT (cALT) expression on the hepatic metabolism in *Sparus aurata*. A number of siRNA and shRNA designed to down-regulate cALT expression were validated in HEK-293 cells transfected with plasmids expressing *S. aurata* cALT or mitochondrial ALT (mALT) isoforms: ALT silencing significantly decreased the expression levels of *S. aurata* mRNA cALT1 to 62 % (siRNA) and 48 % (shRNA) of the values observed in control cells. The effect of cALT silencing was analysed in the liver of *S. aurata* 72 h after intraperitoneal injection of chitosan-tripolyphosphate (TPP) nanoparticles complexed with a plasmid encoding a shRNA to down-regulate cALT expression (pCpG-si1sh1). In fish fed diets with different ratio of protein to carbohydrate and treated with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1, cALT1 and cALT2 mRNA levels significantly decreased irrespective of the diet. Consistently,

ALT activity decreased in liver of treated animals. In the liver of *S. aurata* treated with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 nanoparticles, down-regulation of cALT expression increased the activity of key enzymes in glycolysis (6-phosphofructo-1-kinase and pyruvate kinase) and protein metabolism (glutamate dehydrogenase). Besides showing for the first time that administration of chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 nanoparticles silences hepatic cALT expression in vivo, our data support that down-regulation of cALT could improve the use of dietary carbohydrates to obtain energy and spare protein catabolism.

Keywords Alanine aminotransferase · siRNA · shRNA · Chitosan · Gene therapy · *Sparus aurata*

Introduction

Alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) links amino acid and carbohydrate metabolism through catalysing the reversible transamination reaction between L-alanine and 2-oxoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. Two ALT isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been isolated in mammals (Sohocki et al. 1997; Yang et al. 2002; Jadhao et al. 2004). In teleost fish, the hepatic levels of ALT activity were referred as a good indicator of protein utilisation (Fynn-Aikins et al. 1995; Sanchez-Muros et al. 1998; Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007). We previously reported the presence of three ALT isoforms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): two cytosolic isoforms resulting from alternative splicing of cALT gene (cALT1 and cALT2) and a mitochondrial enzyme (mitochondrial ALT (mALT)) (Metón et al. 2004; Anemaet et al. 2008). cALT1 is expressed mainly in liver, brain, skeletal muscle, intestine and kidney of *S. aurata*. Higher cALT2 mRNA levels are found in heart, gill or spleen. Moderate expression levels of

✉ Isabel V. Baanante
baanantevazquez@ub.edu

¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

² Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

³ Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

⁴ CNC—Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal 3004-517, Coimbra, Portugal

⁵ CFE—Center for Functional Ecology, Department Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martins de Freitas 3000-456, Coimbra, Portugal

cALT2 are also observed in intestine, kidney and liver. The hepatic expression of cALT2 increases under gluconeogenic conditions such as starvation, while cALT1 is predominant in postprandial periods for utilisation of dietary nutrients. Thus, cALT1 is the most contributing cytosolic isoform to ALT activity in liver of fed fish (Anemaet et al. 2010).

RNA interference (iRNA) confers an effective mechanism for specific silencing of target mRNAs (Fire et al. 1998; Elbashir et al. 2001; Sifuentes-Romero et al. 2011). Plasmids or viral vectors can express small interfering RNAs (siRNAs) as short hairpin RNAs (shRNAs) to induce specific iRNA silencing effects. For the development of iRNA-based therapies and to unravel the molecular knowledge of enzymatic pathways and functional genomic studies, the delivery methods of iRNA-mediating agents are one of the major obstacles. Although viral vectors seem to be highly efficient nucleic acid carriers, safety concerns such as cytotoxicity, oncogenicity and immunogenicity limit their potential use. Non-viral vectors such as shRNA expression plasmids have the advantages of no integration into the host chromosome, low cost and high efficiency for gene silencing in fish cell lines and tissues (Su et al. 2008; Zenke and Kim 2008; Terova et al. 2013).

The high positive charge of chitosan allows interaction with negatively charged nucleic acids to form-based systems for delivery of plasmid DNA and siRNAs into cells (Roy et al. 1999; Mao et al. 2001, 2010; Mansouri et al. 2004; Ramos et al. 2005; Guo et al. 2010; Ragelle et al. 2013, 2014). For aquaculture purposes, chitosan has been used for encapsulation of vaccines. However, the use of shRNA-chitosan particles to perform functional genomic studies in fish is relatively unexplored (Zenke and Kim 2008; Sifuentes-Romero et al. 2011; Borgogna et al. 2011). To our knowledge, no studies have addressed knockdown of ALT gene expression and the effect of ALT silencing on the intermediary metabolism.

In carnivorous fish, dietary amino acids are used not only as building blocks for protein synthesis but also as important substrates for energy production and gluconeogenesis. Instead, these animals have a limited capacity for dietary carbohydrate utilisation. This metabolic profile mimics non-insulin-dependent diabetes mellitus in mammals after a glucose load and led to consider carnivorous fish as glucose intolerant (Covey and Walton 1989; Moon 2001; Hemre et al. 2002). We previously reported that amino-oxyacetate (AOA)-mediated inhibition of cALT activity could favour the use of dietary carbohydrates in liver of *S. aurata* (González et al. 2012). In the present study, we hypothesised that administration of chitosan nanoparticles complexed with a plasmid expressing a shRNA to knockdown cALT expression in liver could improve carbohydrate utilisation for energy demands in *S. aurata*, thereby sparing the use of dietary amino acids as an energy source.

Material and Methods

Experimental Design and Procedures

Gilthead seabream (*S. aurata*) juveniles (5 g) were obtained from Piscimar (Andromeda Group, Burriana, Castellón, Spain) and maintained in our facilities distributed in aquaria of 260 L at a temperature of 21 °C. Facilities and maintenance procedures were previously described (Fernández et al. 2007). To validate chitosan-tripolyphosphate (TPP) nanoparticles as a vehicle to deliver the expression plasmids pCpG-siRNA (long-lasting expression plasmid of siRNAs; InvivoGen, San Diego, CA, USA), pCpG-siRNA-Scramble (control plasmid that expresses a scramble sequence with no homology with known sequences; InvivoGen, San Diego, CA, USA) and pCpG-si1sh1 (expression plasmid encoding a shRNA to down-regulate cALT expression) to *S. aurata* liver, fish were fed a commercial diet (Microbaq, from Dibaq Diproteg, S.A., Segovia, Spain) for 30 days at 2 % body weight (BW). Thereafter, fish were intraperitoneally injected with chitosan-TPP nanoparticles complexed with pCpG-siRNA (10 µg of plasmid per gram of BW). In a second experiment, to determine the metabolic effect of pCpG-si1sh1, fish were fed for 30 days with two diets differing in the protein to carbohydrate ratio, P60 and P45 (Table 1) before treatment. For both experiments and to obtain tissue samples, animals were anaesthetised with MS-222 (1:12,500) before handling to prevent stress (9:30 a.m.) and killed by cervical section. Blood was collected, and liver samples were immediately frozen in liquid N₂ and kept at –80 °C until use. The experimental procedures complied with the guidelines of the Animal Use Committee of the Universitat de Barcelona.

Construction of the Expression Plasmids

The coding sequence of cALT1 was obtained by PCR using oligonucleotides JDAL16 and IMAL20 (Table 2) and the previously described pcALT-GFP as template (Metón et al. 2004). To amplify the coding domain sequence of mALT, a PCR using primer pair JDAL26/IMAL24 (Table 2) and the previously described pmALT-GFP as template was carried out (Metón et al. 2004). The coding sequence of cALT2 was obtained by RT-PCR using total RNA isolated from *S. aurata* liver and oligonucleotides JDAL36 and IMAL20 (Table 2), designed from the previously isolated cALT2 messenger (Anemaet et al. 2008). For the three constructs, PCR products were ligated into pcDNA3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) previously digested with *Hind*III and *Bam*HI, to generate pcDNA3-cALT1, pcDNA3-mALT and pcDNA3-cALT2, respectively.

To obtain pCpG-si1sh1, primers JDsi1sh1s and JDsi1sh1as (Table 2) were mixed at a final concentration of 25 µM each, heated at 90 °C for 1 min and then cooled down at room

Table 1 Composition of the diets supplied to *S. aurata* in this study

	P60	P45	Microbaq
Formulation (%)			
Mineral mixture ^a	0.9	0.9	1.7
Brown fish meal ^b	84.7	63.9	60.5
Fish oil ^c	5.0	8.4	13.5
Starch ^d	7.2	24.6	–
Wheat meal	–	–	11.4
Wheat gluten	–	–	8.3
Soluble fish extract	–	–	2.5
Yeast extract	–	–	1.0
Soy lecithin	–	–	1.0
Vitamin mixture ^e	0.2	0.2	0.1
Carrageenan ^f	2.0	2.0	–
Chemical analysis (%)			
Protein	60	45.3	51.0
Carbohydrates ^g	7.2	24.6	16.3
Fat	14.7	15.7	20.1
Moisture	2.3	1.7	2.1
Celluloses	1	1	0.5
Phosphate	1.3	1.3	1.2
Ash	14.6	11.2	10.5
Gross energy (kJ/g) ^h	21.3	21.2	23.0

^a Mineral mixture provided (mg/kg): CaHPO₄·2H₂O, 7,340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO₄·7H₂O, 60; ZnO, 30; MnO₂, 15; CuSO₄·5H₂O, 1.7; CoCl₂·6H₂O, 1.5; KI, 1.5; Na₂SeO₃, 0.3

^b Corpesca S.A. Super-Prime fish meal (Santiago de Chile, Chile)

^c Cod liver oil from A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain)

^d Pregelatinised corn starch from Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain)

^e Vitamin mixture provided (mg/kg): choline chloride, 1,200; myo-inositol, 400; ascorbic acid, 200; nicotinic acid, 70; all-rac-tocopherol acetate, 60; calcium pantothenate, 30; riboflavin, 15; pyridoxine, 10; folic acid, 10; menadione, 10; thiamin-HCl, 8; all-*trans* retinol, 2; biotin, 0.7 cholecalciferol, 0.05; and cyanocobalamin, 0.05

^f Iota carrageenan (Sigma-Aldrich)

^g Carbohydrates were calculated by difference

^h Calculated from gross composition (protein 24 kJ/g, lipids 39 kJ/g, carbohydrates 17 kJ/g)

temperature. One hundred nanograms of the double-stranded product were ligated into pCpG-siRNA previously digested with *Hind*III and *Acc*65I.

Cell Culture and Transfection

The human embryonic kidney-derived cell line HEK-293 (ATCC CRL-1573) was cultured in modified Essential medium (MEM), supplemented with 10 % foetal bovine serum, 90 IU/l penicillin, 90 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. The cells were grown at 37 °C in 5 % CO₂. One day

Table 2 Primers used in the present study

Primer	Sequence (5' to 3')
JDAL16	GAAAGCTTAAACATGTCCCACCAGGCGGC
IMAL20	GAGGATCCCGTGAGAACTCTTGTGTGAAGCG
JDAL26	GAAAGCTTAAACATGTCCGGCTACAAGGATG
IMAL24	GAGGATCCCGTGAGAACTCTTGTGTGAAGCG
JDAL36	GAAAGCTTTTCATGTTTCAGATATCAGTCCAGAG
JDsilsh1s	GTACCTCGAAGAGAGATGGTGAATCTCAAGAG GATTCACCATCTCTCTCTTTTGGAAA
JDsilsh1as	AGCTTTTCCAAAAAGAAGAGAGATGGTGAATC CTCTTGAGATTCCACCATCTCTCTTCGAG
siRNA1	GAAGAGAGAUGGUGGAAUUCTT
JDpepalphas	ATGGACCCTGTTGTGCTGCAAAGG
JDpepalphas	TAGCTCAGGTTTACTTCTGGCACC
BA0199	GACAACCGATCCGGTATGTGC
BA0299	GACCTGTCCGTCGGGCAGCTC
JDc1s	TTACCCTGAACTCCTGAAAAGACAAC
JDc1as	CCGCAGGCCTCGAGAATAC
JDc2s	TCACACTCTATCTGCTCTCGTGC
JDc2as	GAGAGGTTGAGGAGTGAGCAGAAAAG
JDm1s	CCAGGGTCCGCTCACTGAT
JDm1as	GTCGCGCTCACACTCGATAA
JDRTPHPRTs	CATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC
JDRTPHPRTas	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT
JDBAs	CGTCCACCGCAAATGCTTC
JDBAas	GTTGTTGGGCGTTGGTTGG
JDpcmv1s	ACAACCCGTCGATTCTCC
JDpcmv1as	CCCATTACGGTCAATCCGC

The following primers contain restriction sites indicated in bold and underlined: JDAL16, JDAL26 and JDAL36, *Hind*III; IMAL20 and IMAL24, *Bam*HI

before transfection, 5×10^5 cells were seeded per well in six-well plates. For gene knockdown experiments using siRNAs, transfections were performed using 3 to 300 ng cALT1, cALT2 or mALT expression vectors, 20 to 100 nM siRNA and 4 µl of Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer instructions. For gene silencing assays with shRNA expression vectors, the calcium phosphate co-precipitation method was used to transiently transfect the cells with 30 ng pcDNA3-cALT1 and 30 to 600 ng pCpG-si1sh1 or pCpG-siRNA-Scramble. To correct for variations in transfection efficiency, 300 ng of CMV-β plasmid (*lacZ*) was included in each transfection. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added in each transfection. The cells were harvested 24 to 72 h later washed in PBS, lysed and used to isolate total RNA. β-Galactosidase activity in the clear lysate was determined as described elsewhere (Metón et al. 2006). siRNA1 targeting cALT1 (Table 2) was custom designed and synthesised by Bionova Científica, S.L. (Madrid, Spain).

Semi-Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from *S. aurata* liver by the Total Quick RNA Cells and Tissue kit (Talent, Trieste, Italy). Three micrograms of total RNA was reverse-transcribed to cDNA by incubation with 5× First Strand Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTPs, 6.25 ng/μl random hexamers, 1 U/μl RNasin (Promega, Southampton, UK) and 10 U/μl Moloney murine leukaemia virus RT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 37 °C. The cDNA product and specific oligonucleotides to amplify alpha peptide of *Escherichia coli* β-galactosidase (JDpepalphaS and JDpepalphaAS; Table 2) and *S. aurata* β-actin (BA0199 and BA0299; Table 2) were used subsequently for PCR. After initial denaturation at 95 °C for 3 min, a number of cycles between 20 and 35 at 95 °C for 30 s, 68 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 7 min, were performed to verify that the PCR products amplify linearly and to determine the optimal number of cycles allowing detection without saturation of the signal. The PCR product was analysed in a 2 % agarose gel.

Quantitative RT-PCR

Five micrograms of total RNA isolated from HEK-293 cells or *S. aurata* liver were reverse-transcribed to cDNA using Moloney murine leukaemia virus RT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 37 °C in the presence of random hexamer primers. The cDNA product was used for subsequent quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The mRNA levels of *S. aurata* cALT1, cALT2 and mALT were determined in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 0.4 μM of each primer, 10 μl of SYBR Green (Applied Biosystems) and 1.6 μl of the diluted cDNA product in a final volume of 20 μl. Primer pairs used were JDc1s/JDc1as, JDc2s/JDc2as and JDm1s/JDm1as for *S. aurata* cALT1, cALT2 and mALT, respectively (Table 2). The amount of mRNA for the genes of interest in transiently transfected HEK-293 cells was normalised with human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) using primer pair JDRTPHPRTs/JDRTPHPRAs (Table 2). For in vivo experiments, normalisation of mRNA levels was carried out assessing *S. aurata* β-actin expression with primer pair JDBAs/JDBAAs (Table 2). To correct for variations in transfection efficiency in the experiments performed on HEK-293 cells, mRNA were normalised with β-galactosidase expression using oligonucleotides JDpcmv1s and JDpcmv1as (Table 2). Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method.

Western Blot Analysis

Forty micrograms of hepatic protein extract was loaded per lane in a 10 % SDS-PAGE gel. After electrophoresis, the gel was equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris–HCl, 192 mM glycine, 20 % methanol, pH 8.3) and electroeluted onto NytranN nylon membranes (Whatman, Kent, UK) for 3 h at 60 V at 4 °C. A rabbit polyclonal antibody raised against *S. aurata* ALT was used as primary antibody (1:1,000). Immunodetection of ALT protein was performed with the Immun-Star™ Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Enzyme Activity Assays

Enzyme activities were assayed in crude extracts obtained from powdered frozen liver (1:5, w/v) homogenised in buffer H (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 4 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT and 250 mM sucrose) with a PTA-7 Polytron (Kinematica GmbH, Littau-Luzern, Switzerland) (position 3, 30 s). After centrifugation at 20,000×g for 30 min at 4 °C, the supernatant was collected and used to determine enzyme activities. ALT and aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) were assayed using commercial kits (Linear Chemicals, Montgat, Barcelona, Spain). Assays for 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1; EC 2.7.1.11), pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase-1; EC 3.1.3.11), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH; EC 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PG-DH; EC 1.1.1.44) and glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) were previously described (Metón et al. 1999; Bibiano Melo et al. 2006). Protein content in extracts was determined by the Bradford method at 30 °C using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976). Spectrophotometric determinations were performed at 30 °C in a Cobas Mira S analyser (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland).

Preparation of Chitosan-TPP-Plasmid Nanoparticles

Chitosan-TPP-plasmid nanoparticles were prepared using the modified version of the ionic gelation method (Calvo et al. 1997). Briefly, low molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich, MA, USA) was added to acetate buffer solution at pH 5.0 to reach a final concentration of 2 mg/ml. The mixture was shaken for 3 h under vigorous magnetic stirring in order to get chitosan dissolved in acetate buffer. Then, it was filtered to remove any traces of undissolved chitosan. Three-hundred micrograms of plasmid DNA (pCpG-siRNA, pCpG-siRNA-Scramble or pCpG-si1sh1), previously linearised by restriction with *SacI* (Fermentas, Madrid, Spain), was added to 1.2 ml of a 0.84-mg/ml TPP (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain) solution, and then the TPP-plasmid solution was added dropwise to 3 ml of the previously prepared

chitosan solution (1:0.4 chitosan/TPP ratio) under magnetic stirring at 800 rpm (Fàbregas et al. 2013). Nanoparticles were recovered by centrifugation (12,000 rpm at 15 °C for 10 min). The chitosan-TPP-plasmid complexes were gently rinsed twice with ultrapure water and resuspended through vortex shaking with a 2-ml mannitol solution at 2 % w/v, which acted as a cryoprotectant during lyophilisation. Nanoparticles were subjected to a freeze-drying process at -47 °C. In order to remove internal residual water molecules that may not be frozen, a secondary drying was held at 25 °C. Two hours before administration to fish, the samples were resuspended in 0.5 ml of 0.9 % NaCl solution.

Characterisation of the Nanoparticles

Morphological characterisation of the nanoparticles was performed by atomic force microscopy using peak force tapping mode (Multimode 8 AFM attached to a Nanoscope III Electronics, Bruker, USA). The Z potential values, as a measure of surface charge, were determined by means of laser Doppler microelectrophoresis using a Zetasizer NanoZ (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with DTS1060 capillary cells (Malvern Instruments).

Statistics

Data were analysed by one-way and two-way ANOVA using a computer program (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA). One-way statistical analysis with two levels was determined using Student's *t* test. One-way ANOVA statistical differences among three or more levels and two-way ANOVA were determined with the Scheffé post hoc test.

Results

siRNA-Mediated Knockdown of *S. aurata* cALT Isoforms in HEK-293 Cells

HEK-293 cells were used to validate candidate siRNA sequences to knockdown *S. aurata* cALT expression in vitro. After transfection of HEK-293 cells with constructs expressing *S. aurata* cALT1 (pcDNA3-cALT1), cALT2 (pcDNA3-cALT2) or mALT (pcDNA3-mALT), the expression level of ALT isoforms was assessed by measuring ALT activity in cytosolic and mitochondrial cellular fractions. Thereafter, four different siRNAs designed to silence *S. aurata* cALT isoforms were assayed to select the siRNA responsible for the highest knockdown effect on *S. aurata* cALT1 expression. Twenty-four hours after transfection with 20 nM of each siRNA, 30 ng of pcDNA3-cALT1 and 300 ng of pCMV- β as an internal control for transfection efficiency, the cells were lysed and RNA isolated to perform a qRT-PCR assay to determine cALT1 expression

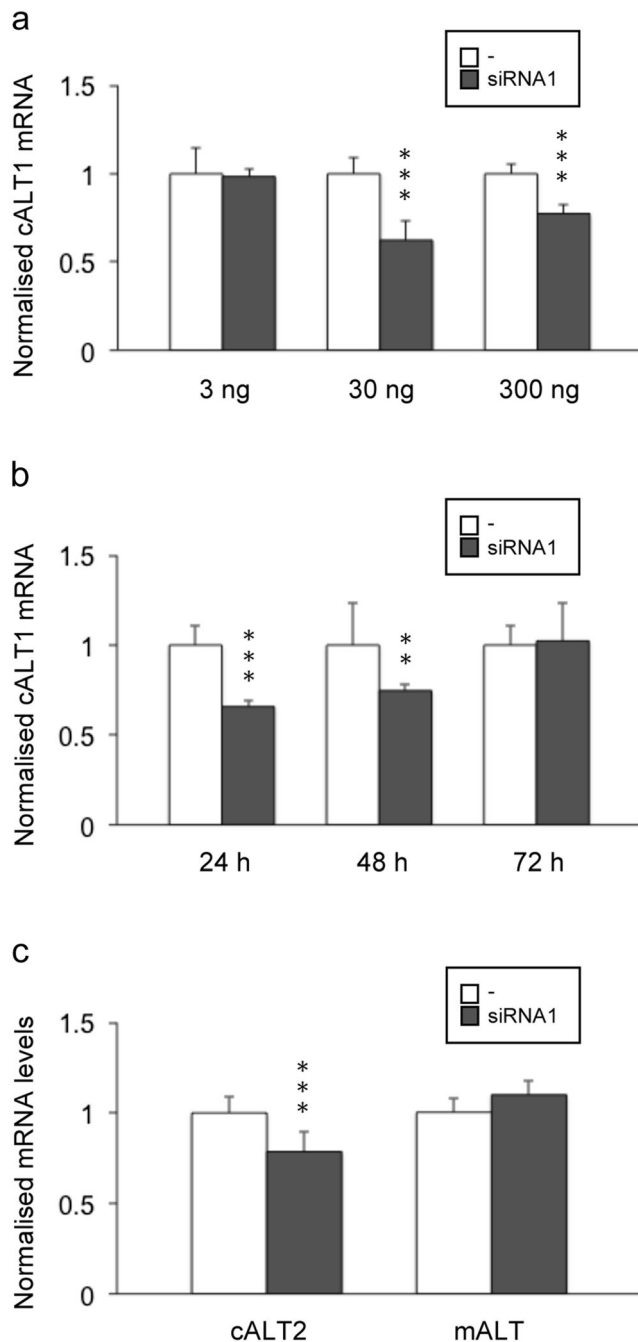
levels. The highest ALT gene silencing effect was observed using the siRNA herein named siRNA1. Two siRNAs (siRNA2 and siRNA4) did not show any effect on cALT1 mRNA levels (data not shown). Therefore, siRNA1 was selected to perform subsequent functional genomic studies. Optimal concentration of the *S. aurata* cALT1 plasmid and time post-transfection (24 to 72 h) to improve an ALT knockdown effect in HEK-293 cells co-transfected with 20 nM siRNA1 was assayed through analysis of cALT1 expression by qRT-PCR. To this end, cALT1 silencing efficiency of siRNA1 was firstly analysed 24 h post-transfection in HEK-293 cells co-transfected with different amounts of the *S. aurata* cALT1 expression plasmid (pcDNA3-cALT1, ranging from 3 to 300 ng). As shown in Fig. 1a, a significant cALT1 silencing effect triggered by siRNA1 was observed when cells were transfected with at least 30 ng of pcDNA3-cALT1, which reduced *S. aurata* cALT1 mRNA levels to about 62 % of the values observed in cells not treated with siRNA. The decreased cALT1 expression observed using 30 ng of pcDNA3-cALT1 was even higher, although not significantly different, than using 300 ng of pcDNA3-cALT1.

In HEK-293 cells transfected with 20 ng of siRNA1, 30 ng of pcDNA3-cALT1 and 300 ng of pCMV- β , qRT-PCR assays were performed to determine cALT1 expression from data obtained after 24, 48 and 72 h post-transfection. The highest decrease in cALT1 mRNA levels (to 66 % of the values in non-treated cells) was observed 24 h after cell transfection. Extended post-transfection times did not allow a greater knockdown effect on cALT1 expression (Fig. 1b).

In addition, we also studied the effect of siRNA1 on the expression of other *S. aurata* ALT isoforms (cALT2 and mALT) expressed in HEK-293 cells. To this end, HEK-293 cells were transfected in the presence or absence of 50 nM siRNA1, 300 ng of pCMV- β and 30 ng of either pcDNA3-cALT2 or pcDNA3-mALT. As expected, transfection with siRNA1 caused a significant knockdown effect in cALT2 mRNA levels to 79 % of the values found in the cells not treated with siRNA (Fig. 1c). However, siRNA1 did not affect mALT expression in transfected cells.

shRNA-Mediated Knockdown of *S. aurata* cALT1 in HEK-293 Cells

Since siRNA1 was able to knockdown the expression of *S. aurata* cALT isoforms at mRNA level in HEK-293 cells, and considering that siRNAs have a short half-life inside the cells, we designed a shRNA based on the siRNA1 sequence and cloned it into pCpG-siRNA, a plasmid designed for long-lasting expression of siRNAs in vivo as the plasmid does not induce inflammatory responses and gene silencing by methylation in vertebrate hosts. The cALT1 silencing efficiency in vitro of the resulting plasmid (pCpG-si1sh1) was assayed by transfection of HEK-293 cells with 30 ng of pcDNA3-cALT1, 300 ng of pCMV- β and different amounts of pCpG-si1sh1. Forty-eight



hours following transfection, the cells were lysed and total RNA isolated to determine cALT1 mRNA levels by qRT-PCR. Transfection with 300 and 600 ng pCpG-si1sh1 caused a significant decrease in cALT1 mRNA levels to about 48 and 60 %, respectively, of the values observed in control cells (Fig. 2).

Administration of Chitosan-TPP-pCpG-siRNA Allows Expression of *E. coli* β -Galactosidase Alpha Peptide in the Liver of *S. aurata*

To study the effect of cALT silencing on intermediary metabolism in vivo, we focused first on finding an appropriate

Fig. 1 siRNA-mediated down-regulation of *S. aurata* cALT isoforms in HEK-293 cells expressing piscine cALT1, cALT2 and mALT. **a** HEK-293 cells grown in six-well plates were transfected with or without siRNA1 (20 nM), different amounts of an expression plasmid encoding *S. aurata* cALT1 (3, 30 or 300 ng) and CMV- β (300 ng). Twenty-four hours following transfection, cells were lysed and RNA isolated. **b** HEK-293 cells grown in six-well plates were transfected with or without siRNA1 (20 nM), an expression plasmid encoding *S. aurata* cALT1 (30 ng) and CMV- β (300 ng). Cells were lysed and RNA isolated at 24, 48 and 72 h following transfection. **c** HEK-293 cells grown in six-well plates were transfected with or without siRNA1 (50 nM), 30 ng of expression plasmids encoding *S. aurata* cALT2 and mALT and CMV- β (300 ng). Twenty-four hours following transfection, cells were lysed and RNA isolated. mRNA levels of *S. aurata* ALT isoforms relative to β -galactosidase (internal control of transfection) and human HPRT were determined by qRT-PCR. Normalised mRNA levels in the cells transfected without siRNA1 were set at 1. The data represent the mean \pm SD values of three independent experiments performed in duplicate. Statistical significance related to cells transfected without siRNA1 is indicated as follows: ** P <0.01; *** P <0.001

method to deliver pCpG-si1sh1 into *S. aurata* liver cells. To assess the use of chitosan-TPP as a vehicle to deliver recombinant DNA to *S. aurata*, chitosan-TPP nanoparticles were complexed with the plasmid pCpG-siRNA, which encompasses an EM7-LacZ alpha peptide cassette that allows expression of amino acids 10–85 of *E. coli* β -galactosidase. Atomic force microscopy of chitosan-TPP nanoparticles showed a rounded morphology with mean diameter size of 193.3 ± 52.8 nm ($n=3$). The mean Z potential of chitosan-TPP samples was 32.0 ± 1.0 mV ($n=3$). Similarly as for chitosan-TPP, images of chitosan-TPP particles complexed with plasmid DNA (pCpG-siRNA) obtained with atomic force microscopy indicated a mean size of 246.0 ± 73.7 nm ($n=3$). The mean Z potential of chitosan-TPP-plasmid DNA particles was 14.4 ± 1.3 mV ($n=3$) (Fig. 3a). Two groups of fish received an intraperitoneal injection of either chitosan-TPP-pCpG-siRNA (10 μ g of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP nanoparticles (control fish). Twenty-four hours after injection, the liver was excised and total RNA was isolated. Expression of bacterial β -galactosidase alpha peptide and *S. aurata* β -actin (endogenous constitutive expression gene) was analysed by semi-quantitative RT-PCR in the liver of fish administered with chitosan-TPP-pCpG-siRNA and control animals. Since the bacterial β -galactosidase alpha peptide is not present in vertebrate tissues, as expected, the mRNA levels of this gene were not detected in control animals. However, bacterial β -galactosidase alpha peptide expression was observed in the liver of all individuals administered with the chitosan-TPP-pCpG-siRNA complex (Fig. 3b). Although β -galactosidase alpha peptide mRNA was detected in the liver of all treated fish, the expression levels differed depending on the individual. This may be due to variations in the quantity of nanoparticles reaching the liver or in the number of transfected hepatic cells. To exclude whether administration of chitosan-TPP and chitosan-TPP complexed with pCpG-siRNA nanoparticles

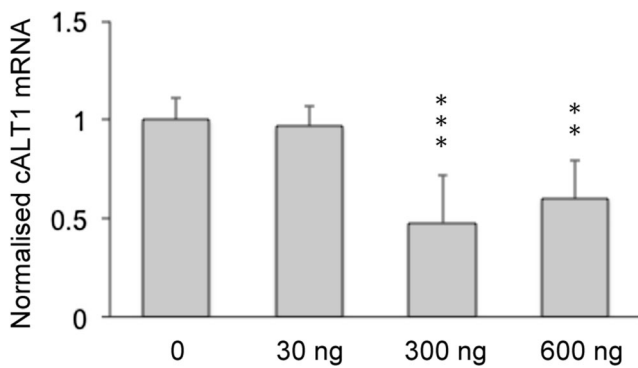


Fig. 2 shRNA-mediated down-regulation of *S. aurata* cALT1 expressed in HEK-293 cells. HEK-293 cells grown in six-well plates were transfected with different amounts of pCpG-si1sh1 (0, 30, 300 or 600 ng), an expression plasmid encoding *S. aurata* cALT1 (30 ng) and CMV- β (300 ng). Forty-eight hours following transfection, cells were lysed and RNA isolated. mRNA levels of *S. aurata* cALT1 relative to β -galactosidase (internal control of transfection) and human HPRT were determined by qRT-PCR. Normalised mRNA levels in the cells transfected in the absence of pCpG-si1sh1 were set at 1. The data represent the mean \pm SD ($n=7$). Statistical significance related to cells transfected in the absence of pCpG-si1sh1 is indicated as follows: ** $P<0.01$

might affect blood glucose levels and the hepatic ALT activity, these parameters were analysed in *S. aurata* intraperitoneally injected with saline, chitosan-TPP or chitosan-TPP-pCpG-siRNA. No differences in glycemia levels and ALT activity were found among the three groups of fish 72 h after treatment (data not shown).

Effect of cALT Silencing on Liver Intermediary Metabolism

The fact that administration of chitosan-TPP-pCpG-siRNA nanoparticles allowed expression of bacterial alpha peptide in the liver prompted us to prepare chitosan-TPP complexed with pCpG-si1sh1 and analyse metabolic effects due to cALT silencing in *S. aurata*. To this end, chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (10 μ g of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (10 μ g of plasmid per gram BW) were intraperitoneally injected to three groups of *S. aurata* fed on Microbaq diet. Seventy-two hours following treatment, cALT1 and cALT2 mRNA levels, immunodetectable ALT protein and enzyme activity corresponding to ALT and AST were determined in liver samples. As shown in Fig. 4a, b, cALT1 mRNA levels and ALT enzyme activity in *S. aurata* administered with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 significantly decreased to 63 and 70 %, respectively, of the values found in the group of animals treated with chitosan-TPP. Although not significant, a similar tendency to decrease cALT2 expression was also observed in pCpG-si1sh1-treated fish (88 % of the values in controls). Consistently, administration of pCpG-si1sh1 caused a significant reduction of immunodetectable ALT protein levels in liver crude extracts compared to the values obtained in controls (fish intraperitoneally injected with chitosan-TPP or chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble). No significant differences were found in AST activity values among the three groups of animals.

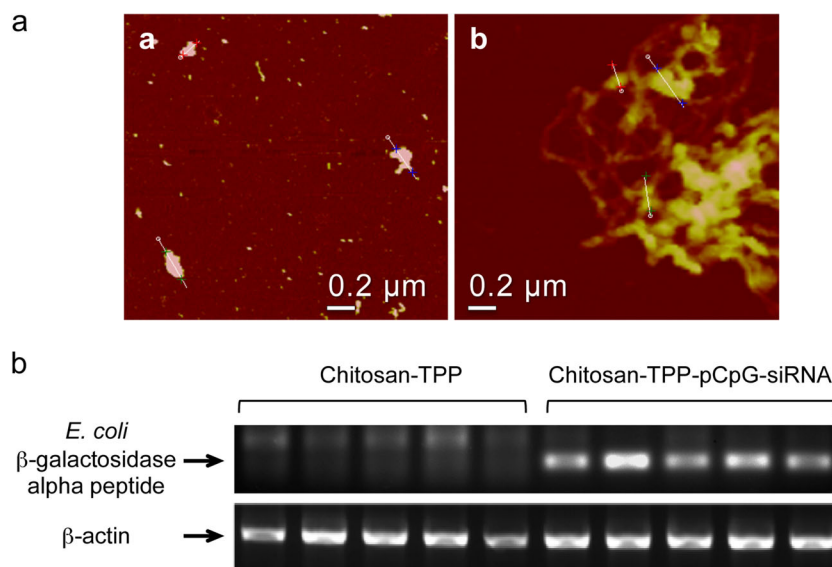


Fig. 3 Atomic force microscopy images of chitosan-TPP-pCpG-siRNA nanoparticles and expression of *Escherichia coli* β -galactosidase alpha peptide in liver of *S. aurata* administered with chitosan-TPP-pCpG-siRNA. **a** Atomic force microscopy images of chitosan-TPP (**a**) and chitosan-TPP-pCpG-siRNA (**b**) nanoparticles. Average particle size for chitosan-TPP and chitosan-TPP-pCpG-siRNA were measured on three samples of each nanoparticle preparation. **b** Two groups of five fish fed 20 days at a daily ration of 2 % BW with Microbaq diet were

intraperitoneally injected with chitosan-TPP or chitosan-TPP-pCpG-siRNA (10 μ g of plasmid per gram BW). The mRNA levels of *E. coli* β -galactosidase alpha peptide were analysed by semi-quantitative RT-PCR in the *S. aurata* liver 24 h following treatment. PCR products corresponding to individual samples were size-fractionated by electrophoresis on a 1 % agarose gel and visualised by ethidium bromide staining

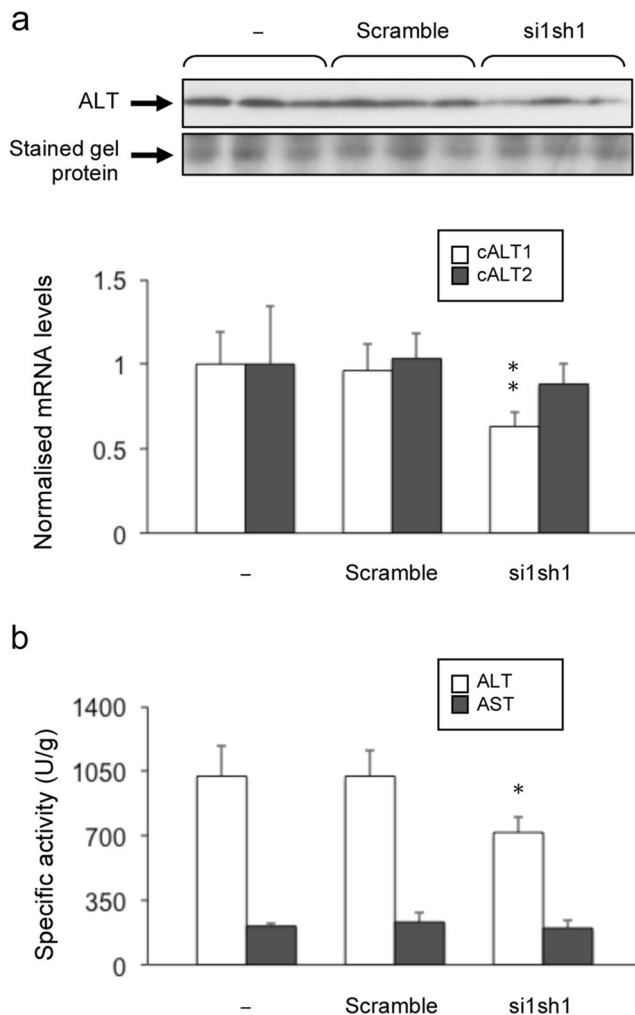


Fig. 4 Effect of cALT silencing on the expression of ALT isoforms in liver of *S. aurata*. Three groups of fish fed 20 days at a daily ration of 2 % BW with Microbaq diet were intraperitoneally injected with chitosan-TPP (–), chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (Scramble; 10 µg of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (si1sh1; 10 µg of plasmid per gram BW). **a** Immunodetection of ALT protein in liver crude extracts, and analysis of hepatic cALT1 and cALT2 mRNA levels relative to *S. aurata* β-actin by qRT-PCR was performed 72 h following treatment. Normalised mRNA levels in the fish administered with chitosan-TPP were set at 1. Expression data represent the mean±SD values ($n=6$). **b** ALT- and AST-specific activity values were determined in the fish liver 72 h following treatment. The data represent the mean±SD values ($n=4$). Statistical significance related to the fish administered with chitosan-TPP is indicated as follows: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

To determine whether knockdown of cALT expression mediated by pCpG-si1sh1 depends on the nutrient composition of the diet, we intraperitoneally injected chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 to two groups of *S. aurata* fed 25 days on diets differing in the protein/carbohydrate ratio, diet P60 (high protein and low carbohydrate content) and P45 (low protein and high carbohydrate content). ALT activity and mRNA levels of cALT1, cALT2 and mALT isoforms were analysed in liver samples of *S. aurata* 72 h after treatment (Fig. 5). Consistent with previous results,

the highest ALT activity was found in the animals fed the high protein/low carbohydrate diet (P60) (Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007; González et al. 2012). Correspondingly, increased cALT1 and cALT2 mRNA levels were observed in the animals fed diet P60. However, mALT expression remained unaffected by diet composition. Administration of chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 decreased cALT1 and cALT2 expression to 53 and 72 %, respectively, of the values observed in *S. aurata* fed diet P60 and to 55 and 57 %, respectively, of the mRNA levels in those fed diet P45. Knockdown of cALT expression caused a concomitant decrease in ALT activity to 59 and 74 % of the values determined in control animals fed diets P60 and P45, respectively. cALT silencing mediated by chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 did not affect mALT expression levels irrespective of the diet supplied.

In order to unravel functional genomic effects associated with silencing of cALT expression, the activity of key enzymes in carbohydrate and protein metabolism was also determined in the liver of fish fed either diet P60 or P45 and administered with chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1. In agreement with previous results, the hepatic activity of glycolytic enzymes PFK-1 and PK and key enzymes of the pentose phosphate pathway (G6P-DH and 6PG-DH) was higher in the liver of *S. aurata* fed the low protein/high carbohydrate diet (P45) (Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007). Knockdown of cALT expression mediated by administration of chitosan-TPP-pCpG-si1sh1, significantly increased PFK-1 (1.4- and 1.9-fold increase compared to controls injected with chitosan-TPP and fed diets P60 and P45, respectively) and PK activity (2.7- and 3.2-fold increase compared to fish injected with chitosan-TPP and fed diets P60 and P45, respectively) (Fig. 6a, b). For both enzymes, cALT silencing caused a higher effect on *S. aurata* fed diet P45. However, no significant changes were detected in the gluconeogenic FBPase-1 activity in the liver of animals fed either diet P60 or P45 and treated with chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (Fig. 6c).

A tendency to present increased activity values (about 1.2-fold) was also found for key enzymes of pentose phosphate pathway (G6P-DH and 6PG-DH) in the liver of *S. aurata* administered with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 and fed diet P60 or P45 (Fig. 7a, b). Concerning GDH, an enzyme with a major role in nitrogen balance, the highest hepatic activity values were observed when feeding the high protein/low carbohydrate diet (P60). Treatment with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 significantly increased GDH activity (1.7- and 1.3-fold in the liver of *S. aurata* fed diet P60 or P45, respectively) (Fig. 7c).

Discussion

In previous studies, we reported that ALT activity levels in *S. aurata* liver depend on the nutritional composition of the

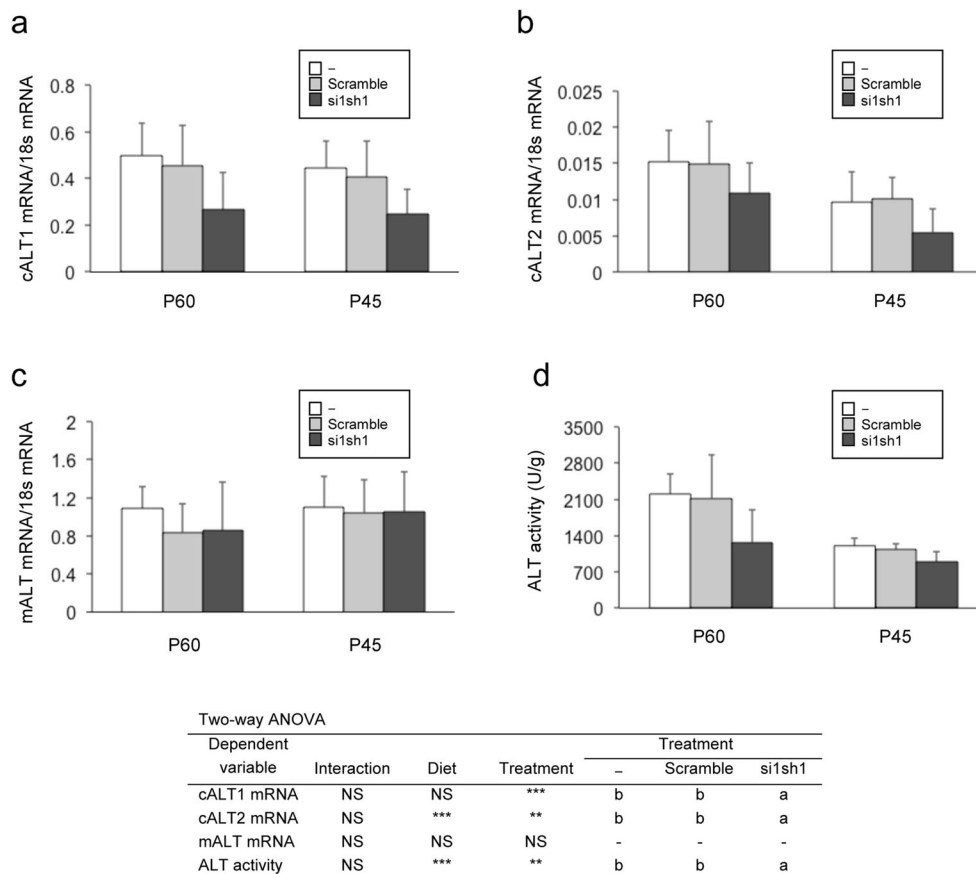


Fig. 5 Effect of cALT silencing on the expression of ALT isoforms in liver of *S. aurata* fed diets differing in nutrient composition. Three groups of fish fed 25 days at a daily ration of 2 % BW with either diet P60 or diet P45 were intraperitoneally injected with chitosan-TPP (-), chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (Scramble; 10 µg of plasmid per gram of BW) or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (si1sh1; 10 µg of plasmid per gram of BW). Analyses were performed on liver samples obtained 72 h following treatment. **a** The mRNA levels of cALT1 relative to *S. aurata* β-actin were determined by qRT-PCR. **b** The mRNA levels of cALT2 relative to

S. aurata β-actin were determined by qRT-PCR. **c** The mRNA levels of mALT relative to *S. aurata* β-actin were determined by qRT-PCR. **d** ALT activity was assayed in liver extracts. The data represent the mean±SD values ($n=7-11$). Statistical significance for independent variables (diet and treatment) and the interaction between independent variables are indicated as follows: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; NS not significant. Homogeneous subsets for the independent variable involving three groups or more (treatment) is indicated with *different letters* ($P<0.05$)

diet (Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007; Anemaet et al. 2008). Moreover, we found that the AOA-dependent inhibition of cytosolic ALT activity may improve the use of dietary carbohydrates in *S. aurata* through a mechanism involving increased PK activity in liver (González et al. 2012). The aim of the present study was to analyse functional genomic effects associated with gene knockdown of *S. aurata* cALT isoforms in liver. To this end, *S. aurata* fingerlings were intraperitoneally administered with chitosan-TPP complexed with a plasmid expressing shRNAs that encoded siRNA for targeting cALT isoforms. In addition to study the effect of cALT knockdown on ALT expression, the activity of key enzymes involved in metabolic pathways related to carbohydrate and protein metabolism was also determined in the liver of fish subjected to cALT silencing.

In order to down-regulate the expression of cALT isoforms, we firstly validated in vitro different specifically designed siRNAs. At present, there is no availability of a

stable hepatic cell line derived from *S. aurata* that is easily transfectable, and therefore selected siRNAs were validated in HEK-293 cells co-transfected with constructs expressing *S. aurata* ALT isoforms. This allowed us to choose siRNA1 to perform further experiments, as it produced the more pronounced knockdown effect on cALT expression and did not affect mALT mRNA levels. siRNA1 can interact with positions 519–537 and 604–622 of cALT1 and cALT2 mRNA sequences (GenBank nos. AY206502 and DQ334748), respectively, and down-regulate both cALT1 and cALT2 expression. In fact, siRNA1 targets both isoforms, which are produced by alternative splicing of cALT gene (Anemaet et al. 2008). However, in vitro and in vivo data indicate that siRNA1 appeared to silence cALT1 expression somewhat more efficiently than cALT2, possibly as a result of secondary structure differences between cALT1 and cALT2 messengers. Indeed, cALT1 lacks an extra 85-bp exon present in cALT2 (Anemaet et al. 2008).

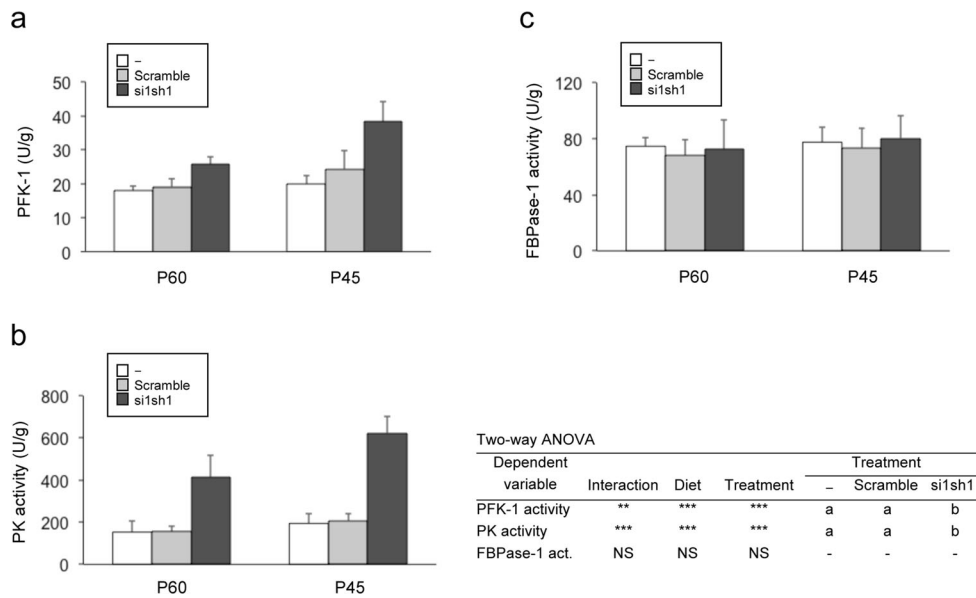


Fig. 6 Effect of cALT silencing on the activity of key enzymes in glycolysis-gluconeogenesis in liver of *S. aurata*. Three groups of fish fed 25 days at a daily ration of 2 % BW with either diet P60 or diet P45 were intraperitoneally injected with chitosan-TPP (-), chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (Scramble; 10 µg of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (si1sh1; 10 µg of plasmid per gram BW). Enzyme activities were assayed on liver extracts from tissue samples

obtained 72 h following treatment. **a** PFK-1 activity. **b** PK activity. **c** FBPase-1 activity. The data represent the mean±SD values ($n=7-13$). Statistical significance for independent variables (diet and treatment) and the interaction between independent variables are indicated as follows: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; NS not significant. Homogeneous subsets for the independent variable involving three groups or more (treatment) are indicated with *different letters* ($P<0.05$)

Based on in vitro results with siRNA1, and with the intention of extending siRNA1 half-life inside the cells, a siRNA1-based shRNA was designed and cloned into pCpG-siRNA to obtain pCpG-si1sh1. In fish species other than zebrafish,

siRNAs for gene silencing were firstly used in rainbow trout embryos. The authors showed the ability of specific siRNAs to target foreign and endogenous cell gene expression (Boonanuntanasarn et al. 2003). Since then, a few studies have

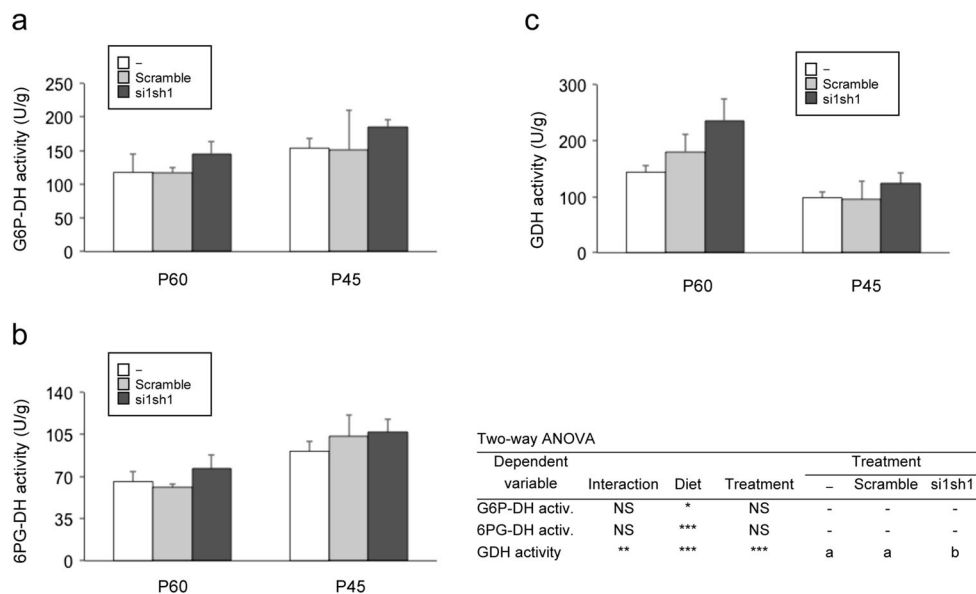


Fig. 7 Effect of cALT silencing on the activity of key enzymes in pentose phosphate pathway and GDH in liver of *S. aurata*. Three groups of fish fed 25 days at a daily ration of 2 % BW with either diet P60 or diet P45 were intraperitoneally injected with chitosan-TPP (-), chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (Scramble; 10 µg of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 (si1sh1; 10 µg of plasmid per gram BW). Enzyme activities were assayed on liver extracts from tissue samples

obtained 72 h following treatment. **a** G6P-DH activity. **b** 6PG-DH activity. **c** GDH activity. The data represent the mean±SD values ($n=7-13$). Statistical significance for independent variables (diet and treatment) and the interaction between independent variables are indicated as follows: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; NS not significant. Homogeneous subsets for the independent variable involving three groups or more (treatment) are indicated with *different letters* ($P<0.05$)

reported the use of shRNAs to produce siRNAs and knock-down the expression of specific genes in fish-derived cell lines and fish species (Su et al. 2008; Zenke and Kim 2008; Terova et al. 2013). Our in vitro results indicate that administration of a shRNA-based vector (pCpG-si1sh1) can be efficiently used to knockdown cALT mRNA levels and thus reduce the economic cost of using synthesised siRNAs.

Based on its beneficial properties compared to viral vectors, chitosan-DNA complexes have increased their use as carrier systems for nucleic acids delivery into cells in culture or animal tissues (Kiang et al. 2004; Huang et al. 2005; Lavertu et al. 2006; Howard et al. 2006; Katas and Alpar 2006; Wang et al. 2009; Mao et al. 2010; Techaarpornkul et al. 2010; Ballarín-González et al. 2013). The low toxicity and the capacity of chitosan to form nanoparticles with nucleic acids represent good characteristics to explore the potential of chitosan-DNA particles for hepatic ALT expression silencing and its downstream metabolic effects. In this regard, it was reported that chitosan nanoparticles complexed with DNA located mainly in liver and kidney following intravenous injection in mice, causing minimal toxicity effects (Mao et al. 2001). In the present study, intraperitoneal administration of chitosan-TPP complexed with the empty vector pCpG-siRNA allowed us to detect expression of bacterial β -galactosidase alpha peptide in the *S. aurata* liver, which suggests that the use of chitosan-TPP complexed with plasmid DNA could be a good strategy to analyse functional genomic effects caused after silencing cALT expression in the liver. Furthermore, no damage or death of animals was found after treatment with chitosan-TPP-DNA particles. Therefore, we have used chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 nanoparticles in order to express a specific shRNA with the aim to induce a siRNA-mediated knockdown of cALT expression in the *S. aurata* liver and to study functional genomic effects derived from cALT silencing in vivo.

Our findings indicate that intraperitoneal delivery of chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 nanoparticles to *S. aurata* down-regulated hepatic mRNA levels of both cALT1 and cALT2 and caused a concomitant decrease in ALT activity irrespective of the diet supplied. Consistent with previous observations, the highest cALT1 and cALT2 expression and ALT activity values were found in the group of animals fed the high protein/low carbohydrate diet (P60). These results confirm that the expression of cALT isoforms represents a biomarker that is sensitive to fish nutritional status and changes in the nutrient composition of the diet (Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007).

To analyse the effect of cALT knockdown on the *S. aurata* intermediary metabolism, activity of key enzymes in glycolysis, gluconeogenesis, pentose phosphate pathway and protein metabolism was determined in the liver of *S. aurata* treated with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1. Silencing of cALT isoforms led to increased activity of glycolytic enzymes (PFK-1 and

PK), whereas it did not affect the gluconeogenic FBPase-1. Concerning the glycolytic enzymes, the effect of cALT down-regulation was significantly more pronounced when feeding the low protein/high carbohydrate diet (P45). In this regard, the hepatic activity of PFK-1 and PK was previously found to correlate positively with the carbohydrate content of the diet and negatively with dietary protein in *S. aurata* (Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007). Taken together, our findings suggest that cALT knockdown stimulates the glycolytic flux in the *S. aurata* liver. In a previous study where cytosolic ALT activity was inhibited by addition of AOA, we also reported increased PK activity in this species (González et al. 2012). Interestingly, a tendency to increase activity of key enzymes in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (G6P-DH and 6PG-DH) was also observed in the liver of *S. aurata* treated with chitosan-TPP-pCpG-si1sh1 nanoparticles, supporting that carbohydrate mobilisation occurs in the liver as a result of decreased cALT expression.

Moreover, silencing of cALT expression increased hepatic GDH activity. *S. aurata* fed the high protein/low carbohydrate diet (P60) exhibited the highest GDH activity levels as a result of cALT down-regulation. GDH links amino acids, carbohydrate metabolism and cellular bioenergetic processes by producing α -ketoglutarate, which can replenish tricarboxylic acid cycle intermediates or generate glutamate for metabolic purposes. Contradictory results have been reported regarding the effect of dietary nutrients on GDH activity (Cowe and Walton 1989; Gómez-Requeni et al. 2003; Figueiredo-Silva et al. 2010; Liu et al. 2012). This may be explained by the fact that GDH undergoes a complex allosteric regulation by amino acids and metabolites, such as activation by ADP and leucine, and inhibition by GTP, ATP and palmitoyl-CoA (Stanley 2009). The rationale behind increased GDH activity resulting from silenced cALT expression in the *S. aurata* liver remains unclear.

In conclusion, our results demonstrate for the first time that chitosan-TPP particles complexed with a shRNA expression vector can efficiently knockdown mRNA levels of cALT isoforms in vivo. Indeed, down-regulation of ALT expression in liver of *S. aurata* might be a good strategy to improve the use of dietary carbohydrates as metabolic fuel, via glucose oxidation through glycolysis or the pentose phosphate pathway, and thus promote the sparing of dietary protein catabolism and increase its utilisation for growth. Development of long-term nucleic acid delivery methods to silence gene expression in vivo will be necessary to further assess the effects of cALT silencing on the use of dietary carbohydrates and growth performance in fish in culture.

Acknowledgments This work was supported by the BIO2009-07589 (MCI, Spain) and AGL2012-33305 (MEC, Spain, co-funded by the European Regional Development Fund, ERDF, EC) grants. The authors thank Piscimar (Burriana, Spain) for providing the fish, the Aquarium

of Barcelona for providing filtered seawater, Eurocoyal (Sant Cugat del Valles, Barcelona, Spain) for the provision of the fishmeal and Dr. José C. Perales (Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Spain) for providing the pCpG-siRNA and pCpG-siRNA-Scramble plasmids.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

- Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F, Baanante IV (2008) A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2833–2844
- Anemaet IG, González JD, Salgado MC, Giralt M, Fernández F, Baanante IV, Metón I (2010) Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol* 45:119–132
- Ballarín-González B, Dagnaes-Hansen F, Fenton RA, Gao S, Hein S, Dong M, Kjems J, Howard KA (2013) Protection and systemic translocation of siRNA following oral administration of chitosan/siRNA nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2:e76
- Bibiano Melo JF, Lundstedt LM, Metón I, Baanante IV, Moraes G (2006) Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145:181–187
- Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Takeuchi T (2003) Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1089–1095
- Borgogna M, Bellich B, Cesàro A (2011) Marine polysaccharides in microencapsulation and application to aquaculture: “from sea to sea”. *Mar Drugs* 9:2572–2604
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 63:125–132
- Cowey CB, Walton MJ (1989) Intermediary metabolism. In: Halver JE (ed) *Fish Nutr*. Academic, San Diego, CA, pp 260–321
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498
- Fàbregas A, Miñarro M, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Carrillo C, Sarrate R, Sánchez N, Ticó JR, Suñé-Negre JM (2013) Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int J Pharm* 446:199–204
- Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, Baanante IV (2007) Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 343:1–10
- Figueiredo-Silva AC, Corraze G, Kaushik S, Peleteiro JB, Valente LMP (2010) Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids* 39:1401–1416
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811
- Fynn-Aikins K, Hughes SG, Vandenberg GW (1995) Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 111:163–170
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Kirchner S, Caldach-Giner J, Médale F, Corraze G, Panserat S, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik SJ, Pérez-Sánchez J (2003) Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220:749–767
- González JD, Caballero A, Viegas I, Metón I, Jones JG, Barra J, Fernández F, Baanante IV (2012) Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxyacetate supplementation. *Br J Nutr* 107:1747–1756
- Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoepflich S, Guo S, Shu Y (2010) Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev* 62:650–666
- Hemre G-I, Mommsen TP, Kroghdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* 8:175–194
- Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J (2006) RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther* 14:476–484
- Huang M, Fong C-W, Khor E, Lim L-Y (2005) Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J Control Release* 106:391–406
- Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, Gong DW (2004) Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* 39:1297–1302
- Katas H, Alpar HO (2006) Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release* 115:216–225
- Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW (2004) The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials* 25:5293–5301
- Lavertu M, Méthot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD (2006) High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 27:4815–4824
- Liu Z, Zhou Y, Liu S, Zhong H, Zhang C, Kang X, Liu Y (2012) Characterization and dietary regulation of glutamate dehydrogenase in different ploidy fishes. *Amino Acids* 43:2339–2348
- Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC (2004) Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm* 57:1–8
- Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW (2001) Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 70:399–421
- Mao S, Sun W, Kissel T (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 62:12–27
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante IV (1999) Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 82:223–232
- Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC, Baanante IV (2004) The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett* 566:251–254

- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV (2006) Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* 147:3446–3456
- Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129:243–249
- Ragelle H, Vandermeulen G, Préat V (2013) Chitosan-based siRNA delivery systems. *J Control Release* 172:207–218
- Ragelle H, Riva R, Vandermeulen G, Naeye B, Pourcelle V, Le Duff CS, D'Haese C, Nysten B, Braeckmans K, De Smedt SC, Jérôme C, Préat V (2014) Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J Control Release* 176:54–63
- Ramos EA, Relucio JLV, Torres-Villanueva CAT (2005) Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds. *Mar Biotechnol* 7:89–94
- Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW (1999) Oral gene delivery with chitosan—DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 5:387–391
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Garcia-Salguero L, de la Higuera M, Lupianez JA (1998) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int J Biochem Cell Biol* 30:55–63
- Sifuentes-Romero I, Milton SL, García-Gasca A (2011) Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: where do we stand? *Mutat Res* 728:158–171
- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S, Daiger SP (1997) Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* 40:247–252
- Stanley CA (2009) Regulation of glutamate metabolism and insulin secretion by glutamate dehydrogenase in hypoglycemic children. *Am J Clin Nutr* 90:862S–866S
- Su J, Zhu Z, Wang Y, Xiong F, Zou J (2008) The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish in vivo. *Mar Biotechnol* 10:262–269
- Techarpornkul S, Wongkupasert S, Opanasopit P, Apirakaramwong A, Nunthanid J, Ruktanonchai U (2010) Chitosan-mediated siRNA delivery in vitro: effect of polymer molecular weight, concentration and salt forms. *AAPS PharmSciTech* 11:64–72
- Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, Saroglia M (2013) Inhibition of myostatin gene expression in skeletal muscle of fish by in vivo electrically mediated dsRNA and shRNAi delivery. *Mol Biotechnol* 54:673–684
- Wang S-L, Yao H-H, Guo L-L, Dong L, Li S-G, Gu Y-P, Qin Z-H (2009) Selection of optimal sites for TGFB1 gene silencing by chitosan-TPP nanoparticle-mediated delivery of shRNA. *Cancer Genet Cytogenet* 190:8–14
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW (2002) cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 79:445–450
- Zenke K, Kim KH (2008) Novel fugu U6 promoter driven shRNA expression vector for efficient vector based RNAi in fish cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 371:480–483

Transcriptomic analysis of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) for the discovery of mitochondrial oxidative phosphorylation biomarkers of the nutritional condition

Jonás I. Silva-Marrero^{1,*}, Alberto Sáez^{1,*}, Albert Caballero-Solares², Ivan Viegas^{3,4}, María Pilar Almajano⁵, Felipe Fernández², Isabel V. Baanante¹ and Isidoro Metón^{1,**}

¹Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

²Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

³Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC), University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal, 3004-517 Coimbra, Portugal

⁴Center for Functional Ecology (CFE), Department Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martins de Freitas 3000-456 Coimbra, Portugal

⁵ Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

*Both authors had equal contribution to this work.

**Corresponding author: Isidoro Metón, Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de

Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520;

E-mail: imeton@ub.edu

Abstract

Background: The impact of nutritional status and diet composition on mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in fish remains largely unknown. To identify biomarkers of interest in nutritional studies, herein we obtained a deep-coverage transcriptome by 454 pyrosequencing of liver and skeletal muscle cDNA normalised libraries from long-term starved gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and fish fed different diets.

Results: After clean-up of high-throughput deep sequencing reads, 699,991 and 555,031 high-quality reads allowed *de novo* assembly of liver and skeletal muscle sequences, respectively (average length: 374 and 441 bp; total megabases: 262 and 245 Mbp). An additional incremental assembly was completed by integrating data from both tissues (hybrid assembly). Assembly of hybrid, liver and skeletal muscle transcriptomes yielded, respectively, 19,530, 11,545 and 10,599 isotigs (average length: 1,330, 1,208 and 1,390 bp, respectively) that were grouped into 15,954, 10,033 and 9,189 isogroups. Following annotation, hybrid transcriptomic data were used to construct an oligonucleotide microarray to analyse nutritional regulation of the expression of 129 genes involved in OXPHOS in *S. aurata*. Starvation upregulated cytochrome c oxidase components and other key OXPHOS genes in the liver, which exhibited higher sensitive to food deprivation than the skeletal muscle. However, diet composition affected OXPHOS in the skeletal muscle to a greater extent than in the liver: most of genes upregulated under starvation presented higher expression among fish fed a high carbohydrate/low protein diet.

Conclusions: Our findings indicate that the expression of coenzyme Q-binding protein (COQ10), cytochrome c oxidase subunit 6A2 (COX6A2) and ADP/ATP translocase 3 (SLC25A6) in the liver, and cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1 (COX5B1) in the liver and the skeletal muscle, are sensitive markers of the nutritional condition that may be relevant to assess the effect of changes in the feeding regime and diet composition on fish farming.

Keywords: Transcriptome, microarray, starvation, diet composition, oxidative phosphorylation,
Sparus aurata

Background

A major advantage of next-generation sequencing (NGS) technology is the ability to provide a huge amount of gene expression data due to its high throughput [1–3]. Among NGS approaches, massive 454 sequencing has become a feasible method for increasing sequencing depth and coverage. Following the pyrosequencing method [4], sequencing error levels in the 454 platform are low (< 1%), arising primarily because of homopolymer runs, but these errors tend to be resolved with sufficient coverage depth to allow assembly of overlapping reads. Expressed sequence tag (EST) projects in fish started in the late 90s with the model species zebrafish, *Danio rerio* [5, 6] and medaka, *Oryzias latipes* [7]. More recently, transcriptomic analyses have been developed for fish species of interest in aquaculture such as Atlantic cod, *Gadus morhua* [8–10], Atlantic salmon, *Salmo salar* [11, 12], common carp, *Cyprinus carpio* [13], rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [14], Senegalese sole, *Solea senegalensis*, and common sole, *Solea solea* [15], and gilthead sea bream larvae, *Sparus aurata* [16–18], among others. *S. aurata* is the most cultured marine fish in Europe, accounting for 46 % of total aquaculture production of marine fish in 2015 [19]. Despite the commercial interest of *S. aurata* production, currently available transcriptomic data for *S. aurata* provide partial information and limited support to identify genes of potential biotechnological interest in nutritional studies. Remarkable efforts to obtain transcriptomic data from *S. aurata* juveniles have been carried out by Garcia de la Serrana et al. [20], who analysed the skeletal muscle transcriptome of fish fed a commercial diet and submitted to short-term fasting at various rearing temperatures; Caldach-Giner et al. [21], who sequenced skeletal muscle, intestine, blood and head kidney (prior and post exposure to infection with the myxosporean parasite *Enteromyxum leei*) RNA samples of *S. aurata* fed with commercial diets; Vieira et al. [22], who analysed the skeleton transcriptome by sequencing RNA samples from vertebrae and gill arches; and Sarropoulou et al. [18], who sequenced brain samples of *S. aurata* submitted to early-life events

during the larval phase. To our knowledge, no tissues from *S. aurata* kept under different nutritional conditions such as long-term starvation and feeding diets differing in nutrient composition have been included for the generation of cDNA libraries and sequencing of ESTs collections using NGS. Therefore, current publicly available data for *S. aurata* is most likely to underrepresent genes involved in metabolic adaptation to long-term starvation and changes in the composition of dietary nutrients.

Oxidative phosphorylation (OXPHOS) is essential for transferring energy from substrate oxidation to ATP production in mitochondria, providing approximately 90 % of the cellular energy. The OXPHOS system comprises complexes I to IV of the respiratory electron transport chain, which generates an electrochemical proton gradient by pumping protons across the inner mitochondrial membrane with the aid of ubiquinone (CoQ) and cytochrome c as mobile electron carriers, and the reversible proton pump F1F0-ATP synthase (complex V), which couples proton reflux into the mitochondrial matrix to generate ATP from ADP and phosphate. Cytochrome c oxidase (or complex IV) catalyses the terminal step of the electron transport chain (reduction of molecular oxygen to water), which is thought to be the rate-limiting reaction of the pathway [23, 24]. Starvation increases the rate of oxygen consumption at about 20 % in the rat liver [25], and enhances cytochrome c oxidase activity in the liver of mice [26]. Starvation increases OXPHOS activity in the liver of mice by stimulating the transcription and efficiency of OXPHOS genes in a process triggered by glucagon/cAMP signalling [27]. Similarly, starvation impairs the glycolytic flux, reduces the ATP/AMP ratio and significantly enhances the activity of cytochrome c oxidase in human fibroblasts [28]. Indeed, the ATP/ADP ratio is considered a major regulator of the phosphorylation status and activity of cytochrome c oxidase [24]. In fish, knowledge of the effect of starvation on the OXPHOS pathway remains limited. In a recent report, Bermejo-Nogales et al. [29] reported the effect of 10 days of starvation on the expression of 88 genes of the OXPHOS pathway in the liver, white skeletal muscle and cardiac muscle of *S. aurata* juveniles. In contrast to previous

observations in mammals, 10 days of starvation downregulated most of OXPHOS genes in the liver of food-deprived fish, while upregulated the expression of some OXPHOS genes in the white skeletal muscle and cardiac muscle.

Little is currently known about the effect of macronutrient composition of the diet on the expression of OXPHOS genes. Accumulating evidence indicates that high-fat diets decrease the expression, activity and assembly of the five OXPHOS complexes in the liver and skeletal muscle of mice [30–32], and partial substitution of dietary protein and fat by starch significantly increases mRNA levels of OXPHOS markers such as ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 2 (UCR2) and cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4) in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), although with expression changes < 2-fold in both cases [33].

The aim of the present study was to perform massive 454 sequencing of liver and white skeletal muscle cDNA libraries from *S. aurata* juveniles submitted to different nutritional conditions (long-term starvation and feeding diets differing in nutrient composition) in order to provide a deep-coverage RNA sequencing data for developing nutritional studies in fish. The resulting database was used to design an oligonucleotide microarray and analyse the effect of nutritional status and diet composition on the expression of genes involved in OXPHOS in *S. aurata*.

Methods

Animals, feeding trial and sampling

Gilthead sea bream (*S. aurata*) juveniles were obtained from Piscimar (Burriana, Castellón, Spain), transported to the laboratory, and distributed into 260 L aquaria maintained at 21 °C and supplied with running seawater in a closed system with active pump filter and UV lamps. The photoperiod was adjusted to a 12 h: 12 h dark-light cycle. Acclimation to our facilities and maintenance

procedures were as previously described [34]. Previous to sampling and to maximise representation and diversity of transcripts of nutritional interest in the cDNA libraries used for 454-pyrosequencing, fish were submitted to six different nutritional conditions. Five groups of fish were fed at a ration of 25 g/kg body weight once a day (10 a.m.) for 23 days with diets that were formulated to cover a range of macronutrients above and below the levels in commercially available diets. Nutrient composition was adjusted to achieve similar energy levels (20 to 22 kJ/g). Diets were named HLL, MHL, MLH, LHH and LLH, where the first, second and third letters indicate the levels of protein, lipids and carbohydrates, respectively (H: high; M: medium; L: low). The composition of the experimental diets is shown in Table 1. A sixth group of fish was deprived of food during the same period of time. To prevent stress during tissue sampling, fish were anaesthetised with MS-222 (1:12,500) before handling (9:30 a.m.) and killed by cervical section. Blood was collected and tissue samples (liver and white skeletal muscle extracted from the middle/dorsal region) were dissected out, immediately frozen in liquid N₂, and kept at -80 °C until use.

RNA extraction, cDNA library construction, normalisation and 454 sequencing

Total RNA was extracted from 30 mg of liver or white skeletal muscle using the RNeasy tissue and RNeasy fibrous tissue, respectively, mini kits (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity was determined spectrophotometrically at 260/280 nm using Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). RNA integrity was determined with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only samples with RNA Integrity Number (RIN) > 9.2 were used for subsequent studies. Six RNA samples per condition (fasting and feeding with diets HLL, MHL, MLH, LHH and LLH) were pooled to construct liver and white skeletal muscle cDNA libraries. The dsDNA synthesis was

performed using a MINT-Universal cDNA synthesis kit (Evrogen, Moscow, Russia). To increase the presence of rare transcripts, the cDNAs libraries were normalised using TRIMMER cDNA normalization kit (Evrogen, Moscow, Russia) following manufacturer's instructions. Sequencing of cDNAs libraries was performed using a GS FLX 454 platform (Roche, Basel, Switzerland) at the CCiTUB of the Universitat de Barcelona (Barcelona, Spain).

Transcriptome assembly and annotation

Pre-processing of raw reads to remove low quality bases, primers and adapters and quality control were performed using Cutadapt [35], Prinseq [36] and FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). The reads were *de novo* assembled using the GSAssembler software (Roche, Basel, Switzerland). Three assemblies were performed: one for sequence data from liver, another for white skeletal muscle, and an incremental assembly using both liver and white skeletal muscle data (hybrid assembly). Gene annotation of unique sequences for the three assemblies was performed with local BLASTx and BLASTn searches against non-redundant protein and nucleotide sequence databases of the NCBI's QBLAST using GPRO software [37] with a significant threshold of E-value < 1e-4. Gene names and putative functions were assigned to each sequence based on the highest alignment score among BLAST best 10 matches. GPRO software was also used to perform functional analysis by mapping annotated unique sequences to the Gene Ontology (GO) database. The number of sequences associated to GO terms was calculated under the categories of biological process, molecular function and cellular component.

Microarray design, hybridization and data analysis

An Agilent custom high-density oligonucleotide microarray (8 x 60k; ID 079501; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was designed to contain 2 different 60-mer probes for each of

the 25,392 assembled unique sequences present in the *S. aurata* hybrid transcriptome. Labelling, hybridisation and scanning were performed using the *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis v. 6.5* protocol (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The microarray analysis was performed using total RNA isolated from liver and skeletal muscle from four fish per condition (starved fish and fish fed diets HLL, MHL and LLH). Briefly, for each sample 200 ng of total RNA was labelled with Cy3 or Cy5 using *Low Input Quick Amp Labeling Kit*. The *Two-Color* and *RNA Spike-In Kit, Two-Color* was used to monitor microarray workflow for linearity, sensitivity and accuracy. Labelled cRNA was purified with the *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After assessing successful dye incorporation and sample integrity, 2.5 µg of each labelled sample was hybridised to the custom-made oligo-microarray at 65 °C for 17 h following *Gene Expression Hybridization Kit* instructions. A double loop hybridisation with dye swap experimental design was adopted [38]. A total of 16 hybridisations (8 per tissue) were performed to maximise discovery of significant changes among the 4 conditions assayed (starvation and feeding with diets HLL, MHL and LLH; n = 4 per condition). Scanning was performed using an *Agilent Microarray Scanner G2565BA*. Outlier spots and spot intensity for Cy3 and Cy5 channels were extracted using *Agilent Feature Extraction* software version 10.7. Loess and Aquantile normalisation for within-and inter-array normalisation, respectively, was applied using the R-Bioconductor package [39, 40]. Data analysis was only considered for transcriptomic annotations of OXPHOS genes with E-value < 1e-10 and HSP/hit > 30. A linear model analysis using Limma [41] was conducted to select differentially expressed genes between conditions.

Quantitative real-time RT-PCR

One microgram of total RNA isolated from liver or white skeletal muscle of *S. aurata* was reverse-transcribed to cDNA using Moloney murine leukemia virus RT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 37 °C in the presence of random hexamer primers. The cDNA product was used for subsequent quantitative real-time PCR (qPCR). The mRNA levels of *S. aurata* NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8 (NDUFB8), NADH ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit (NDUFS1), coenzyme Q-binding protein COQ10 (COQ10), cytochrome b-c1 complex subunit 10 isoform A (UQCR11A), cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1 (COX5B1), cytochrome c oxidase subunit 6A2 (COX6A2), ATP synthase subunit beta (ATP5B) and ADP/ATP translocase 3 (SLC25A6), were determined in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 0.4 µM of each primer, 10 µl of SYBR Green (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), and 1.6 µl of the diluted cDNA product in a final volume of 18 µl. Primers to perform qPCR analysis of the genes of interest (Table 2) were designed from sequence data obtained in the transcriptomic analysis after filtering for E-value < 1e-10 and HSP/hit > 30. To validate the amplification efficiency of primers, standard curves with consecutive dilutions of a cDNA test sample were generated, and PCR products were separated electrophoretically on 2 % agarose gel for band size confirmation. 18S ribosomal RNA (18S) and elongation factor 1 alfa (EF1α) were selected to normalise the amount of mRNA for the genes of interest in each sample using primer pairs shown in Table 2. Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method.

Statistics

Data obtained by performing qPCR were analysed by one-way ANOVA using the SPSS software Version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) and are represented as mean \pm standard deviation. When

statistical significance was found for ANOVA, the Student-Newman-Keuls post hoc test was used to determine differences among treatments.

Results

454 pyrosequencing and assembly

To obtain a deep-coverage database useful for developing nutritional studies in *S. aurata*, total RNA pools were made from the liver and skeletal muscle of 23-day starved fish or fish fed with five different diets for the same time period. The experimental diet HLL (High protein, Low lipids, Low carbohydrates) has a macronutrient composition similar to the diet of wild *S. aurata*. The other diets presented partial substitution of protein by lipids and/or carbohydrates. Liver and white skeletal muscle cDNA libraries were constructed, normalised to increase the presence of rare transcripts, and subsequently sequenced using the 454 FLX technology. Two sequencing runs of liver and skeletal muscle libraries yielded 812,770 and 691,433 reads, respectively. After clean-up and removal of primers and adapter sequences, sequencing of liver and white skeletal muscle libraries generated 699,991 and 555,031 high-quality reads with an average length of 374 and 441 bp and a total of 262 and 245 Mbp sequence data, respectively. Three assemblies were performed: liver, white skeletal muscle and an incremental assembly by integrating data from liver and white skeletal muscle (hybrid transcriptome). A summary of the 454 assemblies is listed in Table 3. Unique reads represented 96.8 and 96.4 % of total reads of liver and skeletal muscle sequencing results, respectively (Figure 1A). Assembly of the hybrid transcriptome was performed by aligning 1,119,088 reads (89.2 % of high quality reads), which generated 23,956 contigs with average and N50 lengths of 901 bp and 1322 bp, respectively, and 102,569 singletons. Contigs were grouped into 19,530 isotigs with average and N50 lengths of 1,330 and 1,536 bp, respectively, and isotigs were further grouped into 15,954 isogroups. For the liver and skeletal muscle, aligned reads (88.6 %

and 91.2 % of high quality reads, respectively) generated 13,313 and 12,333 contigs with an average length of 934 bp (N50 = 1195 bp) and 1056 bp (N50 = 1364 bp), and 43,460 and 30,302 singletons, respectively. The number of isotigs constructed was 11,545 with average and N50 lengths of 1,208 bp and 1,315 bp, respectively, for the liver, and 10,599 isotigs with average and N50 lengths of 1,390 bp and 1,491 bp, respectively, for the skeletal muscle. Isogroups in the liver and skeletal muscle transcriptomes were 10,033 and 9,189, respectively (Table 3). Length distribution of assembled unique sequences is shown in Figure 1B. Liver and white skeletal muscle transcriptomes presented 76.1 and 86.4 % of unique sequences above 500 bp.

Annotation and gene ontology

In the present study, 64.3 %, 73.9 % and 83.1 % unique sequences of liver, skeletal muscle and hybrid transcriptomes, respectively, were annotated using BLASTx and BLASTn against the NCBI non-redundant protein and nucleotide collection database. To categorise gene products, 6,162, 5,581 and 4,793 unique sequences of liver, skeletal muscle and hybrid transcriptomes, respectively, were annotated with specific GO terms. Figure 2 summarises GO terms for the assembled transcriptomes at fourth level for the categories of biological process and cellular components, and at third level for molecular function GO terms. GO terms distribution was similar for the liver, skeletal muscle and hybrid transcriptomes. Terms describing biological process were most abundant for nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139; 17-19 %), gene expression (GO:0010467; 13-14 %), transport (GO:0006810; 11-12 %), and signal transduction (GO:0007165; 10-11 %) (Fig. 2A). GO terms describing molecular function were highest for nucleotide binding (GO:0000166; 12-14 %), hydrolase activity (GO:0016787; 13 %), protein binding (GO:0005515; 10-12 %), transferase activity (GO:0016740; 12 %), and nucleic acid binding (GO:0003676; 11-13 %) (Fig. 2B). Most abundant GO terms describing the results for cellular components were intracellular

(GO:0005622; 50-52 %), membrane (GO:0016020; 37-39 %), plasma membrane (GO:0005886; 3-4 %), extracellular space (GO:0005615; 2 %), and endomembrane system (GO:0012505; 2 %) (Fig. 2C).

GO analysis was also conducted on annotated sequences that were exclusively present either in the liver transcriptome (2,457 sequences out of 19,494) or in the skeletal muscle transcriptome (2,174 sequences out of 17,935). GO terms in the categories of biological process (level 4) and molecular function (level 3) are shown in Figure 3. The more remarkable biological process GO terms showing different percentage of annotated sequences in liver *versus* skeletal muscle were transport (GO:0006810; 23.6 vs. 20.7 %), carbohydrate metabolic process (GO:0005975; 7.1 vs. 5.0 %), lipid metabolic process (GO:0006629; 6.5 vs. 3.8 %), defense response (GO:0006952; 4.1 vs. 0.7 %), cellular amino acid metabolic process (GO:0006520; 3.6 vs. 2.1 %), cell differentiation (GO:0030154; 4.5 vs. 7.6 %), embryo development (GO:0009790; 1.7 vs. 4.8 %), actin cytoskeleton organisation (GO:0030036; 1.5 vs. 3.1 %), pattern specification process (GO:0007389; 1.1 vs. 2.1 %), embryonic morphogenesis (GO:0048598; 0.9 vs. 3.1 %), and mitotic cell cycle (GO:0000278; 0.6 vs. 1.9 %). With regard to molecular function, GO terms with different percentage of annotated sequences in liver and skeletal muscle included transferase activity (GO:0016740; 15.8 vs. 12.3 %), oxidoreductase activity (GO:0016491; 7.5 vs. 5.7 %), ligase activity (GO:0016874; 4.3 vs. 2.3 %), lipid binding (GO:0008289; 2.8 vs. 0.7 %), carbohydrate binding (GO:0030246; 2.1 vs. 0.3 %), nucleotide binding (GO:0000166; 13.0 vs. 20.0 %), and nucleic acid binding (GO:0003676; 9.9 vs. 13.4 %).

A BLAST top-hit species distribution of gene annotations in the hybrid *S. aurata* transcriptome showed the highest homology with NCBI non-redundant database sequences from *Stegastes partitus* (23.5 %), followed by *Larimichthys crocea* (16.3 %), *Neolamprologus brichardi* (7.5 %),

Sparus aurata (3.6 %), *Takifugu rubripes* (3.5 %), *Cynoglossus semilaevis* (3.5 %) and *Kryptolebias marmoratus* (3.4 %) (Fig. 4).

Microarray and gene expression analysis

With the aim of identifying new biomarkers related to OXPHOS of interest for nutritional studies in *S. aurata*, we used the obtained transcriptomic data for designing an oligonucleotide microarray to further analyse changes in gene expression due to long-term starvation or feeding diets differing in macronutrient composition. To this end, three groups of fish were fed 23 days on diets HLL (High protein, Low lipids, Low carbohydrates; with a macronutrient composition similar to the diet of wild *S. aurata*), MHL (Medium protein, High lipids, Low carbohydrates; with a composition similar to commercial diets for *S. aurata* culture) and LLH (Low protein, Low lipids, High carbohydrates; with partial substitution of protein by carbohydrate compared to the HLL diet). A fourth group of fish was deprived of food for the same period. The expression of a total of 129 genes involved in mitochondrial respiratory chain, oxidative phosphorylation and ATP translocation across the mitochondrial inner membrane were analysed in the liver and skeletal muscle of *S. aurata* (Additional file 1). Long-term starvation deeply affected the expression of an important part of analysed genes. Considering statistical significance with an adjusted P value < 0.05 , 24-38 genes (depending on the diet supplied) out of 129 were significantly upregulated in the liver of starved fish, while food restriction downregulated 10-14 genes. Differentially expressed genes in the liver included 8 upregulated and 5 downregulated subunits out of 42 genes associated to NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I of the electron transfer chain), 1 upregulated and 2 downregulated subunits out of 7 from succinate dehydrogenase (complex II), 4 upregulated subunits out of 14 from ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III), 15 upregulated and 4 downregulated subunits out of 34 from cytochrome c oxidase (complex IV), 5 upregulated and 2

downregulated subunits out of 19 from F1F0-ATP synthase (OXPHOS complex V), and 2 upregulated genes out of 3 ADP/ATP translocases (Additional file 2). Food deprivation resulted in 17-40 upregulated and 21-28 downregulated OXPHOS genes in the skeletal muscle (Additional file 3).

Figure 5 shows a heat map hierarchical clustering of differentially expressed genes (fish fed with diets HLL, MHL or LLH *versus* starved fish) with an adjusted P value < 0.05 and with a difference of at least 2-fold in the normalised intensity ratio (Cy5/Cy3 or Cy3/Cy5) for one or more feeding conditions. With a fold change greater than 2, all differentially expressed genes were upregulated by starvation in the liver of *S. aurata*, and 6 genes corresponded to cytochrome c oxidase subunits (COX6A2, COX5B1, COX4I2, COX7A2, COX8B and COX6B1). Indeed, 4 cytochrome c oxidase components (COX6A2, COX5B1, COX4I2 and COX7A2) showed a fold change greater than 4 regardless of the diet supplied (fold change ranging from 4.9 to 86.7). In addition to cytochrome c oxidase subunits, SLC25A6 and COQ10 were also found among upregulated genes with greater fold change expression in the liver of starved fish (SLC25A6: 44.9 to 60.1 fold change depending on the diet supplied; and COQ10: 14.4 to 19.6 fold change). In contrast, starvation resulted in both upregulated and downregulated genes, 18 and 10 respectively, with a fold change greater than 2 in the skeletal muscle. The magnitude of expressional changes due to starvation was lower in the skeletal muscle than in the liver. No genes in the skeletal muscle showed a fold change greater than 4 when compared starved fish *versus* fish fed diets HLL, MHL and LLH. Remarkably, diet composition affected the expression of OXPHOS genes in the skeletal muscle to a greater extent than in the liver. As a general trend, fish fed LLH exhibited higher mRNA levels than fish fed HLL for the majority of significantly upregulated genes in the skeletal muscle of starved fish (Additional file 3).

To validate microarray data, the mRNA levels of several genes involved in OXPHOS were determined by RT-qPCR in liver and skeletal muscle samples from *S. aurata* submitted to long-term starvation or fed diets differing in macronutrient composition. The mRNA abundance of eight genes involved in mitochondrial electron transfer chain (NDUFB8, NDUFS1, COQ10, UQCR11A, COX5B1 and COX6A2), ATP synthesis (ATP5B) and ADP/ATP translocation (SLC25A6) were analysed. The mRNA levels of NDUFB8 and NDUFS1, components of NADH:ubiquinone oxidoreductase, were not affected by the nutritional condition in the liver and the skeletal muscle. (Figs. 6A and 6B). The expression of COQ10, a protein required for coenzyme Q activity in the electron transport chain [42], was also determined in tissue samples of treated fish. In the liver, COQ10 mRNA significantly increased after starvation, reaching values 17-fold higher than fish fed diet HLL, and 9.3 and 10.2-fold higher than fish fed diets LLH and MHL, respectively. A different regulation of COQ10 expression was observed in the skeletal muscle by the nutritional condition: a significant 3-fold decrease was found in starved fish compared to those fed a high protein/low carbohydrate diet (HLL) (Fig. 6C).

The mRNA abundance of UQCR11A and COX5B1, components of ubiquinol-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase, respectively, of the respiratory chain, showed a similar behaviour as a result of starvation or feeding different diets. Starvation significantly increased the expression of both proteins in the liver (UQCR11A: 1.8 and 1.9-fold compared to fish fed HLL and MHL, respectively; and COX5B1: 3.2 to 4.5-fold compared to fed fish regardless of the diet) and the skeletal muscle (1.8 to 2.0-fold for UQCR11A and 2.4 to 9.2-fold for COX5B1 compared to fed fish regardless of the diet). Diet composition did not affect UQCR11A expression, while COX5B1 mRNA levels significantly increased 2.9 and 3.9-fold in the skeletal muscle of fish fed diet LLH compared to those fed HLL and MHL, respectively (Figs. 6D and 6E).

Another component of cytochrome c oxidase, COX6A2, was also greatly affected by food deprivation in the liver. Starvation significantly increased the hepatic mRNA levels of COX6A2 23.1 to 34.6-fold, depending on the diet supplied. In contrast, COX6A2 expression was not affected by the nutritional condition in the skeletal muscle (Fig. 6F). Neither starvation nor diet composition significantly affected the expression of ATP5B, a subunit of the catalytical core of F1F0-ATP synthase, in the skeletal muscle (Fig. 6G). SLC25A6, also known as ADP/ATP translocase 3, is a member of the solute carrier family 25 that facilitates the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane by an antiport mechanism [43]. In the liver, starvation significantly increased 14.3 to 19.3-fold the expression of SLC25A6 compared to fed fish. The effect of starvation depended on the diet composition in the skeletal muscle: fish fed diet HLL presented the lower SLC25A6 mRNA levels, which were 7.6 and 8.2-fold higher in fish fed diet MHL and starved fish, respectively (Fig. 6H).

Discussion

Transcriptomic analysis

The goal of the present study was to increase currently available transcriptomic data for *S. aurata* and identify OXPHOS genes affected by the nutritional status in this species. 454 sequencing of liver and white skeletal muscle cDNA normalised libraries from *S. aurata* juveniles submitted to starvation or feeding on five selected diets allowed us to generate transcriptomes for liver, skeletal muscle and a hybrid transcriptome integrating data from both tissues. The number of isotigs (19,530), contigs (23,956) and average isotig and contig length (1,330 bp and 901 bp, respectively) of the hybrid transcriptome indicates that effective data assemblies were carried out compared to values reported for other fish species of interest in aquaculture [44]. In contrast to previous studies, prior to 454 pyrosequencing we constructed normalised libraries using tissue samples from fish

starved and fish fed five diets differing in nutrient composition to allow maximal representation of transcripts abundance and diversity in regard to dietary condition. Furthermore, the present study reports the first liver transcriptome for *S. aurata* obtained using NGS technology. In regard of the skeletal muscle, the number and average length of assembled sequences were higher than previously reported data for the same tissue and species: Garcia de la Serrana et al. [20] identified 6,502-9,922 isotigs with an average length of 550-936 depending on the experimental condition (11,545 isotigs with an average length of 1,208 bp in the present study), while Caldach-Giner et al. [21] obtained 7,808 contigs with an average length of 968 bp (12,333 contigs with an average length of 1,056 bp in the present study). The length of assembled sequences of the present study allowed annotation of a significant part of unique sequences, improving transcriptome depth.

Functional annotation allowed us to analyse frequency of GO terms in assembled transcriptomes and within annotated sequences exclusively expressed in the liver or the skeletal muscle. Concerning GO terms, liver, skeletal muscle and hybrid transcriptomes exhibited an overall similar functional profiling. However, after filtering common sequences present in the liver and skeletal muscle transcriptomes, marked differences in GO term frequency were found between both transcriptomes for biological process and molecular function categories. Consistent with the plasticity and complexity of the hepatic metabolism, the liver transcriptome presented a higher number of GO terms describing biological processes such as transport, carbohydrate metabolic process, lipid metabolic process, defense response and cellular amino acid metabolic process, and molecular functions related to enzyme activity. During growth skeletal muscle develops an adaptive response that includes tissue repair, cytoskeleton organization and remodeling processes [45]. Consistent with a higher growth rate in *S. aurata* juveniles than in adults [46], GO terms associated with biological processes involved in development and morphogenesis, such as cell differentiation, embryo development and actin cytoskeleton organisation, were more abundant in the skeletal muscle transcriptome from *S. aurata* juveniles.

BLAST similarity analysis of unique sequences in the *S. aurata* hybrid transcriptome against NCBI non-redundant database showed higher homology to genes from ten fish species belonging to the *Percomorhaceae* subdivision (68.3 % of annotations), as it is the case for *S. aurata* [47]. The low number of annotations matching sequences from *S. aurata* highlights the limited genomic information available for this species in the NCBI database.

Nutritional regulation of OXPHOS in *S. aurata*

Transcriptomic data obtained in the present study was further used to identify biomarker genes of interest for nutritional studies by analysing the effect of nutritional status and diet composition on the expression of genes involved in OXPHOS and ATP translocation across the mitochondrial inner membrane in *S. aurata*. Microarray analysis and validation of microarray data by qPCR pointed to a marked increase in the mRNA levels of a high proportion of OXPHOS genes as a result of long-term starvation in the liver of *S. aurata*. In the skeletal muscle, starvation upregulated the majority of OXPHOS genes displaying changes in expression > 2-fold change, although at a considerably smaller magnitude than in the liver. In contrast to the liver, food deprivation downregulated also a significant amount of OXPHOS genes in the skeletal muscle of *S. aurata*. Thus, our findings indicate that the OXPHOS process in the liver is more sensitive to long-term starvation. In support of this hypothesis, mitochondrial-related changes in fasted mice are also greater in the liver than in the skeletal muscle [48]. Indeed, it was reported that fasting does not affect the expression of OXPHOS genes in the skeletal muscle of humans [49].

Bearing in mind that cytochrome c oxidase is considered to be the rate-limiting reaction of the electron transfer chain [23, 24], the fact that starvation markedly increased the expression of multiple components of cytochrome c oxidase is consistent with upregulation of OXPHOS in the liver of food-deprived *S. aurata* (15 out of 35 genes significantly upregulated with an adjusted *P* value < 0.05; 6 of them with a fold change > 2). Our findings are in agreement with previous

evidences highlighting increased OXPHOS activity as an important physiological adaptation in the liver during starvation. Similarly as in *S. aurata*, starvation increases cytochrome c oxidase activity and the transcription of OXPHOS genes in the liver of mice [26, 27], and enhances the activity of cytochrome c oxidase in human fibroblasts [28]. Moreover, a microarray analysis conducted on liver samples of mice indicated that 75 % of diet restriction results in a modest but significant increased expression of an important number of OXPHOS genes [50]. In contrast to our findings, it was reported that the effect of 10 days of starvation mostly downregulated the expression of OXPHOS genes in the liver of food-deprived juveniles of *S. aurata*, while starvation upregulated a number of OXPHOS genes in the white skeletal muscle and cardiac muscle, in most cases with a fold change < 2 [29]. The starvation period (10 days *versus* 23 days in the present study) may explain striking differences among studies. Indeed, long periods of starvation are frequent during the life cycle of many fish species as a result of migration, reproduction and food availability [51]. Hence, metabolic adaptation to food deprivation includes a gradual depletion of hepatic glycogen levels in *S. aurata*, and starvation periods longer than 18 days are required to decrease the liver glycogen content to barely detectable levels [52, 53]. Therefore, it is not surprising that the expression of OXPHOS genes in *S. aurata* tissues could exhibit different patterns depending on the starvation period. In agreement with this hypothesis, three weeks of starvation were necessary to promote a significant increase in the protein content of succinate dehydrogenase, cytochrome c oxidase and F1F0-ATP synthase in the skeletal muscle of fine flounder (*Paralichthys adspersus*) [54]. Thus, stimulation of OXPHOS in the liver of *S. aurata* by long-term starvation may result from a metabolic adaptation that would involve increased lipolysis, enhanced hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis, and reduced glucose uptake and oxidation in peripheral tissues. Consistently, starvation stimulates ATP-dependent processes in the liver, such as gluconeogenesis and ureagenesis, and β -oxidation of fatty acids to provide ketogenic substrates [55]. Therefore,

increased OXPHOS activity may be essential to facilitate substrate oxidation and supply ATP in the liver of long-term starved *S. aurata*.

Among cytochrome c oxidase components significantly upregulated in the liver of starved *S. aurata*, COX6A2 and COX5B1 were more sensitive to food deprivation. Both components may exert an important role in cytochrome c oxidase activity during starvation. In fact, the expression of COX5B, which enhances cytochrome c oxidase activity [56], is repressed by high concentrations of glucose in *Saccharomyces cerevisiae* [57]. The hypothesis that COX6A2 expression may be relevant under food deprivation is supported by the fact that COX6A2^{-/-} mice are very sensitive to food deprivation and lose more weight during starvation than wild type mice [58]. Consistent with an increased expression of cytochrome c oxidase, the mRNA levels of cytochrome c (CYCS), a small one-electron carrier that shuttles electrons from ubiquinol-cytochrome c reductase to cytochrome c oxidase, also increased markedly in the liver of starved fish.

In addition to CYCS and cytochrome c oxidase components, upregulation of two critical proteins in mitochondrial respiration such as COQ10 and SLC25A6 closely fits with an increased OXPHOS function in the liver of starved *S. aurata*. COQ10 is a member of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) domain superfamily that is located in the mitochondrial inner membrane, where binds ubiquinone in its hydrophobic pocket [59]. Deletion of COQ10 gene causes respiratory deficiency and the inability to oxidise NADH and succinate in yeast, while overexpression of COQ10 restores respiratory electron transport in the yeast COQ10 null mutant [42, 60–62]. These observations led to hypothesise that COQ10 is essential for mitochondrial respiration by facilitating ubiquinone biosynthesis and acting as a chaperone for the transport of ubiquinone between electron transfer chain complexes [42, 59, 62]. SLC25A6 is an ADP/ATP translocase that is ubiquitously expressed at levels that are proportional to the respiratory activity of the tissue [63]. As a core component of the mitochondrial permeability transition pore,

SLC25A6 can strongly induce apoptosis in cultured human-derived cells [64, 65]. ADP/ATP translocases are integral proteins that supply cellular energy by coupling mitochondrial respiration with ADP/ATP exchange across the mitochondrial inner membrane. Presence of different ADP/ATP translocases in eukaryotic organisms may enable control of expression levels in response to a variety of stimulus and energy requirements, rather than displaying functional differences [43]. Thus, since long-term starvation caused modest effects on other ADP/ATP translocases (SLC25A4 and SLC25A5) in the liver of *S. aurata*, our findings suggest that increased mRNA levels of SLC25A6 may be critical to support ATP-dependent processes in the liver during starvation. The fact that starvation markedly upregulated COQ10, COX6A2 and SLC25A6 in the liver, while they were barely affected in the skeletal muscle, indicates that the hepatic expression of COQ10, COX6A2 and SLC25A6 can therefore be used as sensitive markers of the nutritional status in *S. aurata*.

In contrast with sensitivity of the expression of OXPHOS genes in the liver of long-term starved *S. aurata*, diet composition did not cause significant changes in the expression pattern of OXPHOS genes. Nevertheless, the expression of OXPHOS genes in the skeletal muscle was more affected by macronutrient dietary composition. Compared to fish fed HLL, the supply of a low-protein/high-carbohydrate diet (LLH) promoted a trend to upregulate mRNA levels of most of the genes whose expression significantly increased in the skeletal muscle of starved fish, such as COX5B1. Given that macronutrient composition of LLH is far from the dietary composition of wild *S. aurata*, our findings are consistent with the fact that partial substitution of dietary protein by carbohydrates reduces weight gain and results in expression levels of appetite-regulating peptides close to the values observed in starved *S. aurata* [66].

Conclusions

454 sequencing of liver and skeletal muscle samples from long-term starved *S. aurata* juveniles and fish fed diets differing in macronutrient composition allowed us to obtain a deep-coverage transcriptome. Transcriptomic data was further used to construct an oligonucleotide microarray to analyse the effect of starvation and diet composition on the expression of OXPHOS components. Our findings support the notion that long-term starvation enhances cytochrome c oxidase and OXPHOS in the liver of *S. aurata*. Among differentially expressed genes, COQ10, COX6A2 and SLC25A6 in the liver and COX5B1 in the liver and the skeletal muscle were remarkably sensitive to changes in the nutritional status, and could be useful for monitoring the impact of changes in the feeding regime and diet composition in fish.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All experimental procedures were approved by the University of Barcelona's Animal Welfare Committee (proceeding #461/16), in compliance with local and EU legislation.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

Transcriptome sequencing data have been deposited to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database and corresponds to BioProject number PRJNA391557. Gene expression data supporting the results of this article are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository with the

number GSE100744. The nucleotide sequence of analysed genes was submitted to the GenBank database under the accession numbers shown in Additional file 1.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The present study was supported by the AGL2012-33305 and AGL2016-78124-R grants (MEC, Spain; co-funded by the European Regional Development Fund, ERDF, EC).

Author's contributions

JIS-M and AS performed most of the experiments. AC-S, IV, MPA, FF, IVB and IM participated in the obtention of experimental data. FF, IVB and IM conceived and designed the study. JIS-M, AS, IVB and IM analysed the data. IVB and IM wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Piscimar (Burriana, Castellón, Spain) for providing *S. aurata* juveniles, and the Aquarium of Barcelona (Barcelona, Spain) for supplying filtered seawater.

References

1. Mutz K-O, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter J-G, Stahl F. Transcriptome analysis using next-

- generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24:22–30.
2. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17:333–51.
 3. Nkili-Meyong AA, Bigarré L, Labouba I, Vallaeyts T, Avarre J-C, Berthet N. Contribution of Next-Generation Sequencing to Aquatic and Fish Virology. *Intervirology.* 2017;59:285–300.
 4. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996;242:84–9.
 5. Gong Z, Yan T, Liao J, Lee SE, He J, Hew CL. Rapid identification and isolation of zebrafish cDNA clones. *Gene.* 1997;201:87–98.
 6. Gong Z. Zebrafish expressed sequence tags and their applications. *Methods Cell Biol.* 1999;60:213–33.
 7. Hirono I, Aoki T. Expressed sequence tags of medaka (*Oryzias latipes*) liver mRNA. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1997;6:345–50.
 8. Morais S, Edvardsen RB, Tocher DR, Bell JG. Transcriptomic analyses of intestinal gene expression of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed diets with Camelina oil as replacement for fish oil. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol.* 2012;161:283–93.
 9. Lanes CFC, Bizuayehu TT, de Oliveira Fernandes JM, Kiron V, Babiak I. Transcriptome of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) early embryos from farmed and wild broodstocks. *Mar Biotechnol.* 2013;15:677–94.
 10. Małachowicz M, Kijewska A, Wenne R. Transcriptome analysis of gill tissue of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from the Baltic Sea. *Mar Genomics.* 2015;23:37–40.
 11. Adzhubei AA, Vlasova A V, Hagen-Larsen H, Ruden TA, Laerdahl JK, Hoyheim B. Annotated expressed sequence tags (ESTs) from pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a searchable

- data resource. *BMC Genomics*. 2007;8:209.
12. De Santis C, Bartie KL, Olsen RE, Taggart JB, Tocher DR. Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2015;15:1–11.
 13. Li G, Zhao Y, Liu Z, Gao C, Yan F, Liu B, et al. De novo assembly and characterization of the spleen transcriptome of common carp (*Cyprinus carpio*) using Illumina paired-end sequencing. *Fish Shellfish Immunol*. 2015;44:420–9.
 14. Olsvik PA, Hemre G-I, Waagbø R. Exploring Early Micronutrient Deficiencies in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Next-Generation Sequencing Technology – From Black Box to Functional Genomics. *PLoS One*. 2013;8:e69461.
 15. Benzekri H, Armesto P, Cousin X, Rovira M, Crespo D, Merlo M, et al. De novo assembly, characterization and functional annotation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and common sole (*Solea solea*) transcriptomes: integration in a database and design of a microarray. *BMC Genomics*. 2014;15:952.
 16. Ferrarresso S, Vitulo N, Mininni AN, Romualdi C, Cardazzo B, Negrisol E, et al. Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *BMC Genomics*. 2008;9:580.
 17. Yúfera M, Halm S, Beltran S, Fusté B, Planas J V., Martínez-Rodríguez G. Transcriptomic Characterization of the Larval Stage in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) by 454 Pyrosequencing. *Mar Biotechnol*. 2012;14:423–35.
 18. Sarropoulou E, Tsalafouta A, Sundaram AYM, Gilfillan GD, Kotoulas G, Papandroulakis N, et al. Transcriptomic changes in relation to early-life events in the gilthead sea bream (*Sparus*

- aurata). *BMC Genomics*. 2016;17:506.
19. FAO Fishery Statistics Web Page. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>. Accessed 11 Jun 2017.
 20. Garcia de la Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston IA. Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 2012;13:181.
 21. Calduch-Giner JA, Bermejo-Nogales A, Benedito-Palos L, Estensoro I, Ballester-Lozano G, Sitjà-Bobadilla A, et al. Deep sequencing for de novo construction of a marine fish (*Sparus aurata*) transcriptome database with a large coverage of protein-coding transcripts. *BMC Genomics*. 2013;14:178.
 22. Vieira FA, Thorne MAS, Stueber K, Darias M, Reinhardt R, Clark MS, et al. Comparative analysis of a teleost skeleton transcriptome provides insight into its regulation. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;191:45–58.
 23. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1604:77–94.
 24. Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of Mammalian Cytochrome c and Cytochrome c Oxidase in the Regulation of Cell Destiny: Respiration, Apoptosis, and Human Disease. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2012. p. 237–64.
 25. Matsumura T, Thurman RG. Measuring rates of O₂ uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: stop-flow experiments with perfused liver. *Am J Physiol*. 1983;244:G656-9.
 26. Casas F, Pineau T, Rochard P, Rodier A, Daury L, Dauça M, et al. New molecular aspects of

- regulation of mitochondrial activity by fenofibrate and fasting. *FEBS Lett.* 2000;482:71–4.
27. Liu L, Nam M, Fan W, Akie TE, Hoaglin DC, Gao G, et al. Nutrient sensing by the mitochondrial transcription machinery dictates oxidative phosphorylation. *J Clin Invest.* 2014;124:768–84.
 28. Marini C, Bianchi G, Buschiazzo A, Ravera S, Martella R, Bottoni G, et al. Divergent targets of glycolysis and oxidative phosphorylation result in additive effects of metformin and starvation in colon and breast cancer. *Sci Rep.* 2016;6:19569.
 29. Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J. Unraveling the Molecular Signatures of Oxidative Phosphorylation to Cope with the Nutritionally Changing Metabolic Capabilities of Liver and Muscle Tissues in Farmed Fish. *PLoS One.* 2015;10:e0122889.
 30. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 2005;54:1926–33.
 31. García-Ruiz I, Solís-Muñoz P, Fernández-Moreira D, Grau M, Colina F, Muñoz-Yagüe T, et al. High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Dis Model Mech.* 2014;7:1287–96.
 32. Li R, Jia Y, Pan S, Li X, Song H, Zhao R. Glucocorticoid Receptor Mediates the Effect of High-Fat Diet on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Mouse Liver. *DNA Cell Biol.* 2016;35:51–8.
 33. Figueiredo-Silva AC, Saravanan S, Schrama JW, Kaushik S, Geurden I. Macronutrient-induced differences in food intake relate with hepatic oxidative metabolism and hypothalamic regulatory neuropeptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol Behav.* 2012;106:499–505.
 34. Fernández F, Miquel AG, Cordoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, et al. Effects of diets with

- distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2007;343:1–10.
35. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011;17:10.
36. Schmieder R, Edwards R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLoS One.* 2011;6:e17288.
37. Futami R, Muñoz-Pomer A, Viu J, Dominguez-Escribá L, Covelli L, Bernet G, et al. GPRO: the professional tool for annotation, management and functional analysis of omic databases. *Biotechnava Bioinforma.* 2011;2011–SOFT3.
38. Kerr MK, Churchill GA. Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics.* 2001;2:183–201.
39. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5:R80.
40. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* 2013.
41. Smyth GK. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:1–25.
42. Allan CM, Hill S, Morvaridi S, Saiki R, Johnson JS, Liao W-S, et al. A conserved START domain coenzyme Q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831:776–91.
43. Kunji ERS, Aleksandrova A, King MS, Majd H, Ashton VL, Cerson E, et al. The transport

- mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863:2379–93.
44. Chen X, Mei J, Wu J, Jing J, Ma W, Zhang J, et al. A Comprehensive Transcriptome Provides Candidate Genes for Sex Determination/Differentiation and SSR/SNP Markers in Yellow Catfish. *Mar Biotechnol.* 2015;17:190–8.
45. Calduch-Giner JA, Davey G, Saera-Vila A, Houeix B, Talbot A, Prunet P, et al. Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC Genomics.* 2010;11:193.
46. Hadj-Taieb A, Ghorbel M, Hadj-Hamida N Ben, Jarboui O. Sex ratio, reproduction, and growth of the gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Pisces: Sparidae), in the Gulf of Gabes, Tunisia. *Ciencias Mar.* 2013;39:101–12.
47. Betancur-R R, Broughton RE, Wiley EO, Carpenter K, López JA, Li C, et al. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS Curr.* 2013;5.
48. Nesteruk M, Hennig EE, Mikula M, Karczmarski J, Dzwonek A, Goryca K, et al. Mitochondrial-related proteomic changes during obesity and fasting in mice are greater in the liver than skeletal muscles. *Funct Integr Genomics.* 2014;14:245–59.
49. Wijngaarden MA, van der Zon GC, van Dijk KW, Pijl H, Guigas B. Effects of prolonged fasting on AMPK signaling, gene expression, and mitochondrial respiratory chain content in skeletal muscle from lean and obese individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304:E1012-21.
50. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, Klaassen CD. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver—insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One.* 2014;9:e88584.

51. Day RD, Tibbetts IR, Secor SM. Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes. *J Comp Physiol B*. 2014;184:497–512.
52. Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante I V. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr*. 1999;82:223–32.
53. Metón I, Fernández F, Baanante I V. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis–gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 2003;225:99–107.
54. Fuentes EN, Safian D, Einarsdottir IE, Valdés JA, Elorza AA, Molina A, et al. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;186:172–80.
55. Soeters MR, Soeters PB, Schooneman MG, Houten SM, Romijn JA. Adaptive reciprocity of lipid and glucose metabolism in human short-term starvation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303:E1397-407.
56. Waterland RA, Basu A, Chance B, Poyton RO. The isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V alter the in vivo kinetic properties of the holoenzyme. *J Biol Chem*. 1991;266:4180–6.
57. Hodge MR, Singh K, Cumsky MG. Upstream activation and repression elements control transcription of the yeast COX5b gene. *Mol Cell Biol*. 1990;10:5510–20.
58. Quintens R, Singh S, Lemaire K, De Bock K, Granvik M, Schraenen A, et al. Mice Deficient in the Respiratory Chain Gene Cox6a2 Are Protected against High-Fat Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *PLoS One*. 2013;8:e56719.

59. Murai M, Matsunobu K, Kudo S, Ifuku K, Kawamukai M, Miyoshi H. Identification of the Binding Site of the Quinone-Head Group in Mitochondrial Coq10 by Photoaffinity Labeling. *Biochemistry*. 2014;53:3995–4003.
60. Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 Gene Encodes a START Domain Protein Required for Function of Coenzyme Q in Respiration. *J Biol Chem*. 2005;280:42627–35.
61. Cui T-Z, Kawamukai M. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J*. 2009;276:748–59.
62. Jenkins BJ, Daly TM, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB, Bergman LW. Characterization of a *Plasmodium falciparum* Orthologue of the Yeast Ubiquinone-Binding Protein, Coq10p. *PLoS One*. 2016;11:e0152197.
63. Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*. 1992;267:14592–7.
64. Zamora M, Granell M, Mampel T, Viñas O. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett*. 2004;563:155–60.
65. Guo X, Huang Y, Qi Y, Liu Z, Ma Y, Shao Y, et al. Human cytomegalovirus miR-UL36-5p inhibits apoptosis via downregulation of adenine nucleotide translocator 3 in cultured cells. *Arch Virol*. 2015;160:2483–90.
66. Babaei S, Sáez A, Caballero-Solares A, Fernández F, Baanante I V, Metón I. Effect of dietary macronutrients on the expression of cholecystokinin, leptin, ghrelin and neuropeptide Y in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol*. 2017;240:121–8.

Figure legends

Figure 1. Characteristics of 454-pyrosequencing reads and unique sequences for *S. aurata* liver and skeletal muscle transcriptomes. A. Frequency distribution of identical 454-pyrosequencing reads of liver and skeletal muscle samples. B. Average length distribution of assembled unique sequences of liver and skeletal muscle transcriptomes.

Figure 2. Functional gene ontology classification of *S. aurata* liver, skeletal muscle and hybrid transcriptomes. The 4th level of GO terms was used for biological process (A), the 3rd level for molecular function (B), and the 4th level for cellular component (C).

Figure 3. Functional gene ontology classification of annotations exclusively present in the liver and the skeletal muscle. The 4th of GO terms was used for biological process (A), and the 3rd level for molecular function (B).

Figure 4. BLAST top-hit species distribution of homologous sequences to annotations in the *S. aurata* hybrid transcriptome.

Figure 5. Heat map image of differentially transcribed genes involved in OXPHOS. Three groups of fish were fed 23 days at a daily ration of 25 g/kg body weight with diets HLL, MHL or LLH. A fourth group of animals was fasted for the same period. Hierarchical clustering of differentially expressed genes in the liver (A) and the skeletal muscle (B) is represented from microarray data obtained from tissue samples of *S. aurata* fed with diets HLL, MHL or LLH versus starved fish) with an adjusted *P* value < 0.05 and a difference of at least 2-fold in the normalised intensity ratio

(Cy5/Cy3 or Cy3/Cy5) for one or more dietary conditions. Results are presented as logFC mean value (n = 4 fish); logFC is the log₂ transformed fold change. Green colour denotes downregulated genes and red colour upregulated genes in fed animals. ATP synthase subunit alpha (ATP5A1), ATP synthase F(0) complex subunit C3 (ATP5G3), ATP synthase subunit e isoform 1 (ATP5I1), ATPase inhibitor (ATPIF1), coenzyme Q-binding protein COQ10 (COQ10), cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2 (COX4I2), cytochrome c oxidase subunit 5A isoform 2 (COX5A2), cytochrome c oxidase subunit 6A2 (COX6A2), cytochrome c oxidase subunit 7A2 (COX7A2), cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1 (COX5B1), cytochrome c oxidase subunit 6B1 (COX6B1), cytochrome c oxidase subunit 6B isoform 1B (COX6B1B), cytochrome c oxidase subunit 8B (COX8B), mitochondrial inner membrane protein COX18 (COX18), cytochrome c (CYCS), electron transfer flavoprotein subunit beta (ETFB), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (MT-ND1), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (MT-ND2), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 (MT-ND4), NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (MT-ND5), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 (NDUFA4), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2 (NDUFA4L2), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 (NDUFA10), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11 (NDUFA11), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3 (NDUFAF3), protein SCO1 homolog (SCO1), succinate dehydrogenase assembly factor 4 (SDHAF4), ADP/ATP translocase 1 (SLC25A4), ADP/ATP translocase 2 (SLC25A5), ADP/ATP translocase 3 (SLC25A6), ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1 (UQCC1), cytochrome b-c1 complex subunit 10 isoform A (UQCR11A), cytochrome b-c1 complex subunit 1 (UQCRC1), cytochrome b-c1 complex subunit 2 (UQCRC2), cytochrome b-c1 complex subunit 6 (UQCRH).

Figure 6. Effect of starvation and diet composition on the expression of OXPHOS genes. Three groups of fish were fed 23 days at a daily ration of 25 g/kg body weight with diets HLL, MHL or LLH. A fourth group of animals was fasted for the same period. Expression levels in the liver and the skeletal muscle are shown for NDUFB8 (A), NDUFS1 (B), COQ10 (C), UQCR11A (D), COX5B1 (E), COX6A2 (F), ATP5B (G) and SLC25A6 (H). Expression levels for each gene were normalised using 18S and EF1 α as housekeeping genes. Results are presented as mean \pm SD (n = 5 fish). Different letters (lowercase for the liver; uppercase for the skeletal muscle) indicate significant differences among conditions ($p < 0.05$).

Table 1. Composition of the diets supplied in this study to *S. aurata*.

	HLL	MHL	MLH	LHH	LLH
Formulation (%)					
Fish meal ^a	81.6	67.6	67.6	54.3	54.3
Fish oil ^b	0.8	13.1	3.1	16.5	6.0
Starch ^c	15.0	16.7	26.7	26.6	37.1
Vitamin mixture ^d	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral mixture ^e	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Carrageenan ^f	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Proximate composition (%)					
Protein	58.0	48.0	48.0	38.6	38.6
Carbohydrates ^g	15.0	16.7	26.7	26.6	37.1
Fat	9.9	20.7	10.7	22.5	12.1
Ash	15.4	12.9	12.9	10.5	10.5
Gross energy (kJ/g) ^h	20.1	22.0	20.0	22.1	20.0

^aCorpesca S.A. Super-Prime fish meal (Santiago de Chile, Chile).

^bFish oil from A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

^cPregelatinised corn starch from Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

^dVitamin mixture provided (mg/Kg): choline chloride, 1200; myo-inositol, 400; ascorbic acid, 200; nicotinic acid, 70; all-rac-tocopherol acetate, 60; calcium pantothenate, 30; riboflavin, 15; piridoxin, 10; folic acid, 10; menadione, 10; thiamin-HCl, 8; all-trans retinol, 2; biotin, 0,7 cholecalciferol, 0.05; cyanocobalamin, 0.05.

^eMineral mixture provided (mg/Kg): CaHPO₄·2H₂O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO₄·7H₂O, 60; ZnO, 30; MnO₂, 15; CuSO₄·5H₂O, 1.7; CoCl₂·6H₂O, 1.5; KI, 1.5; Na₂SeO₃, 0.3.

^fTota carrageenan (Sigma-Aldrich).

^gCarbohydrates were calculated by difference.

^hCalculated from gross composition (protein 24 kJ/g, lipids 39 kJ/g, carbohydrates 17kJ/g).

Table 2. Primers used to analyse gene expression by qPCR.

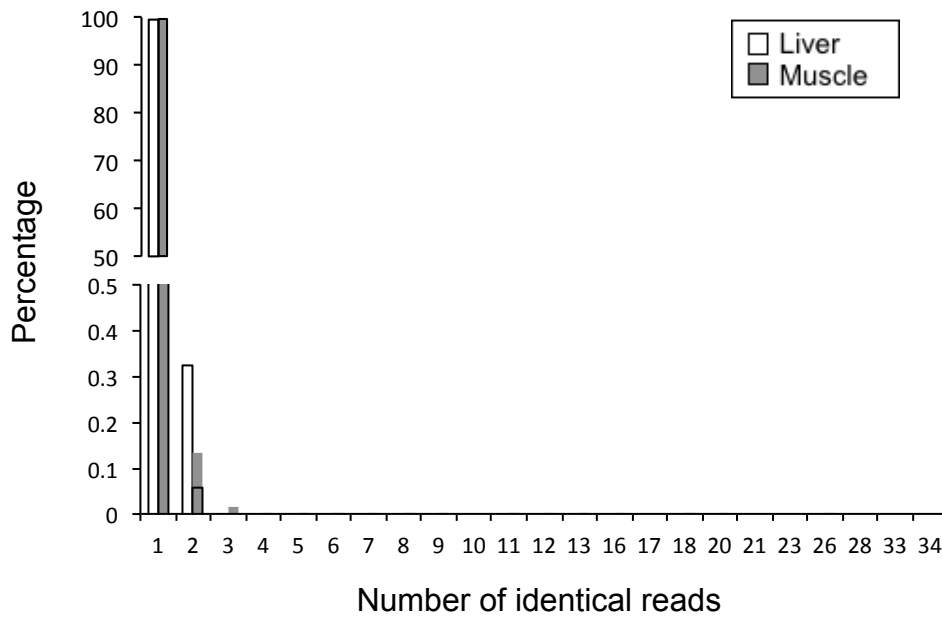
Gene	Accession no. (GenBank)	Name of primer	Sequence (5' to 3')
NDUFB8	MF438220	JA1511	ATATCCCGACAAAGGCGAGGGC
NDUFB8		JA1512	AGGTCAGGGTGGTCCCCTTGT
NDUFS1	MF438168	ASA205F	TGGCGAGGGAGGATTGGAGGAT
NDUFS1		ASA205R	ACAGCCGCGTTCCTGCCTTA
COQ10	MF438156	JA1505	CCAGCAAACGACTCCACTCCTC
COQ10		JA1506	CCCACAGGAGCCCAAGTTTCT
UQCR11A	MF438251	JA1509	TATTCTGAGGGCGTGGGTGC
UQCR11A		JA1510	TCGAGAAATAAGCGCCAGTCTGT
COX5B1	MF438221	JA1513	CCTTCCTGCGGTTCCCCTA
COX5B1		JA1514	CATGAAGGAGGCAAATATGAATGC
COX6A2	MF438235	JS1703	GGGTTCGTGTGAGGGTTGTGG
COX6A2		JS1704	CATCCCTGGTGTTACTGTCTGC
ATP5B	MF438166	JA1507	GGGCAGGGTCAGTCAAATCGTCAG
ATP5B		JA1508	CAACATCTTCCGCTTCACACAGGCT
SLC25A6	MF438196	JA1503	CTGTGTTTCGTCTACCCCCTCG
SLC25A6		JA1504	CTTCACCAAACAGTCTCCCAGGC
18S	AM490061	JDRT18S	TTACGCCCATGTTGTCCTGAG
18S		DTRT18AS	AGGATTCTGCATGATGGTCACC
EF1 α	AF184170	AS-EF1Fw	CCCGCCTCTGTTGCCTTCG
EF1 α		AS-EF1Rv	CAGCAGTGTGGTTCCGTTAGC

Table 3. Summary statistics of 454 sequencing and assembly

	Liver	Muscle	Hybrid
<i>Data generation</i>			
Number of reads	812,770	691,433	1,504,203
Total Megabases	298.9	275.9	574.8
Average length of reads (bp)	368	399	382
<i>After clean-up processing</i>			
Number of high quality reads	699,991	555,031	1,255,022
Total high quality Megabases	261.6	244.7	506.3
Average length of high quality reads (bp)	374	441	404
<i>Assembly</i>			
Number of contigs	13,313	12,333	23,956
Average length contigs	934	1,056	901
N50 contig length	1,195	1,364	1,322
Number of Isotigs	11,545	10,599	19,530
Average length of isotigs	1,208	1,390	1,330
N50 isotig length	1,315	1,491	1,536
Number of Isogroups	10,033	9,189	15,954

Figure 1

A



B

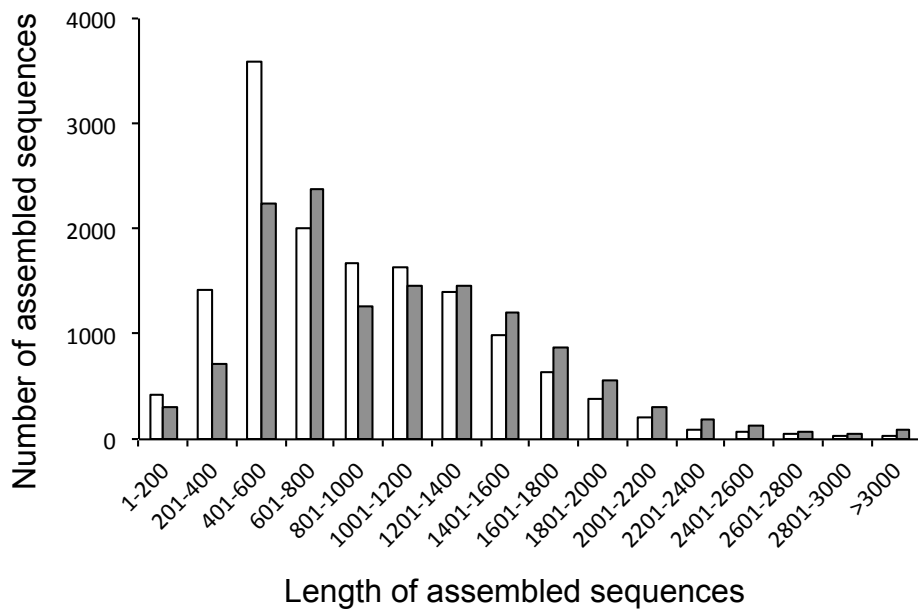


Figure 2

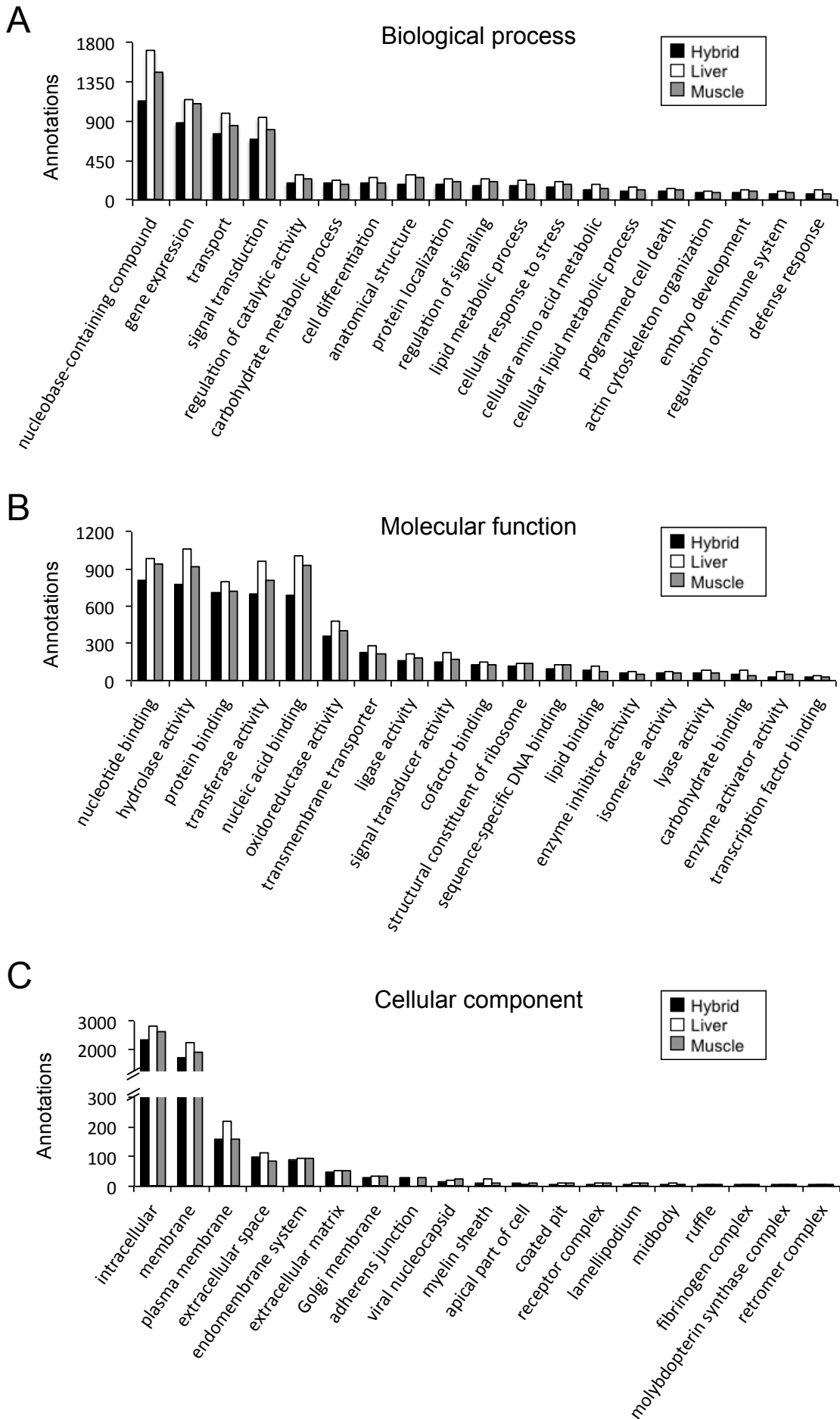
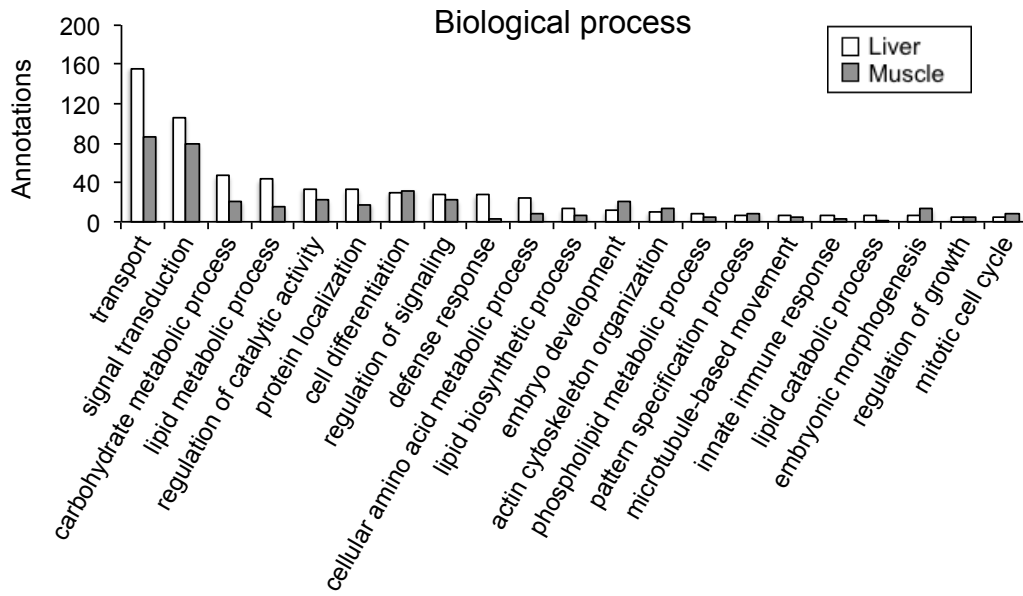


Figure 3

A



B

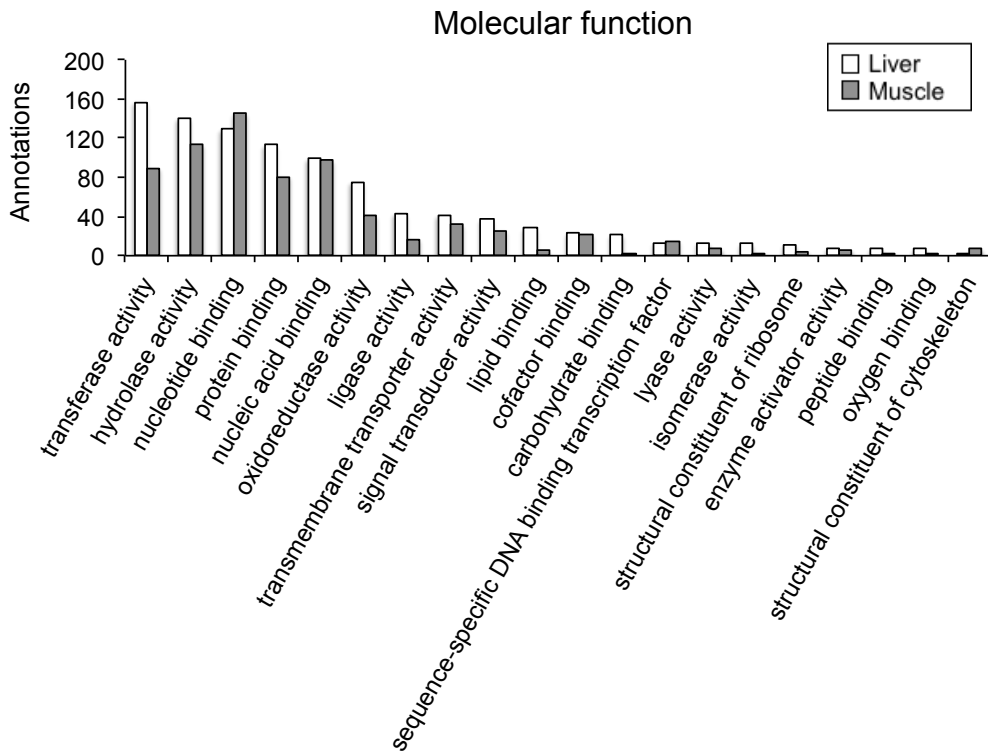


Figure 4

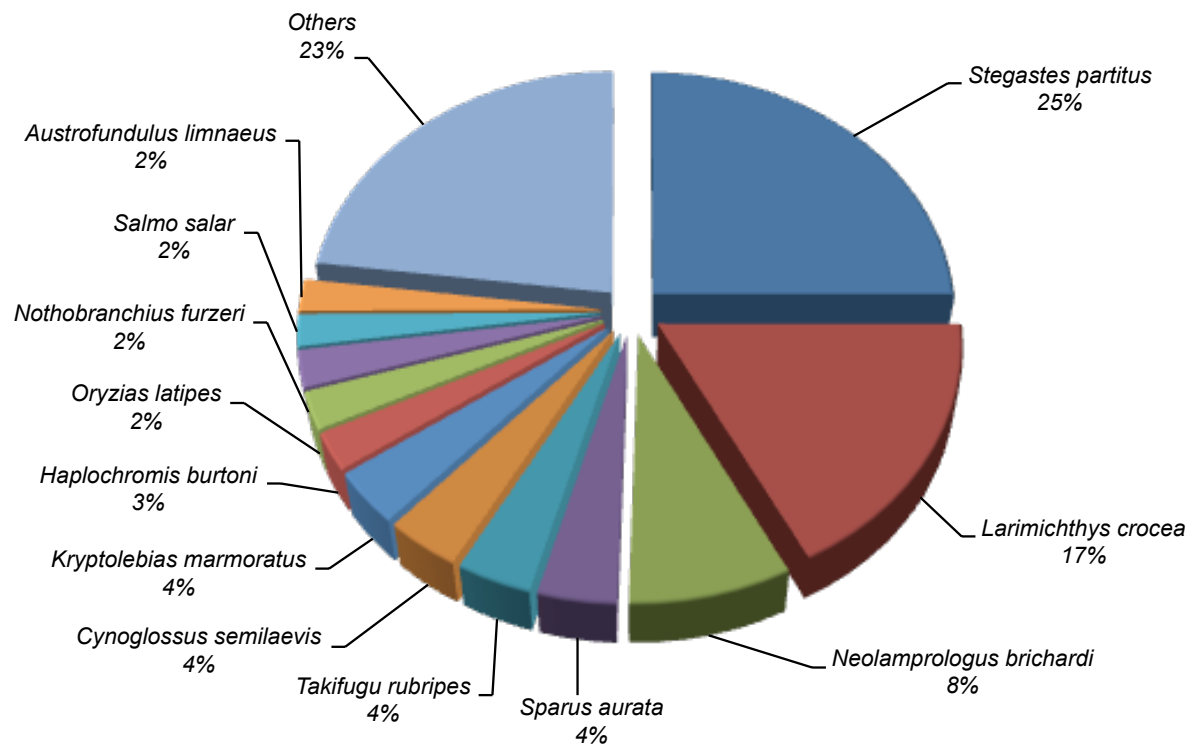
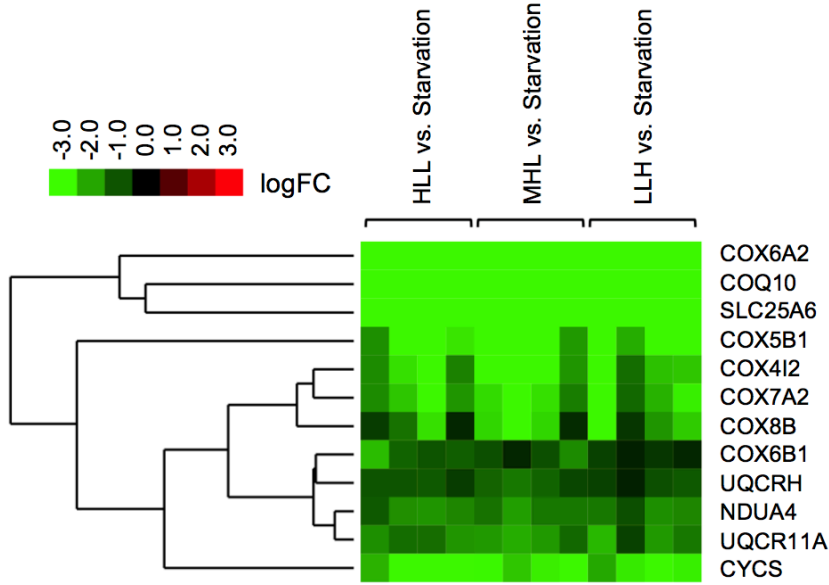


Figure 5

A



B

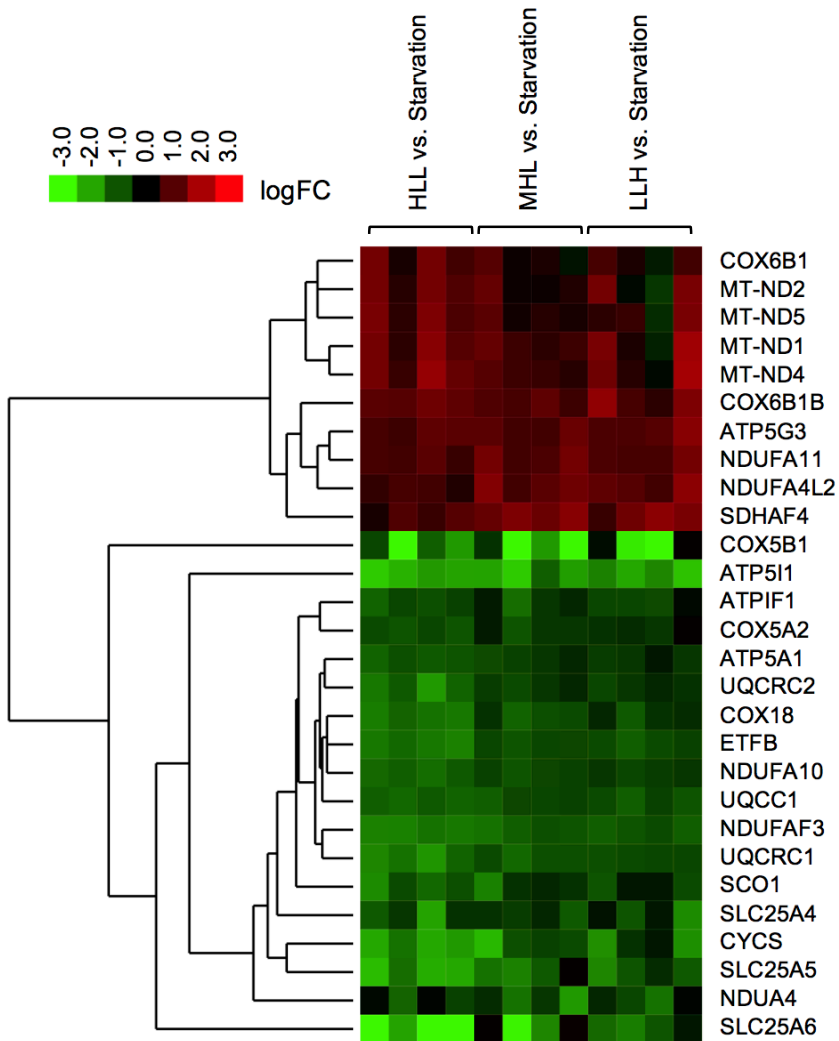
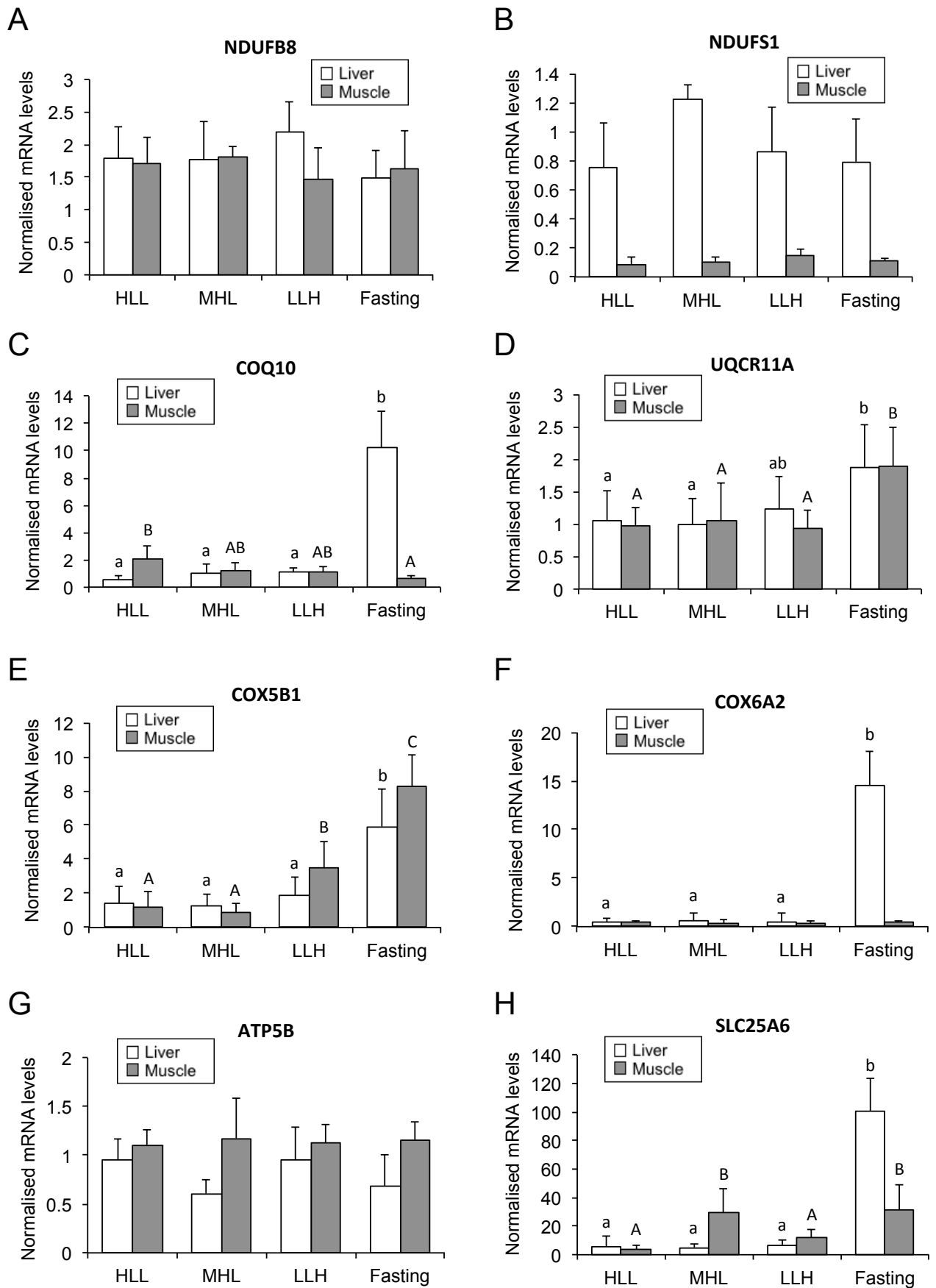


Figure 6



Additional file 1. OXPHOS-related genes analysed in microarrays.

Gene description	Symbol	GenBank No.
<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase complex</i>		
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	MT-ND1	MF438141
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	MT-ND2	MF438140
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	MT-ND4	MF438136
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	MT-ND5	MF438137
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	NDUFA1	MF438236
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUFA2	MF438253
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	NDUFA3	MF438260
NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 4	NDUA4	MF438229
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2	NDUFA4L2	MF438191
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	NDUFA6	MF438241
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	NDUFA7	MF438244
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	NDUFA8	MF438202
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUFA9	MF438190
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	NDUFA10	MF438184
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	NDUFA11	MF438238
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	NDUFA12	MF438261
Acyl carrier protein, mitochondrial	NDUFAB1	MF438161
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	NDUFB1	MF438259
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial	NDUFB2	MF438237
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	NDUFB3	MF438154
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4	MF438242
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	NDUFB5	MF438219
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	NDUFB6	MF438158
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	NDUFB7	MF438228
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	NDUFB8	MF438220
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	NDUFB9	MF438215
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	NDUFB10	MF438218
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	NDUFB11	MF438194
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C1, mitochondrial	NDUFC1	MF438152
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	NDUFC2	MF438155
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like	NDUFS1	MF438168
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	NDUFS2	MF438172
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	MF438207
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	NDUFS4	MF438224
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	NDUFS6	MF438250
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	NDUFS7	MF438193
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	NDUFS8	MF438187
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	NDUFV1	MF438171
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	MF438208
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	NDUFV3	MF438248
Mimitin, mitochondrial	NDUFAF2	MF438146
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	NDUFAF3	MF438205

Succinate dehydrogenase complex

Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	MF438162
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	SDHB	MF438181
Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	SDHC	MF438216
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial	SDHD	MF438165
Succinate dehydrogenase assembly factor 1, mitochondrial	SDHAF1	MF438157
Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial	SDHAF2	MF438173
Succinate dehydrogenase assembly factor 4, mitochondrial	SDHAF4	MF438209

ETF-ubiquinone oxidoreductase

Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	MF438174
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	MF438188
Electron transfer flavoprotein beta subunit lysine methyltransferase	ETFBKMT	MF438211
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	ETFDH	MF438145

Synthesis and transport of ubiquinone

Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial transcript variant X1	COQ4	MF438195
Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial	COQ6	MF438175
5-Demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial	COQ7	MF438206
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial transcript variant X2	COQ9	MF438151
Coenzyme Q-binding protein COQ10, mitochondrial	COQ10	MF438156

Ubiquinol-cytochrome c reductase complex

Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	CYC1	MF438142
Cytochrome b	MT-CYB	MF438139
Cytochrome b-c1 complex subunit 9	UQCR10	MF438239
Cytochrome b-c1 complex subunit 10 isoform A	UQCR11A	MF438251
Cytochrome b-c1 complex subunit 10 isoform B	UQCR11B	MF438223
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	UQCRB	MF438240
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	MF438167
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	MF438176
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	UQCRES1	MF438182
Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like	UQCRH	MF438230
Cytochrome b-c1 complex subunit 8 isoform X1	UQCRQ	MF438257
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1	UQCC1	MF438170
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2	UQCC2	MF438245
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 3 isoform X2	UQCC3	MF438183

Cytochrome c

Cytochrome c	CYCS	MF438179
Cytochrome c-type heme lyase	HCCS	MF438150

Cytochrome c oxidase complex

Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX4I1	MF438143
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial	COX4I2	MF438204
Cytochrome c oxidase subunit 5A isoform 1	COX5A1	MF438203

Cytochrome c oxidase subunit 5A isoform 2	COX5A2	MF438227
Cytochrome c oxidase subunit 5B isoform 1	COX5B1	MF438221
Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1	MF438233
Cytochrome c oxidase subunit 6A2, mitochondrial	COX6A2	MF438235
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	MF438258
Cytochrome c oxidase subunit 6B1 isoform A	COX6B1A	MF438226
Cytochrome c oxidase subunit 6B1 isoform B	COX6B1B	MF438159
Cytochrome c oxidase subunit 6C-1	COX6C1	MF438247
Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial-like	COX7A2	MF438249
Cytochrome c oxidase subunit 7A2-related protein, mitochondrial	COX7A2L	MF438243
Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial	COX7B	MF438147
Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	COX7C	MF438256
Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial	COX8A	MF438255
Cytochrome c oxidase subunit 8B, mitochondrial	COX8B	MF438232
Cytochrome c oxidase assembly protein COX14	COX14	MF438225
Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog	COX15	MF438164
Cytochrome c oxidase copper chaperone	COX17	MF438246
Mitochondrial inner membrane protein COX18	COX18	MF438178
Cytochrome c oxidase assembly protein COX19	COX19	MF438217
Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	COX20	MF438197
Cytochrome c oxidase subunit I	MT-CO1	MF438138
Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	COA1	MF438263
Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	COA3	MF438213
Cytochrome c oxidase assembly factor 4 homolog, mitochondrial	COA4	MF438264
Cytochrome c oxidase assembly factor 5	COA5	MF438222
Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	COA6	MF438144
Cytochrome c oxidase assembly factor 7	COA7	MF438177
Protein SCO1 homolog, mitochondrial	SCO1	MF438192
Surfeit locus protein 1	SURF1	MF438199
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21	TIMM21	MF438185

F1F0-ATP synthase

ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	MF438153
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	MF438166
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATP5C1	MF438189
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	ATP5D	MF438160
ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	ATP5E	MF438201
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	ATP5F1	MF438200
ATP synthase F(0) complex subunit C1, mitochondrial	ATP5G1	MF438198
ATP synthase F(0) complex subunit C3, mitochondrial	ATP5G3	MF438214
ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	MF438234
ATP synthase subunit e isoform 1, mitochondrial	ATP5I1	MF438210
ATP synthase subunit e isoform 2, mitochondrial	ATP5I2	MF438262
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	ATP5J	MF438252
ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5J2	MF438148
ATP synthase subunit g, mitochondrial	ATP5L	MF438254

ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	MF438212
ATP synthase subunit s, mitochondrial	ATP5S	MF438149
ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1	MF438231
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATPAF1	MF438186
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	ATPAF2	MF438169

ADP/ATP translocases

ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	MF438180
ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	MF438163
ADP/ATP translocase 3	SLC25A6	MF438196

Additional file 2. Differentially expressed genes with and adjusted P value < 0.05 in the liver of starved *Sparus aurata* versus at least one group of fed fish (diets HLL, MHL and LLH). Four fish per condition were used to perform microarrays. FC: fold change. NS: not significant.

FC (HLL)	FC (MHL)	FC (LLH)	Gene symbol	Complex/function
2.99	2.95	2.71	NDUA4	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.52	-1.58	-1.48	NDUFA4L2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.31	-1.36	-1.47	NDUFA7	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	1.29	NS	NDUFA10	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.53	-1.57	-1.63	NDUFA11	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	-1.33	-1.31	NDUFA12	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	1.42	NS	NDUFAB1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.69	1.59	1.40	NDUFB1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.22	1.30	NS	NDUFB5	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	1.31	NS	NDUFB8	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	1.43	1.32	NDUFB9	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	NS	-1.27	NDUFB11	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.41	NS	NS	NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.52	1.48	NS	NDUFS2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.35	-1.28	-1.55	SDHA	Succinate dehydrogenase
NS	1.32	NS	SDHD	Succinate dehydrogenase
-1.53	-1.56	-1.76	SDHAF2	Succinate dehydrogenase
1.35	1.83	1.61	ETFA	ETF-ubiquinone oxidoreductase
1.41	1.33	1.37	ETFB	ETF-ubiquinone oxidoreductase
NS	NS	-1.69	ETFBKMT	ETF-ubiquinone oxidoreductase
-1.55	-1.49	-1.79	COQ9	Synthesis and transport of ubiquinone
19.64	18.94	14.36	COQ10	Synthesis and transport of ubiquinone
2.87	3.33	2.81	UQCR11A	Ubiquinol-cytochrome c reductase
NS	1.39	NS	UQCRC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase
NS	1.26	NS	UQCRFS1	Ubiquinol-cytochrome c reductase
2.00	2.30	1.75	UQCRH	Ubiquinol-cytochrome c reductase
1.28	NS	NS	UQCC3	Ubiquinol-cytochrome c reductase
7.90	8.09	7.24	CYCS	Cytochrome c
1.49	1.41	1.27	COX4I1	Cytochrome c oxidase
5.70	8.03	5.16	COX4I2	Cytochrome c oxidase
1.32	1.38	1.38	COX5A1	Cytochrome c oxidase
1.32	1.39	NS	COX5A2	Cytochrome c oxidase
11.31	16.44	15.00	COX5B1	Cytochrome c oxidase
NS	1.84	1.47	COX6A1	Cytochrome c oxidase
35.01	86.71	36.25	COX6A2	Cytochrome c oxidase
2.54	1.99	NS	COX6B1	Cytochrome c oxidase
1.63	1.87	1.47	COX6B1A	Cytochrome c oxidase
1.76	1.82	1.82	COX6B1B	Cytochrome c oxidase
1.36	1.37	NS	COX6C1	Cytochrome c oxidase
4.88	6.62	5.02	COX7A2	Cytochrome c oxidase
NS	1.42	NS	COX7B	Cytochrome c oxidase

NS	4.97	4.36	COX8B	Cytochrome c oxidase
-1.55	-1.45	-1.42	COX17	Cytochrome c oxidase
NS	NS	1.46	COX18	Cytochrome c oxidase
NS	-1.75	NS	MT-CO1	Cytochrome c oxidase
-1.34	-1.35	-1.34	COA5	Cytochrome c oxidase
NS	1.33	NS	COA7	Cytochrome c oxidase
NS	-1.36	-1.32	SURF1	Cytochrome c oxidase
1.41	1.52	NS	ATP5A1	F1F0-ATP synthase
1.30	1.32	NS	ATP5G1	F1F0-ATP synthase
-1.23	NS	-1.23	ATP5G3	F1F0-ATP synthase
NS	1.24	NS	ATP5H	F1F0-ATP synthase
NS	NS	1.32	ATP5I2	F1F0-ATP synthase
-1.33	NS	-1.32	ATP5O	F1F0-ATP synthase
1.51	NS	NS	ATP5S	F1F0-ATP synthase
NS	1.56	1.42	ATPIF1	F1F0-ATP synthase
1.32	1.44	1.26	ATPAF1	F1F0-ATP synthase
1.46	NS	NS	SLC25A5	ADP/ATP translocases
48.90	60.09	44.87	SLC25A6	ADP/ATP translocases

Additional file 3. Differentially expressed genes with and adjusted P value < 0.05 in the skeletal muscle of starved *Sparus aurata* versus at least one group of fed fish (diets HLL, MHL and LLH). Four fish per condition were used to perform microarrays. FC: fold change. NS: not significant.

FC (HLL)	FC (MHL)	FC (LLH)	Gene symbol	Complex/function
-2.32	NS	NS	MT-ND1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-2.20	NS	NS	MT-ND2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-2.55	NS	-2.02	MT-ND4	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-2.22	NS	NS	MT-ND5	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.62	NS	NS	NDUFA1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.72	-1.23	-1.85	NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	-1.17	-1.69	NDUFA3	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	2.19	NS	NDUA4	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.61	-1.26	-2.21	NDUFA4L2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.38	NS	NS	NDUFA8	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.44	NS	NS	NDUFA9	NADH:ubiquinone oxidoreductase
2.24	1.81	1.64	NDUFA10	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.81	NS	-2.03	NDUFA11	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	-1.22	-1.47	NDUFA12	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	-1.21	-1.55	NDUFAB1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.56	-1.14	-1.72	NDUFB1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.56	NS	NS	NDUFB5	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	NS	NS	NDUFB8	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.22	NS	NS	NDUFB10	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	NS	-1.26	NDUFB11	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.58	NS	NS	NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.69	NS	NS	NDUFS7	NADH:ubiquinone oxidoreductase
NS	-1.13	NS	NDUFV2	NADH:ubiquinone oxidoreductase
-1.38	1.03	-1.50	NDUFV3	NADH:ubiquinone oxidoreductase
2.68	2.17	2.08	NDUFAF3	NADH:ubiquinone oxidoreductase
1.46	NS	NS	SDHC	Succinate dehydrogenase
1.62	NS	NS	SDHD	Succinate dehydrogenase
NS	-1.23	-1.56	SDHAF2	Succinate dehydrogenase
-1.68	2.56	-2.48	SDHAF4	Succinate dehydrogenase
2.68	1.88	1.91	ETFB	ETF-ubiquinone oxidoreductase
1.33	NS	NS	COQ4	Synthesis and transport of ubiquinone
1.81	1.45	1.43	COQ6	Synthesis and transport of ubiquinone
NS	-1.83	-1.65	COQ7	Synthesis and transport of ubiquinone
1.72	NS	NS	COQ9	Synthesis and transport of ubiquinone
1.94	1.65	NS	CYC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase
-1.39	-1.15	-1.45	MT-CYB	Ubiquinol-cytochrome c reductase
1.87	1.87	NS	UQCR11A	Ubiquinol-cytochrome c reductase
-1.39	-1.20	-1.65	UQCR11B	Ubiquinol-cytochrome c reductase
2.84	2.09	1.86	UQCRC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase
2.65	1.64	1.57	UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome c reductase
1.78	1.61	1.59	UQCRFS1	Ubiquinol-cytochrome c reductase

2.24	1.87	1.92	UQCC1	Ubiquinol-cytochrome c reductase
-1.43	-1.11	-1.73	UQCC2	Ubiquinol-cytochrome c reductase
1.23	NS	NS	UQCC3	Ubiquinol-cytochrome c reductase
3.42	2.40	2.22	CYCS	Cytochrome c
1.80	NS	NS	HCCS	Cytochrome c
1.34	NS	NS	COX5A1	Cytochrome c oxidase
1.92	2.41	NS	COX5A2	Cytochrome c oxidase
NS	8.10	NS	COX5B1	Cytochrome c oxidase
-1.73	-1.11	-1.69	COX6A1	Cytochrome c oxidase
-2.08	NS	NS	COX6B1	Cytochrome c oxidase
-2.02	-1.10	-2.08	COX6B1B	Cytochrome c oxidase
NS	-1.46	-1.60	COX7B	Cytochrome c oxidase
NS	NS	-1.38	COX7C	Cytochrome c oxidase
-1.70	-1.29	-1.80	COX8A	Cytochrome c oxidase
-1.49	-1.21	-1.55	COX14	Cytochrome c oxidase
-1.45	-1.26	-1.57	COX17	Cytochrome c oxidase
2.56	1.90	1.60	COX18	Cytochrome c oxidase
1.45	NS	NS	COX20	Cytochrome c oxidase
-1.51	-1.13	-1.45	MT-CO1	Cytochrome c oxidase
1.48	1.39	NS	COA5	Cytochrome c oxidase
1.86	NS	NS	COA6	Cytochrome c oxidase
2.33	NS	NS	SCO1	Cytochrome c oxidase
1.48	NS	NS	SURF1	Cytochrome c oxidase
1.76	2.00	1.36	TIMM21	Cytochrome c oxidase
2.04	1.63	1.52	ATP5A1	F1F0-ATP synthase
-1.35	-1.29	-1.64	ATP5G1	F1F0-ATP synthase
-1.97	NS	-2.25	ATP5G3	F1F0-ATP synthase
4.04	3.52	3.52	ATP5I1	F1F0-ATP synthase
NS	-1.04	-1.71	ATP5I2	F1F0-ATP synthase
NS	-1.38	-1.34	ATP5J2	F1F0-ATP synthase
1.88	2.85	1.55	ATPIF1	F1F0-ATP synthase
1.44	NS	1.43	ATPAF2	F1F0-ATP synthase
2.26	1.77	1.78	SLC25A4	ADP/ATP translocases
3.65	2.02	2.16	SLC25A5	ADP/ATP translocases
8.51	NS	NS	SLC25A6	ADP/ATP translocases