



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**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*)**

Alberto Felipe Sáez Arteaga



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

**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*)**

Alberto Felipe Sáez Arteaga
2015



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

**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*)**

Memoria presentada por Alberto Felipe Sáez Arteaga para obtener el título de doctor por la
Universitat de Barcelona

Directores:

Autor:

Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

Alberto Felipe Sáez Arteaga

Alberto Felipe Sáez Arteaga
2015

AGRADECIMIENTOS

Finalmente ha llegado el día en el que se pone punto final a una etapa intensa, llena de trabajo, emociones y aprendizaje, que sumados dan lugar al periodo de formación humana y profesional más potente y enriquecedor que he experimentado. Han sido 4 años en total, desde que pisé por primera vez el laboratorio para realizar el máster y luego a partir del segundo año continuar con la formación doctoral. En este punto, debo agradecer enormemente a los directores del grupo de investigación, la Dra. Isabel Vázquez y el Dr. Isidoro Metón por aceptarme y brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo sin antes haberme conocido, creo que esa confianza depositada hacía que cada día me planteara mejorar y hacer las cosas bien. Gracias por su apoyo constante, por estar siempre disponibles cuando surgía alguna duda en el desarrollo de los experimentos, por guiarme en el transcurso de este trabajo y sobre todo, por la capacidad humana que poseen.

El desarrollo de esta tesis no habría sido posible, sin la financiación otorgada por el gobierno de Chile, mediante la beca que me ha permitido en compañía de Nancy, poder emprender esta hermosa y a la vez sacrificada aventura, dejando atrás familia y amigos.

Nancy, que te puedo decir, gracias por acompañarme en esta cruzada, sabíamos que no iba a ser fácil, había que adaptarse a otra forma de vida, otro país, otro clima, etc., pero con tu templanza, consejo y apoyo, permitiste que me abocará 100% en sacar los estudios del máster de la mejor forma posible para luego continuar con el doctorado. De alguna u otra forma, esta tesis tiene mucho de ti.

También debo dar gracias a mi familia, en especial a mis padres y a mi abuelita Julia, que gracias a ellos y a su apoyo incondicional he podido llegar hasta aquí. Mención especial a los que han partido durante el desarrollo del doctorado. Abuelo Juan, tío Pedro, don Dago siempre los tengo presente.

Han sido años de muchas emociones, dedicación y esfuerzo de los cuales muchas personas han sido testigo y han contribuido en mi desarrollo profesional y personal. Entre mis compañeros de laboratorio no puedo dejar de mencionar a Mari, siempre con su alegría haciendo más distendido el ambiente en el trabajo, como olvidar también esas preguntas sin filtro que te caracterizan y te hacen única, pero por sobre todo, eres una persona muy buena. Marina, otra de las personas del laboratorio a las cuales les debo mucho y de las que me llevo los mejores recuerdos, gracias por enseñarme gran parte de las técnicas de biología molecular, las cuales eran un mundo nuevo para mí. Además de guiarme en la correcta gestión del laboratorio en cuanto a compra de insumos y

materiales (habilidad desarrollada digna de poner en el currículum). A Iván, por formarme en las buenas prácticas de laboratorio, incitando siempre a trabajar de forma limpia, metódica, ordenada y enseñarme sobre las actividades enzimáticas y el funcionamiento del COBAS, ¡grande Iván! A Albert, con el que más compartí en el desarrollo de los experimentos relacionados con las doradas, gracias por guiarme en el diseño de las dietas, mantenimiento de las doradas y el correcto funcionamiento de los acuarios, sin duda una gran persona y un muy buen amigo. Aquí quiero mencionar también al Dr. Felipe Fernández por su asesoramiento, disponibilidad y por abrirnos las puertas en la Facultad de Biología para llevar a cabo los experimentos con las doradas. A Jonás, con el que he ido a la par en este proceso de aprendizaje, desde el máster en donde fuimos compañeros de aula hasta ahora en donde ya eres uno de los más *senior* del lab. Igual pienso que lo tuyo es la política, se te da muy bien ese tema! Así como tantos otros compañeros que han llegado recientemente u otros que han estado en pasantías breves, Carlos, Aline, Sedighe, Isadora, Anne y Alberto.

Recordar a toda la gente del departamento de bioquímica y biología molecular, quienes día a día han sido partícipes, no solo de esta tesis, sino, la de todos los estudiantes que formamos parte del departamento. A las secretarías que hacen una enorme labor administrativa, a los técnicos que hacen que la gestión de las compras sea fácil y expedita y a todos los profesores con los cuales he trabajado en la realización de prácticas, de todos ellos me llevaré lo mejor para aplicarlo en mi vida laboral.

En términos generales, este ha sido un camino arduo, de altos y bajos, pero todos los momentos felices y de satisfacción superan con creces los momentos de frustración. De lo aprendido a nivel profesional (que ha sido enormemente enriquecedor), quiero destacar el aprendizaje a nivel personal, la capacidad de organización, aprender a trabajar en un grupo multidisciplinario, o muchas otras situaciones para las cuales no hay un protocolo o una técnica estandarizada, pero que han sido determinantes en mi formación.

Finalmente, estas últimas líneas son para dedicar esta tesis doctoral a mi esposa Nancy y a mi pequeña Sofía quienes han sido cómplices, especialmente en estos últimos meses en la realización y culminación de este trabajo.

ABREVIATURAS

6PGD	6-Fosfogluconato deshidrogenasa
AKT	Proteína quinasa B
AKT-p	AKT fosforilado
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
CCiTUB	Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona
CDA	Coeficiente de digestibilidad aparente
CoQ10	Coenzima Q10
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DE	Desviación estandar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamina tetra acetato
EIF4EBP1	Factor eucariótico de iniciación de la traducción de unión a proteína 1
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinases</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBPasa	Fructosa 1,6-bifosfatasa
FCR	Tasa de conversión del alimento
FER	Ratio de eficiencia de alimentación
FoxO	<i>Forkhead box O</i>
Fst	Folistatina
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gb	Gigabases
GDF-8	Factor diferenciador del crecimiento 8
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GHRs	Receptores de hormona del crecimiento
GK	Glucoquinasa
GLUT4	Transportador de glucosa 4

GO	Ontología génica
HI	Índice hepatosomático
H ^P L ^L C	<i>High protein, Low lipid, Low carbohydrate</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF1R	Receptor de IGF-1
IGFs	<i>Insulin-like growth factors</i>
IRS	Substrato del receptor de la insulina
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L ^P H ^L C	<i>Low protein, High lipid, Low carbohydrate</i>
L ^P L ^H C	<i>Low protein, Low lipid, High carbohydrate</i>
LR	Retención de grasa de la dieta
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Mb	Megabases
M ^P H ^L C	<i>Medium protein, High lipid, Low carbohydrate</i>
M ^P L ^H C	<i>Medium protein, Low lipid, High carbohydrate</i>
MRFs	Familia de reguladores miogénicos
Mst	Miostatina
mTOR	Proteína quinasa diana de rapamicina en mamíferos
mTORC1/2	mTOR complejo 1/2
Myf5	Factor miogénico 5
Myf6	Factor miogénico 6
MyoD	Proteína determinante del mioblasto
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PER	Ratio de eficiencia proteica
PFK-1	6-fosfofructo-1-quinasa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PR	Retención proteica
PVDF	Membrana de difluoruro de polivinilideno
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RIN	Número de integridad de RN ^o

RT	Transcriptasa inversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa
S6	Proteína ribosomal S6
S6K	Proteína ribosomal S6 quinasa
S6-P	Proteína ribosomal S6 fosforilada
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SGR	Tasa de Crecimiento Específica
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletildiamina
TGF- β	Superfamilia de factores del crecimiento beta
THR	Treonina
TPI	Triosa fosfato isomerasa

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA	7
1.2	METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PECES	8
1.3	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES	10
1.4	ESTRUCTURA, COMPOSICIÓN Y FUNCIONES DEL MÚSCULO	12
1.5	DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	14
1.5.1	Fase embrionaria	14
1.5.2	Fase de Larva	15
1.5.3	Fase juvenil y adulta	16
1.6.	REGULACIÓN DE LA MIOGÉNESIS	16
1.6.1	Control génico	16
1.6.2	Control hormonal	20
1.7.	FUNCIONES DE mTOR	23
1.7.1	Complejos mTOR	24
1.7.2	Vías de señalización por encima de mTOR	26
1.7.3.	Vías de señalización en la cascada por debajo de mTOR	28
1.8	TRANSCRIPTÓMICA	31
1.8.1	DNA, RNA y expresión génica	31
1.8.2	Next generation sequencing	32
1.9	MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA	34
1.9.1	Principios y análisis de datos	35
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1	ANIMALES UTILIZADOS	45
3.2	CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS PECES	46
3.3	PREPARACIÓN DE DIETAS EXPERIMENTALES	47
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS	47
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS DEL APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES DE LA DIETA, CRECIMIENTO Y REGULACIÓN DEL METABOLISMO	50
3.6	MANIPULACIÓN DE LAS DORADAS, SACRIFICIO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS	52
3.7	TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA	54
3.8	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL	55
3.8.1	Humedad	55
3.8.2	Proteína cruda	56
3.8.3	Contenido de grasa	56
3.8.4	Contenido de cenizas	57
3.9	PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	58
3.10	DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	59
3.10.1	Determinación de glucosa en suero	59
3.10.2	Determinación de triglicéridos en suero	60
3.10.3	Determinación de glucógeno en músculo	61
3.10.4	Determinación de actividades enzimáticas	61

3.11	ANÁLISIS DE DIGESTIBILIDAD E INGESTA DE NUTRIENTES	68
3.12	EXTRACCIÓN DE RNA	69
3.12.1	Transcripción inversa	70
3.12.2	PCR cuantitativa (RT-qPCR)	71
3.13	WESTERN BLOT	73
3.13.1	Determinación de proteína: Método de Bradford	74
3.13.2	Electroforesis de Proteína	74
3.13.3	Transferencia de proteína a membrana	76
3.13.4	Bloqueo de la membrana	77
3.14	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO	79
3.14.1	Ensamblado de secuencias y anotación	80
3.14.2	Aplicación y validación del análisis transcriptómico	81
3.15	MICROARRAYS	81
3.15.1	Construcción, hibridación y análisis de microarrays	81
3.15.2	Análisis Funcional	83
3.15.3	Validación de genes	83
4	RESULTADOS	87
4.1	ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE SPARUS AURATA	87
4.1.1	Calidad e integridad del RNA	87
4.1.2	Obtención de una biblioteca de cDNA, análisis transcriptómico por pirosecuenciación 454 FLX y ensamblado de secuencias	87
4.1.3	Ontología génica	90
4.1.4	Rutas metabólicas KEGG	93
4.2	EFFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA	96
4.3.	EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA	99
4.3.1.	Metabolitos en suero y músculo esquelético	99
4.3.2.	Efecto de la composición de la dieta sobre la actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario en músculo esquelético de <i>S. aurata</i>	100
4.4	EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL APROVECHAMIENTO, DIGESTIBILIDAD E INGESTA DE NUTRIENTES	102
4.4.1	Crecimiento y eficiencia alimentaria	102
4.4.2	Digestibilidad	103
4.5	ANÁLISIS POR MICROARRAYS DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GLOBAL DE GENES EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA EN FUNCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y AYUNO	104
4.5.1	Expresión diferencial de genes en músculo esquelético de dorada mediante uso de microarrays	104
4.5.2	Análisis funcional	106
4.6	EFFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVE EN EL CRECIMIENTO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN DORADA	137
4.6.1	Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de MyoD2 y Myf5	138
4.6.2	Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de Miogenina y Myf6	139
4.6.3	Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de miostatina y folistatina	140
4.6.4	Efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre los perfiles de expresión génica de los receptores 1 y 2 de GH, IGF-1 y GLUT4	141

4.6.5.	Efecto del ayuno y la composición de la dieta en las vías de señalización Akt/TOR en músculo esquelético	142
4.6.6	Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión de genes relacionados con autofagia	144
5	DISCUSIÓN	149
5.1	TRANSCRIPTOMA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA	149
5.2	METABOLISMO INTERMEDIARIO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO	154
5.3	CRECIMIENTO Y APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES	155
5.4	EFFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN EL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN DE GENES	157
5.5	EFFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVES EN EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	159
6	CONCLUSIONES	169
7	REFERENCIAS	175
8	ANEXOS	191

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA

Desde el año 1970 la cría y el crecimiento de peces en cultivo ha cobrado importancia como fuente de proteína de alto valor nutricional para la población mundial. Concretamente, la producción intensiva ha crecido desde 3,5 millones de toneladas en el citado año a 97,2 millones de toneladas en el año 2013 (FAO, 2014). De esta manera, la acuicultura en el panorama mundial se enmarca dentro de las actividades productivas más importantes y de mayor desarrollo en las últimas décadas, logrando una tasa de crecimiento de un 6,2 % en el periodo 2000-2012, tendencia que según las estimaciones no cambiará a lo largo de los próximos años.

En la actualidad, la acuicultura presenta diversos desafíos que dificultan la consolidación tanto de especies como de modelos o sistemas de cultivo. Una de las principales problemáticas del sector es su vinculación con la sobreexplotación de determinadas pesquerías (Asche, 2008), debido principalmente a la dependencia de la harina de pescado como fuente preferente de proteína para la fabricación de piensos y dietas empleadas en la alimentación de las especies cultivadas en sistemas controlados.

Sin embargo, la acuicultura se consolida como una actividad predecible y de fácil capacidad para planificar, lo cual contrasta con otros métodos u opciones que tienen como finalidad satisfacer la demanda de proteína animal, como es el caso de la pesca extractiva, que resulta mucho más agresiva en términos ecológicos y con rendimientos que dependen de fenómenos climáticos.

En la acuicultura marina, la dorada (*Sparus aurata*) es la especie de mayor producción acuícola en España y, entre los peces de origen marino, en Europa. En el año 2013, la producción total de esta especie, cultivada fundamentalmente en el área mediterránea, se cuantificó en 152 mil toneladas aportando el 56 % del total de la producción de peces marinos de Europa (FEAP, 2014). Esta especie, de hábitos carnívoros, está presente a lo largo de las costas del Atlántico desde Gran Bretaña hasta Senegal y debido a sus hábitos eurihalinos y euri térmicos, la especie se encuentra tanto en ambientes marinos como salobres. Sin embargo, a pesar del interés comercial en la producción de *S. aurata*, los datos y recursos genómicos para estudiar el impacto de los nutrientes de la dieta sobre el metabolismo en esta especie siguen siendo limitados.

Hoy en día, uno de los objetivos principales de la investigación aplicada a la piscicultura es el estudio de la regulación del crecimiento ante cambios medioambientales, disponibilidad de nutrientes y composición de las dietas suministradas. En este sentido, se han dedicado grandes esfuerzos en realizar investigaciones sobre la nutrición de peces con el objetivo de comprender el

papel que juegan enzimas claves en el metabolismo intermediario (Metón *et al.*, 1999; Panserat *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2007), así como en la regulación endocrina del crecimiento (Saera-Vila *et al.*, 2009; Vargas-Chacoff *et al.*, 2009). Por otra parte, mención especial merece la investigación sobre el papel que juegan los carbohidratos en el metabolismo de los peces carnívoros, ya que éstos no presentan un control estricto de los niveles de glucosa en sangre, lo que limita su inclusión (Wilson, 1994; Polakof *et al.*, 2012), y hace que resulten más dependientes de las proteínas y el metabolismo de aminoácidos para satisfacer sus demandas energéticas. El estudio de los requerimientos proteicos y energéticos, ha permitido ajustar la proporción de proteínas en las dietas (Fernandez *et al.*, 1999; Metón *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2007), observando una gran eficiencia en el metabolismo aminoacídico en peces (Ballantyne, 2001). Estos organismos se adaptan a la oxidación preferente de aminoácidos no esenciales y de aquéllos que están en exceso en la dieta (Rønnestad, 2003; Abboudi *et al.*, 2009). En este sentido, un objetivo importante en la acuicultura es reducir la cantidad de proteína suministrada con las dietas y aumentar el contenido de nutrientes más económicos para reemplazar la harina de pescado (Naylor *et al.*, 2009). La disminución en la cantidad de proteína suministrada con la dieta aliviará la presión y la dependencia de la pesca extractiva (Naylor *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2015). Por otra parte, es un hecho que el exceso de proteínas en la dieta de los peces en cultivo conduce a la eutrofización de las aguas locales como consecuencia del aumento de la excreción de amoníaco y compuestos orgánicos (Cole *et al.*, 2009), por lo que el descenso de proteína con las dieta contribuiría a la disminución de la eutrofización, mejorando los parámetros medioambientales.

1.2 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PECES

Los peces carnívoros no presentan un control estricto de los niveles de glucosa en sangre. En estos animales, después de la administración de glucosa o la alimentación con dietas con elevados niveles de carbohidratos, se observa que la hiperglicemia se mantiene elevada durante más tiempo que en los mamíferos. Este perfil metabólico imita a la diabetes tipo 2 en humanos (Wright, Jr. *et al.*, 1998; Moon, 2001). El elevado porcentaje de proteínas y la baja cantidad de carbohidratos presentes en su dieta natural hace que los aminoácidos resulten importantes sustratos gluconeogénicos para la síntesis *de novo* de glucosa y glucógeno. Por otro lado, los peces omnívoros metabolizan mejor la glucosa que los peces carnívoros, sin embargo esta capacidad es menor que la que presentan los mamíferos (Furuichi y Yone, 1981).

Aunque se ha reportado que la utilización de carbohidratos, suministrados con la alimentación, es limitada, diversos trabajos muestran que los carbohidratos de la dieta pueden ser utilizados para sustituir parcialmente a las proteínas como fuente de energía en los peces de cultivo. La sustitución

parcial de proteínas por carbohidratos en las dietas suministradas a peces en cultivo resulta relativamente bien tolerada por la dorada mediante 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.*, 1999).

Las bases moleculares que determinan la baja capacidad de los peces carnívoros para utilizar los carbohidratos aún no han sido totalmente esclarecidas. Se sugirió que niveles bajos de insulina endógena, podrían contribuir al mantenimiento de una hiperglicemia prolongada y de la baja capacidad de los peces para utilizar niveles elevados de carbohidratos (Palmer y Ryman, 1972; Wilson y Poe, 1987). Sin embargo, los niveles de insulina en los peces son similares o a menudo más elevados que los observados en mamíferos (Plisetskaya, 1998). Si bien se ha observado un aumento de la insulina en plasma después de la administración de glucosa en los peces (Masayuki Furuichi, 1982), ciertos aminoácidos parecen ser estimuladores más potentes que la glucosa en la liberación de insulina. Los peces tienen receptores específicos de insulina y también para los factores de crecimiento insulínicos (*insulin-like growth factor*, IGF-I e IGF-II) (Gutiérrez y Plisetskaya, 1991; Drakenberg *et al.*, 1993). Las propiedades de unión de estos receptores en diferentes tejidos y en diferentes especies de peces también han sido estudiadas. El tejido muscular de trucha arcoíris presenta un 3-10 % más de receptores de insulina en membrana que la rata. No obstante, en general, la cantidad total del receptor de insulina que se encuentra unido a insulina en trucha es inferior al reportado en mamíferos (Gutiérrez y Plisetskaya, 1991).

La incapacidad relativa de los peces carnívoros para utilizar los carbohidratos se describió que podía ser debida en parte a la ausencia de actividad de la enzima glucoquinasa en hígado (GK, EC 2.7.1.2) (Wilson, 1994). La GK es una isoforma de hexoquinasa que se caracteriza por su baja afinidad a la glucosa, y que se expresa en hígado y páncreas de mamíferos. Diversos estudios han demostrado su expresión en hígado de peces, como *S. aurata* (Caseras *et al.*, 2002), *Hippoglossus hippoglossus* (Tranulis *et al.*, 1997), *Salmo salar* (Tranulis *et al.*, 1996) y *Cyprinus carpio* (Panserat *et al.*, 2000). Por otra parte, La sobreexpresión de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa, EC 3.1.3.9), conlleva una excesiva producción hepática de glucosa, y como consecuencia puede promover hiperglicemia (Trinh *et al.*, 1998).

Muchas especies de peces presentan períodos prolongados de ayuno en su medio natural, a menudo relacionados con la migración y el desove. En estas situaciones, las variaciones en los niveles de glucógeno en hígado y músculo dependen en gran medida de la especie estudiada. En *S. aurata*, el glucógeno, tiende a disminuir significativamente tras 8 días de ayuno y alcanza niveles mínimos después de 20 días de ayuno (Baanante *et al.*, 1991; De Frutos *et al.*, 1991; Metón *et al.*, 1999).

Asimismo, Navarro *et al.* (1992) encontraron también una disminución significativa del contenido de glucógeno tras 8 días de ayuno, en trucha de río. Sin embargo, en anguila europea (*Anguilla anguilla*) sometida a ayuno en condiciones de laboratorio, la concentración de glucógeno en hígado no disminuyó hasta superar los 96 días de ayuno, y el glucógeno muscular permaneció en sus niveles iniciales tras 164 días de ayuno (Dave *et al.*, 1975). Comparado con los peces, el glucógeno hepático de rata es rápidamente metabolizado y sus niveles están prácticamente agotados después de 24 horas de ayuno, incluso en ausencia de actividad física vigorosa (Freedland, 1967).

1.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES

La mayor parte de especies de peces son carnívoras y requieren altos contenidos de proteína en la dieta. Los aminoácidos son los componentes fundamentales de las proteínas, clasificándose en esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser suministrados con la dieta. Dependiendo de la especie, los requerimientos varían entre un 35 y un 55 % (Ballantyne, 2001), siendo la proteína el componente más abundante y costoso de las dietas para peces carnívoros. La naturaleza predominantemente carnívora de los peces queda reflejada en un metabolismo adaptado a emplear aminoácidos como principal sustrato energético y gluconeogénico (Ballantyne, 2001). Los requerimientos primarios de los aminoácidos son para la síntesis de proteínas y en menor medida, para la síntesis de otros compuestos, como hormonas, purinas, neurotransmisores y cofactores. En peces, el principal destino de los aminoácidos después de los requerimientos para la síntesis de proteína es para la producción de energía. Embriones y larvas de peces dependen exclusivamente de los aminoácidos para la obtención de energía y consecuente desarrollo (Ohkubo y Matsubara, 2002). En el caso de los teleósteos, el catabolismo de los aminoácidos es promovido por el hecho de que no precisan gastar energía convirtiendo el amonio en urea, ya que lo excretan directamente al medio a través de las branquias (Kaushik y Seiliez, 2010), lo que a su vez contribuye a la eutrofización de las aguas en acuicultura (Davenport *et al.*, 2003). En el organismo, los aminoácidos derivan de dos fuentes principales: la dieta y el catabolismo de proteínas corporales. El catabolismo de proteínas corporales suministra menos del 50 % de los aminoácidos precursores para formar proteínas en peces, lo que hace que éstos sean más dependientes de las fuentes dietéticas que otros vertebrados. En términos energéticos, una de las principales funciones de los aminoácidos es actuar como sustratos catabólicos para proveer ATP con fines biomecánicos, sintéticos y para procesos de transporte. En este sentido, los aminoácidos parecen ser una fuente de energía más importante que los carbohidratos en peces (Cowey, 1994). Asimismo, la capacidad de convertir la proteína ingerida en proteína somática es mucho más eficiente en peces que en aves y mamíferos (Tacon y Cowey, 1985).

Kaushik y Seiliez. (2010) indican que la falta de control del catabolismo aminoacídico podría ser el principal factor de los elevados requerimientos de proteína en peces. No obstante, diferentes estudios realizados en peces señalan una modulación de las enzimas del metabolismo de los aminoácidos en respuesta de la composición de la dieta. La reducción de la relación proteína/carbohidrato de la dieta ha demostrado reducir las actividades de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1) y alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2) en el hígado de dorada (Metón *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2007), *Rhamdia quelen* (Bibiano Melo *et al.*, 2006), y *Oreochromis niloticus* (Gaye-Siessegger *et al.*, 2006). El metabolismo de los peces promueve mayores tasas de oxidación de aminoácidos que en los mamíferos.

En peces, la tasa de oxidación de los aminoácidos supera con creces la de incorporación a glucosa a través de la vía gluconeogénica (Ballantyne, 2001). En mamíferos, la oxidación completa de los aminoácidos en el hígado produciría más ATP de lo que realmente requiere el animal (Brosnan, 2003), por lo que tienden a metabolizar la glucosa. En cambio, en peces carnívoros como el salmón del atlántico, las tasas de oxidación de aminoácidos como la alanina llegan a superar en 10 veces la tasa de incorporación de glucosa. De esta manera, los aminoácidos son precursores preferentes en los peces para la síntesis de glucosa (Enes *et al.*, 2009; Polakof *et al.*, 2012) y de lípidos endógenos (Masanori Nagai, 1972).

Se han logrado grandes progresos en la optimización de la retención de la proteína de la dieta. Una de las estrategias más comunes ha sido manipular la relación proteína/energía. La reducción de esta relación mediante nutrientes no nitrogenados ha demostrado promover la retención proteica en peces, así como reducir la excreción de nitrógeno soluble al medio (Kaushik y Seiliez, 2010). Es sabido que los lípidos son fácilmente digeridos y metabolizados por los peces. Sin embargo, niveles demasiado elevados en dieta pueden derivar en una acumulación excesiva de grasas corporales y en un crecimiento menor (McGoogan y Gatlin, 2000). Como ya se ha detallado anteriormente, la incorporación de carbohidratos se ve limitada por la naturaleza carnívora del metabolismo hepático de los peces.

Los aminoácidos son reguladores claves en el flujo metabólico y son considerados como moléculas implicadas en vías de señalización. Investigaciones desarrolladas en trucha arcoíris por Lansard *et al.* (2010) mostraron que los aminoácidos, de manera dependiente de la dosis, son capaces de regular la expresión de algunos genes, como la G6Pasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, EC 4.1.1.32) y piruvato quinasa (PK, EC 2.7.1.40) a través de un mecanismo no dependiente de la proteína mTOR, la cual se presenta como un regulador clave de la homeostasis energética y el crecimiento celular. Sin embargo, los aminoácidos, junto a la insulina, provocan un incremento

significativo en enzimas lipogénicas y genes glicolíticos mediante la vía de señalización mTOR. En estudios *in vivo* en trucha arcoíris realimentadas después de dos días de ayuno, se observó que la realimentación con dietas de elevado contenido en proteínas incrementaron significativamente la fosforilación de proteína quinasa B (AKT), la proteína ribosomal S6 (S6) y el factor eucariótico de iniciación de la traducción de unión a proteína 1 (EIF4EBP1) (proteínas involucradas en la vía de señalización de mTOR) tanto en hígado como en músculo, a diferencia de peces alimentados con dietas de alto contenido en carbohidratos (Seilliez *et al.*, 2011).

1.4 ESTRUCTURA, COMPOSICIÓN Y FUNCIONES DEL MÚSCULO

En peces, el músculo esquelético representa entre un 40 y un 60 % de la masa corporal. El crecimiento y desarrollo muscular representa un indicador del estado fisiológico y sanitario del organismo en estudio. Un crecimiento rápido indica condiciones de alimentación y mantenimiento favorables, mientras que un crecimiento lento indica justamente lo opuesto (Kießling *et al.*, 2006).

Existen dos tipos de fibras claramente diferenciadas y separadas a nivel anatómico que componen el músculo esquelético de los peces y que presentan propiedades muy diferentes. La musculatura roja, también llamada musculatura lenta, con elevado contenido de mitocondrias, capilares, reservas de glucógeno y lípidos, se encarga de la contracción lenta y por tanto del movimiento y natación sostenida. El metabolismo energético del músculo rojo es principalmente aeróbico y se basa fundamentalmente en la utilización de lípidos como combustible, complementado con la metabolización de carbohidratos (Johnston, 1981). Por otra parte, el músculo blanco también denominado musculatura rápida, depende del metabolismo anaeróbico y se encarga de la contracción rápida, responsable de los movimientos bruscos como la captura de presas y el escape en el medio natural (Kießling *et al.*, 2006).

La unidad básica del músculo esquelético es el sarcómero, que tanto en el músculo blanco como en el rojo está formado por filamentos altamente organizados, que interaccionan entre ellos con el fin de generar la fuerza necesaria para dar movilidad al organismo.

El proceso de formación del músculo tiene lugar en tres fases diferenciadas durante el crecimiento del animal: fase embrionaria, periodo larvario y juvenil (Johnston, 1999; Albors *et al.*, 2005).

El desarrollo del músculo esquelético permite alcanzar una estructura ordenada, que es capaz de adaptarse y modularse en función de las diferentes condiciones. En este sentido, el proceso de miogénesis presenta una significativa plasticidad, característica fundamental para la proliferación, diferenciación, migración y fusión de los nuevos mioblastos (Johnston, 2006). Este complejo y

dinámico proceso conlleva a la fusión de miocitos con miofibras existentes (hipertrofia) o a un incremento en el número de miocitos (hiperplasia) (Zhu *et al.*, 2014), determinando el tamaño y el peso del pez.

Entre los diversos factores implicados en la regulación de la formación y el crecimiento del músculo cabe destacar que el sistema comprende componentes somatotrópicos, como los IGFs y los receptores de la hormona del crecimiento (GHRs), además de factores transcripcionales como los de la familia de los factores reguladores miogénicos (MRFs) y factores de crecimiento como los pertenecientes a la superfamilia de los factores transformadores del crecimiento (TGF).

El músculo esquelético es un tejido contráctil altamente especializado que tiene como función principal la actividad locomotora del organismo. Este tejido está formado por miofibras contráctiles que derivan de la fusión de diversas células, haciendo del músculo estriado una maquinaria eficiente y precisa que contiene una compleja red citoesquelética interconectada y especializada en realizar actividad contráctil. El trabajo que realiza esta red de miofibrillas es crítico para las interacciones moleculares producidas por la actina y la miosina en cada sarcómero a través del movimiento de contracción (Clark *et al.*, 2002).

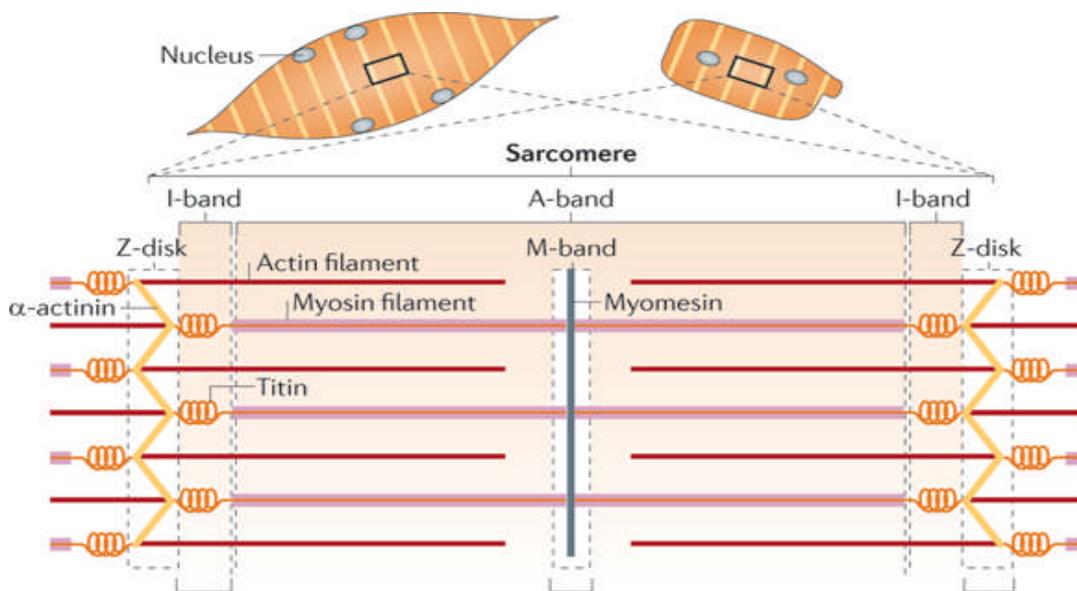


Figura 1. Esquema del sarcómero. Se observa la unidad contráctil de músculo esquelético a la izquierda y la del músculo cardíaco a la derecha. En el esquema se pueden observar los filamentos delgados de actina y los filamentos gruesos de miosina, además de la titina. Los filamentos se anclan a la banda Z en donde interaccionan con la α -actinina. Los filamentos más gruesos se encuentran en el centro del sarcómero constituyendo la banda A. Figura adaptada de Braun y Gautel (2011).

La apariencia estriada de las miofibrillas, así como la presencia de bandas claras y oscuras, son fácilmente observables e identificables por microscopía. Las bandas claras también llamadas bandas I incluyen los filamentos delgados (actina), que se superponen con los filamentos gruesos de miosina, constituyentes de las bandas oscuras o bandas A. Un tercer sistema de filamentos está compuesto por moléculas de titina, proteína de mayor tamaño descrita (3,8 MDa) y nebulina que se extienden a través de los filamentos de actina y miosina. Las líneas o discos Z están ubicados en el extremo del sarcómero y es en este límite donde los filamentos de actina y miosina se intercalan. Por otro lado, la banda M representa el sitio de intersección de la fibra de miosina de una de las bandas con la miosina adyacente (Figura 1).

1.5 DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.5.1 Fase embrionaria

En peces teleósteos y en vertebrados superiores el músculo esquelético deriva de los somitos, los cuales corresponden a estructuras segmentadas ubicadas a ambos lados del tubo neural y la notocorda, formadas durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. En el embrión en formación, los somitos dan lugar a tres compartimentos principales: el esclerotomo, el miotomo primario y la capa celular externa (Figura 2) (Rescan, 2005). Los somitos poseen un papel importante en la organización de patrones segmentarios, dando origen a las células que serán las precursoras en

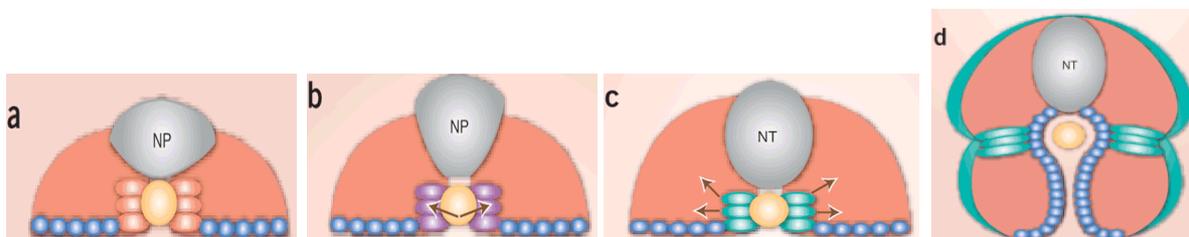


Figura 2. Sección transversal del mesodermo presomítico (a-c) y somito (d) en la que se aprecia el desarrollo del compartimento muscular en embrión. El miotomo se muestra de color naranja, el esclerotomo en azul y la notocorda en amarillo. (a) Las células adaxiales expresan los factores de transcripción que determinan el linaje muscular, mientras que el esclerotomo ocupa una posición ventral. (b) En respuesta a señales de la notocorda (flechas) las células adaxiales comienzan a expresar genes específicos del músculo. (c) Las células migran radialmente hasta su posición final en la capa superficial. (d) Células adaxiales permanecen cerca de la notocorda y el esclerotomo migra dorsalmente sobre ésta, diferenciándose en fibras musculares de contracción rápida. Figura adaptada de Brent y Tabin (2004).

la formación de vertebras, piel y músculo. De esta manera los somitos son diferenciados a miotomos, responsables de la organización y diferenciación de tres principales fibras musculares principales

reconocibles en peces teleósteos: músculos pioneros o primordiales, músculo lento y músculo rápido. La especificidad celular dentro de cada uno de estos linajes depende de ciertos miembros o familias de factores de transcripción de la miogénesis, entre los que destacan los MRFs (Johnston *et al.*, 2011). Los MRFs provocan cambios sustanciales en las células precursoras musculares, promoviendo la formación de los miocitos (fibras musculares). Estos cambios implican seguir una secuencia ordenada capaz de permitir la progresión desde una forma celular apenas diferenciada a formas más evolucionadas, como lo es la maduración y la fusión de diferentes mioblastos para formar los miotubos, que finalmente se diferenciarán a miocitos.

1.5.2 Fase de Larva

En esta fase se consolida la morfogénesis en los dos estratos musculares fundamentales de los teleósteos: el músculo superficial (rojo) de contracción lenta y el músculo profundo (blanco) de contracción rápida. Una vez diferenciados, ambos estratos musculares progresan de forma significativa mediante dos estrategias de crecimiento, la hiperplasia estratificada y la hiperplasia en mosaico. Ambas tienen como finalidad la formación de nuevas fibras musculares.

La formación de las fibras musculares requiere nuevamente la activación de las células miogénicas, proceso que ha sido catalogado en algunos trabajos como una segunda miogénesis o fase de crecimiento estratificado, el cual se produce justo después de la eclosión (Johnston *et al.*, 1995). Durante los primeros estadios larvales de dorada, la densidad del músculo blanco aumenta debido a la adición de nuevas fibras derivadas de la zona germinal de los mioblastos, también llamados miosatélites (Watabe, 1999). En pez cebra (*Danio rerio*) se produce un reordenamiento del compartimento de los somitos impulsado por la segregación de la citoquina Sdf1 y el receptor Cxcr4a (Hollway *et al.*, 2007). Durante este proceso, las células de la región anterior del somito expresan los factores de transcripción Pax3 y Pax7, quienes ayudan a posicionar a las células implicadas en la formación del músculo rojo en la zona o capa más externa del organismo. Las células externas o miosatélites pueden proporcionar una población de células precursoras de la miogénesis en reposo, equivalentes a las células satélites de mamíferos, que una vez activadas proporcionan una fuente de células proliferativas requeridas para el crecimiento muscular adulto (Stellabotte *et al.*, 2007) o bien para la reparación de daño tisular (Morgan y Partridge, 2003).

Hiperplasia estratificada e hiperplasia en mosaico

Esta fase de la miogénesis conlleva a la expansión lateral del miotomo embrionario, formando de esta manera nuevas fibras musculares situadas principalmente en los márgenes de la región dorsal y ventral del miotomo (Barresi *et al.*, 2001). Debido a que este proceso hiperplásico tiene lugar

en diversas capas del miotomo se ha denominado hiperplasia estratificada. Las fibras se forman en la interfase entre el músculo blanco y rojo, presentando características propias de ambos tipos musculares (Johnston y Hall, 2004). Este proceso se presenta como el principal mecanismo responsable en el incremento del número de fibras musculares lentas después de la eclosión. Por otra parte, se han identificado zonas de formación de miotubos en el músculo rápido de algunos teleósteos (Rowlerson *et al.*, 1997), así como también zonas que se mantienen inactivas durante las últimas etapas del desarrollo larvario y en las primeras etapas de los estadios juveniles (Johnston, 2006).

En relación a la hiperplasia en mosaico, esta es considerada como uno de los procesos más importantes en la miogénesis debido a que es el principal mecanismo para la expansión del número de fibras musculares en estadios juveniles y adultos de la mayoría de las especies, llegando a contribuir al 40% de la talla máxima del animal (Revisado por Johnston, 2006). Esta estrategia de crecimiento da lugar a la morfología típica de mosaico, en la que es posible observar fibras de diferentes tamaños en el músculo blanco. El diámetro máximo de las fibras varía de acuerdo a factores como: la masa corporal, patrones de actividad y demanda metabólica (Johnston *et al.*, 2003), así como a los diferentes estadios de desarrollo de cada especie.

1.5.3 Fase juvenil y adulta

Cuando la capacidad hiperplásica de la musculatura se agota, el crecimiento del miotomo depende únicamente del incremento en el diámetro de las fibras existentes, proceso llamado hipertrofia. Esto limita el potencial de crecimiento total, ya que la capacidad hipertrófica de las fibras musculares también está limitada por el mayor diámetro fibrilar fisiológicamente eficiente. El máximo tamaño que es capaz de alcanzar una especie está determinado en gran parte por el número y diámetro de las fibras de la musculatura axial (Revisado por Albors *et al.*, 2005). En esta fase de crecimiento, el desarrollo muscular adquiere plasticidad debido a la respuesta adaptativa hacia determinados cambios fisiológicos relacionados con el metabolismo y características contráctiles (Braun y Gautel, 2011). De esta manera, la masa muscular esquelética adulta es controlada por mecanismos anabólicos y catabólicos que regulan el incremento de las proteínas musculares y su degradación mediante la coordinación y expresión de factores transcripcionales, factores de crecimiento y factores endocrinos (Rescan, 2005).

1.6. REGULACIÓN DE LA MIOGÉNESIS

1.6.1 Control génico

1.6.1.1 Factores reguladores de la miogénesis

El proceso de miogénesis muestra una plasticidad significativa, factor fundamental para los eventos de proliferación, diferenciación, migración y fusión de nuevos mioblastos (Johnston, 2006). Este complejo y dinámico proceso involucra mecanismos como los mencionados anteriormente (hiperplasia e hipertrofia), determinantes en la regulación del tamaño y el peso final del animal, y que son controlados por los MRFs (Zhu *et al.*, 2014).

MRFs son una familia de factores de transcripción que incluye: factor miogénico 5 (Myf5), factor miogénico 6 (Myf6), proteína determinante del mioblasto (MyoD) y miogenina (Rescan, 2001; Braun y Gautel, 2011). Estos factores se caracterizan por tener un motivo básico de unión al DNA y un dominio de dimerización hélice-vuelta-hélice esencial para la especificación y determinación del linaje muscular (Revisado por Olson y Klein, 1994).

Los cuatro factores de transcripción se expresan durante el desarrollo temprano y, en casos específicos, se ha observado una duplicación génica en alguno de los factores, como es el caso de MyoD en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Delalande and Rescan, 1999) y *S. aurata* (Tan and Du, 2002).

MyoD, Myf5, miogenina y Myf6 son proteínas que comparten una región central altamente conservada, la cual es clave en la activación transcripcional regulando la dimerización con las proteínas E12 y E14 que son codificadas por el gen *E2A*. De esta manera, el heterodímero formado, presenta una alta afinidad por el motivo consenso E-box (CANNTG) (Revisado por Rescan, 2001), presente en las secuencias promotoras de genes específicos de músculo esquelético, en donde promueve su transcripción (Edmondson y Olson, 1993). Se ha observado que existen diversos factores que influyen en la activación de los MRFs, entre los que destacan causas medioambientales como la temperatura y el fotoperíodo (Johnston, 2006) y causas nutricionales (Fauconneau y Paboeuf, 2000).

Los diferentes miembros de la familia perteneciente a los MRFs presentan unos patrones de expresión espacial y temporal altamente regulados durante la miogénesis. MyoD y Myf5 se expresan principalmente durante el desarrollo primario, y por lo tanto, son esenciales en el inicio del desarrollo del músculo esquelético a nivel embrionario. La miogenina y Myf6 se expresan en periodos más tardíos y han sido relacionadas con la maduración final de las miofibras (Tan y Du, 2002).

Diversos estudios sobre la expresión del gen que codifica para MyoD muestran una expresión diferencial tanto en células que promueven la formación del músculo lento como en las que promueven la formación del músculo rápido. Células precursoras de músculo lento o rojo, también

conocidas como células adaxiales, son las primeras en expresar MyoD en embriones de pez cebra (Weinberg *et al.*, 1996). En trucha arcoíris, han sido identificados dos genes que codifican para MyoD, los cuales exhiben diversos patrones de expresión en músculo rápido y lento dependiendo a su vez del estadio de desarrollo (Delalande y Rescan, 1999). Otra especie en la que se han aislado y caracterizado dos genes para MyoD es la dorada. El análisis de las secuencias reveló que ambos genes presentan una estructura similar con tres exones y dos intrones y un dominio hélice-vuelta-hélice altamente conservado. El análisis de la expresión génica indica la existencia de un solapamiento entre los dos genes: MyoD1 se expresa tanto en músculo lento como rápido, mientras que MyoD2 se expresa inicialmente en ambos tipos tisulares, pero va desapareciendo gradualmente su expresión en el músculo lento, siendo así MyoD2 un factor específico de músculo blanco (Tan y Du, 2002).

Función de los MRFs en el desarrollo muscular

El proceso de miogénesis comprende la activación y participación secuencial de los MRFs, los cuales desempeñan diferentes funciones en el control del proceso que determina el inicio del linaje miogénico.

El rol que juegan los MRFs ha sido estudiado mediante la disrupción génica en ratones (Arnold y Winter, 1998). En el caso de delección génica de MyoD o Myf5, los animales mostraron un retraso en el desarrollo muscular de sus extremidades a nivel embrionario, resultados que reflejan el control temprano del linaje muscular por MyoD y Myf5. Por otra parte, estudios de doble *Knock-out* muestran que la ausencia simultánea de la expresión de ambos genes, impide completamente la formación de miocitos o miofibras, sugiriendo que la expresión de MyoD y Myf5 resulta necesaria para la formación y supervivencia de los mioblastos (Rudnicki *et al.*, 1993).

Por otra parte, se ha observado que determinadas mutaciones del gen que codifica la miogenina causan una reducción de la masa muscular debido a que los mioblastos no son capaces de fusionarse para generar fibras musculares (Venuti *et al.*, 1995). Además, se ha determinado que la miogenina presenta funciones de posible cooperación con MyoD y Myf5 en la activación de proteínas contráctiles del músculo.

Entre los MRFs se puede diferenciar un grupo primario que incluye a MyoD y Myf5 y un grupo secundario compuesto por miogenina y Myf6. Estos últimos participarían más tarde en la cascada de actuaciones en la miogénesis, después de la expresión de MyoD y Myf5 (Figura 3).

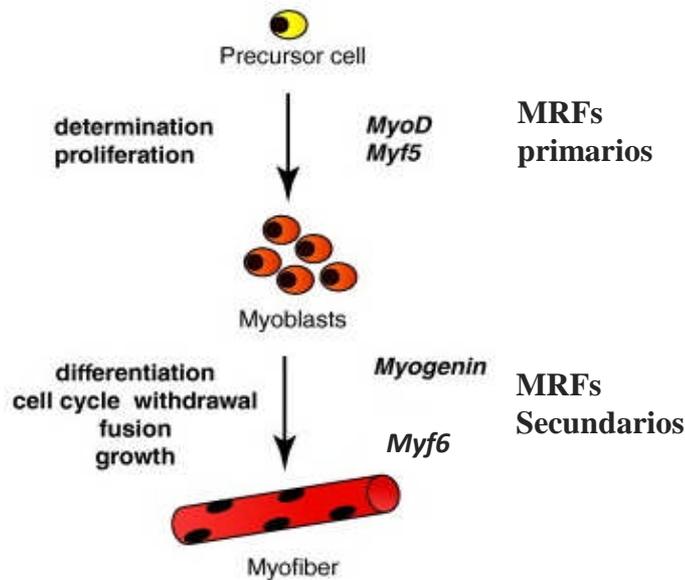


Figura 3. Detereminación del linaje miogénico y su diferenciación en relación a la expresión de los MRFs. MyoD y Myf5 actúan en las etapas iniciales de determinación y proliferación, mientras que la diferenciación se realiza bajo la expresión de la miogenina y Myf6. Figura adaptada de Apponi *et al.* (2011).

1.6.1.2 Factores transformadores del crecimiento

Además de los MRF, otros dos miembros de la superfamilia de factores del crecimiento beta (TGF- β), miostatina (Mst) y folistatina (Fst) juegan un papel esencial en la regulación, desarrollo y funcionamiento del músculo esquelético.

La Mst, también denominada factor diferenciador del crecimiento 8 (GDF-8), se expresa exclusivamente en el músculo esquelético, inhibiendo el crecimiento y la diferenciación. En ratones, McPherron *et al.* (1997), mediante una delección en el gen de la Mst, se observó un dramático crecimiento de la masa muscular. Los animales mutantes aumentaron la masa muscular dos veces en relación a los ratones salvajes, debido principalmente al aumento en el número de fibras (hiperplasia) y de su diámetro (hipertrofia). Resultados similares de incremento en la masa muscular se han observado en perros y ovinos (Mosher *et al.*, 2007).

En peces, la Mst cumple un papel fundamental en el crecimiento, lo que hace pensar en su aplicación potencial para disponer de futuras herramientas biotecnológicas en diferentes especies de interés comercial (Nadjar-Boger y Funkenstein, 2011). Estudios filogenéticos indican que, a diferencia de mamíferos y aves, los peces presentan dos genes diferentes con expresión diferencial para Mst (Revisado por Rodgers y Garikipati, 2008) (Figura 4), resultado probablemente de una duplicación génica durante el proceso evolutivo. En el caso de *S. aurata*, se han clonado y caracterizado dos

isoformas del gen Mst: Mst1 y Mst2 (Maccatrozzo *et al.*, 2001a, 2001b). Mientras que la expresión de Mst1 se observó en diferentes tipos de tejido incluido el músculo, la expresión de Mst2 se detectó en cerebro, lóbulo óptico y lóbulos olfatorios, lo que indica su implicación en el mecanismo de acción y regulación de la diferenciación del sistema nervioso central. (Maccatrozzo *et al.*, 2001a).

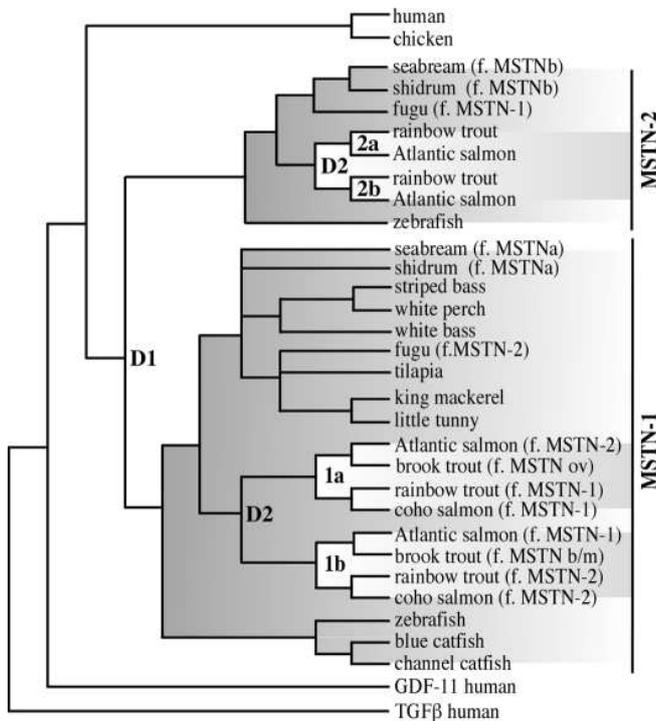


Figura 4. Relación filogenética de la Mst en vertebrados. En todas las especies de peces se observan dos formas del gen (MSTN-1 y MSTN-2). En el caso de los salmónidos es posible encontrar isoformas adicionales (MSTN-1a; MSTN-1b; etc.). Figura tomada de Rodgers y Garikipati, (2008).

Por otra parte, la Fst, otro miembro de la superfamilia TGF- β , ha demostrado ser un potente antagonista de otros miembros de la superfamilia, como la Mst (Amthor *et al.*, 2004). Diferentes estudios indicaron la capacidad de Fst de incrementar la masa muscular mediante la sobreexpresión del gen en ratones transgénicos (Lee y McPherron, 2001), así como también en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Medeiros *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha observado que la Fst desempeña un papel en la regeneración muscular en mamíferos (Armand *et al.*, 2003).

En investigaciones recientes en *S. aurata*, se ha logrado aislar y caracterizar el mensajero que codifica Fst. La estructura primaria de la Fst de dorada presenta un alto grado de conservación respecto a otros vertebrados. Por otra parte, la expresión de Fst ha sido observada en diferentes tejidos entre los que se incluye el músculo esquelético (Funkenstein *et al.*, 2009).

1.6.2 Control hormonal

1.6.2.1 Componentes somatotrópicos

Factores de crecimiento como IGF-1 y GHRs han demostrado jugar un papel importante en la regulación nutricional del metabolismo.

En el músculo esquelético se ha observado que la expresión génica de IGF-1 incrementa la masa muscular, favoreciendo que descienda de esta manera la atrofia muscular (Glass, 2003a). Los factores de crecimiento de tipo IGFs son una familia de polipéptidos de cadena simple relacionados estructuralmente con la proinsulina (Revisado por Duan, 1998). La organización genómica de IGF-1 se ha determinado en diversas especies de peces, como trucha arcoíris (Shamblott y Chen, 1992), tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Chen jyh-yih *et al.*, 1998) y pez cebra (*Danio rerio*) (Chen *et al.*, 2001). Diversos estudios han mostrado que la regulación y las funciones de IGF-1 son similares tanto en peces como en mamíferos (Reinecke y Collet, 1998). En muchas especies de peces, niveles elevados de IGF-1 tanto en sangre como en tejidos a nivel de RNA mensajero se correlacionan de manera positiva con el contenido de proteína en la dieta, la tasa específica de crecimiento y la ración de la dieta (Pérez-Sánchez *et al.*, 1995; Duan, 1998b).

En trucha arcoíris IGF-1 ha demostrado ser un importante regulador de la miogénesis, promoviendo la proliferación de células aisladas de músculo esquelético en cultivos *in vitro* (Castillo *et al.*, 2004). Estudios recientes con células musculares de *S. aurata* (mantenidas durante 4 y 9 días en cultivo) muestran que la presencia de IGF-1 incrementó la acción del transportador de glucosa 4 (GLUT4), estimulando la síntesis de proteínas *in vitro* (Montserrat *et al.*, 2012).

La familia de los transportadores de glucosa presenta 14 miembros, los cuales están divididos en tres subfamilias de acuerdo a la similitud y elementos característicos de sus secuencias. GLUT4 es una proteína transmembrana presente principalmente en el músculo esquelético, corazón y en el tejido adiposo. Su actividad es regulada por la insulina e IGF-1 (Díaz *et al.*, 2009). En el músculo esquelético de rata, GLUT4 incrementa a la vez que aumenta la actividad contráctil (Slentz *et al.*, 1992a; Silva *et al.*, 2005). GLUT4 presenta una alta afinidad para la glucosa, siendo su principal función el transporte del azúcar a través de la membrana plasmática (Scheepers *et al.*, 2004).

Vías de señalización a través de IGF-1

En músculo esquelético, una de las principales vías de señalización, que comporta la fosforilación de proteínas implicadas en diversas funciones metabólicas y mitogénicas es la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT, la cual desencadena un gran número de respuestas biológicas en mamíferos, entre las que se encuentran la estimulación de la proliferación celular, la diferenciación y la hipertrofia, inhibiendo de esta manera la atrofia muscular (Glass, 2003b).

La actividad mitogénica y los efectos anabólicos asociados a IGF-1 son mediados a través de la unión de éste al receptor de IGF-1 (IGF1R) (Glass, 2005). Esta unión promueve la activación de las vías PI3K/AKT y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)/ERK. La proteína MAPK pertenece a la familia de las *Extracellular signal Regulated Kinases* (ERK) y presenta un papel importante en la proliferación de las células musculares, proceso que ha sido ampliamente descrito y estudiado en mamíferos (Al-khalili *et al.*, 2004). Específicamente, la serina/treonina quinasa ERK es el principal componente de la vía MAPK/ERK, ya que activa una amplia variedad de sustratos que regulan la transcripción y traducción, controlando así el ciclo celular (Fuentes *et al.*, 2011). Sin embargo, en el músculo esquelético adulto, la función de MAPK/ERK pierde protagonismo, ya que hay estudios que revelan que los procesos de señalización de esta vía dejan de ser activos durante la hipertrofia muscular (Rommel *et al.*, 1999).

Por otra parte, la vía de señalización de la PI3K juega un papel clave en respuesta a la presencia de IGF-1, lo que se traduce en la acción de diferentes proteínas y/o enzimas, como es el caso de AKT. AKT es una serina/treonina quinasa con un rol crítico en la señalización celular y una de las proteínas quinasas más versátiles. Su activación modula la función de numerosos sustratos de la vía, participando así en la regulación de la supervivencia celular y el crecimiento muscular (Figura 5). La fosforilación de AKT mejora la supervivencia mediante el bloqueo de la función y los procesos de proteínas pro-apoptóticas. De esta manera, AKT inhibe la acción de la proteína *Bcl-2-associated death promoter* (BAD), la cual es importante en la supervivencia de las neuronas (Datta *et al.*, 1997). Por otra parte, la activación de AKT inhibe la degradación de proteínas mediante la fosforilación y consecuente inactivación de los factores de transcripción pertenecientes a la familia *forkhead box O* (FoxO). Concretamente, la inactivación del factor de transcripción FoxO3 conduce a la supresión de la expresión del gen *atrogen-1*, el cual está implicado en la inducción de la atrofia muscular a través del dramático decrecimiento del tamaño de las fibras musculares (Sandri *et al.*, 2004). Entre los mecanismos que incrementan la expresión de *atrogen-1* se puede encontrar la supresión de insulina e IGF-1, la reducción en la actividad de la proteína AKT y una supresión de la unión de PI3K con los sustratos del receptor de insulina (IRS) (Wang *et al.*, 2010).

Entre las diversas funciones de la proteína quinasa AKT, una de las mejor conservadas es su implicación en el mecanismo que promueve el crecimiento celular o incremento de la masa celular. En la cascada de señalización IGF-1/PI3K/AKT, promovida por IGF-1, la proteína AKT se encarga de iniciar la fosforilación de mTOR.

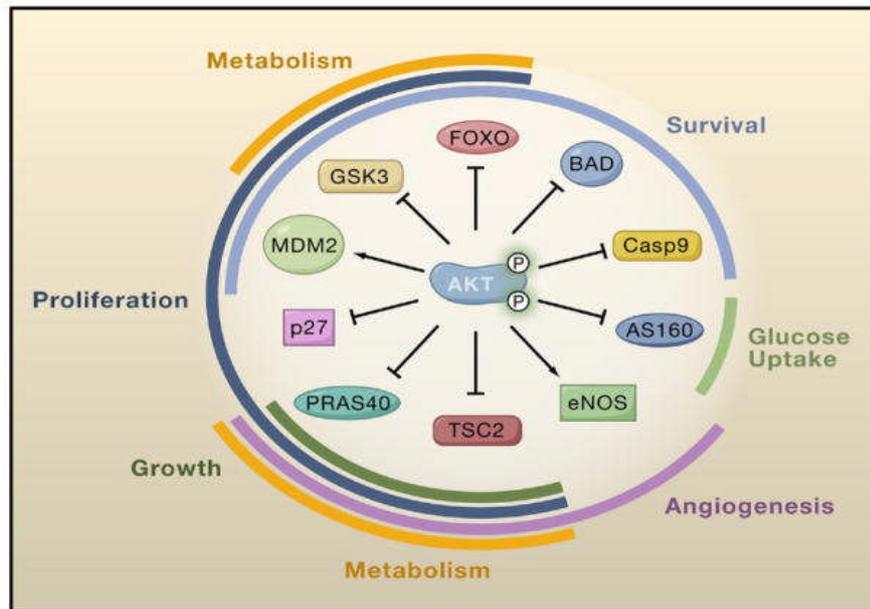


Figura 5. Funciones celulares relacionadas con la supervivencia, crecimiento, proliferación, metabolismo, angiogénesis y captación de glucosa en las que la fosforilación de AKT desempeña un papel importante. En la figura se muestran 10 sustratos con una amplia diversidad funcional que están en directa relación con funciones celulares diversas. Figura adaptada de Manning y Cantley (2007).

1.7. FUNCIONES DE mTOR

En la década de los 70, en la isla de Pascua, una pequeña isla chilena situada en el Océano Pacífico Sur, fue aislada por primera vez una cepa bacteriana denominada *Streptomyces higroscopicus*, capaz de producir una lactona macrocíclica con actividad antifúngica, inmunosupresora y antineoplásica, la cual fue denominada rapamicina debido a la ubicación de su descubrimiento (Isla de pascua, Rapa Nui en lengua nativa) (Li *et al.*, 2014). A partir de su descubrimiento, se identificaron genes diana en levadura (*TOR1* y *TOR2*), y se observó que mutaciones en éstos genes implican una desregulación del ciclo celular. Posteriormente, se determinó que en mamíferos y otros organismos eucariotas superiores, a diferencia de las levaduras, la proteína TOR estaba codificada por un único gen (*MTOR*) (Zhang *et al.*, 2000).

mTOR es una serina/treonina proteína quinasa citosólica multidominio de 289 kDa perteneciente a la familia de las quinasas relacionadas con la PI3K (PIKKs), frecuentemente asociada a membranas internas del retículo endoplasmático, aparato de Golgi, membrana celular, endosomas, lisosomas o la membrana externa de la mitocondria (Fingar y Blenis, 2004).

mTOR es una proteína muy conservada que juega un papel fundamental en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y aminoácidos, posicionándola como uno de los más importantes reguladores de procesos biológicos que tienen como resultado la síntesis proteica (Glass, 2005). Además, está implicada en la organización del citoesqueleto, la regulación de la autofagia, el transporte de iones y la supervivencia celular.

Las quinasas son enzimas que mediante un proceso denominado fosforilación, se encargan de transferir grupos fosfatos desde moléculas con enlaces de alta energía a un sustrato específico o diana. Como consecuencia de este proceso, la diana puede activarse o inactivarse, generalmente de manera reversible. Las quinasas están frecuentemente implicadas en las vías de transducción de señales. Las PIKKs son una familia de serina/treonina quinasas que están evolutivamente relacionadas con las PI3Ks las cuales presentan una elevada homología en la secuencia aminoacídica y estructura terciaria entre sus miembros. Además de mTOR, dentro de esta familia se incluye *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ATM and Rad3 related* (ATR), proteína quinasa dependiente de DNA (DNAPK), supresor de morfogénesis en genitalia (SMG) y la proteína asociada al dominio de transformación/transcripción (TRRAP). Sus funciones son variadas, de manera que intervienen en procesos como la respuesta ante el daño en el material genético celular, la regulación de la transcripción, el control del crecimiento y el ciclo celular entre otros (Lempiäinen y Halazonetis, 2009).

mTOR es una proteína multidominio compuesta por un dominio N-terminal formado por 20 repeticiones en tándem tipo *huntingtin elongation A subunit TOR* (HEAT), dos dominios FAT (FRAP, ATM y TRRAP), un dominio FKBP12 de unión a rapamicina (FRB), un dominio serina/treonina quinasa (PI3K/PI4K) y un dominio regulador negativo (NRD). Las repeticiones tipo HEAT son motivos de interacción proteína-proteína implicados en la formación de complejos con otras proteínas. Los dominios FAT, presentes también en otras quinasas de la familia de los PIKKs, actúan como moduladores de la actividad enzimática. Existen dos dominios de este tipo en mTOR, uno precediendo al dominio FRB tras las repeticiones tipo HEAT, y otro en la región C-terminal de la proteína (FATC) (Yang y Guan, 2007). Precediendo al dominio FATC se encuentra NRD, un dominio formado por unos 20 residuos cuya eliminación conduce a la activación de mTOR tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.7.1 Complejos mTOR

mTOR se encuentra en las células formando dos complejos multiproteicos diferentes: mTOR complejo 1 (mTORC1) es sensible a rapamicina y a la disponibilidad de nutrientes, mientras que

mTOR complejo 2 (mTORC2) es sensible a la rapamicina pero no a los nutrientes (Laplante y Sabatini, 2012).

mTORC1

El complejo mTORC1, también denominado complejo sensible a rapamicina y a la disponibilidad de nutrientes, está compuesto por las proteínas mTOR, *regulatory-associated protein of mTOR* (RAPTOR), *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8), *proline-rich Akt substrate of 40 kDa* PRAS40 y *Dishevelled Egl-10 and Pleckstrin domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) (Sabatini, 2006) (Figura 6). Estas proteínas tienen una función establecida en el complejo. Así, RAPTOR es un regulador positivo de la actividad quinasa de la proteína mTOR. El complejo mTORC1 también actúa como presentador de dos sustratos que han sido caracterizados, la proteína ribosomal S6 quinasa b1 (S6K) y la proteína EIF4EBP1 (Kim y Guan, 2011). La fosforilación de ambas, es clave en la regulación de mTORC1. De las proteínas presentes en este complejo, PRAS40 es fosforilada mediante la acción de AKT que previamente es estimulada por la insulina. De esta manera AKT activa a mTORC1 a través de la estimulación o la supresión de PRAS40 (Sancak *et al.*, 2007).

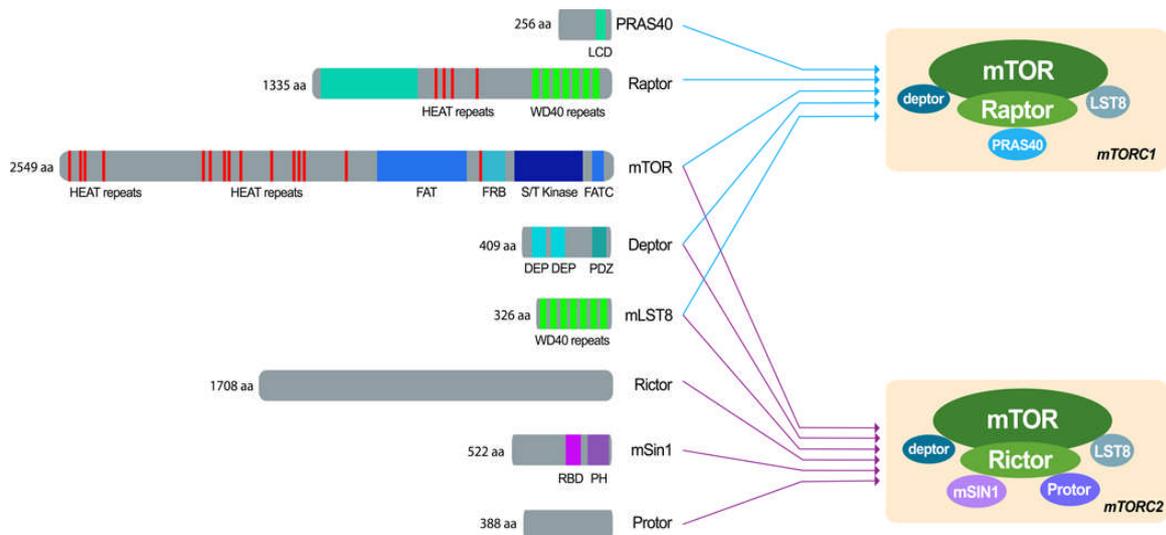


Figura 6. Complejos mTOR. Representación de las subunidades de los complejos mTORC1 y mTORC2. Figura adaptada de Zoncu *et al.* (2011).

El complejo mTORC1 está localizado en el citosol, tanto de forma soluble como asociado a las membranas del aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplasmático, endosomas y lisosomas (Sturgill *et al.*, 2008). Este complejo, como se indicó anteriormente, actúa como un sensor del estado nutricional, energético y oxidativo de la célula, regulando la biosíntesis de macromoléculas, el transporte de nutrientes, la autofagia, el crecimiento celular y el metabolismo como respuesta a

diferentes estímulos externos (Figura 7), regulación que se ejerce principalmente mediante la fosforilación de S6K y EIF4EBP1 (Kim y Guan, 2011).

mTORC2

El complejo mTORC2, el cual se caracteriza por ser un complejo insensible al compuesto rapamicina, está conformado por mTOR, *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (RICTOR), mLST8, *protein observed with RICTOR 1-proline-rich protein 5*; también denominada PRR5 (PROCTOR-PRR5) y DEPTOR (Figura 6) (Sabatini, 2006).

mTORC2 contiene la proteína RICTOR, que participa en la regulación de la actividad quinasas e interviene en la interacción con los sustratos. Por otra parte, es clave en la unión de mSin1 a mTOR. La proteína mSin1 está implicada en la unión a los sustratos y es requerida para la interacción de RICTOR con la quinasas (Jacinto *et al.*, 2006). PRR5, a diferencia de las proteínas anteriores, no interactúa directamente con mTOR, pero se une al complejo a través de RICTOR, actuando como regulador positivo de la actividad quinasas (Woo *et al.*, 2007). En lo que respecta a las proteínas DEPTOR y mLST8, éstas cumplen papeles similares a los realizados en el complejo mTORC1, con la diferencia que mLST8 interactúa con RICTOR en lugar de RAPTOR, permitiendo su unión a mTOR.

1.7.2 Vías de señalización por encima de mTOR

mTOR representa un punto de control para el crecimiento y la proliferación celular. Para ello es necesaria la integración de diferentes señales intracelulares y extracelulares, las cuales convergen en esta proteína. Entre estas señales se encuentran el estado energético de la célula, disponibilidad de nutrientes, presencia o ausencia de factores de crecimiento y estrés celular (Figura 7). mTORC1 integra diferentes vías de señalización en respuesta a factores de crecimiento e insulina, balance energético, niveles de aminoácidos y estrés celular.

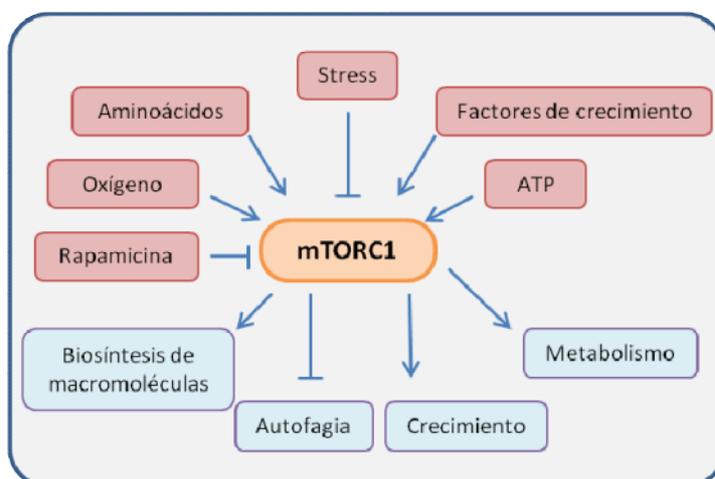


Figura 7. mTORC1 es capaz de responder ante estímulos extracelulares promoviendo el crecimiento celular por inducción o inhibición de procesos anabólicos y catabólicos, respectivamente.

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento activan mTORC1 a través de la vía PI3K-AKT, como se explicó en el apartado 1.6.2.1 *Vías de señalización a partir de IGF-1*.

Balance energético

La actividad de mTORC1 está regulada por los niveles de energía celulares. Bajos niveles de energía involucran un bloqueo de la actividad. Esta regulación se lleva a cabo a través de la activación de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (Hall, 2008). Esta quinasa es activada en respuesta a bajos niveles de energía desencadenando diversos procesos celulares que tienen como finalidad restablecer el equilibrio energético, inhibiendo procesos anabólicos y activando procesos catabólicos. Adicionalmente a la regulación autónoma ejercida por los niveles celulares de energía, se ha descrito que la actividad AMPK también es regulada por numerosas hormonas y citoquinas, como leptina, adiponectina, grelina, cannabinoides y hormonas tiroideas (Hardie, 2011).

Aminoácidos

mTORC1 es regulado por la presencia o ausencia de nutrientes. Elevados niveles de aminoácidos activan mTORC1, compensando un balance energético negativo o la ausencia de factores de crecimiento. Sin embargo, la existencia de un balance energético favorable no necesariamente puede suplir la activación por nutrientes (Hall, 2008), otorgándole un papel fundamental a los aminoácidos en la activación de mTORC1.

Los mecanismos por los cuales la presencia o ausencia de ciertos niveles de aminoácidos regulan mTORC1 aún no han sido aclarados completamente. Estudios recientes demuestran la implicación de componentes situados en la superficie de los lisosomas. Las GTPasas Rag han demostrado cumplir un papel importante en esta vía de señalización. En mamíferos, se ha demostrado la existencia de cuatro proteínas Rag (RagA, RagB, RagC y RagD). RagA y RagB pueden formar complejos heterodiméricos con RagC y RagD. La formación de estos complejos localizados en la superficie de la membrana lisosomal resulta esencial en la activación de mTORC1. Los dos miembros del heterodímero parecen tener estados opuestos de carga de nucleótidos, de manera que, cuando RagA/B está unido a guanosina trifosfato (GTP), RagC/D está vinculado a guanosina difosfato (GDP). Esta forma activa permite al heterodímero interactuar con el componente raptor de mTORC1, produciendo la translocación del complejo hacia la membrana lisosomal (Sancak *et al.*, 2008).

Las GTPasas Rag se encuentran en la superficie de la membrana lisosomal debido a su interacción con el complejo pentamérico Ragulator, compuesto por las proteínas p18 *late endosomal/lysosomal adaptor and MAPK and MTOR activator 1* (LAMTOR1), p14 (LAMTOR2), MP1 *MEK-binding partner 1* (LAMTOR3), C7orf59 (LAMTOR4) y *hepatitis B virus X-interacting protein* (HBXIP o LAMTOR5). Ragulator se ancla a la membrana lisosomal a través de la proteína p18. Este complejo actúa como intercambiador de guanina para la subunidad RagA/B del dímero RagA/B-RagC/D, promoviendo el intercambio de GDP por GTP y, por tanto, favoreciendo su conformación activa (Jewell *et al.*, 2013).

Estrés celular

Las células son capaces de responder al estrés ambiental, como por ejemplo, situaciones de hipoxia, generando diferentes señales que regulan la actividad de mTORC1, ya que se trata de situaciones que requieren reducir el consumo de energía y frenar el crecimiento. Esto se logra mediante la sobreexpresión de dos proteínas homologas, REDD1 y REDD2, cuya expresión esta controlada por el factor de transcripción HIF1. Su sobreexpresión activa el complejo TSC1-TSC2, que a su vez inhibe la señalización de mTORC1 (revisado por Wullschleger *et al.*, 2006).

Otras señales de estrés que regulan negativamente la señalización de mTOR resultan de daños a nivel de material genético, situación que activa el gen supresor de tumores p53, el cual produce la inhibición de mTORC1 a través de AMPK (Feng *et al.*, 2005).

1.7.3. Vías de señalización en la cascada por debajo de mTOR

Siguiendo con la cascada de eventos implicados en la síntesis de proteínas que conllevan al aumento de masa muscular, una vez que mTORC1 ha sido activado por diferentes estímulos externos, se inicia la traducción de dos sustratos de mTORC1, EIF4EBP1 y S6K. La fosforilación de ambas es clave en la regulación de mTORC1 (Figura 8).

EIF4EBP1

Las proteínas EIF4EBP1 pertenecen a la familia de represores traduccionales implicados en la regulación de la interacción entre los factores eucarióticos de iniciación de la traducción 4E y 4F. Existen tres tipos diferentes de EIF4EBPs: 4E-BP1, 4E-BP2 y 4E-BP3. Estos compiten con eIF4G en su unión a eIF4E en el mismo dominio, de manera que la unión de unas u otras resulta excluyente para las demás. eIF4G es una proteína estructural clave en el ensamblaje del complejo de iniciación. Ésta, está constituida por tres dominios que interaccionan con diferentes factores de iniciación. La vía de

señalización de mTORC también regula eIF4G mediante fosforilación. Debido a esta modificación la proteína sufre un cambio conformacional promoviendo la actividad del complejo de iniciación.

La interacción de EIF4EBPs con eIF4E está condicionada por su estado de fosforilación. Las proteínas EIF4EBPs contienen cuatro sitios de fosforilación que resultan determinantes para la regulación de la afinidad con su ligando (Thr37, Thr46, Ser65 y Thr70). La fosforilación de dichos residuos conlleva a la pérdida de la unión entre EIF4EBPs y eIF4E, de manera que eIF4G puede unirse a eIF4E activando de esta forma la traducción. mTORC1 está implicado en esta regulación mediante la fosforilación en Thr37 y Thr46 (Hay y Sonenberg, 2004a). La activación de mTORC1 conduce a un incremento de la actividad del complejo eIF4F y en consecuencia al aumento de la síntesis proteica.

S6K

Dos proteínas homólogas, S6K1 y S6K2, presentando cada uno diversos sitios de fosforilación, constituyen las S6Ks. Estas quinasas están implicadas en el control del crecimiento celular favoreciendo la traducción del mRNA. El efecto de S6K sobre la traducción de mRNAs se produce a través de la fosforilación de diversos sustratos entre los cuales está la proteína ribosomal S6. La fosforilación de S6 se correlaciona con el incremento de la actividad traduccional de mRNAs con secuencias de oligopirimidinas terminales (TOP) en 5'. Por otra parte, este incremento podría deberse a la fosforilación de otros factores, por parte de S6K, implicados en la iniciación de la traducción y la elongación, como son la quinasa de eEF2K (*eEF2*), *S6K1 Aly/REF-like target (SKAR)*, *80 kDa nuclear cap-binding protein (CBP80)* y eIF4B. S6K fosforila y activa a eIF4B, el cual a su vez activa la helicasa de eIF4A, favoreciendo el reclutamiento ribosomal. S6K también incrementa la actividad de eIF4A promoviendo la degradación causada por la fosforilación de *programmed cell death 4 (PDCD4)*, proteína que bloquea la asociación de eIF4A con el complejo eIF4F inhibiendo su actividad helicasa (Zoncu *et al.*, 2011). Por otro lado, la fosforilación de eEF2K por parte de S6K provoca su inhibición. eEF2K fosforila eEF2 inhibiéndolo, de manera que la acción de S6K se traduce en un incremento de la actividad del factor de elongación y por tanto de la síntesis proteica (Huo *et al.*, 2011). En la regulación de S6K, al igual que EIF4EBP1, bajos niveles de aminoácidos y la presencia de rapamicina activan las proteínas *serine/threonine-proteinphosphatase PP1-1 (Sit4)* y *serine/threonine-proteinphosphatase 2A (PP2A)*, inhibiendo la vía de señalización de mTORC1. Dicha inhibición tiene lugar mediante la desfosforilación de residuos previamente fosforilados por mTOR.

Debido a la disponibilidad de anticuerpos de alta calidad y gracias a la abundancia de la proteína ribosomal S6, su nivel de activación mediante fosforilación se puede cuantificar fácilmente. Además, la medición de S6 se utiliza comúnmente para analizar el nivel de actividad de mTORC1 en ensayos *in vivo*.

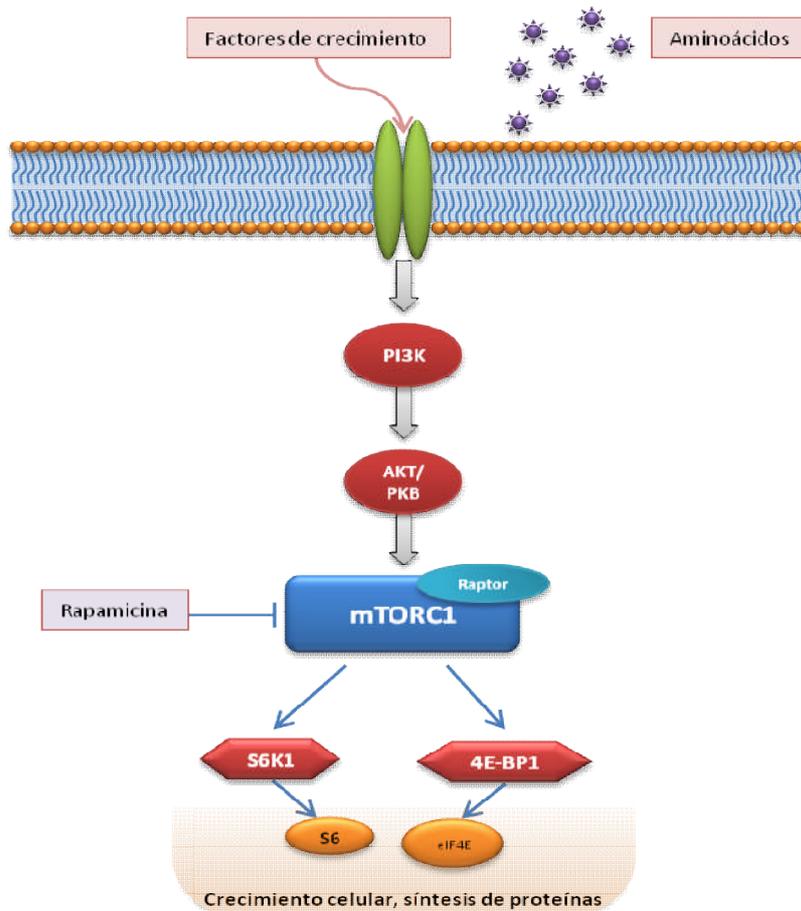


Figura 8. Vía de señalización de mTORC1. El complejo 1 es responsable de incrementar el crecimiento y la síntesis de proteína, entre otras funciones descritas anteriormente. Los factores de crecimiento son los principales factores desencadenantes de la vía de señalización. IGF-1 inicia la activación mediante la fosforilación de PI3K-AKT, que actúa directamente sobre la proteína mTOR unida a la proteína raptor.

Con el objetivo de entender mejor los mecanismos que regulan el metabolismo y el crecimiento del músculo esquelético en peces teleósteos, recientemente Fuentes *et al.* (2013) han llevado a cabo investigaciones en juveniles de *Paralichthys adspersus* mantenidos en condiciones de privación de alimento durante tres semanas. Los autores observaron una disminución paulatina de la actividad mTOR, con la consecuente disminución en el crecimiento del músculo esquelético. Por otra parte, Seiliez *et al.* (2011) evaluaron los efectos de dietas con diferentes niveles de macronutrientes en la vía de señalización mTOR, observando la fosforilación de AKT, la consecuente activación de mTOR y finalmente la fosforilación de la proteína S6 en peces alimentados con una dieta rica en proteína, eventos que consecuentemente aumentaron el crecimiento de la masa muscular.

1.8 TRANSCRIPTÓMICA

1.8.1 DNA, RNA y expresión génica

Las moléculas de DNA que constituyen el genoma de cada organismo vivo contienen la información hereditaria que es transmitida a las células hijas, proporcionando las instrucciones necesarias para el mantenimiento, desarrollo y funcionamiento del organismo (Figura 9).

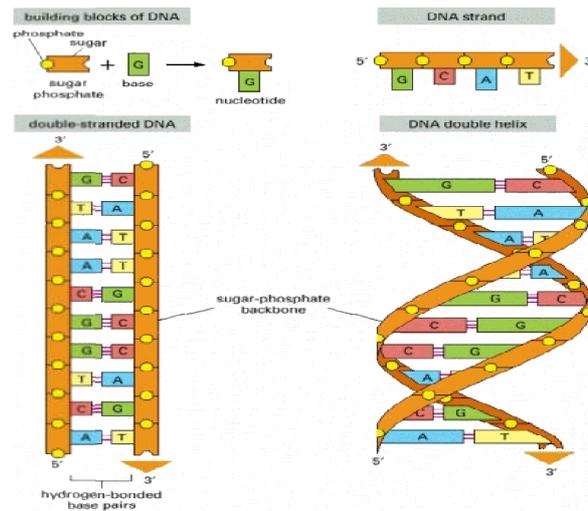


Figura 9. Estructura de la doble hélice de DNA. Figura adaptada de Alberts (2002).

El flujo de transmisión de la información genética desde el DNA a proteínas requiere de procesos de transcripción a RNA y posterior traducción a proteínas (Alberts, 2002).



Actualmente, la comprensión y el análisis de la expresión a nivel de mRNA es una de las principales herramientas utilizadas para estudiar la funcionalidad génica. El transcriptoma corresponde a la colección de mRNAs presentes en una célula, tejido u organismo. Cuando es analizado, el transcriptoma representa los transcritos disponibles en una condición o momento determinado. El transcriptoma no es estático, resulta influenciado por factores tales como: el estadio de desarrollo y las condiciones medioambientales (Goetz y MacKenzie, 2008). Debido a la importancia del análisis y el estudio de la funcionalidad génica, hoy en día se requiere el desarrollo

de tecnologías y plataformas capaces de obtener datos a gran escala, es decir, a nivel ómico o global, como es el caso de las tecnologías de secuenciación *Next generation sequencing* (NGS).

Las investigaciones sobre el transcriptoma de peces comenzaron en la década de los noventa con la especie modelo pez cebra (*Danio rerio*) (Gong *et al.*, 1997), que es actualmente una de las especies de peces con la mayor cantidad de marcadores de secuencia expresados, en inglés *expressed sequence tag* (ESTs). Recientemente, colecciones de ESTs han sido generadas para especies de interés en acuicultura, como es el caso de salmón del atlántico (*Salmo salar*), carpa común (*Cyprinus carpio*), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), solea senegalense (*Solea senegalensis*) y solea común, (*Solea solea*), entre otros. Sin embargo, los proyectos de EST realizados en *S. aurata* hasta la fecha son escasos. En esta especie, uno de los trabajos más destacables es el realizado por Calduch-Giner *et al.* (2013). En él, analizaron el transcriptoma en muestras de músculo esquelético, intestino, sangre y riñón de doradas alimentadas con una dieta convencional previa y posterior exposición a infección con el parásito *Enteromyxum leei*.

1.8.2 Next generation sequencing

La tecnología de pirosecuenciación de última generación ha transformado drásticamente la forma de investigar el genoma, ya que en periodos acotados de tiempo (horas-días) es capaz de procesar una gran cantidad de información genómica, desde megabases (Mb) a gigabases (Gb), haciendo de esta plataforma una herramienta esencial en lo que respecta a nuevas tecnologías utilizadas en investigación científica (Cerdà y Manchado, 2013). En contraste con la secuenciación con el método Sanger, NGS es capaz de generar datos transcriptómicos masivos del genoma de forma rentable, gracias al continuo desarrollo y mejora de las tecnologías y metodologías, que han permitido reducir enormemente el costo de la secuenciación.

Diversas plataformas NGS difieren en cuanto a metodologías aplicadas, costos y cantidad de información procesada. Actualmente, se pueden dividir en dos grupos principales: plataformas de secuenciación de segunda generación y plataformas de tercera generación. Las plataformas de segunda generación requieren una etapa de amplificación de PCR previa a la reacción de secuenciación. Dentro de este grupo podemos encontrar las siguientes plataformas: (1) plataforma 454 (Roche Applied Science), basada en una PCR en emulsión seguida de la reacción de pirosecuenciación, es capaz de producir 0,4 a 0,5 Gb por lectura y alcanza una longitud media en sus secuencias de 400 a 700 pares de bases (pb); (2) plataforma Solexa Illumina® (Illumina, Inc.), basada en el fraccionamiento del genoma, seguido de una amplificación clonal sobre la superficie sólida de una celda de flujo. Esta plataforma es capaz de producir entre 200 a 300 Gb por lectura, con secuencias de 100 pb de longitud; y (3) Solid® (Life Technologies), basada en un proceso similar al

utilizado en la plataforma 454 a excepción del anclaje final, el cual se realiza en una superficie de cristal donde se lleva a cabo la secuenciación (Glenn, 2011).

En relación a las tecnologías de tercera generación, éstas se basan en la secuenciación de una única molécula de DNA sin la necesidad de efectuar una amplificación mediante PCR. 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).

Secuenciación 454

Entre las diferentes plataformas NGS existentes, la 454 se ha convertido en un método factible para aumentar la profundidad y la cobertura de la secuenciación. Siguiendo el método de pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1996), los niveles de error en esta plataforma son bajos (<1 %) debido a la presencia de homopolímeros, errores que generalmente son resueltos gracias a la profundidad y cobertura de la secuenciación mediante el ensamblado y superposición de lecturas. Como resultado, el uso de la plataforma 454 puede ser más preciso que las metodologías de secuenciación tradicionales, lo que la convierte en una poderosa herramienta para la interpretación de elementos funcionales en el genoma y que ha comenzado a promover y facilitar los estudios transcriptómicos en peces (Qian *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo la secuenciación mediante esta tecnología, el DNA debe ser aislado y posteriormente fragmentado. Los fragmentos son adheridos a adaptadores específicos unidos a microesferas de agarosa (cada fragmento de DNA está asociado a una microesfera) que se encuentra dentro de una solución de agua y aceite formando burbujas. De esta manera, se logra la separación entre cada una de las microesferas. Cada burbuja formada con la microesfera en su interior es un microrreactor que contiene los reactivos y enzimas necesarias para poder realizar la PCR (PCR en emulsión) y así obtener un gran número de copias del fragmento de DNA en la superficie de la microesfera (aproximadamente un millón de copias) (Margulies *et al.*, 2005).

La siguiente etapa consiste en cargar las microesferas en una placa “*PicoTiterPlate*” que será introducida en el equipo secuenciador. La placa cuenta con un millón de pocillos, con lo cual en cada pocillo queda una esfera con sus respectivos fragmentos de DNA. Finalmente, mediante la utilización de enzimas, tales como la sulfirasa y la luciferasa se produce la emisión de luz debido a la incorporación de nucleótidos en la cadena de DNA. La luz es captada e interpretada mediante programas bioinformáticos, identificando qué tipo de base nitrogenada se ha incorporado (Figura 10).

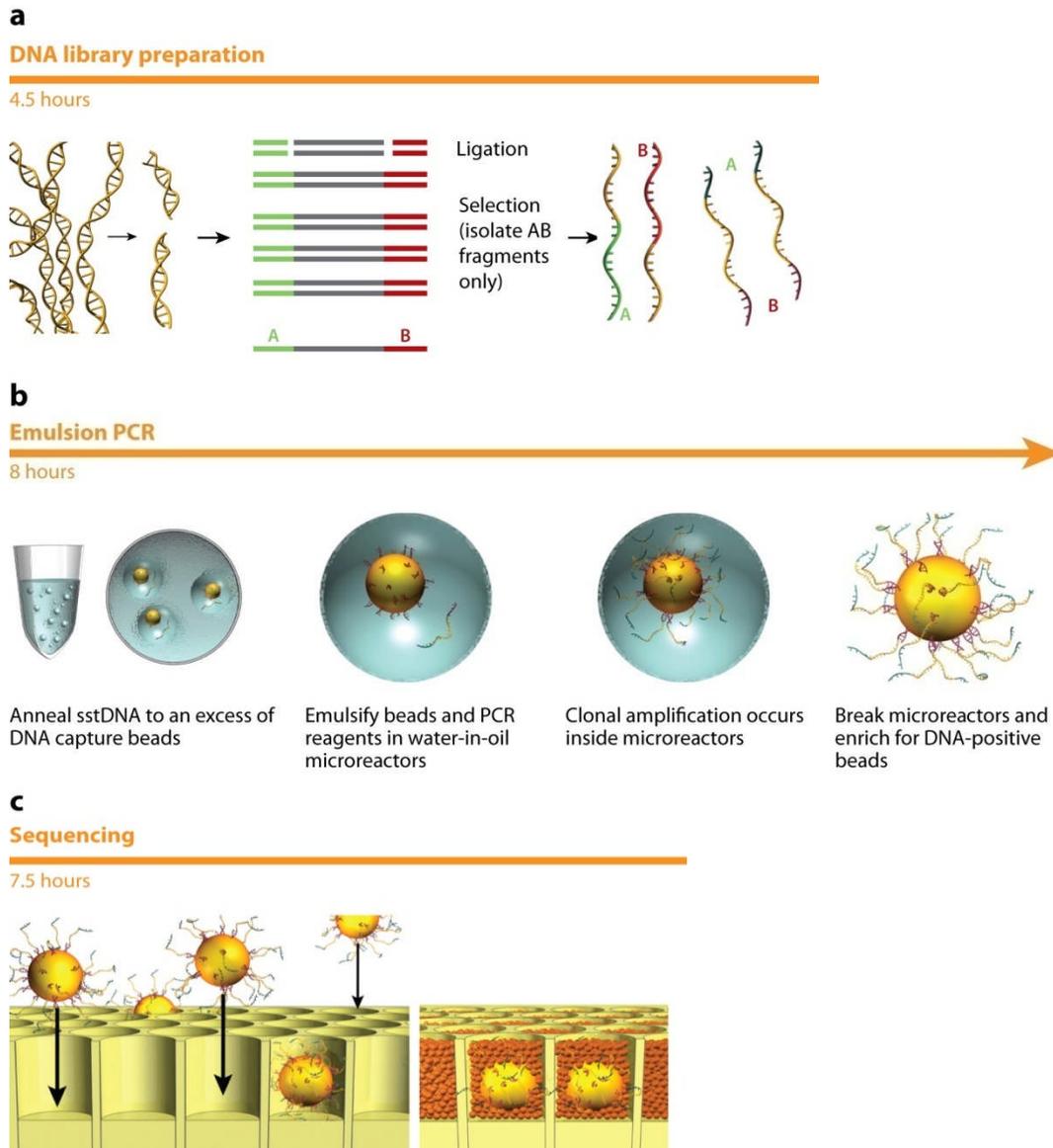


Figura 10. Flujo de trabajo de amplificación de PCR en emulsión. (a) DNA genómico es aislado, fragmentado y ligado a adaptadores. (b) Los fragmentos son unidos a microesferas en las cuales se produce la amplificación en presencia de reactivos y enzimas necesarias para la reacción. (c) Las microesferas son dispuestas en la placa “PicoTiterPlate” donde se produce la reacción de pirosecuenciación. Figura adaptada de Mardis (2008).

1.9 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Las técnicas genómicas de alto rendimiento desarrolladas en los últimos años han automatizado técnicas experimentales de biología molecular convencional con el fin de realizar los análisis y obtener datos a gran escala. En el área de transcriptómica, los *microarrays* de oligonucleótidos para determinar los perfiles de expresión génica han protagonizado una revolución

en el campo biológico debido principalmente a la capacidad que presentan para abordar el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes a bajo costo económico.

Gracias a la aplicación de esta herramienta, la genómica funcional se presenta como una nueva área de la ciencia capaz de determinar los genes responsables de cambios fenotípicos, procesos biológicos, procesos moleculares, respuesta a enfermedades, etc. (Miller y Maclean, 2008). El uso de esta tecnología ha servido para estudiar la genómica funcional de diversas especies modelos como es el caso de *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).

El funcionamiento del *microarray* se basa en determinar el nivel de hibridación entre sondas de DNA unidas a una superficie sólida y la molécula diana (por ejemplo, por competición entre dos muestras, cada una de ellas marcadas con un fluorocromo diferentes, generalmente cianina de coloración verde -Cy3- y roja -Cy5-). Existen dos tipos principales de *microarrays* de expresión génica en función del tipo de sonda utilizada para detectar la expresión: *Microarrays* de cDNA y *Microarrays* de oligonucleótidos. Los de cDNA presentan sondas de moléculas de DNA de entre 500 y 5000 pares de bases. En cambio, los de oligonucleótidos contienen secuencias de oligonucleótidos sintetizadas *in situ* mediante fotolitografía. Pionera en comercializar esta tecnología fue la compañía Affymetrix, utilizando sondas sintetizadas directamente en la superficie del *microarray* con una longitud de 25 pares de bases. Por otra parte, *microarrays* diseñados por la compañía Agilent (utilizados en este estudio) comprenden la síntesis *in situ* de oligonucleótidos de 60 bases de longitud, lo cual se traduce en una ventaja comparativa mejorando la selectividad debido al aumento de la longitud de la sonda. En la práctica, esta ventaja se ve reflejada al observar mayor fluorescencia en el sitio de hibridación (Šášík *et al.*, 2004). Otra de las ventajas que presenta la metodología Agilent, es una herramienta web (eArray) que permite a los usuarios personalizar el diseño de *microarray*. En función del experimento concreto a analizar se puede optar entre una u otra plataforma, considerando que cada una presenta sus propias ventajas y desventajas.

1.9.1 Principios y análisis de datos

Para determinar y cuantificar la expresión génica, previamente es necesario realizar el marcaje con fluorocromos de las muestras a estudiar, generalmente utilizando la detección con dos colores (rojo -Cy5- y verde -Cy3-). Posteriormente, las cadenas dianas en estudio marcadas se ponen en contacto con las sondas dispuestas en la superficie del *microarray*, produciéndose de esta manera la hibridación mediante la complementariedad de bases. Con el objetivo de determinar la cantidad de muestra que ha hibridado, el *microarray* es excitado mediante una luz láser que provoca la emisión

de fluorescencia de las moléculas marcadas. Como resultado, cada celda del *microarray* adquiere un color e intensidad en base al grado de hibridación de las secuencias presentes en la plataforma con las secuencias en estudio marcadas. De esta manera, los colores del *microarray* tienden a ser rojo o verde dependiendo del tipo de muestra con mayor grado de hibridación, amarillo en caso de que el nivel de hibridación sea similar o negro si no se ha producido hibridación con ninguna de las dianas (Figura 11).

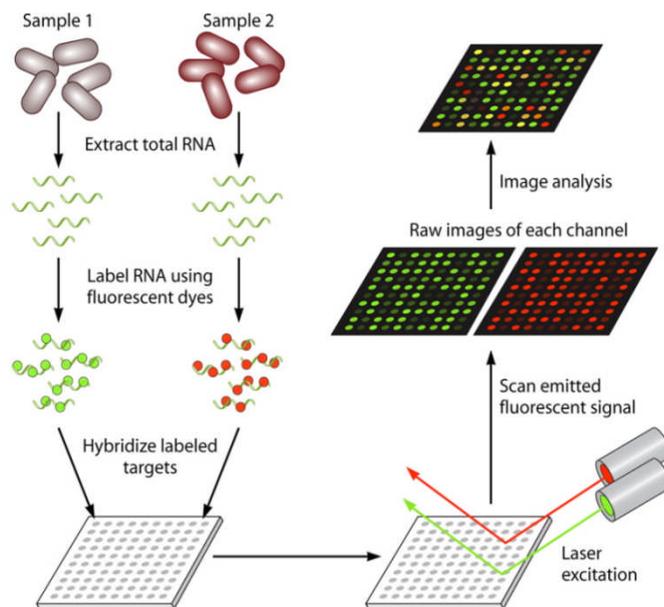


Figura 11. Flujo de trabajo para la determinación de expresión de genes mediante la utilización de *microarrays*. Figura adaptada de Miller y Tang (2009b).

Antes de proceder al análisis de los datos, es necesaria su normalización para eliminar la variabilidad de los datos genómicos propia de la tecnología utilizada. Estas variaciones pueden ser de dos tipos: sistemáticas y aleatorias. En el caso de las variaciones sistemáticas, están ligadas a procedimientos técnicos, mientras que las aleatorias son atribuibles tanto a razones técnicas como biológicas (Sánchez y Villa, 2008). La normalización de los datos se realiza mediante análisis bioinformático utilizando paquetes computacionales como Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004).

El siguiente paso consiste en el análisis de los genes relacionados funcionalmente mediante una interpretación biológica. Para ello es necesario agrupar los genes en bases de datos con anotaciones funcionales como es el caso de los términos de ontología génica (GO) y la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEEG). La base de datos GO nació como resultado de un esfuerzo colaborativo para establecer descripciones consistentes de los productos génicos anotados en

diferentes bases de datos. En 1998 representantes de las bases de datos de tres organismos modelo: *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Mus musculus* fundaron el Consorcio GO con el cual se creó un vocabulario de terminologías controlado y estructurado, que define con precisión la descripción de las funciones de los genes y productos genéticos en cualquier organismo (Ashburner *et al.*, 2000). Mediante el uso de la base de datos GO es posible organizar los términos funcionales en tres categorías:

Procesos Biológicos: se refiere a un objetivo biológico al que el gen o el producto génico contribuyen. Generalmente implica transformaciones químicas o físicas que ocurren por acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas. Los procesos biológicos pueden ser de un nivel más elevado o más bajo. Un ejemplo de proceso biológico de alto nivel es el crecimiento o el mantenimiento celular, en cambio, un proceso biológico de nivel inferior sería el metabolismo de pirimidinas o la biosíntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPC).

Función Molecular: describe actividades bioquímicas de un producto génico. Sus términos representan a las actividades y no a las entidades (moléculas o complejos moleculares) que llevan a cabo las acciones, sin especificar cuándo, dónde, o en qué contexto ocurren. Para evitar confusiones entre los nombres de los productos genéticos y las funciones moleculares, muchos términos incorporan la palabra *activity*.

Componente Celular: se refiere 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 genéticos, como el ribosoma (Ashburner *et al.*, 2000).

Por otra parte, la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa, 1997) es otro recurso bioinformático muy útil a la hora de clasificar los resultados en base a las rutas metabólicas en las que puede participar, facilitando la agrupación de los genes en un contexto funcional. El proyecto KEGG se inició en 1995 bajo el Programa Genoma Humano del Ministerio de Educación, Ciencia, Deportes y Cultura de Japón (Minoru Kanehisa y Susumu Goto, 1999). Según sus creadores, KEGG es una representación computacional del sistema biológico que integra y construye diagramas del sistema, 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 en total representan 15 subgrupos

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

La dorada (*Sparus aurata*) es ampliamente cultivada en la región mediterránea. Constituye el pez con mayor producción acuícola en España y, entre los peces de origen marino, en Europa. En el año 2013, la producción total de esta especie se cuantificó en 152 mil toneladas, llegando a representar el 56 % de la producción total de peces marinos en Europa (FEAP, 2014).

Hoy en día uno de los objetivos principales de la investigación aplicada a la piscicultura es el estudio de la relación entre el crecimiento y los cambios medioambientales, la disponibilidad de nutrientes y la composición de las dietas suministradas. En este sentido, se han dedicado grandes esfuerzos a realizar investigaciones sobre la nutrición de peces con el objetivo de comprender el papel que cumplen genes clave en el crecimiento y metabolismo intermediario. Sin embargo, a pesar del interés comercial en la producción de *S. aurata*, los datos y recursos, tanto genómicos como transcriptómicos disponibles para esta especie, son hoy en día aún muy escasos, lo que limita enormemente la realización de estudios de genómica funcional con fines nutricionales.

El objetivo general de este estudio es realizar un análisis transcriptómico de músculo esquelético de dorada de utilidad para estudios nutricionales, e identificar mediante el uso de la tecnología de *microarrays* genes biomarcadores de la utilización de los nutrientes de la dieta presentes en el músculo esquelético de *S. aurata*. La modulación de la expresión de genes seleccionados tras el análisis del transcriptoma y mediante *microarrays* a partir de RNA aislado de músculo esquelético de doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales, nos proporcionará información para profundizar en las adaptaciones metabólicas que desarrollan los peces en función del estado nutricional y la composición de la dieta, y su relación con el crecimiento muscular.

Este conocimiento podría permitir analizar la funcionalidad génica en condiciones de implementación de una sustitución parcial de proteínas de pescado por carbohidratos y/o lípidos en los piensos utilizados en piscicultura, lo que abarataría de manera significativa los costes de producción. Dado que las harinas de pescado suministradas en los piensos destinados a la piscicultura son altamente dependientes de las pesquerías, a menudo sobreexplotadas, cualquier avance que permita reducir la cantidad de proteína de pescado presente en los piensos tendría un impacto relevante a nivel económico, ambiental, y sobre el ecosistema marino y la biodiversidad, permitiendo la sostenibilidad de la acuicultura. Por otra parte, los efectos negativos que causa la acuicultura a nivel local por acumulación de amonio excretado y materia orgánica, podrían verse atenuados por una disminución del catabolismo de aminoácidos de los peces en cultivo.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

- Realizar un análisis transcriptómico, a partir de RNA total procedente de músculo esquelético de doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales para disponer de una amplia base de datos de secuencias genómicas de utilidad para desarrollar investigación nutricional en *S. aurata*.
- Validar la utilidad de los resultados del análisis transcriptómico analizando el efecto del ayuno y la composición de la dietas en la expresión de genes implicados en procesos de obtención de energía, como la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en músculo esquelético de juveniles de *S. aurata*, y para los que no se disponía de información genómica previa para dorada en las bases de datos.
- Evaluar el efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre la digestibilidad, el aprovechamiento de nutrientes, la ingesta, parámetros somáticos relacionados con el crecimiento y enzimas clave en el metabolismo intermediario en la dorada.
- Estudiar el efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre el patrón global de expresión génica en músculo esquelético de dorada mediante la utilización de *microarrays* de oligonucleótidos para identificar genes biomarcadores de utilidad potencial para mejorar la utilización de los nutrientes de la dieta en la piscicultura.
- Validar los resultados de *microarrays* analizando los efectos del ayuno y la composición de la dieta sobre genes clave en procesos de crecimiento y remodelación del músculo esquelético.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES UTILIZADOS

Para la realización de esta tesis se han utilizado muestras de músculo esquelético procedentes de juveniles de dorada (*Sparus aurata*), pez teleósteo de la familia *Sparidae*. Esta especie habita principalmente la zona mediterránea y el mar negro y se extiende en el océano Atlántico desde el Sur de las islas británicas hasta Senegal. Su cuerpo generalmente con forma ovalada comprimida lateralmente, presenta una mancha oscura sobre el opérculo y una franja dorada situada entre los ojos de la cual deriva su nombre común, dorada.

La dorada es capaz de tolerar un amplio rango de salinidad habitando tanto en ambientes marinos como salobres, tales como lagunas costeras y áreas estuarinas. Suele habitar aguas relativamente poco profundas, a menudo en fondos rocosos con algas y también en fondos blandos con praderas de *Posidonia oceanica*. Los juveniles tienen hábitos más litorales y viven en aguas menos profundas que los adultos, los cuales pueden llegar a habitar profundidades cercanas a los 100–150 metros, adoptando un comportamiento solitario. Presenta alta sensibilidad a las bajas temperaturas, dejando de alimentarse cuando ésta baja de los 12 °C, aunque puede soportar temperaturas menores, siendo su mínimo letal del orden de 5–7 °C. Su crecimiento más rápido se observa a temperaturas de 25–26 °C, pudiendo soportar temperaturas de hasta 32 °C.

Es un pez de hábitos carnívoros, que se alimenta principalmente de moluscos bivalvos, crustáceos y pequeños peces o cefalópodos.

S. aurata constituye una especie hermafrodita protándrica, que primero se comporta como macho y luego como hembra. Durante el primer año de vida suelen ser inmaduros, aunque algunos pueden llegar a madurar como machos. Pero en la mayoría, la primera maduración sexual suele ocurrir durante el segundo año de vida, momento en el que se desarrolla la parte ventral de la gónada, originando testículos funcionales. Al final de esta primera estación reproductora, todos los individuos inician un proceso de reversión sexual, que afecta aproximadamente a un 80 % de la población, y a partir del tercer año de vida se comportan como hembras. El 20 % restante interrumpe los procesos de reversión y permanece como machos (Aurelio Ortega, 2008).

Es una especie muy apreciada comercialmente en los países europeos del Mediterráneo, por lo cual el desarrollo de su cultivo y producción tiene un gran impacto económico y alimenticio en la zona.

3.2 CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS PECES

Las doradas utilizadas en nuestros estudios procedían de la piscifactoría Piscimar S.L. (Burriana, Castellón), perteneciente al Grupo Andrómeda. Llegaron a nuestro laboratorio con un peso inicial entre 5–8 g. Se mantuvieron en acuarios con una capacidad de 260 litros de agua, ubicados en cámaras con control de temperatura, en el Departamento de Ecología de la Facultad de Biología en la Universidad de Barcelona. La temperatura del agua se mantuvo constante en los acuarios, a $21 \pm 0,5$ °C, gracias a la utilización de dos cámaras climatizadas: una con capacidad para 10 acuarios y otra con capacidad para 7 acuarios. La iluminación de cada cámara fue programada para un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. La salinidad del agua de cada acuario se mantuvo controlada a 35 ‰. Con el objetivo de garantizar niveles óptimos de oxígeno disuelto, los acuarios contaban con un suministro continuo de aire mediante compresores (400 L/h) (Stellar S-30, California, USA).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua en los acuarios. Incidencias más frecuentes, causas y medidas de corrección.

Parámetro	Rango	Medición	Incidencia	Causas	Medida de corrección
Temperatura	20,5 – 21,5 °C	Termómetro de mercurio	Disminución/Aumento	Falla luz UV, fallo de cámara climatizada	Comprobar UV, sustituir si es necesario. Comprobar nivel de líquido refrigerante de la cámara, rellenar.
Salinidad	34 - 36 ‰	Refractómetro	Aumento	Evaporación	Cambio parcial de agua.
pH	7,5 – 8,0	SERA pH test (SERA GmbH, Alemania)	disminución	Falla luz UV. Bomba parada	Comprobar UV. Revisar bomba y cebar nuevamente.
Amonio	0 – 0,5 mg/L	SERA NH4/NH3 test (SERA GmbH, Alemania)	Aumento	Bomba parada o con caudal bajo	Revisar bomba y cebar nuevamente.

Los residuos procedentes de las excreciones de los peces o de degradación del alimento no ingerido fueron eliminados u oxidados biológicamente a formas menos tóxicas bombeando el agua (1800 L/h) a través de un filtro externo tipo Eheim professional 3 (Eheim, Deizisau, Alemania). Los filtros están formados por 3 secciones: la primera, de material cerámico poroso, una segunda sección de arena calcárea y la tercera compuesta por carbón activo. De esta forma, el agua es filtrada mediante un sistema mecánico, un sistema químico (carbón activo) y un sistema biológico (bacterias nitrificantes). Con la finalidad de esterilizar y controlar la carga microbiana del agua, cada acuario contaba con una lámpara ultravioleta Eheim reeflexUV 800 (Eheim, Deizisau, Alemania) situada a la salida del filtro.

Cada semana se comprobaron los parámetros abióticos de mayor importancia en el bienestar de los peces. De esta manera, minimizando las fluctuaciones de cada variable nos asegurábamos de tener buena homogeneidad en las condiciones de mantenimiento de los peces de los diferentes acuarios. La tabla 1 muestra los parámetros analizados y las medidas adoptadas en caso de encontrar cambios que los alejasen de los rangos óptimos.

3.3 PREPARACIÓN DE DIETAS EXPERIMENTALES

Para la preparación de las dietas experimentales, inicialmente se mezclaron todos los ingredientes en seco durante 5 minutos, utilizando una amasadora industrial (Kenwood). A continuación, sin dejar de mezclar, se agregó una cantidad equivalente de agua destilada donde previamente se había disuelto el cloruro de colina. Después de 5 minutos se procedió a agregar el aceite de pescado. Posteriormente, en función de la viscosidad de la mezcla obtenida se siguieron mezclando los ingredientes hasta obtener una mezcla de composición homogénea.

Para la elaboración de pienso granulado, la masa fue procesada con un moldeador Simac Pastamatic 700, mediante el cual se obtienen por presión filamentos de 2,5 mm de diámetro. Estos filamentos se secaron en estufa (WTE Binder 7200, Alemania) a 70 °C durante 24 horas y posteriormente fueron fragmentados utilizando una trituradora (Kenwood) obteniendo un pienso granulado de 3 a 5 mm de largo y 2 mm de diámetro.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS

Con el fin de obtener la máxima representación y diversidad de transcritos de RNA para analizar el transcriptoma y estudiar los efectos de los cambios nutricionales sobre el metabolismo de juveniles de dorada, se formularon 5 dietas experimentales diferentes en su composición en proteína, lípidos y carbohidratos. Las dietas fueron denominadas: $H^P L^L C$, $M^P H^L C$, $L^P L^H C$, $M^P L^H C$, $L^P H^L C$ (Tabla 2). En la nomenclatura asignada a cada dieta las letras mayúsculas hacen referencia a los niveles de nutrientes presentes en cada una de ellas (*High*, *Medium* and *Low*). Las letras en superíndice hacen referencia al tipo de nutriente (*Protein*, *Lipid* and *Carbohydrate*).

Con estas cinco dietas experimentales y a fin de realizar un análisis transcriptómico en dorada, los peces fueron alimentados durante un periodo de 23 días (experimento 1). La alimentación se realizó a saciedad de lunes a viernes proporcionándoles la dieta correspondiente en dos raciones diarias, una a la mañana (9:30) y otra ración por la tarde (15:30). Los fines de semana se les suministró una ración única al mediodía (12:00). Un sexto grupo de peces fue mantenido durante el mismo período de tiempo en condición de ayuno.

El suministro de alimento se efectuó a intervalos de 5-10 minutos observando el comportamiento de los peces frente a la entrega de alimento. Una vez detectada la pérdida de interés de parte de las doradas para captar el alimento, además de observar la presencia de éste en el fondo del acuario, se dejaba de ofrecer más alimento. Posteriormente, transcurridos 10 minutos aproximadamente del final de la alimentación, los restos de pienso no ingeridos eran colectados con el fin de mantener los acuarios en condiciones óptimas de limpieza.

Tabla 2. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales.

DIETAS	H ^P L ^L C	M ^P H ^L C	L ^P L ^H C	M ^P L ^H C	L ^P H ^L C
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	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Carragenano §	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Energía bruta (kJ/g dw)	20,2	22,4	19,9	20,02	22,13
Análisis químico (% peso seco)					
Proteína cruda	59,5	50,1	40,6	-	-
Grasas	7,2	17,5	8,2	-	-
Carbohidratos**	18,4	20,9	40,9	-	-
Cenizas	14,9	11,5	10,3	-	-

* 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 colesterciferol, 0,05; cianocobalamina, 0,05.

§ Iota carrageenan (Sigma-Aldrich).

** 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).

La figura 12 representa el diseño del experimento 1, así como también los tipos de muestras biológicas colectadas. Se analizaron parámetros morfológicos, nutricionales, bioquímicos y moleculares.

• EXPERIMENTO 1

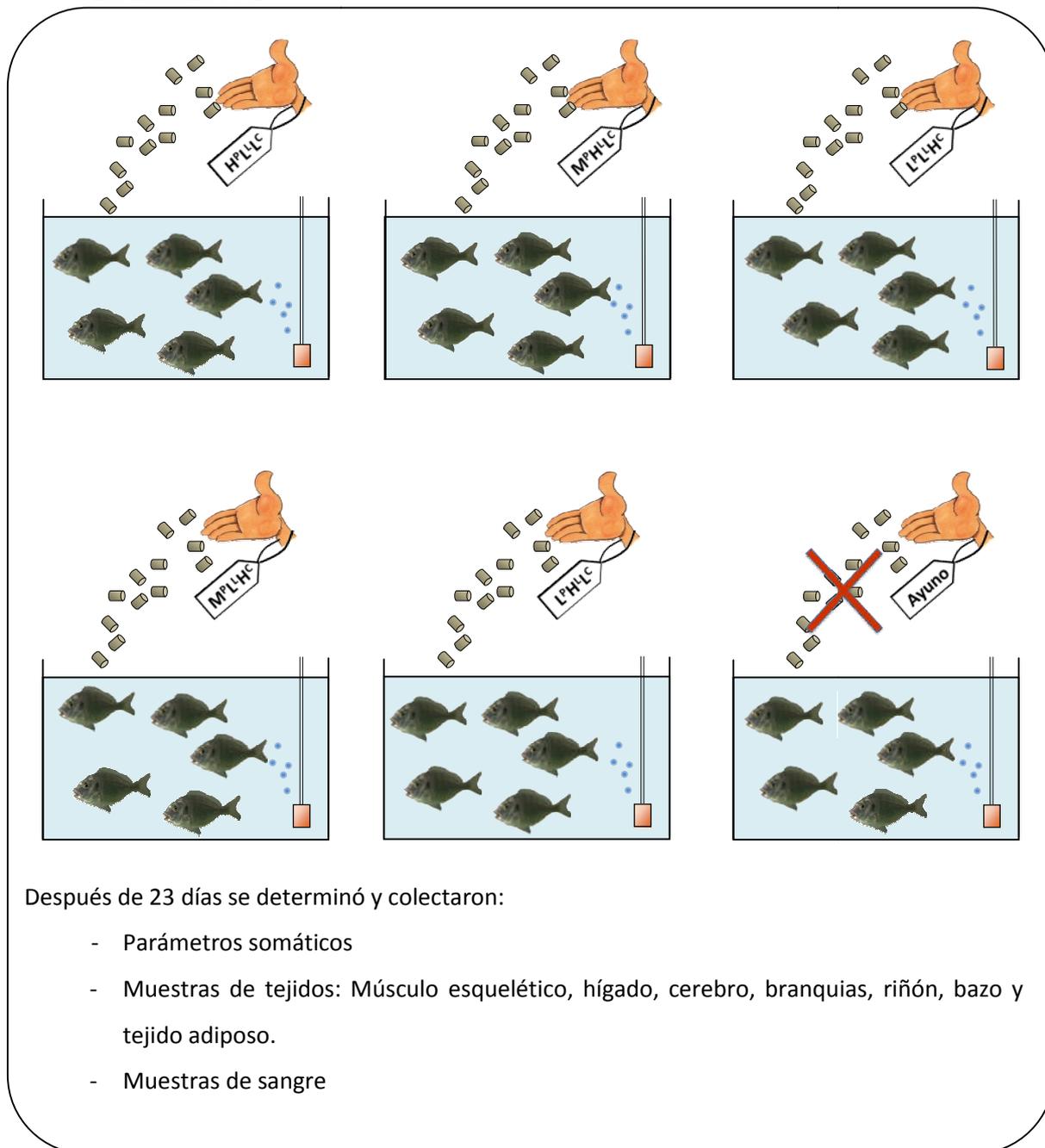


Figura 12. Esquema experimental para el estudio del transcriptoma del músculo esquelético en juveniles de dorada.

Durante el desarrollo del experimento se efectuaron los siguientes procesos:

- 1) Cada 7-10 días, se pesaban las doradas individualmente, se determinaba el peso promedio correspondiente a cada acuario. Diariamente se anotaba la cantidad de dieta suministrada. Los valores de peso de los peces y la ingesta diaria fueron utilizados para calcular:
 - Tasa de crecimiento de las doradas.

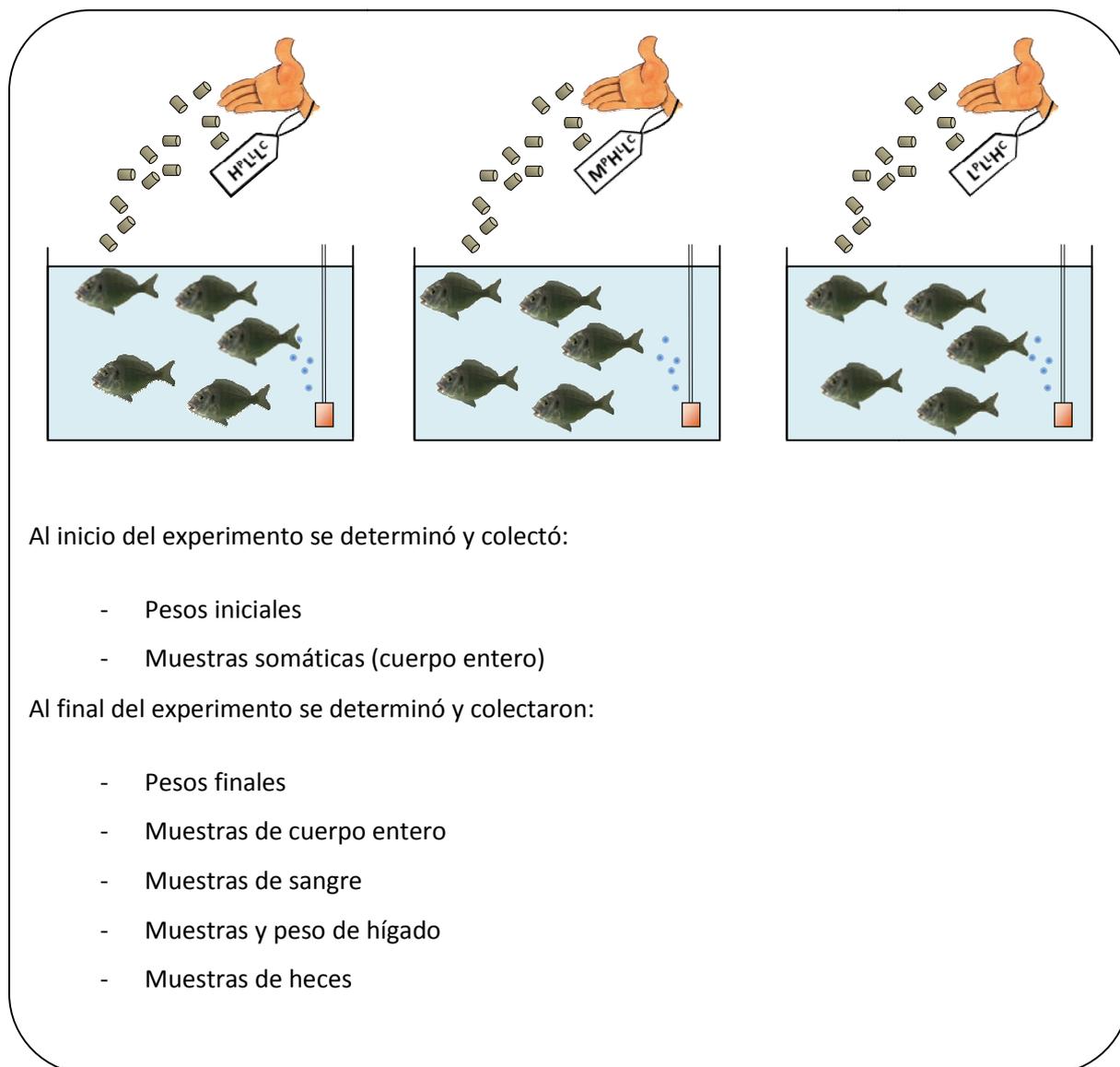
- Ingesta diaria de pienso.
 - Tasa de conversión de alimento en biomasa.
- 2) Al finalizar el experimento se sacrificaron 10 peces por acuario obteniendo diferentes muestras biológicas:
- Muestras de suero para analizar glucosa y triglicéridos.
 - Muestras de hígado para determinar:
 - o Índice hepatosomático.
 - o Transcriptoma del hígado
 - Muestras de músculo esquelético para estudios de:
 - o Transcriptoma del músculo esquelético.
 - o Niveles de expresión génica en vías relacionadas con la modulación y el crecimiento del músculo esquelético.
 - o Actividades de enzimas clave en el metabolismo intermediario.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS DEL APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES DE LA DIETA, CRECIMIENTO Y REGULACIÓN DEL METABOLISMO

Un segundo experimento (experimento 2) fue realizado con el fin de determinar el aprovechamiento y la digestibilidad de los nutrientes, además de los parámetros de crecimiento de los peces alimentados con cada dieta. Para ello, tres grupos de doradas fueron alimentadas durante 37 días con las dietas $H^P L^L C$, $M^P H^L C$ y $L^P L^H C$. El régimen de alimentación fue similar al aplicado en el experimento 1, el cual corresponde a un régimen a saciedad de lunes a viernes proporcionándoles la dieta correspondiente en dos raciones diarias, una en la mañana (9:30) y una ración por la tarde (15:30). Los fines de semana se les suministró una ración única al mediodía (12:00). La selección de estas tres dietas se realizó en base a que la dieta $H^P L^L C$ es la de mayor contenido en proteína, asemejándose a la dieta natural de las doradas, mientras que la dieta $M^P H^L C$ muestra una composición similar a las dietas comerciales y en la dieta $L^P L^H C$ una parte importante de la proteína ha sido sustituida por carbohidratos.

La figura 13 representa el diseño del experimento 2, así como también los tipos de muestras biológicas colectadas. Se analizaron parámetros morfológicos, nutricionales, bioquímicos y moleculares.

• EXPERIMENTO 2



Al inicio del experimento se determinó y colectó:

- Pesos iniciales
- Muestras somáticas (cuerpo entero)

Al final del experimento se determinó y colectaron:

- Pesos finales
- Muestras de cuerpo entero
- Muestras de sangre
- Muestras y peso de hígado
- Muestras de heces

Figura 13. Esquema experimental para el estudio del crecimiento, aprovechamiento y digestibilidad de los nutrientes en juveniles de dorada.

Durante el desarrollo del experimento se efectuaron los siguientes procesos:

- 3) Cada 7-10 días, se pesaban las doradas individualmente, se determinaba el peso promedio correspondiente a cada acuario. Diariamente se anotaba la cantidad de dieta suministrada. Los valores de peso de los peces y la ingesta diaria fueron utilizados para calcular:
 - Tasa de crecimiento de las doradas.
 - Ingesta diaria de pienso.
 - Tasa de conversión de alimento en biomasa.

- 4) Con el fin de analizar la composición química a nivel somático de los peces alimentados con las dietas experimentales, se sacrificaron 10-12 peces al inicio del experimento y 5 peces de cada acuario al final del experimento. Una vez analizada la composición química de las doradas, se calculó:
- Retención corporal de proteína para cada tipo de dieta.
 - Retención corporal de grasa para cada tipo de dieta.
- 5) Al finalizar el experimento, se sacrificaron 8-12 peces por acuario, obteniendo diferentes muestras biológicas:
- Muestras de hígado para determinar:
 - o Índice hepatosomático.
 - Muestras de heces, con las cuales se analizó:
 - o Digestibilidad de cada dieta y de los nutrientes presentes en su formulación.
 - o Ingesta diaria digerible.
 - o Pérdidas fecales

3.6 MANIPULACIÓN DE LAS DORADAS, SACRIFICIO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS

Con el fin de minimizar el estrés durante la manipulación de los peces, estos eran anestesiados vía inmersión en un acuario auxiliar de 5 L con agua de mar que contenía metasulfonato de tricaina (MS-222) a una concentración de 70 mg/L. Posteriormente eran pesados en tandas de 5 a 10 peces, de tal manera de que cada individuo no permaneciese más de 10 minutos en exposición al anestésico. Una vez finalizada la manipulación de los peces, si no eran sacrificados se dejaban en otro acuario con un volumen de 5 L de agua de mar sin anestésico, para lograr su recuperación antes de retornarlos a su acuario de origen.

Al final del experimento se calculó la ingesta diaria de pienso para cada acuario mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ingesta (g/Kg día)} = \frac{\text{g de dieta ingerida}}{\text{Biomasa promedio (Kg)} \times \text{duración del experimento (días)}}$$

Para analizar la composición de los peces, se realizó el sacrificio de los mismos 24 horas después de la última ingesta de alimento, con una sobredosis de anestésico (1 g/L de MS-222). Cinco peces se secaron en estufa (WTE Binder 7200, Alemania) a 70 °C, se agruparon por acuario y se

homogenizaron, utilizando una trituradora (Kenwood). Los homogenizados fueron secados en estufa (WTE Binder 7200, Germany) a 70 °C durante 4 días hasta observar un peso constante. Finalmente, se conservaron a -30 °C hasta la realización de los análisis.

Para la obtención de suero y músculo esquelético, los peces fueron sacrificados 24 horas después de la última ración de alimento. Tras el proceso de anestesia (70 mg/L MS-222) y de sacrificio mediante un corte cervical, se recogía la sangre utilizando una pipeta Pasteur de vidrio, previamente lavada con citrato sódico al 3 %. La sangre obtenida se dejó en hielo durante 30 minutos aproximadamente. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se recuperó el suero y se conservó a -20 °C hasta su utilización para los análisis.

Para la obtención de las muestras de músculo, de cada pez se retiró la piel mediante un corte en la zona dorso lateral, como se observa en la figura 14 y se procedió a extraer una muestra de músculo esquelético, que se lavó con una solución de NaCl al 0,9 %. Inmediatamente después, la muestra fue congelada mediante la técnica de *freeze clamping* utilizando pinzas previamente enfriadas en nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras de tejido se almacenaron individualmente a -80 °C hasta su utilización.

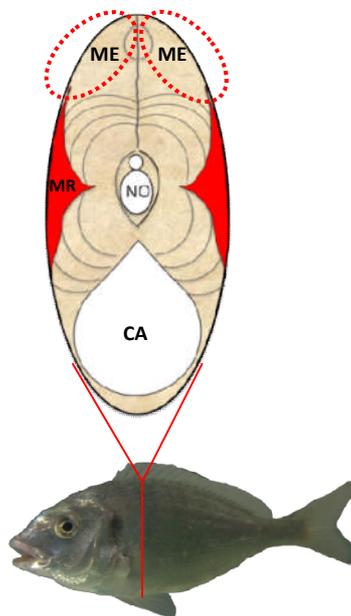


Figura 14. Corte transversal de *S. aurata*. La línea punteada representa la zona del músculo esquelético (ME) muestreada. También se representa el músculo rojo (MR), la cavidad abdominal (CA) y la notocorda (NO).

Para realizar los diferentes análisis bioquímicos y moleculares, las muestras de músculo esquelético fueron pulverizadas en un mortero, manteniendo en todo momento la temperatura de la muestra por debajo de -80 °C mediante la utilización de nitrógeno líquido.

Protocolo de obtención de extractos musculares:

1. Pesar 50-60 mg de tejido muscular y agregar tampón de homogenización en una relación 1:5 P/V (mg/μL). A partir de este momento, las muestras permanecerán en hielo.
2. Homogenizar las muestras utilizando un POLYTRON-PTA 7 (Kinematica GmbH, Littau-Luzern, Suiza) en posición 3-4, durante 10 segundos.
3. Centrifugar el extracto a 13000 rpm durante 45 minutos a 4 °C con el fin de eliminar los compuestos sólidos insolubles.
4. Recoger el sobrenadante descartando la capa superior de grasa.

En los extractos musculares se determinó la concentración de proteína según el método de Bradford, (1976) descrito en el apartado 3.13.1.

Tampón de homogenización	
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 TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA

Una vez llegados los peces a nuestras instalaciones estos fueron pesados y distribuidos aleatoriamente en los diferentes acuarios en grupos de 15-25 peces. Durante la semana siguiente a la recepción, los peces fueron aclimatados a las nuevas condiciones de mantenimiento. Para ello, fueron alimentados una vez al día con una ración del 2 % de su peso corporal con dieta comercial Microbaq 15 (Dibaq Grupo, España) (Tabla 3).

Tabla 3. Composición y análisis proximal de la dieta comercial Microbaq 15

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

Una vez finalizado el período de aclimatación, se pesaron los peces nuevamente y se procedió con la experimentación, asignando aleatoriamente los acuarios para los tratamientos con las dietas correspondientes. Se calculó la Tasa de Crecimiento Específica (SGR) mediante la siguiente fórmula:

$$SGR (\%) = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{D} \times 100$$

Donde:

W_1 = Peso medio de los peces al inicio del periodo de alimentación

W_2 = Peso medio de los peces al final del periodo de alimentación

D= Días de alimentación

3.8 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

3.8.1 Humedad

La determinación de humedad se realizó utilizando las muestras obtenidas para el análisis de composición. La diferencia entre el peso de la muestra previo al proceso de secado (peso fresco) y

tras el proceso de secado (peso seco) correspondió al contenido de humedad. El cálculo fue realizado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

3.8.2 Proteína cruda

Para cuantificar el contenido proteico de la dieta suministrada y en los peces, se determinó el contenido de nitrógeno utilizando un analizador elemental Carlo-Erba NA 2100 (CE Instruments). Para ello, se pesó en balanza analítica 1 mg de muestra correspondiente al homogenizado corporal de los peces dentro de una pequeña cápsula de estaño de 4 X 6 mm, agregando aproximadamente unos 3 mg de pentóxido de vanadio (V_2O_5) dentro de la cápsula. Posteriormente, la muestra era oxidada por combustión instantánea en una atmósfera de oxígeno puro. Como resultado de la combustión, el nitrógeno y el carbono orgánico e inorgánico de la muestra fueron convertidos a nitrógeno molecular (N_2) y dióxido de carbono (CO_2), respectivamente. A continuación, estos gases eran arrastrados por un flujo de helio a través de un horno de reducción, en el que cualquier residuo de NO se reducía a N_2 . Finalmente, después de pasar por una columna de cromatografía, N_2 y CO_2 llegaban separadamente a un detector de conductividad térmica, que generaba una señal eléctrica proporcional a la concentración de estos dos elementos. La concentración de proteína cruda de la muestra fue estimada multiplicando la concentración de N_2 obtenida (en % de peso seco) por un factor de 6,25.

La preparación de la muestra y la cuantificación de su contenido de nitrógeno fueron realizadas en la Unidad de Técnicas Separativas de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

3.8.3 Contenido de grasa

El contenido lipídico de las dietas así como el de las muestras de peces homogenizadas, fue extraído con éter de petróleo utilizando un Tecator Soxtec HT 1043 (Foss). Para ello, se pesaban 2 g de muestra sobre papel de filtro y se agregaba una pequeña cantidad de sulfato de sodio (Na_2SO_4) con la finalidad de evitar la absorción de humedad por parte de la muestra. Acto seguido, la muestra era empaquetada dentro del papel de filtro en que había sido pesada, se colocaba dentro de un cartucho de celulosa y se tapaba la abertura del cartucho con fibra de algodón. Una vez colocado el

cartucho dentro de la columna, se iniciaba el proceso de extracción de los lípidos, el cual constaba de tres etapas:

1. En la primera etapa, el cartucho con la muestra eran sumergidos durante 15 minutos en 50 ml de éter de petróleo en ebullición dentro de una cápsula de aluminio. El vapor de éter liberado al hervir la muestra, se condensaba al llegar al circuito de refrigeración y volvía a la cápsula de aluminio, lavando continuamente la muestra.
2. En la segunda etapa se levantaba el cartucho y se dejaba suspendido sobre el solvente en ebullición durante 40 minutos. Los sucesivos enjuagues durante esta etapa acababan de extraer la grasa remanente en la muestra.
3. En la última etapa, de 15 minutos de duración, se impedía el retorno del éter condensado mediante una válvula interna, concentrando el extracto dentro de la cápsula de aluminio. Para eliminar cualquier residuo de disolvente o humedad, se dejaban las cápsulas en estufa a 100 °C durante 5 minutos. Por último, se dejaban enfriar los extractos hasta alcanzar la temperatura ambiente en un desecador y se pesaban. El contenido de grasa de la muestra se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Tara de la cápsula})}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

De manera similar a la medida del peso final (cápsula más extracto), la tara de la cápsula se realizaba después de haberla calentado previamente a 100 °C durante 30 minutos.

3.8.4 Contenido de cenizas

Para la determinación de cenizas tanto en las dietas suministradas como en las muestras de peces, se pesaban 200 mg de muestra, que eran depositados en un crisol de cerámica previamente tarado. La muestra era calcinada aumentando la temperatura de forma gradual en una mufla (Hobersal 12PR/300, Hobersal) a 450 °C durante 12 horas. Las temperaturas, así como los tiempos utilizados fueron los siguientes:

1. Aumento de temperatura, a 1,5 °C/min hasta llegar a 200 °C (2 horas).
2. Estabilización de la muestra a 200 °C durante 2 horas.
3. Aumento de temperatura, a 1,4 °C/min hasta 450 °C (3 horas).
4. Calcinación de la muestra a 450 °C durante 12 horas.

Al finalizar la calcinación se dejaba enfriar la muestra hasta temperatura ambiente en un desecador y se pesaba. El contenido de cenizas se calculaba mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Tara del crisol})}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

La preparación y las determinaciones en las muestras fueron realizadas en los (CCiTUB).

3.9 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Utilizando los valores de peso, ingesta y composición corporal de los peces, se calcularon diferentes parámetros con el fin de evaluar las variaciones de eficiencia alimentaria observadas en los peces alimentados con las diferentes dietas suministradas.

Tasa de conversión del alimento (FCR) en relación a la biomasa:

$$\text{FCR} = \frac{\text{g de dieta ingerida (peso seco)}}{\text{g de biomasa ganado (peso fresco)}} \times 100$$

Retención de la proteína de la dieta (PR):

$$\% \text{ Retención de proteína} = \frac{\text{g de proteína ganado (peso seco)}}{\text{g de proteína ingerido (peso seco)}} \times 100$$

Retención de la grasa de la dieta (LR):

$$\% \text{ Retención de grasa} = \frac{\text{g de grasa ganado (peso seco)}}{\text{g de grasa ingerido (peso seco)}} \times 100$$

Ratio de eficiencia de alimentación (FER):

$$\text{Ratio de eficiencia de alimentación} = \frac{\text{g de biomasa ganado (peso fresco)}}{\text{g de dieta ingerida (peso seco)}}$$

Ratio de eficiencia proteica (PER):

$$\text{Ratio de eficiencia proteica} = \frac{\text{g de biomasa ganado (peso fresco)}}{\text{g de proteína ingerida (peso seco)}}$$

Índice hepatosomático (HI): Se calculó utilizando el peso del hígado en relación al peso del pez

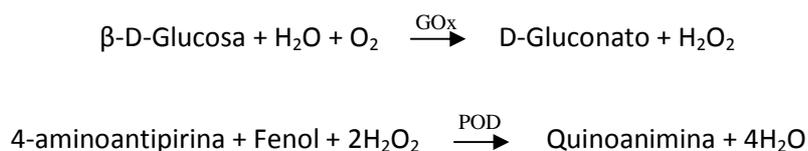
$$\% \text{ HI} = \frac{\text{g de hígado (peso fresco)}}{\text{g de peso corporal (peso fresco)}} \times 100$$

3.10 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.10.1 Determinación de glucosa en suero

Las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el kit comercial Glucosa MR (*Linear Chemicals*, España). El método se basa en una reacción enzimática en la que a partir de un metabolito de interés (glucosa en este caso) se formará una cantidad proporcional de un compuesto que absorbe a una longitud de onda de 500 nm. El protocolo descrito por el fabricante fue adaptado al autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

Para determinar la concentración de glucosa, el principio de la reacción se basa en la oxidación de la glucosa presente en el suero a D-gluconato por acción de la glucosa oxidasa (GOx, EC 1.1.3.4), formando peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En la reacción enzimática acoplada se produce una quinona de color rojizo a partir de la reacción del peróxido con fenol y 4-aminoantipirina (reacción Trinder) en presencia de peroxidasa (POD).



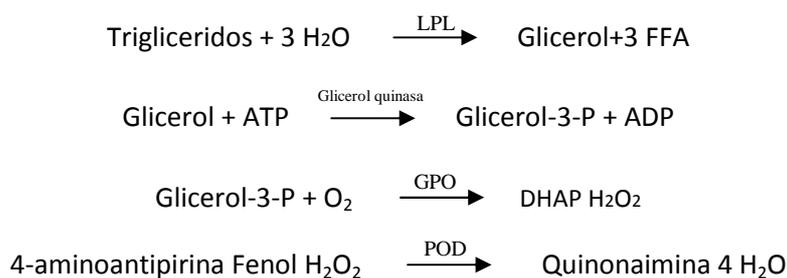
Protocolo:

Se mezclaban 2,5 µL de muestra con 200 µL de monoreactivo suministrado con el kit, que contiene las enzimas y los sustratos necesarios para la reacción. La reacción se incubaba durante 12 minutos a 30 °C. La variación de la absorbancia a 500 nm se determina a punto final y la concentración de glucosa se estimaba a partir de una curva patrón diseñada a partir de concentraciones de glucosa en un rango de 6,25 a 200 mg/dL. Cuando la concentración de las muestras superaba los valores de la curva patrón, se diluyeron las muestras con agua destilada. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

3.10.2 Determinación de triglicéridos en suero

Las concentraciones de triglicéridos fueron determinadas utilizando el kit comercial Triglicéridos MR (Linear Chemicals, España). El método, al igual que en el caso de glucosa se basa en una reacción enzimática que a partir de un metabolito se forma la cantidad proporcional de un compuesto que absorbe a una longitud de onda de 500 nm. El protocolo fue adaptados al autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

La determinación de triglicéridos se llevó a cabo mediante la hidrólisis de estos a glicerol y ácidos grasos libres (FFA) mediante la acción de la lipoproteína lipasa (LPL, EC 3.1.1.34). La enzima glicerol quinasa (EC 2.7.1.30) se encargaba de fosforilar el glicerol liberado a glicerol-3-fosfato, el cual era oxidado por la enzima glicerolfosfato oxidasa (GPO, EC 1.1.3.21), produciendo dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y peróxido de hidrógeno. Finalmente, mediante la reacción Trinder, el peróxido de hidrógeno producía quinonaimina.



Protocolo:

Se mezclaban 3 µL de muestra con 200 µL de monoreactivo suministrado con el kit, que contiene las enzimas y sustratos necesarios para la reacción. La reacción se incubaba durante 4 minutos a 30 °C. La variación de absorbancia se determinaba a punto final y la concentración de triglicéridos era estimada a partir de una curva patrón con concentraciones desde 12,5 a 200 mg/dL.

3.10.3 Determinación de glucógeno en músculo

Para la determinación de glucógeno en el músculo esquelético, en primer lugar se homogenizaron 50 mg de tejido agregando HClO₄ 0,6 M en una relación 1:5 P/V (mg/ µl) haciendo uso de un POLYTRON-PTA 7. Con el extracto se determinó el contenido de glucógeno según el método descrito por Keppler and Decker (1974):

1. A 100 µl del extracto se agregan 75 µl de KHCO₃ 1 M
2. Añadir 75 µl de amiloglucosidasa (3mg/ml) (Sigma) tamponada a pH 4,8 en acetato sódico 0,2 M. La mezcla se deja incubar durante 2 horas a 40 °C. De esta manera la amiloglucosidasa hidroliza el glucógeno y libera la glucosa contenida.
3. Parar la reacción agregando 7,5 µl de HClO₄ 6 N. Centrifugar la mezcla a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C.
4. Obtener el sobrenadante y determinar la concentración de glucosa siguiendo el mismo protocolo descrito para el análisis de glucosa en suero (apartado 3.10.1). El contenido de glucosa en músculo se expresa como mg de glucosa por gramo de músculo.

3.10.4 Determinación de actividades enzimáticas

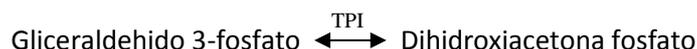
La actividad enzimática en los extractos fue ensayada a 30 °C, con concentraciones saturantes de sustratos y pH óptimo. Los diferentes métodos de determinación fueron previamente adaptados y calibrados para ser realizados en el autoanalizador Cobas Miras S (Roche).

Las actividades enzimáticas fueron expresadas en U por g de proteína (U = 1 mmol de producto formado/min).

Determinación de la actividad 6-fosfofructo-1-quinasa

La 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1. EC 2.7.1.11) cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato en presencia de ATP para formar fructosa 1,6-bifosfato y ADP. Para determinar la actividad PFK-1 se acoplan tres reacciones, catalizadas por tres enzimas diferentes. La primera de estas reacciones la cataliza la aldolasa A o fructosa bifosfato aldolasa (EC 4.1.2.13), la cual rompe la fructosa 1,6-bifosfato formada por la PFK-1 en gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. A continuación, la triosa fosfato isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1) transforma el gliceraldehido 3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato. Por último, la dihidroxiacetona es reducida a glicerol 3-fosfato por acción del glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH, EC 1.1.1.8). En esta reacción se oxida NADPH a NADP⁺, así la

absorbancia de la mezcla de la reacción a 340 nm disminuye proporcionalmente a la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato.



El protocolo empleado se basa en el método empleado por Castaño *et al.* (1979). La mezcla de reacción de ensayo de la actividad determinada a 30 °C, fue la siguiente:

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
	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
R	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 de músculo		4	
	Total		200	

¹ Las disoluciones de Tris-HCl, MgCl₂, KCl, sulfato amónico, fructosa 6-fosfato (Sigma), glucosa 6-fosfato (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 justo antes de cada ensayo.

³ Se preparaba una única disolución con la aldolasa (Sigma), la TPI (Sigma) y GPDH (Sigma), justo antes de cada ensayo.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para consumir 2 μmol de NADH por minuto. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanizador Cobas Mira S (Roche).

Determinación de la actividad piruvato quinasa

La piruvato quinasa (PK, EC 2.7.1.40) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a una molécula de ADP para formar piruvato y ATP. Para el ensayo de su actividad es necesario acoplar una segunda reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), en la cual el piruvato es reducido a lactato junto con la oxidación de NADH a NAD⁺. La oxidación de NADH resulta en la disminución de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción.



El protocolo empleado se basa en el método descrito por Staal *et al.* (1975). La mezcla de reacción para medir la actividad PK a 30 °C, fue la siguiente:

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
R	Glicil-glicina, 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
	PEP 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 de músculo		4	
	Total		251,5	

¹ Las disoluciones de glicil-glicina, MgCl₂, KCl, PEP (Sigma) y ADP (Sigma) se guardaban en alícuotas a -20 °C hasta su análisis.

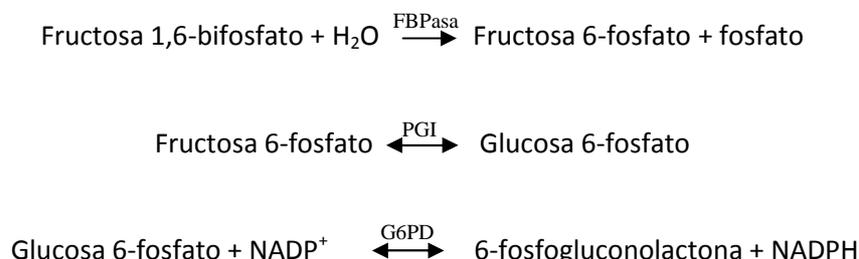
² Las disoluciones de NADH (Sigma) y LDH (Sigma) se preparaban justo antes de cada ensayo.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para consumir 1 μmol de NADH por minuto. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

Determinación de la actividad fructosa 1,6-bifosfatasa

La fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11) cataliza la conversión de la fructosa 1,6-bifosfato a fructosa 6-fosfato. Para medir la actividad de la FBPasa es necesario acoplar dos reacciones catalizadas por dos enzimas diferentes. En la primera reacción, la glucosa 6-fosfato

isomerasa (PGI. EC 5.3.1.9) transforma la fructosa 6-fosfato en glucosa 6-fosfato, que posteriormente es oxidada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49) a 6-fosfogluconolactona. En esta última reacción se reduce el NADP⁺ a NADPH y el aumento de absorbancia de la mezcla de reacción se registra a 340 nm.



La reacción se llevó a cabo a 30 °C y el protocolo empleado se basa en el método descrito por Ekdahl and Ekman, (1985). La mezcla de reacción para medir la actividad de la FBPasa fue la siguiente:

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
	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
R	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
R1	G6PD ³	0,48 mU	1	0,48 U/ml
	Extracto de músculo		4	
	Total		200	

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

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

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

Una unidad de actividad FBPasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

Determinación de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

G6PD cataliza la oxidación de la glucosa 6-fosfato en 6 fosfogluconolactona con la reducción de NADP⁺ a NADPH. La formación de NADPH resulta en el aumento de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción.



El protocolo empleado se basa en el método descrito por Lee (1981). La mezcla de reacción para medir la actividad G6PD fue la siguiente:

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	100 mM	155	77,5 mM
	MgCl ₂ ¹	1 M	1	0,005 M
R	Glucosa 6-fosfato ¹	10 mM	20	1 M
	NADP ²	10 mM	20	1 mM
	Extracto de músculo		4	
	Total		200	

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

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

Una unidad de actividad G6PD se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

Determinación de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, EC 1.1.1.43) cataliza la oxidación del 6-fosfogluconato en ribulosa 5-fosfato con la reducción de NADP⁺ a NADPH. La formación de NADPH resulta en el aumento de la absorbancia a 340 nm de la mezcla de reacción.

El protocolo empleado, adaptado para efectuar el ensayo automatizado, se basa en el método descrito por Möellering i Bergmeyer (1984). La mezcla de reacción para medir la actividad fue la siguiente:



	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 de músculo		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 justo 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. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

Determinación de la actividad alanina aminotransferasa

La alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2) cataliza la transaminación de L-alanina a α-cetoglutarato para formar piruvato y L-glutamato. Para medir la actividad se debe acoplar una segunda reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), en la cual el piruvato es reducido a lactato con la oxidación de NADH a NAD⁺.



La actividad se determinó mediante el uso del kit comercial ALT-GPT BR (*Linear Chemicals*) 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.

Determinación de la actividad aspartato aminotransferasa

La aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1) cataliza la transaminación de la L-aspartato a α-cetoglutarato para formar oxaloacetato y L-glutamato. Para medir la actividad de AST se debe acoplar una segunda reacción catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), en la cual el oxaloacetato es reducido a malato con la oxidación de NADH a NAD⁺.



La actividad se mide mediante el uso del kit comercial AST-GOT BR (Linear Chemicals) siguiendo instrucciones del fabricante y adaptado para ensayo 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.

Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa

La glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) cataliza la desaminación del L-glutamato a α -cetoglutarato, y viceversa, la aminación del α -cetoglutarato a L-glutamato. En función de la dirección de la reacción, la enzima oxida o reduce los cofactores NADH y NAD^+ , respectivamente.



El protocolo empleado para la determinación de la actividad GDH en la dirección de aminación de la α -cetoglutarato se basa en el método descrito por Hochachka *et al.* (1978). La mezcla de la reacción fue la siguiente:

	Reactivos	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
	Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	500 mM	25	50 mM
	Acetato de amonio ¹	2,5 M		250 mM
R	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 de músculo		23	
	Total		250	

¹ Imidazol-HCl y acetato de amonio (Sigma) se prepararon en una sola solución. Junto con el ADP (Sigma), estos reactivos se guardaron en alicuotas a -20°C hasta su análisis.

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. El protocolo fue adaptado para realizar la determinación en el autoanalizador Cobas Mira S (Roche).

3.11 ANÁLISIS DE DIGESTIBILIDAD E INGESTA DE NUTRIENTES

La digestibilidad e ingesta de los nutrientes de cada dieta suministrada se determinó mediante la inclusión de un marcador inerte. En este caso se seleccionó como marcador el óxido de itrio (Y_2O_3), el cual fue incluido en una proporción en la dieta del 0,1 % en la dieta. Debido a que el óxido de itrio no es asimilable por el aparato digestivo, durante el proceso de digestión el marcador se concentra en el intestino. Por el contrario, la cantidad de nutrientes asimilables son reducidos durante la digestión.

La determinación de la concentración de itrio en la dieta y en las muestras de heces nos permitió calcular el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de la dieta mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CDA materia seca (\%)} = \left(1 - \frac{Y_2O_3 \text{ en la dieta}}{Y_2O_3 \text{ en heces}} \right) \times 100$$

Además, se calcularon los CDAs de los diferentes nutrientes de las dietas.

$$\text{CDA (\%)} = \left(1 - \frac{Y_2O_3 \text{ en la dieta}}{Y_2O_3 \text{ en heces}} \times \frac{\text{proporción de nutrientes en las heces}}{\text{proporción de nutrientes en la dieta}} \right) \times 100$$

Los nutrientes seleccionados para el análisis fueron proteína, carbono y fósforo. Para la determinación de las concentraciones de fósforo e itrio, tanto en las dietas como en las heces, se aplicó el siguiente protocolo:

1. Se pesaban 20-25 mg de muestra en un reactor de teflón.
2. Se agregaban 2-3 ml de HNO_3 al 70 % a los reactores con las muestras de heces y pienso.
3. Las muestras eran digeridas durante 24 horas a 90 °C.
4. Una vez frío el reactor, el hidrolizado era recogido en un tubo y el interior del reactor era enjuagado con 20-30 ml de agua MiliQ, dependiendo de si la muestra era de heces o de pienso. El volumen de agua de los lavados también era recogido en los tubos con el hidrolizado inicial.
5. Se determinaba gravimétricamente la densidad de estos hidrolizados para poder calcular cuidadosamente su volumen a partir del peso.

Las concentraciones de itrio y de fósforo en los extractos finales fueron analizadas mediante espectroscopía de plasma de inducción acoplado (ICP-OES) por el equipo de la Unidad de Análisis de Metales del CCiTUB.

Posteriormente, los CDAs se utilizaron para estimar la cantidad de pienso y nutrientes ingeridos que fueron asimilados por las doradas. Estos valores de ingesta fueron denominados como ingesta digerible, y se calcularon aplicando la fórmula:

$$\text{Ingesta digerible}_{\text{nutriente}} \text{ (g/Kg día)} = \frac{\text{Ingesta}_{\text{nutriente}} \text{ (g/Kg día)} \times \text{CDA}_{\text{nutriente}}}{100}$$

Restando la ingesta digerible de la ingesta total, se obtiene una estimación de las pérdidas de cada nutriente a través de las heces, este cálculo se realiza mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Perdidas fecales}_{\text{nutriente}} \text{ (g/Kg día)} = \text{Ingesta}_{\text{nutriente}} \text{ (g/Kg día)} - \text{Ingesta digerible}_{\text{nutriente}}$$

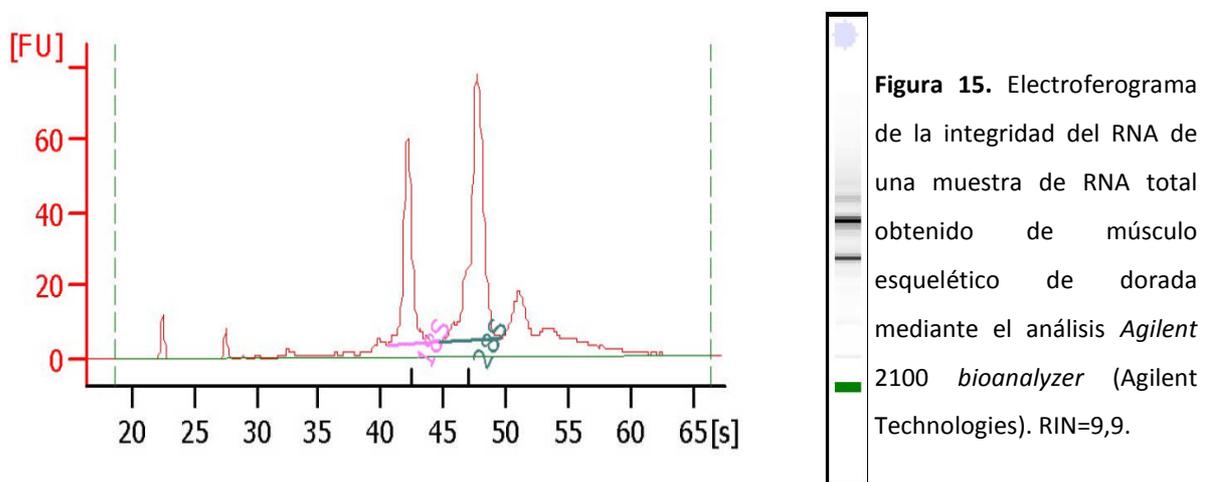
3.12 EXTRACCIÓN DE RNA

Con el fin de analizar el transcriptoma del músculo esquelético, y obtener el transcriptoma de hígado, se procedió a aislar el RNA total de muestras de músculo esquelético e hígado de 6 peces alimentados con cada una de las 5 dietas experimentales y de 8 peces en ayunas como se describe en el experimento 1. Siguiendo las instrucciones del *kit* comercial *RNeasy® fibrous tissue Mini Kit* para las muestras de músculo y el *kit RNeasy® tissue Mini Kit* (QIAGEN, Sussex, UK) para el caso de hígado. La concentración y pureza de las muestras de RNA se determinaron espectrofotométricamente a 260/280 nm mediante el uso de un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, USA). La pureza de la muestra se consideró óptima cuando la relación de los valores de absorbancia era superior a 1,9.

La determinación de la integridad del RNA es de fundamental importancia a la hora de realizar análisis transcriptómicos y de expresión génica, para ello la calidad del RNA fue evaluada utilizando un *Agilent 2100 bioanalyzer* (Agilent Technologies). Así se determina la integridad y cantidad de RNA de una forma más fiable y rigurosa que con los sistemas tradicionales, debido a que esta tecnología utiliza chips de separación electroforética, donde la muestra de RNA es separada en pequeños

volúmenes de gel y analizada vía láser. El *software* del bioanalizador genera un electroferograma y una imagen similar a la que se hubiese obtenido al correr un gel de agarosa para comprobar su integridad (Figura 15). Además, el sistema empleado minimiza la cantidad de RNA necesario y el tiempo empleado en determinar la integridad. El resultado se expresa en unidades RIN que representa el número de integridad de ARN, indicando la calidad del RNA eucariótico total en relación a las subunidades ribosomales 18S y 28S. El RIN tiene un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra íntegra.

Para los estudios realizados en esta tesis doctoral, se utilizaron muestras de RNA con un RIN superior o igual a 9,2.



3.12.1 Transcripción inversa

Las cadenas sencillas de DNA complementario (cDNA) fueron sintetizadas mediante el uso de la transcriptasa inversa (RT) a partir del RNA mensajero (RNAm) utilizado como molde. Para realizar la reacción, se incubó 1 μg de RNAm en presencia de MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*; Promega), desoxirribonucleótidos (dNTPs; Promega) y hexámeros nucleotídicos aleatorios (Invitrogen) durante 60 minutos a 37 °C. Para prevenir la degradación del RNA, en la mezcla de reacción se incluyó inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega).

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	2 µl	0,5 mM
hexameros aleatorios	62,5 ng/µl	2 µl	7,8 ng/µl
RNAsin	80 U/µl	0,5 µl	2 U/µl
RNA total		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), Promega.

3.12.2 PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR) es una técnica que tiene como finalidad monitorizar en tiempo real el progreso de una PCR convencional. El proceso se basa en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente. La señal incrementa de manera proporcional a la cantidad de producto de PCR presente en la reacción. Para monitorizar la amplificación del DNA se debe usar un agente de unión, en esta tesis se ha utilizado SYBR *Green* (Applied Biosystems), el cual es un fluoróforo que se une al DNA de doble cadena. En el momento en que la molécula de SYBR *Green* se intercala en la doble cadena, su fluorescencia incrementa.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

Gen	Sentido (5'-3')	Anti sentido (5'-3')	tamaño (pb)	Alineamiento T (°C)	Nº de acceso
Myf5	CGACGGCATGTTGACAGCA	TCCGGCTGTCTTATCGCCCA	109	62	JN034420
Myf6	TCATCCCACAGCTTTAAAGGCA	AGTGAATCTTCGGCGTCTCTCC	163	62	JN034421
MyoD2	CACTACAGCGGGGATTGACAGAC	CCGTTTGCTTCTCTGGACT	200	62	AF478569
Miogenina	TTCCTGACCAGCGCTCCTA	TCTGTTCTGTACCCCAAC	155	62	EF462191.1
Folistatina	GGAAACGACGGATCATCTATGC	CGACTTGGCCTTGATGCATTTTCC	111	65	AY544167
Miostatina	GGATGCAGGAACACACACAC	AGACGACGAAGGACGAGAAA	128	62	AF258448.1
GHR1	ACCTGTCAGCCACCACATGA	TCGTGCAGATCTGGGTCGTA	99	62	AF438176.2
GHR2	GAGTGAACCCGGCCTGACAG	GCGGTGGTATCTGATTCATGGT	75	62	AY573601.2
Glut4	CCAGCTGAAGAGCGAGAGGA	GGAAACTGGACCCTCAGGAC	123	62	*Isotig03083
IGF1	ACTGCTGTGCGTCTCACCTGA	GTGCATTGGGGCCGTAGCCA	146	65	AY996779
mTOR	GGAGACTGTTTTGAGGTCGCC	ACCTCCATCACCGTGTGGCA	143	62	*Isotig06897
S6	CAGCAAGATCCGCAAGCTCT	CTTCTGGGTGCGCTGTCTCT	190	62	*Isotig09703
AKT	CCCGTGTCTGGAGAGCTTGA	GCACAGCAGCCTCTGGATTG	144	62	*Isotig02649
LC3B	GACTGATCCGAGAGCAGCAC	GTTGACGTGGTCTGGCACTA	116	62	*Isotig01434
Gabarapl1	TGGCCAGTTGTGCTTCTGA	CTGGATGGGGGAAGGGAGTT	93	62	*Isotig08571
ATP-binding cassette	CCTCAGCAGCAGCGATTACGAAGA	GCTCTGCTTTGGTCTGTCTGTAGTAG	119	62	*Isotig3145
ADP/ATP translocasa	CTGTGTTTCGTCTACCCCTCG	CTTCACCAACAGTCTCCAGGC	108	62	*Isotig13418

CoQ10	CCAGCAAACGACTCCACTCCTC	CCCACAGGAGCCCAAGTTTCT	119	62	*Isotig4622
Citocromo b	TATTCTGAGGGCGTGGGTGC	TCGAGAAATAAGCGCCAGTCTGT	93	65	*Isotig18697
Citocromo c	CCTTCTGCGGTTCCCACTA	CATGAAGGAGGCAAATATGAATGC	112	62	*Isotig17429
NADH <i>dehydrogenase</i>	ATATCCCACAAAGGCGAGGGC	AGGTCAGGGTGGTCCCCTTGT	99	62	*isotig17415
ATP <i>synthase</i>	GGGCAGGGTCAGTCAAATCGTCAG	CAACATCTCCGCTTCACACAGGCT	197	62	*isotig06994
EF1 α	CCCGCCTCTGTTGCCTTCG	CAGCAGTGTGGTCCGTTAGC	135	65	AF184170
18S	TTACGCCCATGTTGTCCTGAG	AGGATTCTGCATGATGGTCACC	106	62	AM490061

Los genes identificados fueron: *Myogenic factor 5* (Myf5), *myogenic factor* (Myf6), *myoblast determination factor 2* (Myod2), *growth hormone receptor 1* (GHR1) y 2 (GHR2), *glucose transporter type 4* (Glut4), *insulin-like growth factor 1* (IGF1), *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), *S6 ribosomal protein* (S6), *protein kinase B* (AKT), *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3B), *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1-like* (Gabarapl1), *coenzyme Q-binding protein* CoQ10 (CoQ10), sub unidad ribosomal 18S (18S) y *elongation factor 1-alpha* (EF1 α).
*Secuencias obtenidas por secuenciación transcriptómica.

Las secuencias de los oligonucleótidos sentido y anti sentido fueron diseñadas utilizando la herramienta bioinformática Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) tomando como referencia secuencias publicadas en los bancos de datos genómicos públicos y los datos transcriptómicos obtenidos en esta tesis (Tabla 4).

Los volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados en la RT-qPCR fueron los siguientes:

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 cDNA de cada muestra fue amplificado por duplicado, para lo cual en cada tubo se depositaron 18 μ l de la mezcla de reacción. El aparato utilizado fue un *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1. 50 °C durante 2 minutos.
2. 95 °C durante 10 segundos.
3. 95 °C durante 15 segundos.
4. 62 °C durante 1 minuto (para folistatina, IGF-1, citocromo b y EF1 α se utilizó 65 °C)

5. 40 ciclos (Paso 3 y 4).

Al finalizar la PCR cuantitativa es posible observar una curva de la fluorescencia obtenida respecto al ciclo de PCR. De esta curva se obtuvo el valor Ct (*cycle threshold*), que representa el ciclo en el cual la fluorescencia pasa el nivel umbral de detección. De esta manera, cuanto mayor sea la cantidad de cDNA de partida, más rápidamente se acumula el producto de PCR, obteniendo un valor Ct más bajo. La fluorescencia obtenida es normalizada automáticamente respecto a la fluorescencia de una referencia pasiva (6-carboxi-X-rodamina) presente en la mezcla de SYBR Green.

Una vez determinado el valor Ct, se calcula el Δ Ct para cada muestra que se desee cuantificar, para ello:

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

Posteriormente, una de las muestras es escogida como muestra de referencia para efectuar la comparación con las demás muestras, obteniendo así el valor $\Delta\Delta$ Ct.

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

Por último, los datos deben ser transformados a valores absolutos mediante la siguiente fórmula:

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

La eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos fue testada mediante la generación de curvas estándar con los valores de expresión correspondientes a diluciones consecutivas de una muestra de cDNA de referencia. Posteriormente, para validar el correcto funcionamiento de cada oligonucleótido, el producto de PCR de cada dilución utilizada en el paso anterior fue separado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, de esta manera se confirmó la presencia de una sola banda de amplificación con el tamaño esperado.

3.13 WESTERN BLOT

La técnica *Western blot* se utiliza para detectar proteínas con anticuerpos específicos. Para realizar y aplicar la técnica es necesario que las proteínas hayan sido previamente separadas

electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE), y posteriormente transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Amersham Hybond-P PVDF Membrane, UK*).

3.13.1 Determinación de proteína: Método de Bradford

La determinación de proteína total se realizó siguiendo el método de Bradford (1976), adaptado al autoanalizador Cobas Mira S. El método se basa en la formación de complejos entre las proteínas presentes en la muestra y el colorante azul *Coomassie brilliant blue G-250*. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C, mezclando 5 µl de extracto de muestra en un volumen final de 250 µl utilizando el reactivo *Protein assay* (Bio-Rad), diluido 5 veces. Posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Los valores fueron interpolados en una recta patrón obtenida con muestras de concentración conocida (entre 0,125 a 1 mg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA).

3.13.2 Electroforesis de Proteína

Mediante la aplicación de electroforesis SDS-PAGE es posible separar las cadenas polipeptídicas en función del tamaño molecular. Esto requiere que las proteínas a separar estén desnaturalizadas y cargadas con la misma polaridad para que sean capaces de avanzar hacia el mismo electrodo y se puedan separar exclusivamente en función de su tamaño. Como agente desnaturalizante se ha utilizado SDS y como agente reductor β-mercaptoetanol. El SDS es capaz de romper las interacciones hidrofóbicas de las proteínas, las desnaturaliza y las carga negativamente. El β-mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuro entre cisteínas.

La electroforesis se realiza sobre una matriz semisólida de polímeros sintéticos de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Cuando la acrilamida polimeriza forma una capa fina, transparente y flexible que actúa como una red oponiendo resistencia al paso de las proteínas sometidas a la acción del campo eléctrico. De esta manera, las proteínas de mayor tamaño poseen más resistencia al avance a través del gel, mientras que las más pequeñas avanzan a mayor velocidad.

Una vez obtenida y cuantificada la proteína, en los extractos de cada muestra se agregó tampón de carga y se llevaron a ebullición durante 5 a 10 minutos. La ebullición en presencia de SDS y β-mercaptoetanol permite acelerar la desnaturalización de proteínas. El grado de retención y avance de las proteínas durante la electroforesis depende de la cantidad de acrilamida empleada en la realización del gel. De esta manera, geles con elevadas concentraciones de acrilamida (superior al 15 %) retrasan la migración de las proteínas favoreciendo la correcta separación de las proteínas más pequeñas. Los pasos para realizar la electroforesis fueron los siguientes:

Preparación de las muestras

1. Depositar 80 µg de proteína de la muestra en un tubo eppendorf.
2. Agregar tampón de carga de proteína (4 X) a la muestra.
3. Hervir la muestra introduciendo el tubo con la mezcla en un termociclador a 95 °C durante 5 minutos.

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.

Preparación del gel

La técnica SDS-PAGE se desarrolla verticalmente en un gel que consta de una zona superior correspondiente al gel apilador y una inferior de gel separador, ambas presentan diferente porosidad y pH. La parte superior del gel está constituida por el gel apilador, presenta una proporción de acrilamida del 5 %. La función del gel apilador es alinear la entrada de las proteínas antes de ser separadas. El alineamiento de las proteínas se produce en la interfase entre el gel separador y el gel apilador, debido a la diferencia de pH entre ellos.

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

¹Tris HCl 0,5 M, pH 6,8

²Tris HCl 1,5 M, pH 8,8

³ Persulfato amónico actúa como polimerizador de acrilamida

⁴ TEMED cataliza la polimerización, se agrega al final de la mezcla.

La parte inferior del gel constituida por el gel separador, contiene un 10 % de acrilamida. Esta concentración de acrilamida genera un tamaño de poro más pequeño, permitiendo la separación de las proteínas en función de su tamaño molecular.

Electroforesis

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas, es necesario cargar en un carril adicional al de las muestras un marcador con pesos moleculares conocidos. En esta tesis se utilizó el marcador *Spectra multicolor broad range Protein Ladder* (Life Technologies). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y a un amperaje de 20 mA por gel. En términos generales, el proceso se finaliza cuando el frente electroforético llega a la parte inferior del gel.

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

Las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF por electroelución a 90 V durante 2 horas en tampón de transferencia.

Protocolo:

1. Descartar la parte apiladora del gel y disponer la parte separadora sobre un rectángulo de papel Whatman (Schleicher & Schuell, England), previamente humedecido en tampón de transferencia de proteínas. situarlo encima de una esponja rectangular sobre el *cassette* de transferencia (Biorad).

Tampón de transferencia de proteínas

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

2. Cortar un trozo rectangular de membrana de transferencia y humedecerla en metanol al 100 % durante 10 segundos. Posteriormente la membrana debe ser lavada en agua destilada durante 5 minutos y finalmente ponerla en tampón de transferencia de proteínas durante 10 minutos.
3. Colocar la membrana en la que las proteínas serán transferidas sobre el gel separador. Un segundo rectángulo de papel Whatman se coloca sobre la membrana, y sobre este una esponja. En este paso es importante eliminar las burbujas de aire entre el gel y las diferentes membranas y papeles de filtro.
4. Cerrar el *cassette* e introducirlo en la cubeta de transferencia. Aplicar un voltaje de 90 V durante 2 horas manteniendo la temperatura a 4 °C.
5. Finalmente, realizar la tinción del gel con azul de *Comassie* a fin de comprobar que el proceso de transferencia de proteínas se ha realizado correctamente. Para ello se debe incubar el gel en solución de tinción durante 30 minutos. Posteriormente utilizando la solución de lavado eliminar la coloración inespecífica. Finalmente el gel debe ser secado con ayuda de una bomba de vacío a 70 °C durante 3 horas.

Solución de tinción de proteínas

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

Solución de lavado

Solución	Concentración
Metanol	40 %
Acido acético glacial	7 %

3.13.4 Bloqueo de la membrana

El proceso de bloqueo tiene como finalidad reducir el ruido de fondo durante la inmunodetección. Para ello la membrana se coloca en agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente junto con 50 ml de solución de bloqueo. Posteriormente, la membrana se lava en tampón TBS-T durante 5 minutos.

Solución de bloqueo

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

TBS 1 X

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

3.13.5 Inmunodetección

Para efectuar la inmunodetección, se han seguido las pautas descritas por el proveedor del *kit InmunStar HRP Substrate* (Bio-Rad). La técnica se basa en la incubación de la membrana con dos anticuerpos. El anticuerpo primario es una inmunoglobulina G (IgG) que se encarga de reconocer la proteína de interés. El anticuerpo secundario es un anti-IgG, que reconoce al anticuerpo primario y lleva asociado la enzima peroxidasa. Esta enzima es la responsable de catalizar la oxidación del luminol en medio alcalino, provocando la formación de quimioluminiscencia, que era captada a través de un equipo ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, UK) y cuantificada usando el *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Protocolo:

1. Incubar la membrana en solución con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en agitador orbital.
2. Retirar el anticuerpo primario (la solución se conserva a -20 °C para ser reutilizada en experimentos posteriores) y efectuar 3 lavados de la membrana durante 10 minutos con 50 ml de solución de lavado.
3. Incubar la membrana con anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación continua a temperatura ambiente.
4. Retirar el anticuerpo secundario y efectuar 3 lavados durante 10 minutos con 50 ml de solución de lavado.
5. Preparar la solución de detección. Para ello, se mezclan a partes iguales la solución *Luminol/Enhancer* y el tampón de la peroxidasa. Posteriormente la membrana es incubada en la solución de detección durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
6. Se retira el exceso de solución y la membrana se introduce en una bolsa de plástico, se expone y revela durante un máximo de 45 minutos.

Solución de dilución de anticuerpo

Solución	Concentración
Leche en polvo descremada	5 %
TBS	1 X
Tween 20	0,1 %

Solución de lavado

Solución	Concentración
TBS	1 X
Tween 20	0,1 %

Anticuerpos utilizados

Proteína ribosomal S6: (*Cell Signaling Technology* #2217). Anticuerpo monoclonal de conejo.

Proteína ribosomal S6 fosforilada (S6-P): (*Cell Signaling Technology* #2215). Anticuerpo policlonal de conejo, dirigido contra los aminoácidos Ser240 y Ser244 de la proteína ribosomal S6 humana.

AKT: (*Cell Signaling Technology* #9272). Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la secuencia carboxi-terminal de Akt de ratón.

AKT fosforilado (AKT-p): (*Cell Signaling Technology* #9271). Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el aminoácido Ser473 de Akt de ratón.

Anticuerpo secundario: (*Cell Signaling Technology* #7074). Anticuerpo IgG anti conejo purificado a partir de cabra.

3.14 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Con la finalidad de identificar genes que resulten dianas potenciales para ser utilizados como biomarcadores en la modulación y detección de crecimiento del músculo esquelético de *S. aurata* se realizó un análisis transcriptómico mediante la secuenciación 454 de bibliotecas de cDNA obtenidas a partir de muestras de tejido de juveniles de dorada en ayuno durante 23 días y de alimentados con las dietas correspondientes al experimento 1 (apartado 3.4) durante el mismo periodo de tiempo. Las dietas utilizadas diferían ampliamente en su composición de macronutrientes, para tener una máxima representación, abundancia y diversidad de transcritos de interés para estudios nutricionales en dorada.

Se obtuvieron muestras de músculo esquelético e hígado de seis peces procedentes de cada uno de los grupos de doradas alimentadas y de 8 peces que permanecieron en situación de ayuno. El RNA total de cada muestra fue aislado como se indica en el apartado 3.12 y mezclado conjuntamente (cada tejido de manera independiente) para obtener un *pool*. Con el propósito de sintetizar cDNA de doble cadena a partir del RNA total aislado, se utilizó el *kit MINT-Universal cDNA synthesis kit* (Evrogen, Moscú, Rusia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La tecnología utilizada por este método genera copias completas de cDNA de doble cadena a partir de los RNAs originales, con una secuencia adaptadora adicional presente en los extremos.

Dado que las bibliotecas de cDNA no normalizadas son generalmente deficientes en transcritos poco abundantes, a fin de proporcionar una base de datos de secuencias EST de amplia cobertura con la máxima representación posible de cDNA e incrementar la presencia de transcritos poco

frecuentes, las bibliotecas de cDNA fueron normalizadas antes de proceder a su secuenciación. La normalización de las bibliotecas se realizó utilizando *TRIMMER cDNA normalization kit* (Evrogen, Moscú, Rusia). La metodología aplicada en este *kit* ha sido desarrollada específicamente para la normalización de secuencias largas de cDNA, desde 0,5 a 4,5 kb.

Se llevaron a cabo dos procesos de secuenciación (*run 1* y *run 2*) para cada tejido de manera independiente en el CCiTUB. El *run 1* presentó una cobertura de secuenciación limitada en cuanto a número total de lecturas y al tamaño de secuencias obtenidas, situación que obligó a realizar un segundo *run* (*run 2*), con el fin de mejorar y ampliar la cantidad de datos transcriptómicos. En el caso del *run 1* se utilizó una versión nueva del *kit*, que no había sido previamente utilizada en el CCiTUB, que no dio el resultado esperado. En el *run 2*, el tratamiento de las muestras de RNA fue realizado utilizando una versión anterior del *kit*, mediante un protocolo utilizado previamente de manera exitosa en el CCiTUB. Esto fue la causa de la limitada cobertura de datos transcriptómicos obtenidos en el *run 1*. Sin embargo a pesar de presentar una cobertura limitada, la calidad de los datos obtenidos en el *run 1* permitió su uso y análisis en conjunto con los datos del *run 2*, que presentaron mayor calidad y cantidad de datos.

La secuenciación de la biblioteca de cDNA se llevó a cabo mediante la utilización de la plataforma *454 Genome Sequencer FLX System* (Roche). La secuenciación se realizó por el método de pirosecuenciación. Para ello, la biblioteca de cDNA normalizada se fraccionó en pequeños fragmentos, entre 300 y 800 bp, a los que se ligaron adaptadores específicos en los extremos 3' y 5', para su posterior utilización en las etapas de purificación, amplificación y secuenciación. El paquete informático del *Genome Sequencer FLX System* permite determinar simultáneamente más de 106 secuencias individuales, con un promedio de 400 pb, en 10 horas.

3.14.1 Ensamblado de secuencias y anotación

Los datos crudos obtenidos de la secuenciación fueron procesados y ensamblados utilizando el *software GS de novo Assembler* (Roche). Además, mediante la utilización del *software Cutadap* (Martin, 2011) fueron eliminadas secuencias sin sentido y los adaptadores utilizados en la etapa de normalización. Tres ensamblados de secuencias fueron realizados: uno para los datos de secuencias de músculo esquelético, otro para hígado y un tercer ensamblado utilizando en conjunto los datos transcriptómicos de hígado y músculo esquelético (ensamblado incrementado que denominamos híbrido). La anotación génica de secuencias únicas de los tres ensamblados fue realizada mediante la comparación con secuencias EST disponibles en bases de datos públicas utilizando las herramientas bioinformáticas MegaBlast y Blastn utilizando el *software GPRO* (Futami *et al.*, 2011) con un umbral de significancia en el valor esperado (E-value) $< 1e-4$. Los nombres y las funciones propias de los

genes fueron asignados a cada secuencia en base a la puntuación obtenida entre los 10 mejores emparejamientos del alineamiento Blast.

Con el fin de explorar y comprender la funcionalidad de las secuencias ensambladas, se realizó un análisis GO (Ashburner *et al.*, 2000), que tiene por finalidad agrupar los genes de acuerdo a sus atributos mediante la representación de tres conceptos claves en la biología molecular: función del gen en procesos biológicos, función molecular de los productos génicos, así como también la localización de estos en componentes celulares. La anotación de cada secuencia fue realizada utilizando el *software* GPRO (Futami *et al.*, 2011). Por otra parte, para determinar las diferentes rutas metabólicas asociadas a los conjuntos de genes se utilizó la base de datos KEGG, recurso útil para obtener datos relacionados con rutas enzimáticas, así como procesos químicos y biológicos que sirven para entender las interacciones moleculares dentro de un sistema biológico.

3.14.2 Aplicación y validación del análisis transcriptómico

Para validar la utilidad de la información genómica obtenida mediante el análisis transcriptómico, se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido para realizar un análisis de expresión (RT-qPCR) sobre genes implicados en la cadena de transportes de electrones y la fosforilación oxidativa, mayoritariamente no descritos para dorada en las bases de datos.

3.15 MICROARRAYS

Para analizar la expresión diferencial de genes en músculo esquelético de juveniles de *S. aurata* alimentados con dietas que difieren en la composición de nutrientes e identificar genes con potencial uso como biomarcadores en la modulación y crecimiento del músculo esquelético, se llevó a cabo un análisis de genómica funcional mediante el uso de *microarrays*.

El análisis por *microarrays* es una tecnología de alto rendimiento que permite analizar los niveles de expresión de miles de genes de manera simultánea. Este método es especialmente adecuado para la identificación y el análisis de genes cuyo nivel de expresión difiera entre muestras procedentes de condiciones experimentales diferentes. Los datos transcriptómicos obtenidos previamente para dorada fueron utilizados para diseñar *microarrays* de oligonucleótidos con el fin de identificar y posteriormente validar por RT-qPCR posibles genes candidatos biomarcadores.

3.15.1 Construcción, hibridación y análisis de *microarrays*

La construcción, hibridación y normalización de los datos de los *microarrays* presentados en esta tesis doctoral fueron llevados a cabo por la empresa Bioarray S.L. (Elche, Alicante). Para maximizar la abundancia y diversidad de transcritos representados, se diseñaron *microarrays* de

oligonucleótidos específicos de *S. aurata* a partir de las secuencias EST obtenidas del análisis transcriptómico resultante de la secuenciación 454 de bibliotecas de cDNA normalizadas. El formato de los *microarrays* para imprimir el número adecuado de sondas fue en portaobjetos 8 x 60k de diseño personalizado (Agilent, ID 068650) para análisis de dos colores. Este formato de microchip contiene 8 matrices por 60.000 funciones (60.000 puntos de sonda y un número de lugares reservados para el control de calidad interno) para permitir la identificación y cuantificación de la expresión diferencial de genes de 16 muestras. La construcción de los *microarrays* se realizó utilizando la plataforma eArray (Agilent Technologies), con 3 sondas de 60 nucleótidos para cada una de las anotaciones correspondientes al transcriptoma incrementado (híbrido de músculo esquelético e hígado) obtenido para dorada (apartado 3.14).

Para cada ensayo de *microarrays*, el RNA total obtenido de cada uno de los grupos de doradas en estudio se utilizó para producir RNA complementario (cRNA) marcado con cianina. La síntesis y marcaje fluorescente del cRNA con C-y-3 o C-y-5 se realizó utilizando el *Quick Amp Labeling Kit, two-color* (Agilent Technologies). El análisis de *microarrays* se llevó a cabo mediante la comparación de intensidades de fluorescencia entre las dietas suministradas a las doradas. Para ello, se analizaron 4 grupos o condiciones de mantenimiento (doradas alimentadas con tres dietas experimentales; H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC más la condición de ayuno; n = 4) (Figura 16). El RNA marcado se combinó e hibridó en un mismo *microarray* (Slide de 8 X 60K). Se monitorizaron las señales fluorescentes (-Cy3- y -Cy5-) y se determinaron los genes que se expresaron de manera diferencial entre muestras de condiciones diferentes (las intensidades relativas de las señales de color en los puntos individuales son proporcionales a la cantidad de transcritos específicos en cada muestra).

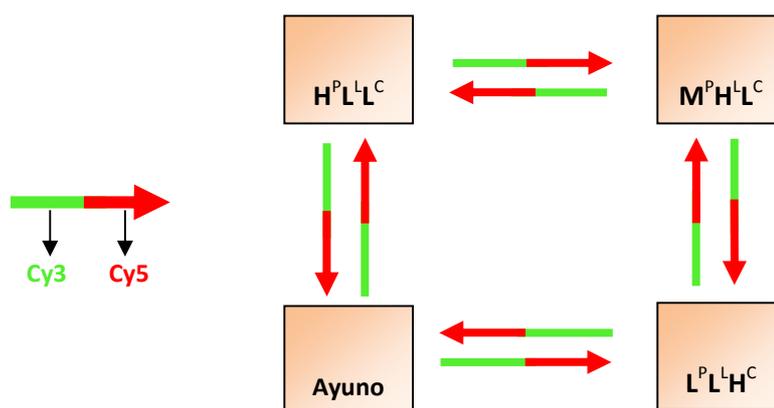


Figura 16. Esquema que representa el diseño experimental directo, utilizado para el análisis de *microarrays* mediante la hibridación de muestras de mRNA correspondiente a las diferentes condiciones de alimentación y ayuno en juveniles de dorada (representadas dentro de cada cuadro). Flechas, representan la hibridación entre dos muestras de mRNA. La cola de la flecha indica la muestra marcada con Cy3 (verde) y la punta de flecha indica la muestra marcada con Cy5 (rojo).

Una normalización cuidadosa de los datos de fluorescencia con estándares internos y genes de expresión constitutiva fue realizada para obtener resultados precisos y reproducibles. La lectura de las intensidades de fluorescencia del *microarray* se efectuó en dos canales (para detectar marcajes con -Cy3- y -Cy5-), utilizando un escáner láser confocal. Dos canales de imágenes en formato TIFF fueron analizados informáticamente con *Feature Extraction* (Agilent Technologies). Los datos se normalizaron en cuanto a la intensidad de las señales fluorescentes e interferencias por marcaje recíproco. El análisis bioinformático de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático Bioconductor (Luo y Brouwer, 2013) aplicado en el entorno R.

3.15.2 Análisis Funcional

Los genes expresados diferencialmente en los *microarrays* fueron utilizados para realizar un análisis funcional de GO. La finalidad de este análisis, así como el *software* bioinformático utilizado, se describe en el apartado (3.12.1).

En el análisis de ontología se consideraron los genes diferencialmente expresados, filtrados con un valor *P* ajustado al 0,05. Se consideraron los términos GO que presentaron al menos 10 genes descritos.

3.15.3 Validación de genes

Aquellos genes que mostraron de manera significativa una regulación de la expresión al alza o a la baja en los peces alimentados con las dietas utilizadas y en condiciones de ayuno, fueron considerados genes candidatos potenciales para ser utilizados como biomarcadores de la utilización de los nutrientes de la dieta en peces en cultivo. La validación de la expresión diferencial de los genes que mostraron potencial interés como biomarcadores nutricionales se llevará a cabo mediante RT-qPCR.

3.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS 18.0 para *Windows* (SPSS Inc.) y representados como la media \pm desviación estandar. El nivel de significancia escogido para los diferentes análisis fue $P < 0,05$.

Las diferencias estadísticas entre condiciones se analizaron mediante un ANOVA de una vía. En caso de que el ANOVA indicara diferencias significativas entre las diferentes condiciones estudiadas, estas eran identificadas mediante la aplicación del test *post-hoc* de Tukey.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE *SPARUS AURATA*

Para obtener información transcriptómica de músculo esquelético de dorada relevante en el campo de la nutrición, juveniles de esta especie fueron distribuidos en siete acuarios, con 15-25 peces por acuario. Durante 23 días, cinco grupos de peces fueron alimentados con las 5 dietas indicadas en la tabla 2 y en las condiciones descritas en el apartado 3.4 (experimento 1). Las dietas experimentales fueron seleccionadas para cubrir un rango de macronutrientes por encima y por debajo de los niveles utilizados en dietas comerciales. Un sexto grupo de peces repartido en dos acuarios se mantuvo en ayuno durante el mismo período de tiempo.

Al término del período indicado, los peces fueron sacrificados según el protocolo descrito en Materiales y métodos, apartado 3.6, a fin de obtener RNA total de músculo esquelético.

4.1.1 Calidad e integridad del RNA

El RNA utilizado para realizar el análisis transcriptómico fue obtenido mediante la utilización del *kit RNeasy® fibrous tissue Mini Kit* (QIAGEN, Sussex, UK), como se indica en el apartado 3.12 de Materiales y métodos. Se obtuvo un *pool* de RNA a partir de 1 µg de RNA total de músculo de 6 peces alimentados con cada una de las cinco dietas utilizadas y de 8 peces en ayuno (experimento 1). La concentración y pureza de cada muestra de RNA fue determinada espectrofotométricamente y la integridad (RIN) del RNA analizada utilizando un *Agilent 2100 bioanalyzer* (Agilent Technologies). Los valores obtenidos aparecen indicados en la tabla 5. Con la finalidad de incrementar la fiabilidad del análisis transcriptómico, para preparar el *pool* de RNA se utilizaron solo muestras con un valor de RIN > 9,2. El RIN del *pool* de RNA utilizado para realizar el análisis transcriptómico fue de 9,5.

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

A partir del *pool* de RNA total de músculo esquelético obtenido de peces en ayuno y alimentados con diferentes dietas, se construyó una biblioteca de cDNA por duplicado (un proceso similar fue realizado para hígado). Las bibliotecas obtenidas fueron normalizadas para incrementar la presencia de transcritos poco frecuentes. Las bibliotecas normalizadas fueron secuenciadas independientemente (*run 1* y *run 2*) utilizando la plataforma GS FLX 454 (Roche). La tabla 6 muestra un resumen de los resultados correspondientes a la secuenciación de las bibliotecas normalizadas (dos reacciones independientes, una para cada biblioteca correspondiente a cada tejido) de músculo

esquelético e hígado, además de una columna correspondiente al ensamblado incrementado (híbrido que incluye los datos de ambos tejidos).

Tabla 5. Valores de pureza e integridad (RIN) de las muestras de RNA total obtenidas de músculo esquelético de *S. aurata* y utilizadas para realizar el análisis transcriptómico.

Muestra	Acuario	Dieta	[RNA] ng/ μ l	260/280	260/230	RIN
M1	Ac11	M ^P L ^H C	212,2	2,10	2,32	10,00
M2	Ac11	M ^P L ^H C	121,4	2,09	2,08	10,00
M5	Ac11	M ^P L ^H C	362,1	2,12	2,24	10,00
M7	Ac11	M ^P L ^H C	352,1	2,13	2,08	10,00
M9	Ac11	M ^P L ^H C	298,9	1,98	1,59	10,00
M10	Ac11	M ^P L ^H C	335,4	2,12	2,32	10,00
M1	Ac12	H ^P L ^L C	242,9	2,13	2,32	10,00
M2	Ac12	H ^P L ^L C	208,7	2,15	2,23	10,00
M3	Ac12	H ^P L ^L C	222,1	2,13	2,24	10,00
M4	Ac12	H ^P L ^L C	165,2	2,12	0,94	10,00
M5	Ac12	H ^P L ^L C	218,2	2,15	1,32	9,40
M6	Ac12	H ^P L ^L C	268,6	2,14	2,17	9,50
M1	Ac13	L ^P H ^L C	362,6	2,11	2,10	9,30
M2	Ac13	L ^P H ^L C	295,1	2,13	2,29	9,50
M3	Ac13	L ^P H ^L C	389,9	2,12	2,26	9,30
M4	Ac13	L ^P H ^L C	254,6	2,14	2,23	9,80
M5	Ac13	L ^P H ^L C	213,4	2,13	2,27	9,40
M6	Ac13	L ^P H ^L C	220,4	2,15	1,78	9,30
M1	Ac14	M ^P H ^L C	176,8	2,13	2,15	9,50
M2	Ac14	M ^P H ^L C	244,4	2,13	0,92	9,20
M3	Ac14	M ^P H ^L C	393,0	2,12	2,29	9,30
M4	Ac14	M ^P H ^L C	301,9	2,12	2,28	9,40
M5	Ac14	M ^P H ^L C	326,6	2,12	2,32	9,30
M6	Ac14	M ^P H ^L C	163,5	2,13	2,20	10,00
M1	Ac15	L ^P L ^H C	246,1	2,13	1,58	9,20
M2	Ac15	L ^P L ^H C	183,9	2,14	1,88	9,20
M3	Ac15	L ^P L ^H C	249,3	2,12	2,27	9,30
M4	Ac15	L ^P L ^H C	536,1	2,08	2,27	9,20
M5	Ac15	L ^P L ^H C	231,6	2,13	2,25	9,70
M6	Ac15	L ^P L ^H C	233,8	2,11	2,20	10,00
M1	Ac16	Ayuno	194,2	2,14	2,27	9,60
M2	Ac16	Ayuno	147,8	2,10	2,23	9,40
M3	Ac16	Ayuno	204,4	2,14	2,24	9,50
M4	Ac16	Ayuno	343,1	2,11	2,32	9,90
M1	Ac17	Ayuno	247,1	2,13	2,28	9,70
M2	Ac17	Ayuno	82,1	2,12	2,20	10,00
M3	Ac17	Ayuno	189,1	2,13	1,86	9,60
M4	Ac17	Ayuno	232,1	2,12	2,22	9,90

En total se obtuvieron 691433 lecturas para músculo esquelético, que corresponden a un total de 275,9 millones de pares de bases (Mpb) con una secuencia promedio de 187 nucleótidos en el

run 1 y de 508 nucleótidos en el *run 2*. En la figura 17 se muestra la distribución de secuencias idénticas pertenecientes al *run 2*, observando 453913 lecturas únicas que representan prácticamente el total de las lecturas obtenidas. Después de filtrar las secuencias obtenidas tras la eliminación de secuencias cebadoras y adaptadoras, se obtuvo un total de 547544 secuencias de elevada calidad, correspondiendo a un total de 227 Mpb.

Tabla 6. Resumen de los datos de secuenciación 454

	Músculo		Hígado		Híbrido Músculo + Hígado
	<i>Run 1</i>	<i>Run 2</i>	<i>Run 1</i>	<i>Run 2</i>	
Número de lecturas	235791	455642	338171	474599	1258933
Número de pares de bases leídas (pb)	44102714	231837814	89964440	208935014	518890599
Longitud promedio de lecturas (pb)	187	508	266	440	-
Longitud mayor de lectura (pb)	1415	974	1585	1348	-
Longitud menor de lectura (pb)	40	40	40	40	-
Limpieza de secuencias					
Número de lecturas limpiadas	91902	455642	185567	474599	1207710
Número de bases limpiadas (pb)	15680476	212023255	39586453	187123761	454413945
Ensamblado					
	<i>Run 1 + Run 2</i>		<i>Run 1 + Run 2</i>		
Lecturas ensambladas	383320		389338		1007795
Número de <i>Singleton</i>	30302		43460		102569
Número de <i>Contigs</i>	9708		10279		16125
Número de <i>Isotigs</i>	10599		11545		19530
Número de <i>Isogroups</i>	9189		10033		15954
Longitud promedio de <i>isotigs</i>	1390		1208		1330
Longitud promedio de <i>contigs</i>	1281		1138		1237
N50 <i>Contig</i>	1390		1228		1377
N50 <i>Isotig</i>	1491		1315		1536

El ensamblado de las secuencias fue realizado utilizando el *software* GS de novo *Assembler* (Roche). En músculo esquelético, el número de lecturas ensambladas fue 383320, generando un total de 40010 secuencias únicas las cuales comprendieron 9708 *contigs* y 30302 *singletons*. La N50 (longitud en pares de bases para la que el conjunto de secuencias ensambladas de longitud igual o superior corresponde, al menos, a la mitad de la suma total de pares de bases ensambladas) de los *contigs* e *isotigs* fue de 1390 y 1491 pb, respectivamente. Por otra parte, el 45 % de las secuencias ensambladas presentaron un tamaño comprendido entre 400 y 1000 pb, mientras que las secuencias superiores a 1000 pb representaron el 48 % (Figura 18).

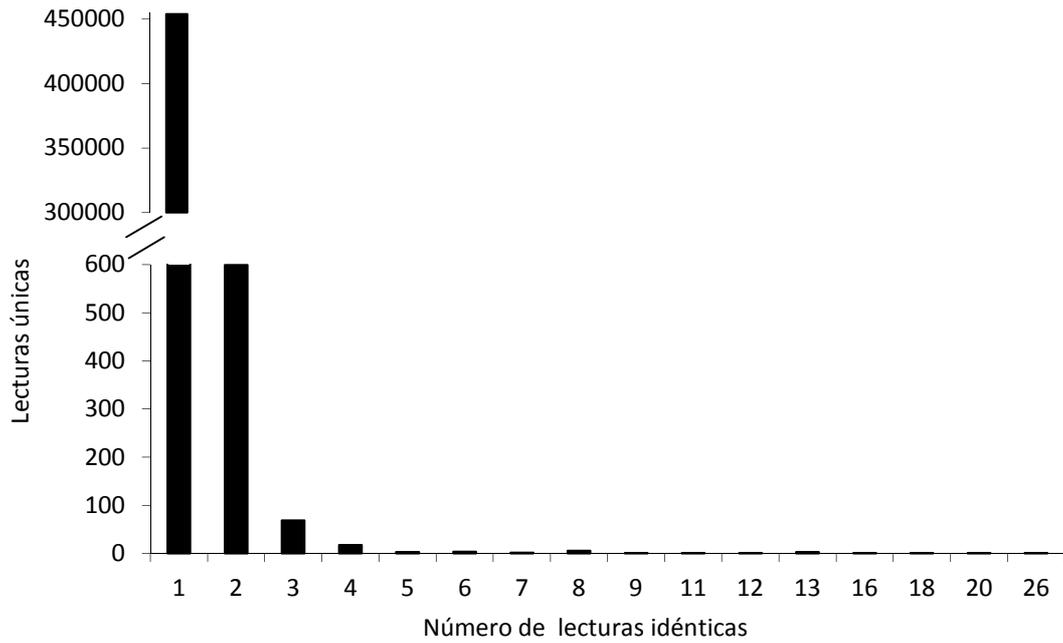


Figura 17. Distribución de secuencias idénticas obtenidas mediante secuenciación 454 para músculo esquelético de *S. aurata*.

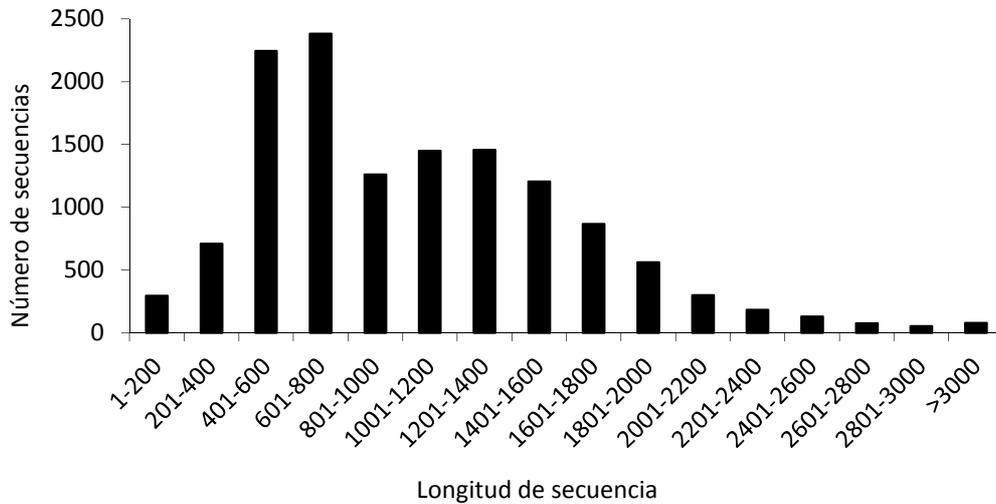


Figura 18. Distribución de longitud de las secuencias de músculo esquelético de *S. aurata* después de realizar el ensamblado.

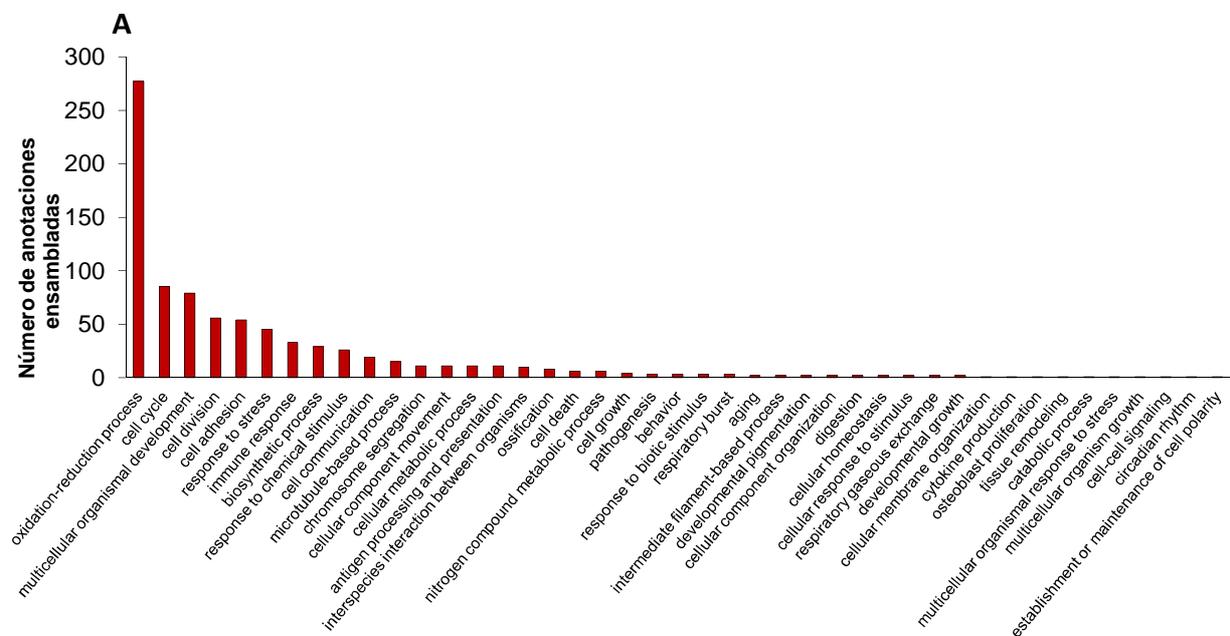
4.1.3 Ontología génica

La GO es ampliamente utilizada para clasificar los productos génicos y estandarizar su representación a través de diferentes especies. Los productos génicos se clasifican en función de tres criterios biológicos: función molecular, procesos biológicos y componentes o localización subcelular.

Para realizar la clasificación ontológica del transcriptoma de músculo esquelético de dorada, las anotaciones ensambladas fueron analizadas con el *software* GPRO (Futami *et al.*, 2011). En total, 4799 anotaciones fueron asignadas a una categoría GO, lo que representa un 34,99 % del total de las anotaciones ensambladas. La figura 19 resume el número de anotaciones o términos ontológicos en función de su asociación a procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares.

Las anotaciones que incluyen los procesos biológicos fueron más abundantes para procesos de oxidación-reducción (GO: 0055114) (33 %), ciclo celular (GO: 0007049) (10 %), procesos de desarrollo en organismos multicelulares (GO: 0007275) (9 %) y división celular (GO: 0051301) (7 %) (Figura 19A).

Los términos ontológicos más representativos que describen las funciones moleculares fueron: unión a proteínas (GO: 0005515) (25 %), unión a nucleótidos (GO: 0000166) (15 %), actividad hidrolasa (GO: 0016787) (12 %) y actividad transferasa (GO: 0016740) (12 %) (Figura 19B). Finalmente, los términos GO correspondientes a presencia en componentes celulares fueron: Componentes de membrana (GO: 001620), componentes intracelulares (GO: 0005622), componente de membrana plasmática (GO: 0005886) y espacio extracelular (GO: 0005615) (Figura 19C).



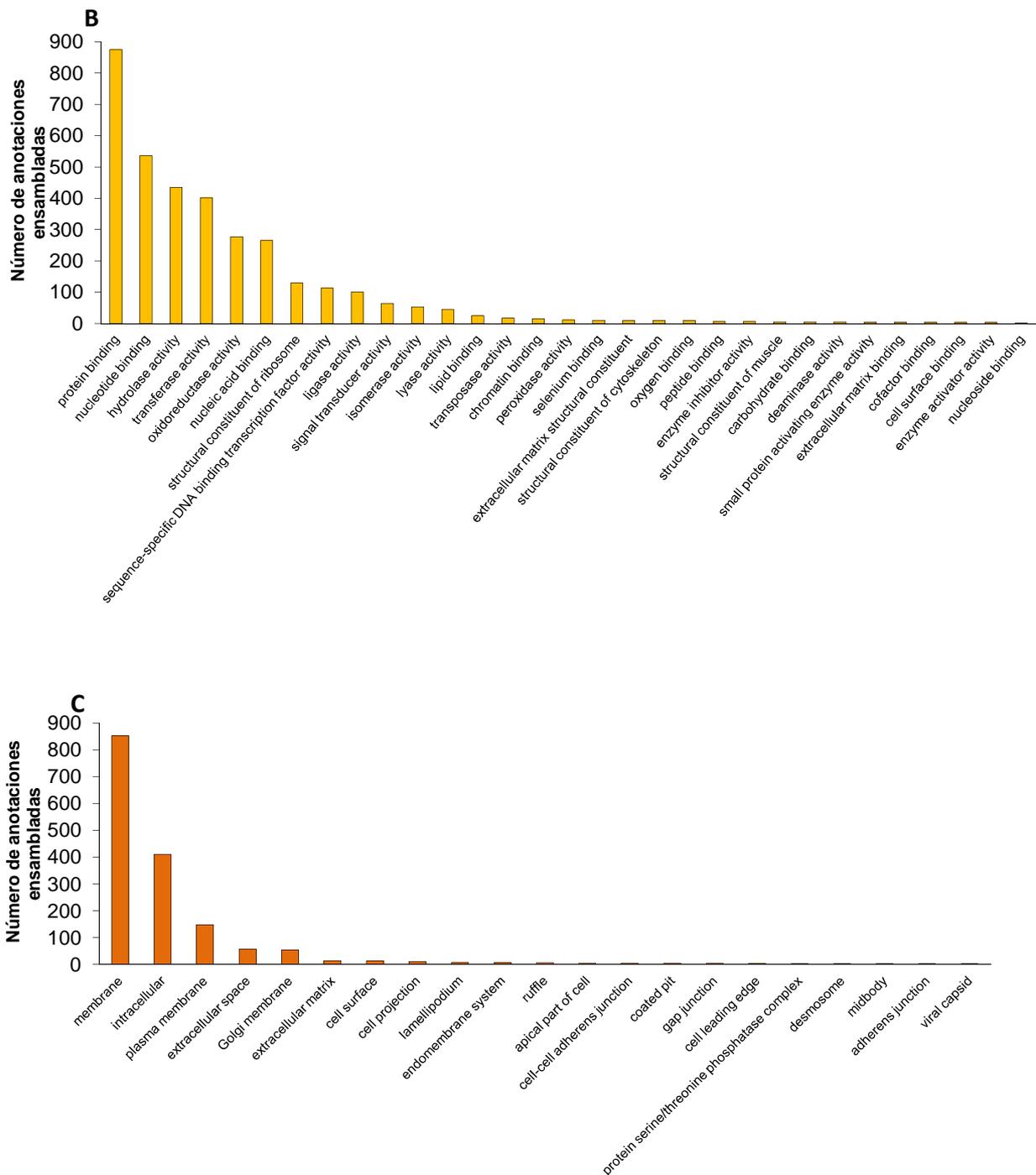


Figura 19. Clasificación funcional de las secuencias ensambladas basadas en términos (GO). (A) Procesos biológicos, (B) funciones moleculares y (C) componentes celulares.

Para anotar las secuencias del transcriptoma de músculo esquelético de dorada, se realizó un análisis de distribución de especies utilizando las secuencias de las bases de datos y la herramienta BLASTn. La especie con mayor número de secuencias en las bases de datos que presentan elevada homología con las del transcriptoma de músculo de dorada es *Oreochromis niloticus*, que contiene hasta un 29 % de las secuencias anotadas. La segunda especie con mayor representatividad en la

comparación fue *Haplochromis burtoni* (14 %), y posteriormente aparecen *Maylandia zebra* (12 %), *Pundamilia nyererei* (9 %) y *Takifugu rubripes* (8 %) (Figura 20).

El 16,5 % de las secuencias transcriptómicas fueron anotadas en base a secuencias de 30 especies de peces teleósteos. De estas, solo un 1,24 % lo han sido en base a secuencias anotadas por homología con datos de *S.aurata* presentes en las bases de datos, lo que es reflejo de la escasez de datos genómicos para esta especie en las bases de datos públicas. Por otra parte, los resultados indican, como era de esperar, la existencia de un alto grado de conservación filogenética de los genes de *S. aurata* al compararlos con los correspondientes de otras especies de peces.

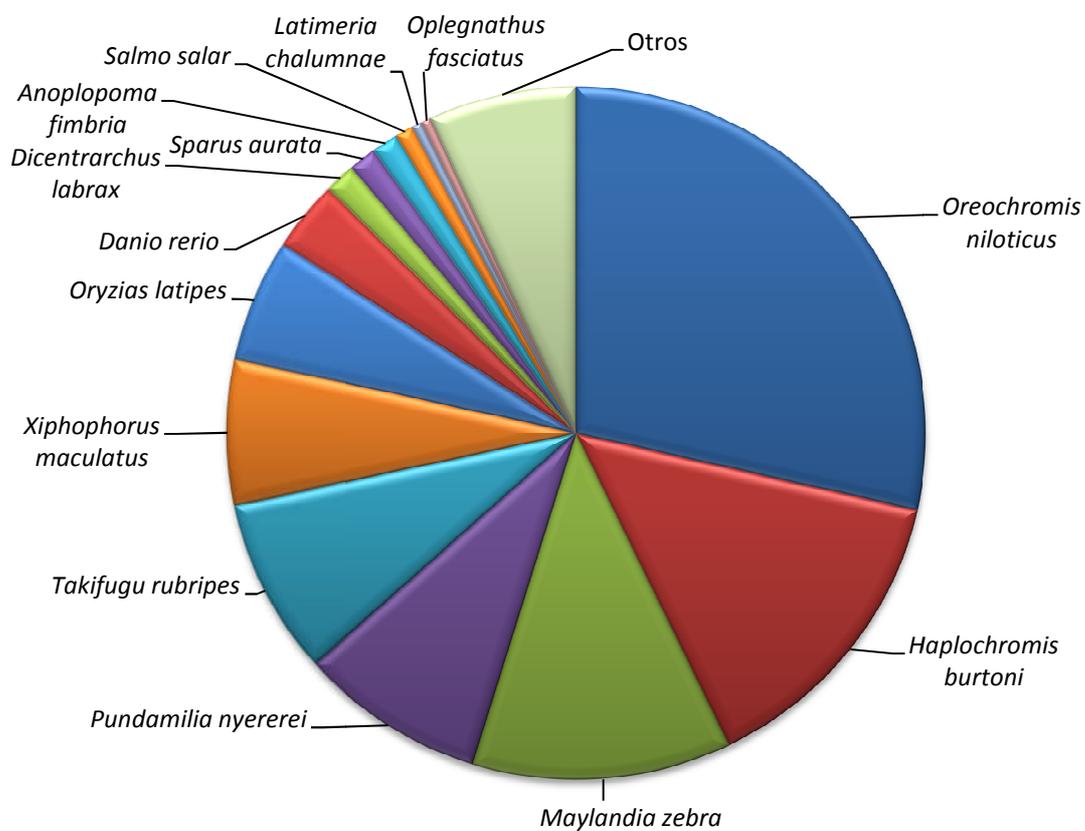


Figura 20. Distribución de especies en base a las secuencias de las bases de datos y la herramienta BLASTn para anotar las secuencias del transcriptoma de músculo esquelético de dorada.

4.1.4 Rutas metabólicas KEGG

La utilización del *software* GPRO nos permitió asociar las secuencias transcriptómicas obtenidas mediante la plataforma 454 con códigos de enzimas (EC). Las secuencias transcriptómicas con EC se asociaron a rutas metabólicas utilizando la base de datos KEGG-PATHWAY (Kanehisa, 1997). Esta base de datos clasifica las enzimas en siete grupos principales, que a su vez presentan

subgrupos o subcategorías. En la tabla 7 se indican los diferentes grupos asociados a las rutas metabólicas en las que participan secuencias de genes identificadas en el análisis transcriptómico. Se encontraron elementos correspondientes a cuatro categorías básicas: metabolismo, procesamiento de la información genética, procesamiento de la información ambiental y sistemas de organismos. Un total de 728 secuencias fueron asignadas a 73 rutas metabólicas pertenecientes a las cuatro categorías principales anteriormente mencionadas. Del total de 145 secuencias clasificadas en la subcategoría del metabolismo de nucleótidos, 132 fueron asignadas al metabolismo de purinas. Por otra parte, fue posible identificar 139 secuencias correspondientes a genes implicados en rutas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. De éstas, 41 secuencias tienen relación con genes de las vías de glucólisis-gluconeogénesis. El metabolismo de aminoácidos fue el tercer grupo con mayor representación de secuencias relacionadas, 109 secuencias. Entre las rutas del metabolismo de aminoácidos destacan las del metabolismo de la glicina, serina y treonina, cisteína y metionina así como también el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato.

La diversidad y variedad de rutas metabólicas identificadas (Tabla 7) se puede explicar en base a las diferentes condiciones de alimentación y mantenimiento de los peces a partir de los cuales se obtuvo el RNA utilizado en este estudio: dietas de composición muy diferentes y condiciones nutricionales diferentes (peces alimentados y en ayuno).

Tabla 7. Rutas metabólicas representadas en el transcriptoma de músculo esquelético de *S. aurata* mediante análisis KEGG

KEGG Categorías representadas	Número de secuencias anotadas
METABOLISM	
<i>Amino acid metabolism</i>	
<i>Alanine, aspartate and glutamate metabolism</i>	15
<i>Glycine, serine and threonine metabolism</i>	23
<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	18
<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	5
<i>Lysine degradation</i>	7
<i>Arginine and proline metabolism</i>	13
<i>Histidine metabolism</i>	3
<i>Tyrosine metabolism</i>	3
<i>Tryptophan metabolism</i>	6
<i>Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis</i>	2
<i>Phenylalanine metabolism</i>	14
<i>Carbohydrate metabolism</i>	
<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	41
<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	17
<i>Pentose phosphate pathway</i>	15
<i>Fructose and mannose metabolism</i>	8

<i>Pentose and glucuronate interconversions</i>	7
<i>Galactose metabolism</i>	8
<i>Ascorbate and aldarate metabolism</i>	1
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	8
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	11
<i>Pyruvate metabolism</i>	9
<i>Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</i>	5
<i>Inositol phosphate metabolism</i>	9
Energy metabolism	
<i>Oxidative phosphorylation</i>	51
<i>Photosynthesis</i>	1
<i>Methane metabolism</i>	1
<i>Nitrogen metabolism</i>	3
<i>Sulfur metabolism</i>	4
Lipid metabolism	
<i>Fatty acid biosynthesis</i>	2
<i>Fatty acid degradation</i>	13
<i>Fatty acid elongation</i>	8
<i>Synthesis and degradation of ketone bodies</i>	2
<i>Cutin, suberine and wax biosynthesis</i>	1
<i>Steroid biosynthesis</i>	4
<i>Steroid degradation</i>	1
<i>Steroid hormone biosynthesis</i>	11
<i>Glycerolipid metabolism</i>	7
<i>Glycerophospholipid metabolism</i>	14
<i>Ether lipid metabolism</i>	2
<i>Sphingolipid metabolism</i>	5
<i>Arachidonic acid metabolism</i>	5
<i>Linoleic acid metabolism</i>	5
<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	2
<i>Primary bile acid biosynthesis</i>	1
Nucleotide metabolism	
<i>Purine metabolism</i>	132
<i>Pyrimidine metabolism</i>	13
Metabolism of other amino acids	
<i>Taurine and hypotaurine metabolism</i>	1
<i>Selenocompound metabolism</i>	3
<i>Glutathione metabolism</i>	18
<i>beta-Alanine metabolism</i>	1
Glycan biosynthesis and metabolism	
<i>N-Glycan biosynthesis</i>	2
<i>Various types of N-glycan biosynthesis</i>	2
<i>Glycosaminoglycan degradation</i>	2
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series</i>	1
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - globo series</i>	1
<i>Other glycan degradation</i>	6

Metabolism of cofactors and vitamins	
<i>Riboflavin metabolism</i>	2
<i>Thiamine metabolism</i>	1
<i>Vitamin B6 metabolism</i>	2
<i>Pantothenate and CoA biosynthesis</i>	2
<i>Biotin metabolism</i>	2
<i>Folate biosynthesis</i>	4
<i>One carbon pool by folate</i>	8
<i>Retinol metabolism</i>	2
<i>Porphyrin and chlorophyll metabolism</i>	14
<i>Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis</i>	2
<i>Lipoic acid metabolism</i>	1
Xenobiotics biodegradation and metabolism	
<i>Aminobenzoate degradation</i>	12
<i>Bisphenol degradation</i>	2
<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	2
<i>Drug metabolism - other enzymes</i>	9
Metabolism of terpenoids and polyketides	
<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	6
<i>Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis</i>	1
Biosynthesis of other secondary metabolites	
<i>Streptomycin biosynthesis</i>	1
GENETIC INFORMATION PROCESSING	
Translation	
<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	28
ENVIRONMENTAL INFORMATION PROCESSING	
Signal transduction	
<i>mTOR signaling pathway</i>	9
<i>Phosphatidylinositol signaling system</i>	4
ORGANISMAL SYSTEMS	
Immune system	
<i>T cell receptor signaling pathway</i>	41

4.2 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA

Con el fin de corroborar y validar los datos obtenidos en la secuenciación 454, muestras de RNA de dorada expuestas durante 23 días a ayuno o alimentación con las dietas H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC, fueron utilizadas para analizar mediante RT-qPCR la expresión de genes relacionados con la cadena de transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y la translocación de ATP desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana-citosol. Los genes cuya expresión fue analizada

fueron: subunidad 8 del subcomplejo NADH deshidrogenasa 1 β , coenzima Q10 (CoQ10), citocromo b-c1 subunidad 10-*like* isoforma 2, citocromo C oxidasa subunidad 5B, caja de unión a ATP subfamilia G, miembro 2 isoforma X1, ATP sintasa subunidad β y ADP/ATP translocasa 3-*like*. Para ninguno de estos genes se disponía de información transcriptómica previa para *S. aurata*. En las bases de datos. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis mediante RT-qPCR fueron diseñados en base a las secuencias correspondientes al transcriptoma híbrido obtenido para dorada.

Los resultados de nuestros estudios indican diferencias significativas en la expresión de la mayoría de los genes relacionados con la cadena respiratoria en función del estado nutricional y la composición de la dieta. Tras 23 días de tratamiento, los niveles de expresión para el gen que codifica la subunidad 8 del subcomplejo NADH deshidrogenasa 1 β (del complejo I de la cadena respiratoria) fueron similares entre las diferentes condiciones de alimentación (Figura 21A). Por el contrario, los niveles de expresión de mRNA del citocromo b-c1 subunidad 10-*like* isoforma 2, perteneciente al complejo III, y la citocromo C oxidasa subunidad 5B, perteneciente al complejo IV, mostraron un aumento significativo en condición de ayuno (Figura 21B y C). No se detectaron diferencias significativas en la expresión de la ATP sintasa subunidad β (complejo V) entre los diferentes tratamientos (Figura 21D).

En cuanto a la expresión de genes relacionados con proteínas implicadas en la regulación de la permeabilidad mitocondrial, la expresión del gen que codifica a la proteína ADP/ATP translocasa 3-*like* mostró una tendencia a aumentar en músculo de peces alimentados con la dieta M^PH^LC, aunque los valores de expresión observados en peces en ayuno y alimentados con las diferentes dietas durante el mismo período no mostraron diferencias significativas (Figura 21E). La expresión correspondiente al gen que codifica para la caja de unión a ATP subfamilia G, miembro 2 isoforma X1, fue significativamente más elevada en peces sometidos a ayuno y alimentados con la dieta de bajo contenido en proteína y alto en carbohidratos (L^PL^LH^C) en comparación con los peces alimentados con las dietas H^PL^LC y M^PH^LC, observando un incremento en la expresión génica de 4 y 1,8 veces en los peces en ayuno respecto a las condiciones de alimentación mencionadas (Figura 21F). Por otra parte, la expresión de CoQ10 disminuyó en ayuno respecto a la alimentación con una dieta rica en proteínas, observándose valores de expresión 2,6 veces inferiores en comparación con los observados en los peces alimentados con la dieta H^PL^LC. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas al realizar el análisis comparativo entre el efecto de las dietas M^PH^LC, L^PL^LH^C y el ayuno (Figura 21G).

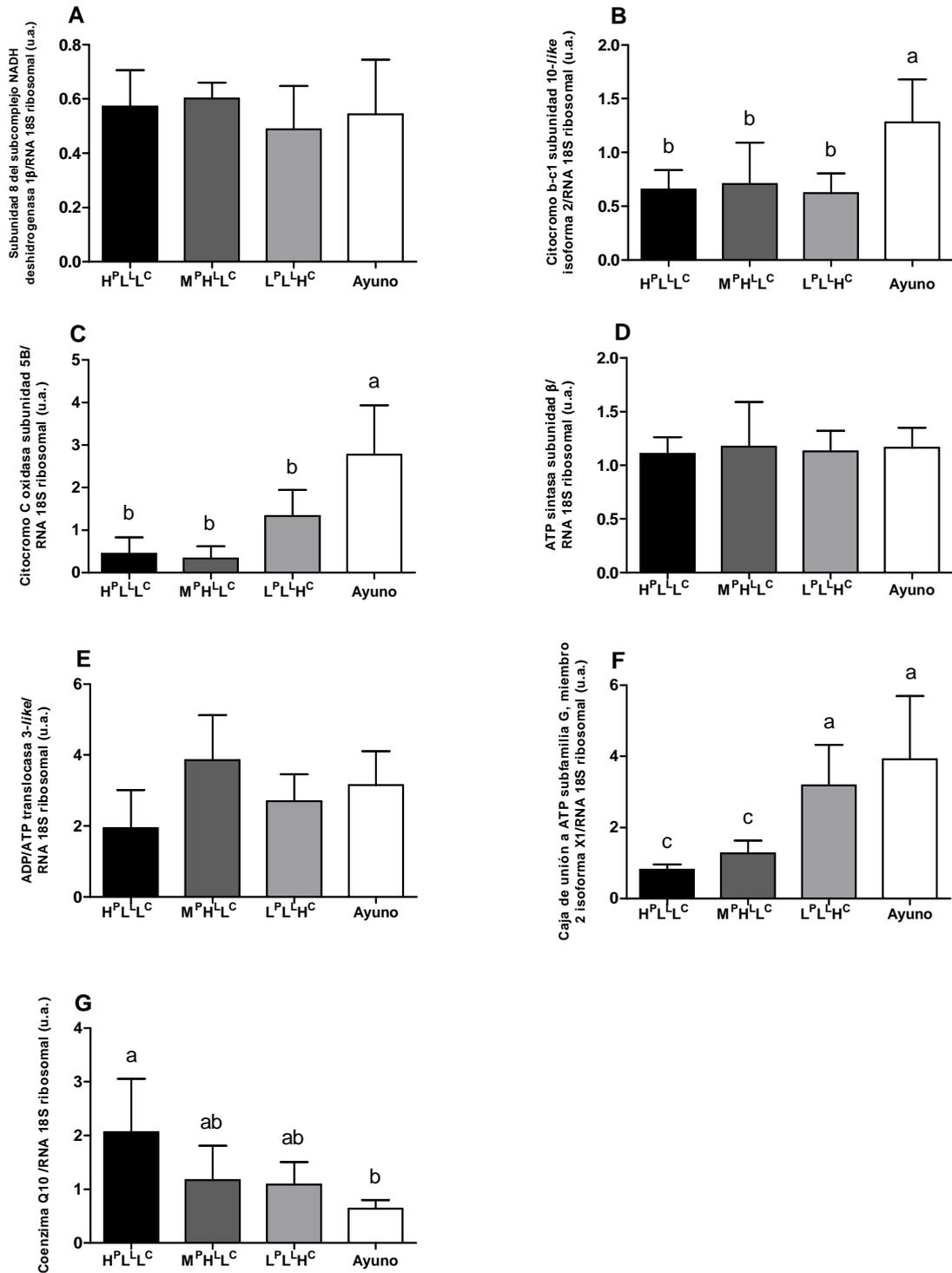


Figura 21. Niveles de mRNA de genes de la fosforilación oxidativa y el transporte de ATP. (A) subunidad 8 del subcomplejo NADH deshidrogenasa 1 β , (B) citocromo b-c1 subunidad 10-like isoforma 2, (C) citocromo C oxidasa subunidad 5B, (D) ATP sintasa subunidad β , (E) ADP/ATP translocasa 3-like, (F) caja de unión a ATP subfamilia G, miembro 2 isoforma X1, (G) CoQ10. Se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de mRNA de los diferentes genes en estudio en relación a los niveles de RNA ribosomal 18S. Los valores corresponden a la media \pm Desviación estándar (DE) de las determinaciones en músculo esquelético (4 a 6 peces). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrarias.

4.3. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA

4.3.1. Metabolitos en suero y músculo esquelético

El nivel de glicemia en juveniles de dorada alimentados durante 23 días con la dieta de alto contenido en carbohidratos (dieta L^PL^HC) fue significativamente superior al de los peces alimentados con la dieta H^PL^LC o mantenidos en ayuno (Figura 22A). Sin embargo, no se establecieron diferencias significativas entre los valores obtenidos con las dietas experimentales M^PH^LC, M^PL^HC y L^PH^LC, que mostraron niveles intermedios entre los peces alimentados con la dieta L^PL^HC y los alimentados con la dieta H^PL^LC. Por otra parte, en ayuno los valores de glicemia fueron significativamente más bajos que los observados en peces alimentados.

Con respecto a los triglicéridos en suero, en la figura 22B se puede observar que los valores fueron más elevados en los peces alimentados con la dieta M^PL^HC, llegando a ser 1,3; 1 y 0,5 veces superiores a los detectados en los peces alimentados con las dietas L^PL^HC, L^PH^LC, M^PH^LC, respectivamente, y similares a los observados en peces alimentados con la dieta H^PL^LC. Los niveles más bajos correspondieron a los peces sometidos a ayuno, así como a los alimentados con las dietas L^PL^HC y L^PH^LC. El contenido de glucógeno en músculo, de las doradas alimentadas con las diferentes dietas en estudio, fue similar en todas las condiciones de alimentación, siendo en promedio 2,7 veces superior al de los peces mantenidos en ayuno (Figura 22C).

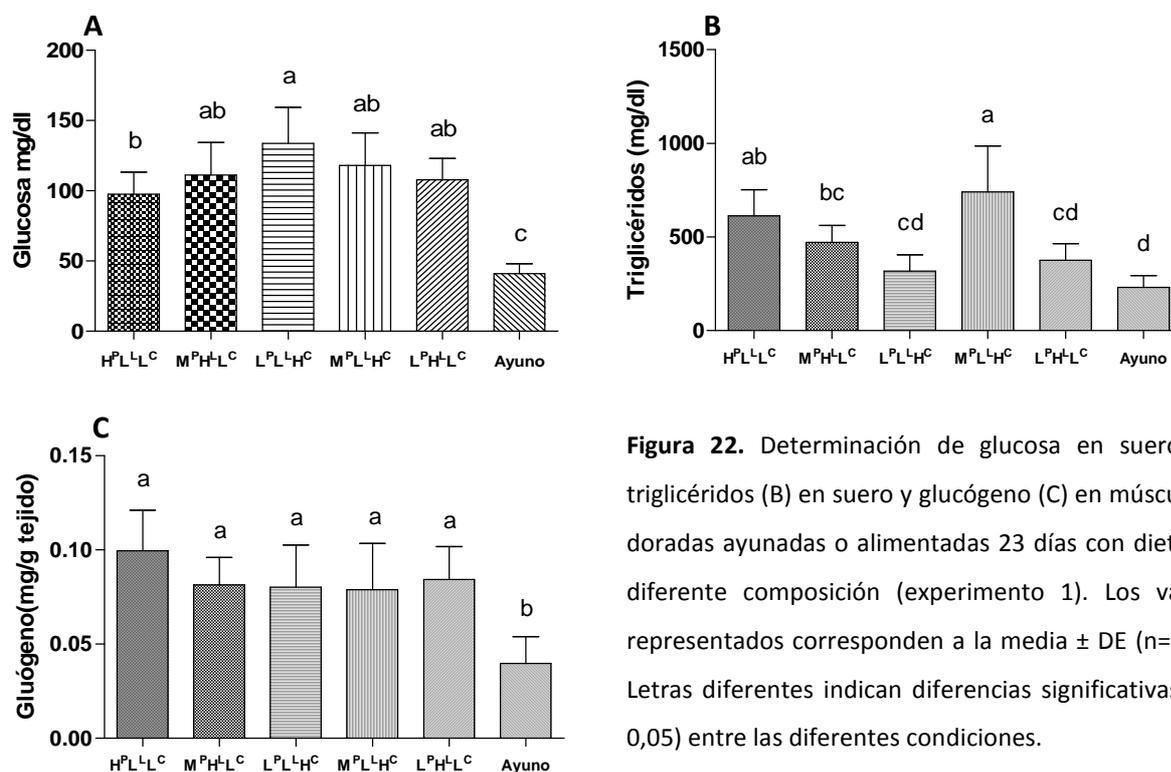


Figura 22. Determinación de glucosa en suero (A), triglicéridos (B) en suero y glucógeno (C) en músculo de doradas ayunadas o alimentadas 23 días con dietas de diferente composición (experimento 1). Los valores representados corresponden a la media \pm DE (n=7-10). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones.

4.3.2. Efecto de la composición de la dieta sobre la actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario en músculo esquelético de *S. aurata*

En relación a las enzimas implicadas en la glucólisis, la actividad PK no mostró diferencias significativas en músculo de peces alimentados con las cinco dietas experimentales (Experimento 1), si bien se observó una tendencia al alza en peces a los que se suministró la dieta con una proporción de carbohidratos más elevada ($M^P L^L H^C$) (Figura 23A). De manera similar, los valores de actividad PFK-1 fueron similares en todas las condiciones de alimentación (Figura 23B). Las doradas sometidas a ayuno mostraron valores de actividad PFK-1 0,5 veces más bajos que los observados en las doradas sometidas a alimentación con diferentes dietas.

En relación al metabolismo de aminoácidos, ALT mostró valores de actividad más elevados en los peces alimentados con la dieta de alto contenido lipídico ($L^P H^L L^C$) que en los alimentados con las otras dietas y que en los sometidos a ayuno (Figura 23C). Un comportamiento similar se observó para la actividad AST. Los valores de AST más elevados, como en el caso de ALT, correspondieron a peces alimentados con la dieta $L^P H^L L^C$, si bien valores similares se observaron también en músculo de los peces alimentados con la dieta $L^P L^L H^C$ y en los peces en ayuno (Figura 23D). La actividad correspondiente a la enzima GDH fue similar en los peces sometidos a los diferentes tratamientos de alimentación. Los valores más elevados correspondieron a los peces alimentados con la dieta $L^P H^L L^C$ y son significativamente diferentes de los observados en peces en ayuno, que mostraron los valores más bajos (Figura 23E).

En cuanto a las actividades de las enzimas implicadas en la vía de las pentosas fosfato, la actividad de la enzima G6PD mostró valores 0,5 y 0,63 veces menores en los peces en ayuno respecto a los valores detectados en los peces alimentados con las dietas $M^P L^L H^C$ y $L^P H^L L^C$ (Figura 13G). La actividad 6PGD no se vio afectada por la composición de la dieta ni el estado nutricional (Figura 23F).

Las actividades de la enzima gluconeogénica FBPasa observada en doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales, fueron similares a las obtenidas para los peces en ayuno.

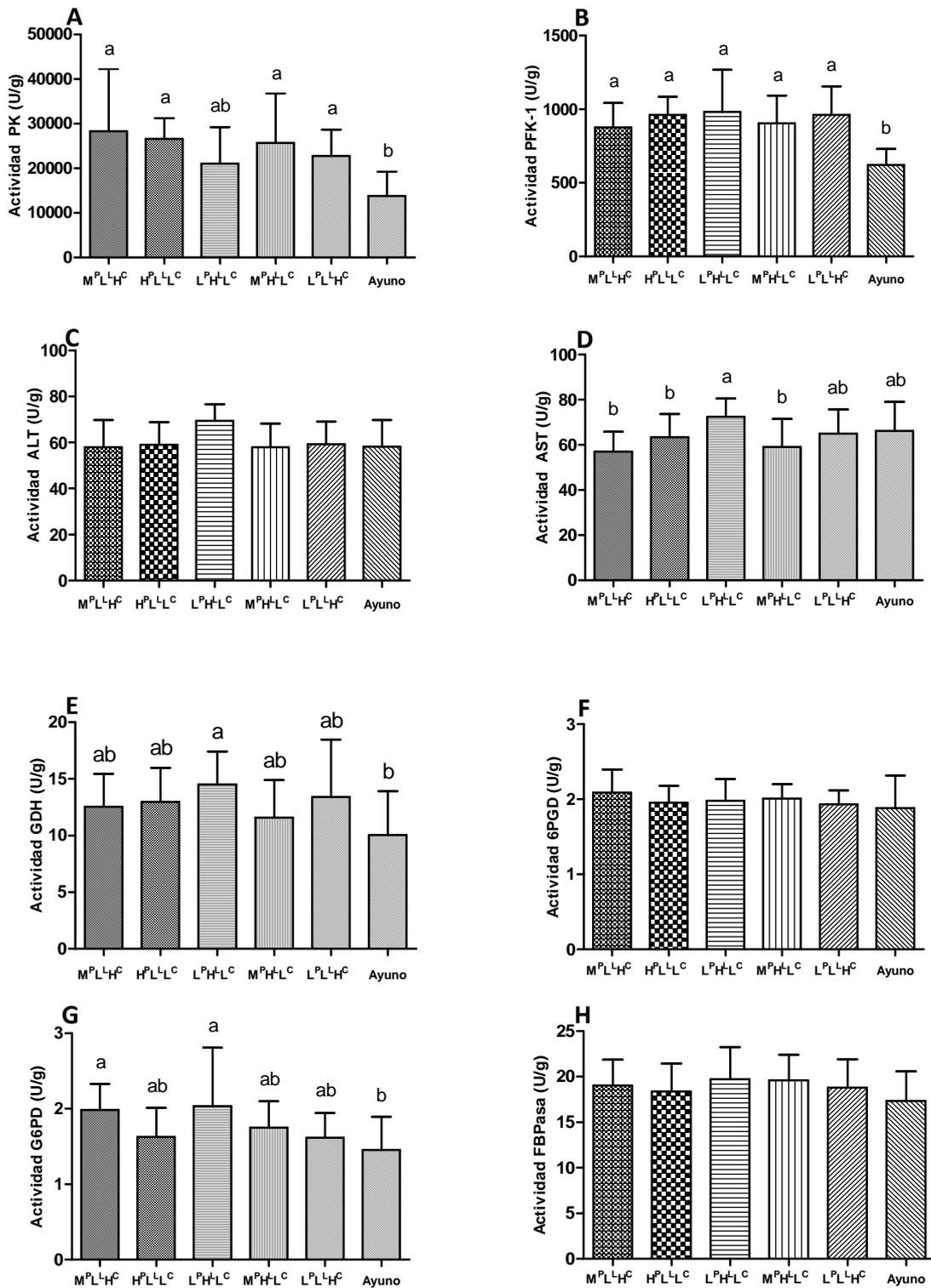


Figura 23. Efecto de la composición de la dieta y el ayuno en las actividades enzimáticas: (A) PK, (B) PFK-1, (C) ALT, (D) AST, (E) GDH, (F) 6PGD, (G) G6PD, (H) FBPasa de músculo esquelético de juveniles de dorada. Los valores de actividad expresadas en U/g corresponden a la media \pm DE determinada en músculo de 7-10 peces. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones.

4.4 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE EL APROVECHAMIENTO, DIGESTIBILIDAD E INGESTA DE NUTRIENTES

En un segundo experimento (experimento 2, apartado 3.5 de Materiales y métodos), los peces se alimentaron durante 37 días con las dietas $H^P L^L C$, $M^P H^L C$ y $L^P L^H C$ (tabla 2) con el fin de determinar los valores de aprovechamiento y digestibilidad de las dietas y determinar los parámetros de crecimiento de los peces.

4.4.1 Crecimiento y eficiencia alimentaria

Los juveniles de dorada alimentados con estas tres dietas experimentales, mostraron diferencias en los parámetros de crecimiento y eficiencia alimentaria según el tipo de dieta suministrada. Los peces alimentados con las dietas $H^P L^L C$, de contenido más elevado en proteína y bajo en lípidos, y $M^P H^L C$, de composición media en proteína y elevada en lípidos, son las que mostraron los mejores valores en lo que respecta al peso final, SGR y FER (Tabla 8). Por otra parte los juveniles alimentados con la dieta $M^P H^L C$ presentaron un FCR mejor que los alimentados con las otras dos dietas, si bien no se observaron diferencias significativas entre las dietas $H^P L^L C$ y $M^P H^L C$ para este parámetro. En cuanto al parámetro LR, los peces alimentados con la dieta $L^P L^H C$, baja en proteína y alta en carbohidratos, presentaron valores significativamente más altos que los peces alimentados con la dieta $H^P L^L C$. El ratio PER fue mejor en los peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$ que en los peces alimentados con la dieta $H^P L^L C$, siendo los valores observados en los peces alimentados con la dieta $L^P L^H C$ similares a los de los alimentados con la dieta $M^P H^L C$. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el HI ni en el parámetro PR después de 37 días de alimentación con las diferentes dietas.

En lo que respecta a composición corporal, los peces alimentados con la dieta $H^P L^L C$ presentaron un alto contenido de proteína y humedad a diferencia de los alimentados con las otras dietas, no mostrando diferencias significativas entre ellas. El contenido lipídico a nivel somático fue significativamente diferente en los peces alimentados con las diferentes dietas en estudio. Los peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$, dieta de mayor contenido en lípidos, presentaron los valores más elevados de contenido lipídico corporal. Los peces alimentados con la dieta $H^P L^L C$ mostraron un contenido de cenizas superior al de los alimentados con la dieta $M^P H^L C$. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en cuanto al contenido de carbono.

Tabla 8. Perfiles de crecimiento, utilización de nutrientes y composición corporal de juveniles de dorada alimentados con tres dietas experimentales.

	H ^P L ^L L ^C	M ^P H ^L L ^C	L ^P L ^L H ^C
	60P7L18C	50P18L21C	40P8L41C
Peso inicial (g)	8,2 ± 0,06	8,52 ± 0,1	8,11 ± 0,36
Peso final (g)	17,69 ± 0,37 ^a	18,36 ± 0,3 ^a	14,75 ± 1,22 ^b
SGR	2,08 ± 0,07 ^a	2,07 ± 0,03 ^a	1,61 ± 0,17 ^b
FCR	1,58 ± 0,02 ^{ab}	1,44 ± 0,07 ^b	1,96 ± 0,27 ^a
HI	1,22 ± 0,3	1,11 ± 0,31	1,33 ± 0,24
PR (%)	17,92 ± 1,25	20,52 ± 1,82	20,34 ± 3,1
LR (%)	24,90 ± 7,17 ^b	33,21 ± 3,73 ^{ab}	41,95 ± 7,45 ^a
FER	0,63 ± 3,16 ^a	0,69 ± 3,16 ^a	0,51 ± 6,98 ^b
PER	1,06 ± 0,01 ^b	1,39 ± 0,06 ^a	1,27 ± 0,17 ^{ab}
Composición corporal (% peso seco (ps); % peso húmedo. (ph))			
Humedad (% ph)	72,28 ± 0,47 ^a	70,09 ± 0,37 ^b	70,62 ± 0,23 ^b
Proteína (% ps)	60,23 ± 1,11 ^a	52,18 ± 0,49 ^c	55,42 ± 1,00 ^b
Lípidos (% ps)	22,40 ± 1,20 ^a	30,43 ± 0,62 ^b	28,79 ± 1,08 ^c
Ceniza (% ps)	12,66 ± 0,75 ^a	11,29 ± 0,16 ^b	12,17 ± 0,42 ^a
Carbono (% ps)	49,03 ± 0,70	50,17 ± 1,45	49,62 ± 0,92

Los valores expresan la media ± DE correspondiente a los peces de 3 acuarios por condición. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 9. Coeficientes de digestibilidad aparente en peces alimentados con diferentes dietas experimentales.

Nutriente	H ^P L ^L L ^C	M ^P H ^L L ^C	L ^P L ^L H ^C
	60P7L18C	50P18L21C	40P8L41C
Fósforo	39,96 ± 1,93	50,97 ± 6,02	44,74 ± 10,85
Calcio	54,71 ± 3,43	59,25 ± 9,26	45,07 ± 11,64
Carbono	70,53 ± 11,75	79,94 ± 5,96	65,08 ± 14,15
Proteína	79,24 ± 4,12	78,08 ± 5,97	77,46 ± 1,27
Materia seca	64,76 ± 2,67	67,21 ± 7,45	57,18 ± 9,07

Los valores de las diferentes determinaciones se expresan como el valor de la media ± DE (N=3 acuarios).

4.4.2 Digestibilidad

Los CDAs correspondientes a los nutrientes y de materia seca de las muestras de heces, obtenidas del intestino posterior de los peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C fueron inferiores a los

valores observados en peces alimentados con las otras dietas experimentales (tabla 9). Si bien los peces alimentados con la dieta M^PH^LC mostraron valores superiores en cuanto a fósforo, calcio, carbono y materia seca, la digestibilidad aparente de la proteína fue similar en los peces alimentados con las diferentes dietas. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros cuantificados tras 37 días de alimentación con las diferentes dietas experimentales.

4.5 ANÁLISIS POR MICROARRAYS DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GLOBAL DE GENES EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA EN FUNCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA Y AYUNO

4.5.1 Expresión diferencial de genes en músculo esquelético de dorada mediante uso de *microarrays*

Para analizar la expresión diferencial de genes en el músculo esquelético de juveniles de *S. aurata* alimentados con dietas que difieren en la composición de nutrientes y así identificar genes de uso potencial como biomarcadores del crecimiento, se llevó a cabo un análisis de genómica funcional basado en el perfil de expresión génica global mediante el uso de *microarrays*. Para ello se construyeron microchips que contenían ocho matrices por 60 000 funciones o puntos de sondas (8 x 60K) con sondas de 60 nucleótidos diseñadas a partir de la información genómica obtenida en el análisis del transcriptoma híbrido de dorada indicado en el apartado 4.1. Se hibridaron 4 muestras por condición (peces en ayuno o alimentados durante 23 días con las dietas H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC).

Tabla 10. Pureza e integridad (RIN) de las muestras de RNA total procedentes del músculo esquelético de *S. aurata* utilizadas para los *microarrays*.

Muestra	Dieta	Ratio 28S/18S	RIN	[RNA] ng/μl	260/280	260/230
MH1	H ^P L ^L C	1,8	9,5	254,65	2,05	2,27
MH2	H ^P L ^L C	1,7	9,5	239	2,05	2,12
MH3	H ^P L ^L C	2	9,5	231,21	2,04	2,17
MH4	H ^P L ^L C	1,8	9,4	221,88	2,09	1,42
MM1	M ^P H ^L C	1,9	9,3	244,21	2,11	0,95
MM2	M ^P H ^L C	1,8	9,3	437,98	2,04	2,25
MM3	M ^P H ^L C	1,7	9,5	336,79	2,05	2,25
MM4	M ^P H ^L C	2	9,6	375,7	2,06	2,34
ML1	L ^P L ^H C	1,7	9,3	256,19	2,05	2,21
ML2	L ^P L ^H C	1,7	9,4	298,95	2,05	2,23
ML3	L ^P L ^H C	2,1	9,5	547,23	2	1,79
ML4	L ^P L ^H C	1,8	9,6	245,23	2,08	2,19
MA1	Ayuno	1,5	9,2	196,71	2,09	2,28
MA2	Ayuno	1,6	9,2	222,78	2,06	2,2
MA3	Ayuno	1,6	9,2	267,5	2,05	2,24
MA4	Ayuno	1,6	9,4	221,58	2,07	1,78

Antes de proceder al análisis fue necesario determinar la calidad del RNA de partida. En la tabla 10 se pueden observar los valores correspondientes de RIN y pureza de las muestras de RNA obtenidas de músculo esquelético de juveniles de doradas sometidas a ayuno o alimentados con dietas que difieren en su composición. Todas las muestras presentaron un RIN igual o superior a 9,2.

Con el fin de determinar los genes que muestran expresión diferencial significativa entre las condiciones analizadas, los datos fueron normalizados y ajustados a un modelo lineal utilizando el paquete bioinformático Bioconductor. Se ordenaron aquellos genes con expresión diferencial con un valor *P* ajustado inferior a 0,05 (95 % de confianza estadística).

Tabla 11. Resumen del número de anotaciones con expresión diferencial al comparar las diferentes condiciones de alimentación, filtrados con valor *P* ajustado < 0,05 y valor *P* (no ajustado) < 0,05.

Valor <i>P</i> ajustado < 0,05	M ^P H ^L L ^C vs. H ^P L ^L L ^C	L ^P L ^H L ^C vs. H ^P L ^L L ^C	Ayuno vs. H ^P L ^L L ^C	L ^P L ^H L ^C vs. M ^P H ^L L ^C	Ayuno vs. M ^P H ^L L ^C	Ayuno vs. L ^P L ^H L ^C
Incremento	23	78	5553	3	4944	4718
Disminución	14	17	5228	1	4900	4727
Total	37	95	10781	4	9844	9445
Valor <i>P</i> < 0,05						
Incremento	2704	2288	7430	1244	6853	6660
Disminución	2068	1690	7165	1192	7188	6801
Total	4772	3978	14595	2436	13971	13461

La tabla 11 muestra el número de anotaciones con expresión diferencial observadas y representadas en todas las comparaciones realizadas. Para las comparaciones con ayuno se utilizó los datos filtrados con un valor *P* ajustado < 0,05. En el caso del análisis ontológico para la comparación entre dietas también se consideraron los datos filtrados con un valor *P* (no ajustado) < 0,05. Como era de esperar, la mayoría de genes con expresión al alza y a la baja se encontraron al comparar los peces en ayuno frente a los alimentados con cualquiera de las dietas utilizadas (H^PL^LL^C, M^PH^LL^C y L^PL^HL^C), identificando 10781, 9844 y 9445 anotaciones con expresiones diferenciales, respectivamente. En la comparación entre las dietas con bajos niveles de proteína y alta en carbohidratos (L^PL^HL^C) frente a la dieta de alto contenido en proteína y bajo en carbohidratos (H^PL^LL^C), se identificaron 95 anotaciones con expresión diferencial. Esta comparación resulta de especial interés, dado que corresponde a la sustitución parcial de proteína de la dieta por carbohidratos. Por otra parte, al realizar la comparación entre las dietas suministradas, fueron obtenidas 37 anotaciones

con expresión diferencial al contrastar la dieta de niveles medios de proteína ($M^P H^L L^C$), frente a la dieta de alto contenido en proteína ($H^P L^L C$). Al comparar la expresión de genes presentes en los peces alimentados con la dieta de baja inclusión de proteína ($L^P L^H C$) frente a los observados en las doradas alimentadas con la dieta de nivel medio de proteína ($M^P H^L C$) se observó un total de 4 anotaciones con expresiones diferencialmente expresadas.

4.5.2 Análisis funcional

Se realizó un análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en los *microarrays* utilizando la anotación de términos GO (función molecular, procesos biológicos y componentes celulares). Para ello se consideraron solo los genes expresados diferencialmente filtrados con un valor P ajustado inferior a 0,05 en el caso de la comparación de las condiciones ayuno vs. $H^P L^L C$, ayuno vs. $M^P H^L C$ y ayuno vs. $L^P L^H C$. Por otra parte, al realizar la comparación de las condiciones $L^P L^H C$ vs. $H^P L^L C$, $M^P H^L C$ vs. $H^P L^L C$ y $L^P L^H C$ vs. $M^P H^L C$, se consideraron también los genes expresados diferencialmente con un valor P sin ajustar. En este caso, se consideraron solo términos que incluían un mínimo de 10 anotaciones con expresión diferencial. La representación detallada de la expresión génica diferencial tanto incrementada como disminuida para el contraste de las condiciones $L^P L^H C$ vs. $H^P L^L C$ se llevó a cabo utilizando un valor P ajustado inferior a 0,05 (Tabla 12). En el caso de la comparación entre las condiciones $L^P L^H C$ vs. $M^P H^L C$ se utilizó un valor P normal (Tabla 15).

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces alimentados con las dietas $L^P L^H C$ y $H^P L^L C$

La figura 24 representa el análisis funcional en la categoría de procesos biológicos al realizar la comparación de la expresión diferencial de genes (valor P sin ajustar) presentes en peces alimentados con la dieta de baja proteínas y alta cantidad de carbohidratos ($L^P L^H C$) comparados con los correspondientes a la dieta de alta cantidad de proteína y baja en carbohidratos ($H^P L^L C$). En la figura es posible observar que los términos con expresión diferencial más significativos fueron los relacionados con el establecimiento de la localización de la proteína al organelo (GO: 0072594) el cual presentó 6 anotaciones con expresión diferencial incrementada, la misma cantidad de anotaciones se observó en el término relacionado con la organización mitocondrial (GO: 0007005).

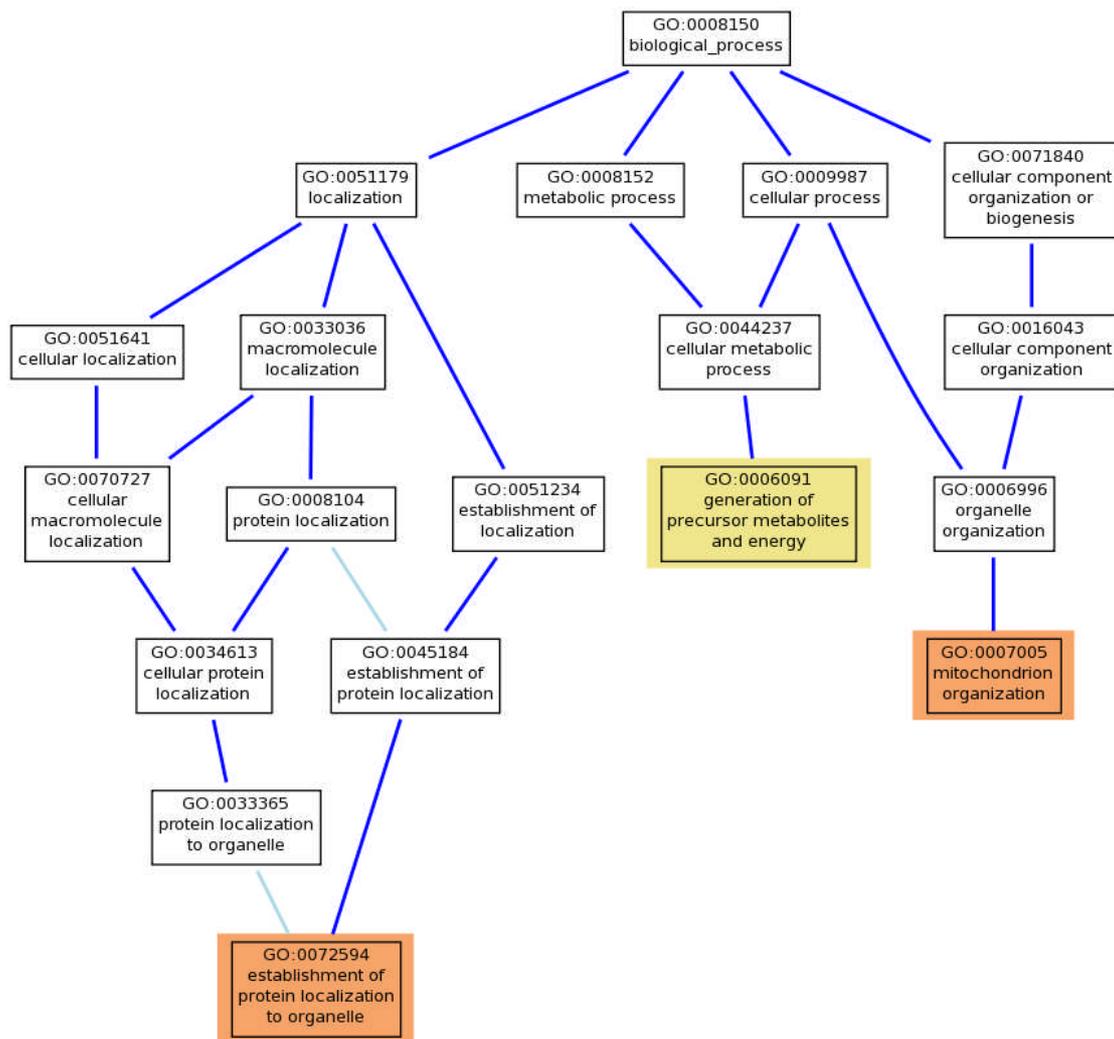


Figura 24. Análisis GO correspondiente a procesos biológicos en función de los genes con expresión incrementada en el músculo esquelético de peces alimentados con la dieta L^PL^HC respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan el grado en que son significativas, siendo los colores más oscuros los más significativos.

El análisis de la expresión diferencial de genes incrementados en términos ontológicos relacionados con las funciones moleculares está indicado en la figura 25, en ella se observa la presencia de genes con funciones en la actividad oxidasa de citocromo C (GO: 0004129), concretamente, cinco anotaciones involucradas en esta función. El término ontológico más significativo en la representación de genes, fue la categoría ontológica de actividad transportadora transmembrana de cationes inorgánicos monovalentes (GO: 0015077), en el cual se identificaron 14

anotaciones, entre ellas el gen que codifica para la proteína sodio potasio ATPasa subunidad A isoforma 1.

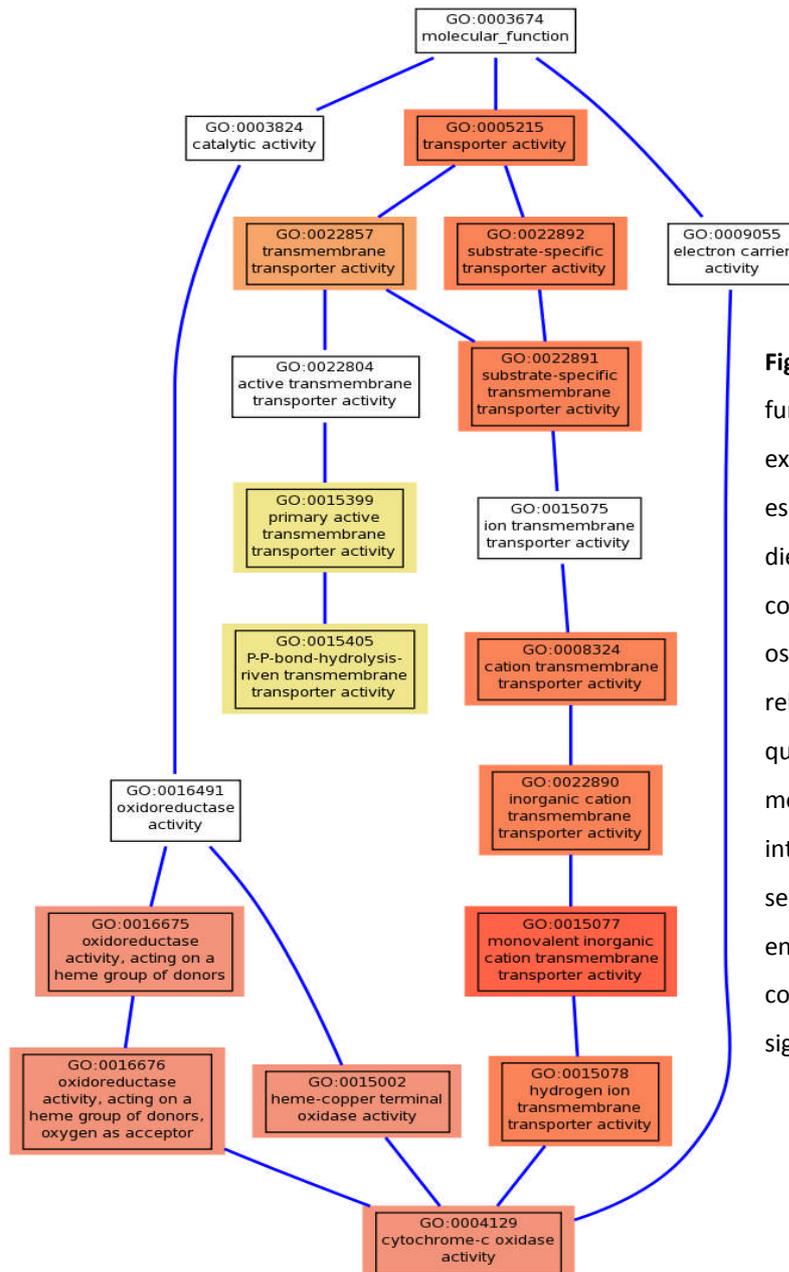


Figura 25. Análisis GO correspondiente a funciones moleculares de los genes con expresión incrementada en el músculo esquelético de peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C respecto a los alimentados con la H^PL^LC. En líneas de color azul oscuro se muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, indican el grado en que son significativas, siendo los colores más oscuros los más significativos.

La tabla 12 representa la expresión diferencial en base a genes regulados tanto de manera incrementada como disminuida en el músculo esquelético de peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Los niveles de expresión génica fueron obtenidos mediante el análisis de *microarrays* en los cuales los valores de intensidades de expresión, representados en la tabla como veces de inducción fueron filtrados mediante el uso de un valor *P* ajustado inferior a 0,05. Como resultado, del filtrado de datos se obtuvieron 95 anotaciones de un total de 41878, entre las cuales anotaciones con expresión incrementada como el citocromo P450 1A1 y el gen que codifica para la expresión de la proteína única F-box 32-*like* isoforma X1, los cuales

experimentaron un incremento promedio de 11,1 y 6,5 veces de inducción tras ingesta de la dieta L^PL^HC respecto a los peces alimentados con la dieta H^PL^LC. Por otra parte, entre los genes con una regulación negativa, encontramos el que codifica para la proteína asociada al citoesqueleto (-1,6 veces de inducción) y el gen que codifica para el receptor nuclear perteneciente a la subfamilia 1 grupo D miembro 2, que disminuyó su expresión 2,7 veces respecto a la dieta alta en proteínas.

Entre los genes descritos, es posible observar en la parte inferior de la tabla, la expresión diferencial de genes que no lograron ser identificados mediante la utilización de la herramienta BLASTn, y que muestran disminución en la expresión génica diferencial en músculo esquelético de doradas alimentadas con la dieta L^PL^HC, de hasta 59 veces.

Tabla 12. Expresión génica diferencial mediante el análisis de *microarrays* de músculo esquelético de doradas alimentadas con la dieta L^PL^HC respecto a los peces alimentados con la dieta H^PL^LC. Los valores individuales de cada gen se indican como niveles de inducción en la expresión. Los valores correspondientes a las veces de inducción fueron filtrados mediante el uso de un valor *P* ajustado inferior a 0,05.

Nombre sistemático	Descripción del gen	Veces de inducción	Log. veces de inducción	Valor P	Valor P ajustado
isotig06546	RecName: Full=Cytochrome P450 1A1; AltName: Full=CYP1A1	11,41	3,51	2,0E-10	1,1E-05
isotig06546	RecName: Full=Cytochrome P450 1A1; AltName: Full=CYP1A1	11,39	3,51	4,3E-09	7,8E-05
isotig06546	RecName: Full=Cytochrome P450 1A1; AltName: Full=CYP1A1	10,60	3,41	1,0E-09	2,8E-05
isotig06121	PREDICTED: F-box only protein 32-like isoformX1	6,74	2,75	1,1E-07	8,7E-04
isotig06121	PREDICTED: F-box only protein 32-like isoformX1	6,73	2,75	4,4E-08	6,0E-04
isotig06121	PREDICTED: F-box only protein 32-like isoformX1	5,89	2,56	1,1E-07	8,7E-04
isotig19322	Rachycentron canadum alpha actin-4 gene, complete cds	4,91	2,30	2,2E-05	2,4E-02
isotig10060	PREDICTED: xin actin-binding repeat-containing protein 1-like isoform X2	3,73	1,90	3,7E-05	2,9E-02
isotig11122	Oplegnathus fasciatus klf9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11	3,49	1,80	1,8E-07	1,1E-03
isotig11122	Oplegnathus fasciatus klf9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11	3,48	1,80	1,2E-06	4,9E-03
isotig11122	Oplegnathus fasciatus klf9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11	3,02	1,59	2,4E-06	6,8E-03
isotig14227	PREDICTED: solute carrier family 26 member 10-like isoform X2	2,98	1,58	7,9E-06	1,6E-02
isotig15306	PREDICTED: alpha-protein kinase 3-like	2,96	1,57	8,3E-06	1,6E-02
isotig16255	Lithognathus mormyrus clone lmos2p06d04 mRNA sequence	2,73	1,45	1,7E-05	2,1E-02
isotig15306	PREDICTED: alpha-protein kinase 3-like	2,70	1,44	3,0E-05	2,6E-02
isotig14643	PREDICTED: uncharacterized protein C11orf96 homolog	2,69	1,43	3,8E-07	1,9E-03
isotig19273	Sparus aurata GLUT1 (SLC2A1) mRNA, complete cds	2,68	1,42	3,4E-05	2,8E-02
isotig15306	PREDICTED: alpha-protein kinase 3-like	2,63	1,40	1,1E-05	1,7E-02
isotig11734	PREDICTED: regulator of cell cycle RGCC-like isoform X1	2,62	1,39	1,0E-05	1,6E-02
isotig14643	PREDICTED: uncharacterized protein C11orf96 homolog	2,55	1,35	3,3E-06	7,5E-03
isotig08045	PREDICTED: Haplochromis burtoni max-binding protein MNT-like (LOC102293132), transcript variant X2, mRNA	2,53	1,34	6,4E-08	6,9E-04
isotig14643	PREDICTED: uncharacterized protein C11orf96 homolog	2,53	1,34	2,6E-06	6,8E-03
isotig11734	PREDICTED: regulator of cell cycle RGCC-like isoform X1	2,49	1,31	1,2E-05	1,7E-02
isotig16255	Lithognathus mormyrus clone lmos2p06d04 mRNA sequence	2,48	1,31	8,7E-05	4,9E-02
isotig07346	PREDICTED: patatin-like phospholipase domain-containing protein 2-like	2,39	1,26	6,5E-05	4,3E-02
isotig10543	PREDICTED: Pundamilia nyererei inward rectifier potassium channel 2-like (LOC102213496), mRNA	2,38	1,25	3,3E-05	2,8E-02
isotig08045	PREDICTED: Haplochromis burtoni max-binding protein MNT-like (LOC102293132), transcript variant X2, mRNA	2,36	1,24	1,7E-07	1,1E-03
isotig09038	PREDICTED: 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ABHD5-like	2,34	1,23	2,4E-05	2,4E-02
isotig09306	PREDICTED: cell wall integrity and stress response component 2-like	2,21	1,14	3,6E-05	2,9E-02
isotig14220	PREDICTED: Oreochromis niloticus protein LBH-like (LOC100693150), mRNA	2,16	1,11	6,7E-05	4,3E-02
isotig11934	PREDICTED: Haplochromis burtoni MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1-like (LOC102313431), mRNA	2,09	1,06	9,6E-06	1,6E-02
isotig05628	Sparus aurata clone contig00129 genomic sequence	2,06	1,04	6,4E-05	4,2E-02
isotig11934	PREDICTED: Haplochromis burtoni MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1-like (LOC102313431), mRNA	2,06	1,04	3,3E-06	7,5E-03

isotig08045	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> max-binding protein MNT-like (LOC102293132), transcript variant X2, mRNA	2,05	1,04	3,1E-06	7,5E-03
isotig05628	<i>Sparus aurata</i> clone contig00129 genomic sequence	2,05	1,04	1,7E-05	2,1E-02
isotig06140	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102081941 isoform X1	2,04	1,03	1,6E-06	5,7E-03
isotig16420	PREDICTED: cyclin-dependent kinase inhibitor 1-like isoform X2	2,00	1,00	1,9E-05	2,3E-02
isotig08532	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101471928	1,98	0,99	9,5E-06	1,6E-02
isotig06140	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102081941 isoform X1	1,97	0,98	2,5E-06	6,8E-03
isotig09921	PREDICTED: kelch-like protein 23 isoform X1	1,95	0,97	2,1E-06	6,6E-03
isotig11934	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1-like (LOC102313431), mRNA	1,91	0,93	9,2E-06	1,6E-02
isotig08442	PREDICTED: <i>dnaJ</i> homolog subfamily A member 3, mitochondrial-like isoform X1	1,91	0,93	5,3E-05	3,7E-02
isotig06859	PREDICTED: maternal B9.15 protein-like	1,87	0,91	1,6E-05	2,1E-02
isotig06859	PREDICTED: maternal B9.15 protein-like	1,87	0,90	3,4E-06	7,5E-03
isotig10497	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P	1,85	0,88	1,6E-05	2,1E-02
isotig10497	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P	1,83	0,87	1,6E-06	5,7E-03
isotig16420	PREDICTED: cyclin-dependent kinase inhibitor 1-like isoform X2	1,82	0,87	4,3E-05	3,2E-02
isotig08887	PREDICTED: CD9 antigen-like isoform 2	1,82	0,86	2,7E-05	2,5E-02
isotig08887	PREDICTED: CD9 antigen-like isoform 2	1,80	0,85	3,4E-05	2,8E-02
isotig06140	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102081941 isoform X1	1,77	0,82	3,4E-05	2,8E-02
isotig09921	PREDICTED: kelch-like protein 23 isoform X1	1,75	0,81	2,0E-05	2,3E-02
isotig09921	PREDICTED: kelch-like protein 23 isoform X1	1,72	0,79	2,4E-05	2,4E-02
isotig08470	PREDICTED: protein phosphatase 1K, mitochondrial-like	1,72	0,78	2,5E-05	2,4E-02
isotig07969	<i>Lithognathus mormyrus</i> clone lmos9p09e06 mRNA sequence	1,69	0,76	1,1E-05	1,7E-02
isotig07969	<i>Lithognathus mormyrus</i> clone lmos9p09e06 mRNA sequence	1,68	0,75	7,0E-05	4,4E-02
isotig10497	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P	1,68	0,75	2,6E-05	2,5E-02
isotig12549	PREDICTED: translational activator of cytochrome c oxidase 1-like	1,65	0,72	2,2E-05	2,4E-02
isotig14315	PREDICTED: 28S ribosomal protein S5, mitochondrial-like	1,57	0,65	8,8E-06	1,6E-02
isotig03125	PREDICTED: cytochrome c-type heme lyase-like isoform X1	1,54	0,62	8,8E-05	4,9E-02
isotig19117	<i>Sparus aurata</i> mitochondrial alanine aminotransferase mRNA, complete cds	1,48	0,57	5,7E-05	3,9E-02
isotig19117	<i>Sparus aurata</i> mitochondrial alanine aminotransferase mRNA, complete cds	1,43	0,52	7,6E-05	4,6E-02
isotig06928	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> muscleblind-like (<i>Drosophila</i>) (<i>mbnl1</i>), transcript variant X3, mRNA	-1,49	-0,57	8,5E-05	4,9E-02
isotig14411	PREDICTED: G2/mitotic-specific cyclin-B1-like	-1,58	-0,66	8,5E-05	4,9E-02
IFXJFUR02HW TMS	PREDICTED: cytoskeleton-associated protein 2-like	-1,60	-0,67	7,3E-05	4,5E-02
IFXJFUR02GO B88	<i>Diplodus sargus</i> alpha-amylase 1 mRNA, complete cds	-1,83	-0,87	5,1E-05	3,6E-02
isotig07754	PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> elastin-like (LOC102291789), mRNA	-1,87	-0,91	6,3E-05	4,2E-02
isotig07757	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> hepatic leukemia factor-like (LOC100698155), transcript variant X2, mRNA	-2,28	-1,19	6,8E-05	4,3E-02
isotig09551	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> nuclear receptor subfamily 1 group D member 2-like (LOC101479683), transcript variant X1, mRNA	-2,47	-1,31	1,2E-05	1,7E-02
isotig09551	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> nuclear receptor subfamily 1 group D member 2-like (LOC101479683), transcript variant X1, mRNA	-2,48	-1,31	6,1E-05	4,2E-02
isotig09551	PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> nuclear receptor subfamily 1 group D member 2-like (LOC101479683), transcript variant X1, mRNA	-3,01	-1,59	2,6E-06	6,8E-03
IFXJFUR01CW RVJ	No significant similarities found	3,57	1,83	1,2E-05	1,7E-02
IFXJFUR01B3B TY	No significant similarities found	3,55	1,83	1,8E-06	6,3E-03
isotig12520	No significant similarities found	3,28	1,71	2,4E-05	2,4E-02
IFXJFUR01CW RVJ	No significant similarities found	3,27	1,71	1,0E-05	1,6E-02
IFXJFUR01B3B TY	No significant similarities found	3,22	1,69	1,3E-05	1,7E-02
IFXJFUR01CW RVJ	No significant similarities found	3,19	1,67	2,3E-05	2,4E-02
isotig12520	No significant similarities found	3,19	1,67	2,1E-05	2,4E-02
isotig06806	No significant similarities found	3,01	1,59	2,9E-05	2,6E-02
isotig06806	No significant similarities found	2,92	1,55	2,3E-05	2,4E-02
IFXJFUR01B3B TY	No significant similarities found	2,86	1,52	4,5E-05	3,3E-02
isotig06806	No significant similarities found	2,85	1,51	4,5E-05	3,3E-02
isotig05959	No significant similarities found	2,61	1,39	1,2E-06	4,9E-03
isotig05959	No significant similarities found	2,38	1,25	5,1E-05	3,6E-02
isotig14429	No significant similarities found	2,33	1,22	2,6E-07	1,4E-03
isotig05959	No significant similarities found	2,16	1,11	6,5E-06	1,4E-02
isotig19328	No significant similarities found	1,92	0,94	8,1E-05	4,7E-02
isotig03197	No significant similarities found	1,53	0,61	3,8E-05	3,0E-02
isotig10608	No significant similarities found	-1,50	-0,59	7,8E-05	4,6E-02
IFXJFUR02HL MA9	No significant similarities found	-1,58	-0,66	2,4E-05	2,4E-02
isotig05298	No significant similarities found	-1,87	-0,91	7,6E-05	4,6E-02
isotig05298	No significant similarities found	-1,92	-0,94	6,8E-05	4,3E-02
isotig10298	No significant similarities found	-2,38	-1,25	7,8E-05	4,6E-02
isotig04587	No significant similarities found	-43,28	-5,44	2,9E-05	2,6E-02
isotig04586	No significant similarities found	-54,49	-5,77	4,4E-05	3,3E-02
isotig04587	No significant similarities found	-58,97	-5,88	6,9E-05	4,3E-02

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces alimentados con las dietas M^PH^LL^C y H^PL^LL^C

La tabla 13 muestra el análisis funcional en la categoría de procesos biológicos ($P < 0,01$) de la comparación de expresión diferencial incrementada de genes, en músculo de los peces alimentados con la dieta con contenido medio de proteína y rica en lípidos (M^PH^LL^C) y los alimentados con una dieta rica en proteína y pobre en lípidos y carbohidratos (H^PL^LL^C). Al analizar el listado de términos podemos observar que 108 anotaciones están relacionadas con procesos metabólicos (GO: 0044710), mientras que, si tomamos en cuenta el valor P más bajo y por ende el más significativo, destaca el término ontológico relacionado con el proceso de biosíntesis de nucleósidos trifosfatos (GO: 0009142), para el cual fueron determinadas 12 anotaciones. Entre éstas, podemos nombrar la que codifica para la proteína sodio potasio ATPasa subunidad A isoforma 1, la que experimentó un incremento de 1,9 veces en los peces alimentados con la dieta M^PH^LL^C respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LL^C.

Tabla 13. Resumen de los términos ontológicos asociados a los procesos biológicos con expresión diferencial incrementada, observados al comparar peces alimentados con la dieta M^PH^LL^C con los alimentados con la dieta H^PL^LL^C

ID GO	Término Ontológico	P valor	Nº de anotaciones
GO:0044710	<i>single-organism metabolic process</i>	0,004	108
GO:0055114	<i>oxidation-reduction process</i>	0,002	55
GO:0055086	<i>nucleobase-containing small molecule metabolic process</i>	0,006	27
GO:0006753	<i>nucleoside phosphate metabolic process</i>	0,002	26
GO:0009117	<i>nucleotide metabolic process</i>	0,002	25
GO:0006812	<i>cation transport</i>	0,004	21
GO:0034660	<i>ncRNA metabolic process</i>	0,002	20
GO:0005996	<i>monosaccharide metabolic process</i>	0,003	18
GO:0019318	<i>hexose metabolic process</i>	0,003	17
GO:0009165	<i>nucleotide biosynthetic process</i>	0,005	17
GO:0009259	<i>ribonucleotide metabolic process</i>	0,008	16
GO:0019693	<i>ribose phosphate metabolic process</i>	0,008	16
GO:0009150	<i>purine ribonucleotide metabolic process</i>	0,010	15
GO:0046390	<i>ribose phosphate biosynthetic process</i>	0,003	14
GO:0009260	<i>ribonucleotide biosynthetic process</i>	0,003	14
GO:0006006	<i>glucose metabolic process</i>	0,004	14
GO:1901659	<i>glycosyl compound biosynthetic process</i>	0,004	14
GO:0009163	<i>nucleoside biosynthetic process</i>	0,004	14
GO:0042455	<i>ribonucleoside biosynthetic process</i>	0,004	14
GO:0009141	<i>nucleoside triphosphate metabolic process</i>	0,007	14
GO:0072522	<i>purine-containing compound biosynthetic process</i>	0,007	14
GO:0016052	<i>carbohydrate catabolic process</i>	0,002	13
GO:0044724	<i>single-organism carbohydrate catabolic process</i>	0,002	13
GO:0009152	<i>purine ribonucleotide biosynthetic process</i>	0,003	13
GO:0046129	<i>purine ribonucleoside biosynthetic process</i>	0,004	13

GO:0042451	<i>purine nucleoside biosynthetic process</i>	0,004	13
GO:0015672	<i>monovalent inorganic cation transport</i>	0,006	13
GO:0006164	<i>purine nucleotide biosynthetic process</i>	0,008	13
GO:0009142	<i>nucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	0,001	12
GO:0006007	<i>glucose catabolic process</i>	0,002	12
GO:0019320	<i>hexose catabolic process</i>	0,002	12
GO:0046365	<i>monosaccharide catabolic process</i>	0,002	12
GO:0009145	<i>purine nucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	0,004	11
GO:0009201	<i>ribonucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	0,004	11
GO:0009206	<i>purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process</i>	0,004	11
GO:0006754	<i>ATP biosynthetic process</i>	0,004	10
GO:0016072	<i>rRNA metabolic process</i>	0,007	9
GO:0006364	<i>rRNA processing</i>	0,007	9
GO:0015985	<i>energy coupled proton transport, down electrochemical gradient</i>	0,002	8
GO:0015986	<i>ATP synthesis coupled proton transport</i>	0,002	8
GO:0034220	<i>ion transmembrane transport</i>	0,007	8

El análisis de la expresión diferencial de genes al alza en términos ontológicos relacionados con los componentes celulares, mostrado en la figura 26, indica cambios significativos en la expresión de genes constituyentes del citoplasma (GO: 0044444).

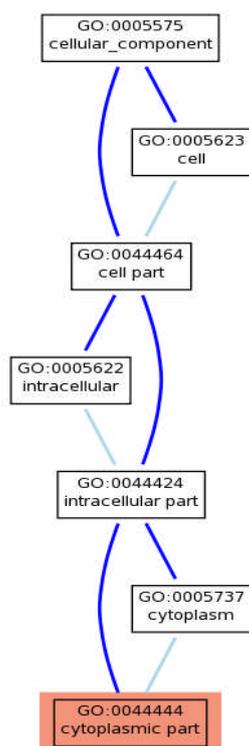


Figura 26. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de los genes con expresión incrementada en el músculo esquelético de peces alimentados con la dieta M^PH^LC respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, indica el grado en que son significativas, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces alimentados con las dietas L^PL^LH^C y M^PH^LC

La tabla 14 representa el análisis funcional en la categoría de procesos biológicos al realizar la comparación de la expresión diferencial de genes (valor *P* sin ajustar) presentes en peces

alimentados con la dieta de baja cantidad de proteínas y alta cantidad de carbohidratos (L^PL^HC) comparados con la dieta de media cantidad de proteína y baja de carbohidratos (M^PL^LC).

Al analizar el listado de términos se observa la presencia de 28 anotaciones relacionadas con procesos biosintéticos (GO: 0009058), los cuales aumentaron su expresión tras alimentación con la dieta L^PL^HC. Por otra parte las anotaciones ontológicas de regulación de procesos biosintéticos celulares y biosíntesis de macromoléculas (GO: 0031326; GO: 0010556) presentaron los valores más significativos, identificando genes como *adenosine deaminase domain-containing protein 1-like* y *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2-like*.

Tabla 14. Resumen de los términos ontológicos asociados a los procesos biológicos con expresión diferencial incrementada, observados al comparar peces alimentados con la dieta L^PL^HC con los alimentados con la dieta M^PL^LC

ID GO	Término Ontológico	Valor P	N° de anotaciones
GO:2000112	<i>regulation of cellular macromolecule biosynthetic process</i>	0,001	13
GO:0010556	<i>regulation of macromolecule biosynthetic process</i>	0,001	13
GO:0031326	<i>regulation of cellular biosynthetic process</i>	0,001	13
GO:0009889	<i>regulation of biosynthetic process</i>	0,001	13
GO:0010468	<i>regulation of gene expression</i>	0,001	13
GO:0031323	<i>regulation of cellular metabolic process</i>	0,001	14
GO:0006355	<i>regulation of transcription, DNA-dependent</i>	0,003	10
GO:2001141	<i>regulation of RNA biosynthetic process</i>	0,003	10
GO:0034645	<i>cellular macromolecule biosynthetic process</i>	0,004	22
GO:0060255	<i>regulation of macromolecule metabolic process</i>	0,004	14
GO:0080090	<i>regulation of primary metabolic process</i>	0,004	14
GO:0019222	<i>regulation of metabolic process</i>	0,004	15
GO:0051252	<i>regulation of RNA metabolic process</i>	0,004	10
GO:0009059	<i>macromolecule biosynthetic process</i>	0,005	22
GO:0009058	<i>biosynthetic process</i>	0,007	28
GO:0044249	<i>cellular biosynthetic process</i>	0,010	26

Los términos ontológicos asociados a los componentes celulares están representados en la figura 27, donde se muestra el análisis funcional en la categoría mediante la comparación de genes que muestran expresión diferencial disminuida (valor P sin ajustar) en peces alimentados con la dieta de baja cantidad de proteínas y alta cantidad de carbohidratos (L^PL^HC) comparados con los observados cuando la dieta suministrada era la de la media cantidad de proteína y alta cantidad de carbohidratos (M^PL^LC).

Los términos ontológicos más representados estadísticamente según la intensidad de color, y en los cuales los productos génicos actúan son: cromosoma (GO: 0005694), partes cromosómicas

(GO: 0044427) y región centromérica del cromosoma (GO: 0000775). Entre los genes representados en estos términos, podemos encontrar los que codifican para la proteína serina/treonina fosfatasa PP1-gama subunidad catalítica A, la aurora quinasa y la proteína cinetocoro NDC80 homóloga.

Por otra parte, en la tabla 15 se presenta la expresión diferencial de genes obtenidos mediante el análisis de *microarrays*. Los valores correspondientes a las intensidades de expresión están indicados como veces de inducción. Para ello, se utilizaron los datos que presentaron un valor *P* normal sin ajustar, observando el incremento de 4,2 veces para el gen que codifica para la proteína única F-box 32 y una disminución de 5,5 veces en el gen que codifica para la proteína colágeno alfa 1 en los peces alimentados con la dieta con baja cantidad de proteína y alta en carbohidratos ($L^P L^H C$), en comparación con la dieta de contenido medio en proteína y baja en carbohidratos ($M^P H^L C$).

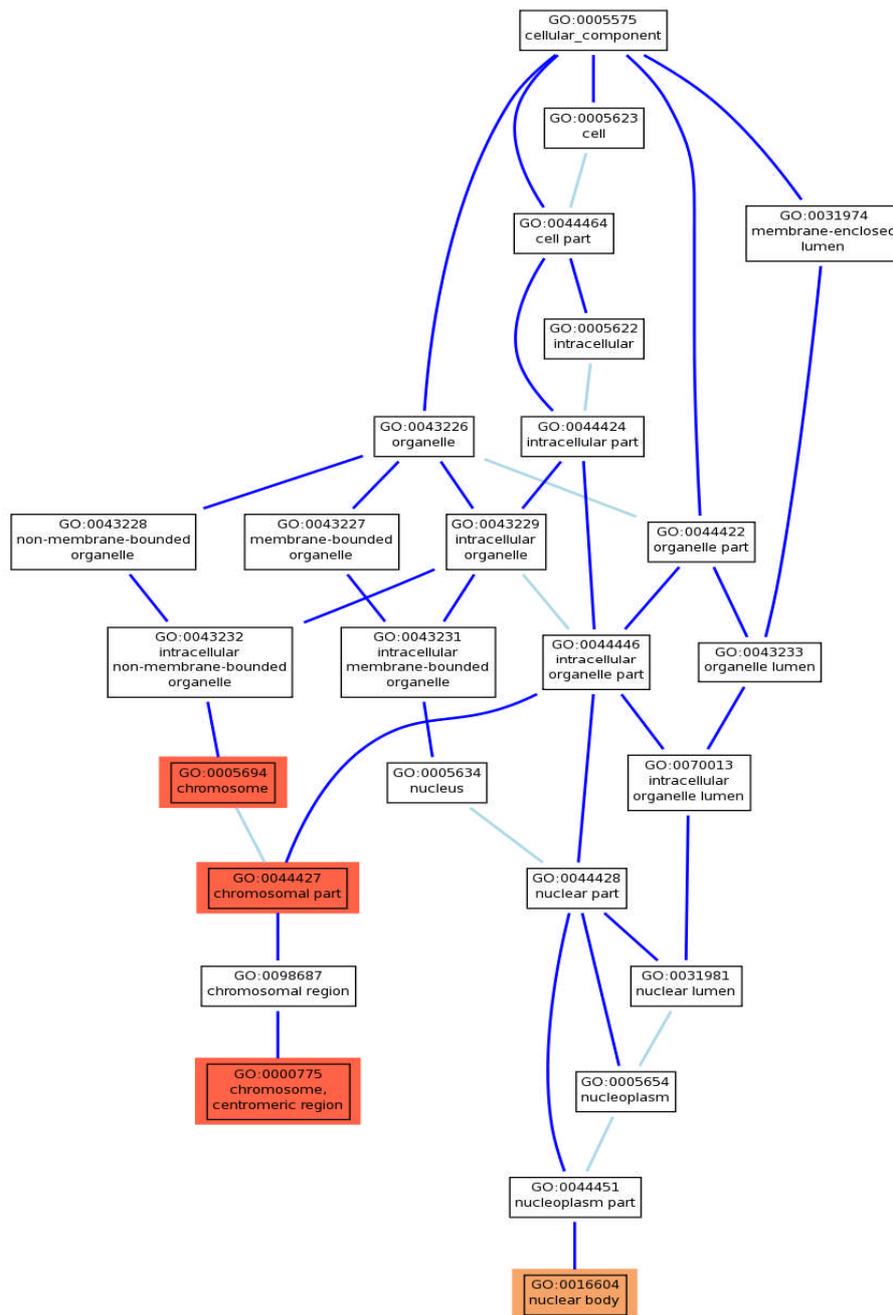


Figura 27. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de los genes con disminución de expresión en músculo esquelético de peces alimentados con la dieta $L^P L^H C$ respecto a los alimentados con la dieta $M^P H^L C$. Las líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles de significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Tabla 15. Expresión génica diferencial mediante el análisis de *microarrays* de músculo esquelético de doradas alimentadas con la dieta L^PL^HC respecto a los peces alimentados con la dieta M^PH^LC. Los valores individuales de cada gen se muestran como niveles de inducción en la expresión.

Nombre sistemático	Descripción del gen	Veces de inducción	log veces de inducción	Valor P	Valor P ajustado
isotig19322	<i>Rachycentron canadum alpha actin-4 gene, complete cds</i>	5,06	2,34	1,0E-05	0,07
isotig06121	PREDICTED: <i>F-box only protein 32-like isoformX1</i>	4,35	2,12	1,5E-06	0,02
isotig00331	PREDICTED: <i>NACT, LRR and PYD domains-containing protein 12-like, partial</i>	4,26	2,09	7,9E-03	0,74
isotig06121	PREDICTED: <i>F-box only protein 32-like isoformX1</i>	4,10	2,03	1,1E-06	0,02
isotig00331	PREDICTED: <i>NACT, LRR and PYD domains-containing protein 12-like, partial</i>	4,05	2,02	1,3E-02	0,79
isotig07266	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus zinc finger and BTB domain-containing protein 16-A-like (LOC100698618), partial mRNA</i>	3,45	1,79	2,1E-03	0,59
isotig07266	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus zinc finger and BTB domain-containing protein 16-A-like (LOC100698618), partial mRNA</i>	3,27	1,71	1,6E-03	0,55
isotig07266	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus zinc finger and BTB domain-containing protein 16-A-like (LOC100698618), partial mRNA</i>	3,24	1,70	1,6E-03	0,55
isotig17429	PREDICTED: <i>cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial-like</i>	2,96	1,57	7,3E-02	0,99
isotig00792	PREDICTED: <i>pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial-like</i>	2,95	1,56	1,3E-01	1,00
isotig11122	PREDICTED: <i>Oplegnathus fasciatus kif9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11</i>	2,70	1,43	9,2E-06	0,07
isotig01182	<i>Lithognathus mormyrus clone lithmor399 mRNA sequence</i>	2,65	1,41	3,1E-03	0,62
isotig13888	PREDICTED: <i>nuclear factor interleukin-3-regulated protein-like</i>	2,49	1,32	3,3E-03	0,63
isotig11122	PREDICTED: <i>Oplegnathus fasciatus kif9 mRNA for Kruppel-like factor 9, complete cds, clone: RB2_F11</i>	2,48	1,31	1,3E-05	0,07
IFXJFUR01CXU9U	<i>Sparus aurata CC chemokine CK3 mRNA, complete cds</i>	2,41	1,27	4,3E-02	0,94
isotig05874	PREDICTED: <i>eukaryotic translation initiation factor 4E type 3-like</i>	2,38	1,25	1,3E-02	0,79
isotig15086	PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D-like (LOC100693394), transcript variant X6, mRNA</i>	2,33	1,22	1,7E-03	0,56
isotig04803	<i>apolipoprotein A-IV4 precursor</i>	-2,37	-1,24	4,5E-02	0,94
isotig06250	<i>hyaluronan binding protein 2 precursor</i>	-2,38	-1,25	6,8E-02	0,98
isotig05071	<i>Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208J2 in linkage group 20, complete sequence</i>	-2,40	-1,26	5,6E-03	0,70
isotig17905	<i>matrix metalloproteinase 9</i>	-2,41	-1,27	6,3E-04	0,46
isotig03434	PREDICTED: <i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like</i>	-2,45	-1,29	4,1E-02	0,94
isotig06478	PREDICTED: <i>biglycan-like isoform X1</i>	-2,56	-1,35	6,5E-04	0,46
isotig03434	PREDICTED: <i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like</i>	-2,65	-1,41	2,3E-02	0,86
isotig17905	<i>matrix metalloproteinase 9</i>	-2,66	-1,41	4,4E-04	0,39
isotig18710	<i>No significant similarities found</i>	-2,71	-1,44	5,6E-02	0,96
isotig17789	PREDICTED: <i>LOW QUALITY PROTEIN: WD repeat-containing protein 55-like</i>	-2,84	-1,51	5,8E-03	0,70
isotig06478	PREDICTED: <i>biglycan-like isoform X1</i>	-2,90	-1,54	9,7E-03	0,76
isotig11178	<i>Diplodus sargus clone 27 5S ribosomal RNA pseudogene region</i>	-2,91	-1,54	5,3E-02	0,95
isotig06478	PREDICTED: <i>biglycan-like isoform X1</i>	-2,95	-1,56	7,4E-03	0,73
isotig15574	PREDICTED: <i>saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein 1-like</i>	-3,07	-1,62	3,0E-02	0,91
isotig15574	PREDICTED: <i>saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein 1-like</i>	-3,07	-1,62	3,5E-02	0,93
isotig04564	PREDICTED: <i>peroxisome assembly protein 26-like isoform X1</i>	-3,08	-1,62	4,0E-02	0,94
isotig15574	PREDICTED: <i>saxitoxin and tetrodotoxin-binding protein 1-like</i>	-3,14	-1,65	3,1E-02	0,91
isotig04564	PREDICTED: <i>peroxisome assembly protein 26-like isoform X1</i>	-3,63	-1,86	1,4E-02	0,79
isotig15911	<i>histone H2B</i>	-4,63	-2,21	1,3E-02	0,79
isotig16015	<i>collagen type X alpha 1</i>	-5,36	-2,42	5,8E-03	0,70
isotig16015	<i>collagen type X alpha 1</i>	-5,58	-2,48	5,9E-03	0,70
isotig16015	<i>collagen type X alpha 1</i>	-5,68	-2,51	4,6E-03	0,66

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces en ayuno y peces alimentados con la dieta H^PL^LC

Al realizar la comparación mediante el análisis de ontología génica entre las condiciones de ayuno y alimentación de los peces con dieta de alto contenido de proteína, podemos observar una gran cantidad de procesos que promueven una regulación génica al alza en los peces mantenidos en ayuno. En la figura 28 se presentan los diversos procesos en los cuales están representadas secuencias obtenidas en el análisis transcriptómico. Entre los términos más destacados podemos observar el relacionado con la actividad transferasa (GO: 0016740) que incluye a su vez varios subgrupos con niveles significativos elevados, como aciltransferasas, metiltransferasas y polimerasas

de DNA y RNA. Por otra parte, el término ontológico relativo a unión a moléculas abarcó una gran cantidad de procesos, que en su totalidad representan 459 anotaciones, entre las que destacan genes de unión a nucleótidos, ácidos nucleicos o iniciación de la traducción.

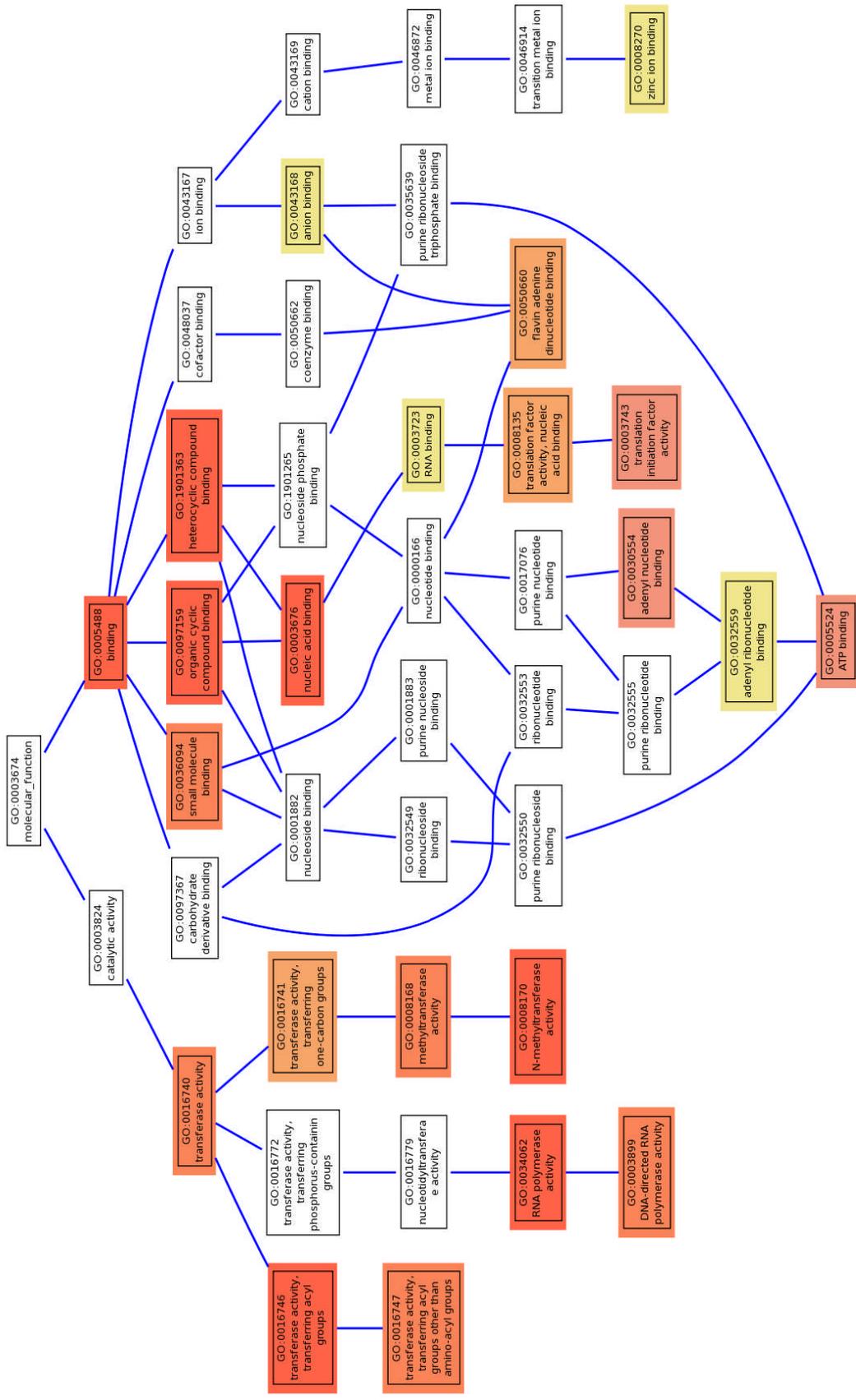


Figura 28. Análisis GO correspondiente a funciones moleculares de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan nive les significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

En relación al análisis para los genes con una expresión diferencial disminuida en el ayuno, podemos observar en la figura 29 que el término relacionado con la actividad antioxidante (GO: 0016209) esta representado de manera significativa en los peces mantenidos en ayuno respecto a los alimentados con la dieta de alto contenido proteico, detectando un total de 12 anotaciones, entre ellas, la proteína reguladora-redox FAM213A isoforma X1. Otro aspecto afectado con disminución de expresión génica incluyó a las proteínas de unión al citoesqueleto (GO: 0008092), proceso estrechamente relacionado con la unión de actina (GO: 0003779) y en el cual se identificaron 23 anotaciones. Entre ellas, genes que codifican para la proteína dineína cadena ligera 2, isoforma X1 (-2,2 veces de inducción) y la proteína anexina A2-B-like isoforma X1 (-1,7 veces de inducción).

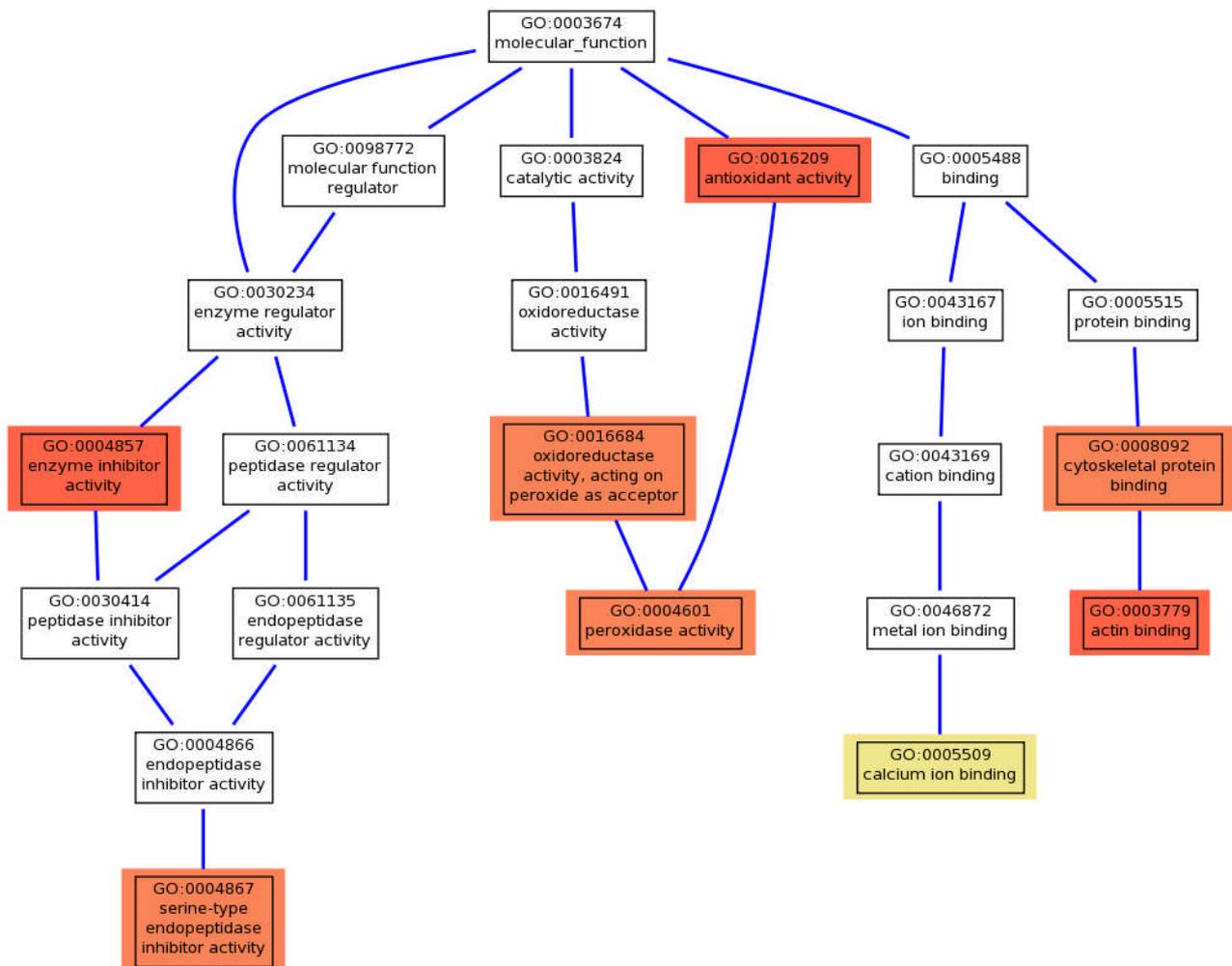


Figura 29. Análisis GO correspondiente a funciones moleculares de genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Al realizar el análisis de ontología génica para los procesos biológicos y comparando los genes que muestran expresión incrementada en ayuno respecto a peces alimentados con la dieta H^PL^LC, en la figura 30 se puede observar la expresión diferencial asociada a procesos metabólicos (GO: 0008152) que incluye procesos metabólicos a nivel celular (GO: 0044237) y procesos metabólicos de sustancias orgánicas (GO: 0071704). El proceso con un alto número de anotaciones identificadas fue el relacionado con los procesos metabólicos de macromoléculas (GO: 0043170) para el cual fueron identificadas 222 anotaciones. Este término incluye varios subgrupos, como procesos metabólicos de RNA (GO: 0016070) y procesamiento de RNA ribosomal (GO: 0006364), asociados a este proceso se identificaron 14 anotaciones, como el gen que codifica para la proteína dimetiladenosina transferase 1 mitocondrial isoform X1 con un incremento de 8 veces, y la proteína factor de producción de ribosoma, que incrementó 2,6 veces.

Tabla 16. Resumen del análisis GO correspondiente a procesos biológicos de genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC.

ID GO	Término Ontológico	Valor P	Nº de anotaciones
GO:0032501	<i>multicellular organismal process</i>	0,008	97
GO:0016043	<i>cellular component organization</i>	0,008	80
GO:0006793	<i>phosphorus metabolic process</i>	0,006	78
GO:0006796	<i>phosphate-containing compound metabolic process</i>	0,006	77
GO:0048856	<i>anatomical structure development</i>	0,006	74
GO:1901564	<i>organonitrogen compound metabolic process</i>	0,001	73
GO:1901135	<i>carbohydrate derivative metabolic process</i>	0,001	54
GO:0019637	<i>organophosphate metabolic process</i>	0,002	41
GO:0055086	<i>nucleobase-containing small molecule metabolic process</i>	0,001	38
GO:1901566	<i>organonitrogen compound biosynthetic process</i>	0,005	33
GO:0006753	<i>nucleoside phosphate metabolic process</i>	0,004	32
GO:1901137	<i>carbohydrate derivative biosynthetic process</i>	0,003	30
GO:0009117	<i>nucleotide metabolic process</i>	0,008	30
GO:1901657	<i>glycosyl compound metabolic process</i>	0,001	26
GO:0009116	<i>nucleoside metabolic process</i>	0,001	26
GO:0090407	<i>organophosphate biosynthetic process</i>	0,009	26
GO:1901293	<i>nucleoside phosphate biosynthetic process</i>	0,002	24
GO:0072521	<i>purine-containing compound metabolic process</i>	0,003	24
GO:0040007	<i>Growth</i>	0,001	22
GO:0009165	<i>nucleotide biosynthetic process</i>	0,003	22
GO:0007010	<i>cytoskeleton organization</i>	0,006	22
GO:0009119	<i>ribonucleoside metabolic process</i>	0,010	21
GO:0046128	<i>purine ribonucleoside metabolic process</i>	0,009	20
GO:0042278	<i>purine nucleoside metabolic process</i>	0,009	20
GO:0072522	<i>purine-containing compound biosynthetic process</i>	0,001	19
GO:0051128	<i>regulation of cellular component organization</i>	0,008	18
GO:0006164	<i>purine nucleotide biosynthetic process</i>	0,003	17
GO:0006006	<i>glucose metabolic process</i>	0,005	17
GO:1901659	<i>glycosyl compound biosynthetic process</i>	0,005	17
GO:0009163	<i>nucleoside biosynthetic process</i>	0,005	17
GO:0042455	<i>ribonucleoside biosynthetic process</i>	0,005	17
GO:0046129	<i>purine ribonucleoside biosynthetic process</i>	0,004	16
GO:0042451	<i>purine nucleoside biosynthetic process</i>	0,004	16
GO:0046390	<i>ribose phosphate biosynthetic process</i>	0,009	16
GO:0009260	<i>ribonucleotide biosynthetic process</i>	0,009	16
GO:0016049	<i>cell growth</i>	0,001	15
GO:0009152	<i>purine ribonucleotide biosynthetic process</i>	0,008	15
GO:0040008	<i>regulation of growth</i>	0,003	14
GO:0009611	<i>response to wounding</i>	0,007	12
GO:0048589	<i>developmental growth</i>	0,001	11
GO:0001558	<i>regulation of cell growth</i>	0,003	11
GO:0045454	<i>cell redox homeostasis</i>	0,006	11
GO:0042060	<i>wound healing</i>	0,009	9
GO:0033333	<i>fin development</i>	0,007	7

Los resultados correspondientes al análisis ontológico de procesos biológicos para genes con expresión disminuida en ayuno en relación a peces alimentados con la dieta H^PL^LC están indicados en la tabla 16. Al analizar el listado de términos afectados se observa que la cantidad de

procesos biológicos relacionados con una disminución en la expresión génica es bastante superior a la cantidad de términos ontológicos basados en genes que presentaron una regulación o expresión positiva. El listado incluye once anotaciones relacionadas con el desarrollo y la regulación del crecimiento celular (GO: 0048589; GO: 0001558) que disminuyeron su expresión en ayuno, como el gen que codifica para la proteína *2-A-like* isoforma 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina, el cual presentó una disminución de 2 veces respecto a los peces alimentados con la dieta H^PL^LC. En esta misma línea y considerando la escasez de desarrollo somático de los peces mantenidos en esta condición, otros procesos estrechamente relacionados con el desarrollo y el crecimiento también se vieron afectados, como es el caso de la organización de componentes celulares (GO: 0016043) para el cual fueron identificadas 80 anotaciones. Entre éstas destacan genes que codifican para la proteína colágeno alfa-1(V) y *formina-like* proteína 3-*like*, las cuales presentaron una expresión génica disminuida en 3,9 y 1,3 veces respecto a la ingesta de dieta rica en proteína. Además, se identificaron 74 anotaciones en el proceso de desarrollo de estructuras anatómicas (GO: 0048856), incluyendo genes que codifican para la alfa-2-macroglobulina-*like* proteína 1-*like* y proteína matriz Gla, los cuales disminuyeron su expresión en 3 y 2,5 veces respectivamente. Por otra parte, en el proceso de crecimiento y organización del citoesqueleto (GO: 0040007; GO: 0007010), se identificó el gen que codifica para la proteína timosina beta-4-*like*, la cual experimentó una disminución de 2,5 veces respecto a la dieta H^PL^LC, además de genes que codifican para la isoforma X1 supervilina y la aurora quinasa B-*like*, las cuales presentaron una disminución de 2,7 y 2,5 veces respectivamente.

El análisis ontológico de los componentes celulares para los cuales la expresión génica fue al alza en los peces mantenidos en condición de ayuno respecto a peces alimentados con la dieta H^PL^LC, se presenta en la figura 31. En dicha figura se encuentran representadas las localizaciones subcelulares en donde se ubican los productos génicos identificados mediante el análisis transcriptómico realizado. Un total de 392 anotaciones fueron identificadas a nivel celular.

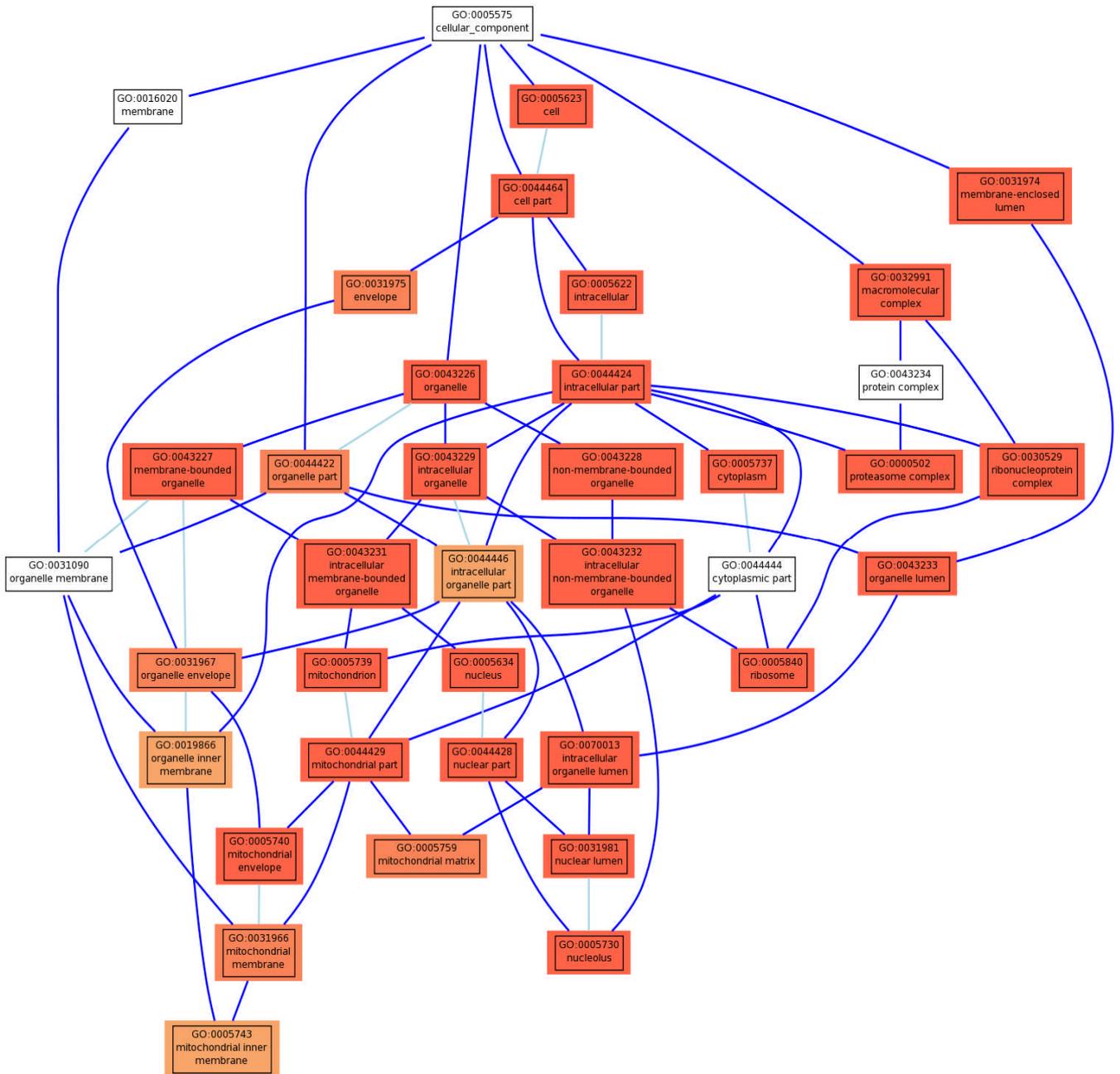


Figura 31. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta H^PL^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces en ayuno y peces alimentados con la dieta M^PH^LC

Análisis de ontología génica tras comparar la expresión génica de peces mantenidos en condición de ayuno con la observada en peces alimentados con una dieta de composición intermedia de proteína, rica en lípidos y pobre en carbohidratos, M^PH^LC. En la figura 32 se indican las categorías de genes que incrementan su expresión, representados en términos de funciones moleculares. Se identificó un total de 382 anotaciones asociados a funciones moleculares como genes implicados en la interacción con ácidos nucleicos y la de unión a compuestos heterocíclicos (GO: 0003676; GO: 1901363). Otra función con una alta representatividad de genes fue la actividad transferasa (GO: 0016740) para la cual fueron identificadas 105 anotaciones con regulación positiva, como los genes que codifican para la enzima tiosulfato sulfurotransferasa-like y dimetiladenosina transferasa 1, mitocondrial-like isoforma X1, que fueron expresadas diferencialmente con 5,7 y 6,5 veces de inducción respectivamente.

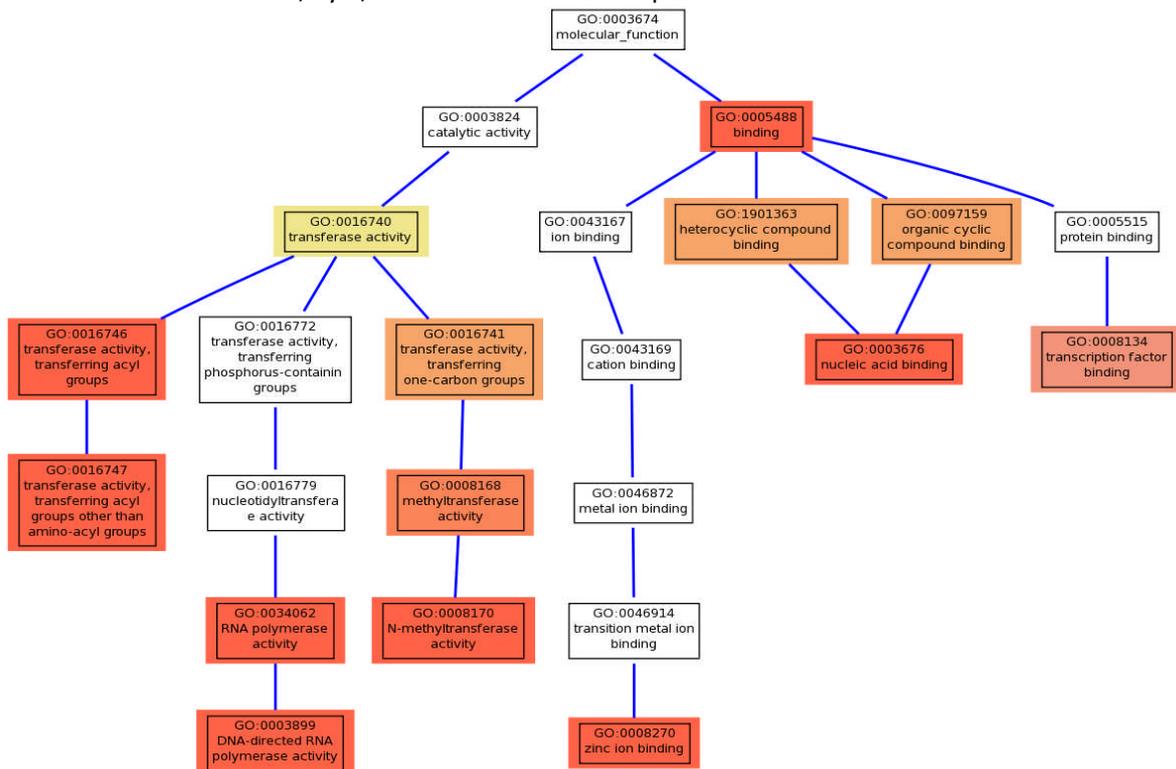


Figura 32. Análisis GO correspondiente de las funciones moleculares en función de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta M^PH^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles de significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Respecto al análisis de genes que presentaron una disminución de expresión en ayuno respecto a la alimentación con la dieta M^PH^LC, en la figura 33 se observa que las funciones relacionadas con la unión a proteínas (GO: 0005515) implicaban 192 anotaciones, por lo que corresponde a la categoría con mayor número de anotaciones. Otra función que presentó una disminución significativa en la expresión de los genes identificados fue la actividad antioxidante (GO: 0016209). Asimismo, el término ontológico relacionado con la regulación de actividad enzimática (GO: 0004857), incluyó un total de 17 anotaciones con expresión disminuida, entre estos podemos mencionar los que codifican para la proteína reguladora redox FAM213A isoforma X1, la proteína peroxiredoxina-4-like y la peroxiredoxina 1, que presentaron una disminución en su expresión génica de 2,4 veces en el caso de las dos primera proteínas mencionadas y 2,6 veces en la peroxiredoxina 1.

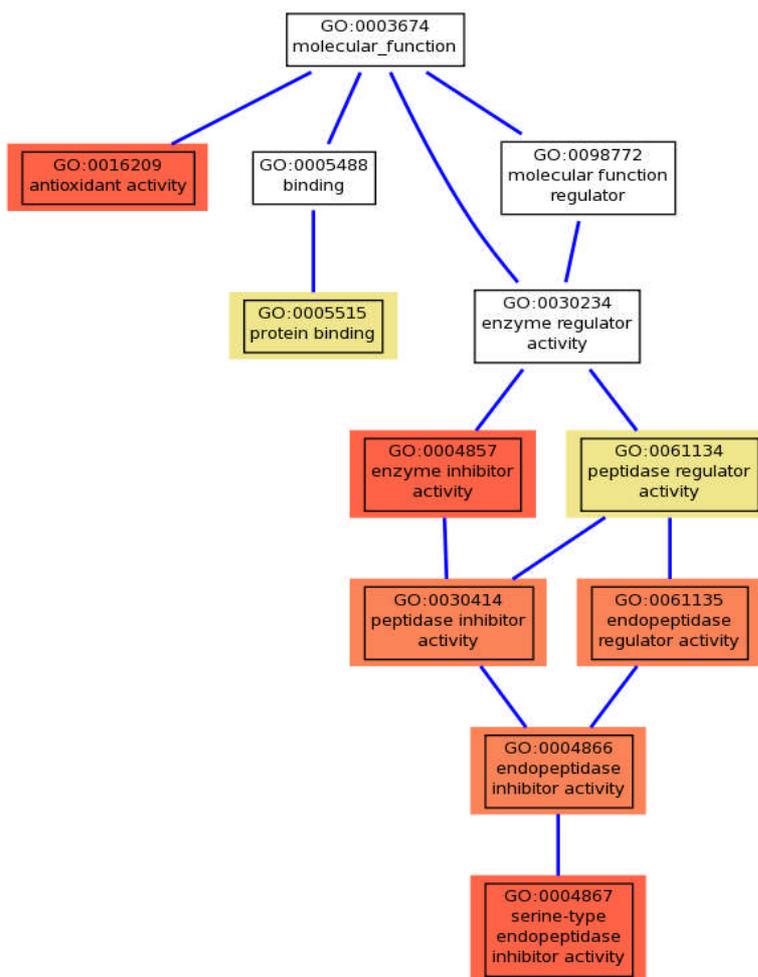


Figura 33. Análisis GO correspondiente de las funciones moleculares en base a genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta M^PH^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, con niveles de expresión significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos

La tabla 17 presenta las categorías ontológicas en relación a procesos biológicos resultantes al comparar la expresión de genes con expresión incrementada en músculo esquelético de peces en ayuno respecto a la de peces alimentados con la dieta M^PH^LC. Podemos destacar el gran número de genes con regulación positiva asociados a procesos metabólicos (GO: 0008152), con 278 anotaciones. Mediante este análisis se han identificado, además, procesos metabólicos celulares (GO: 0044237), con 220 anotaciones, procesos metabólicos asociados al procesamiento de RNA no codificante (ncRNA) (GO: 0034470), 17 anotaciones, y el procesamiento de RNA ribosomal (rRNA) (GO: 0006364), 12 anotaciones.

Tabla 17. Resumen de los términos ontológicos asociados a los procesos biológicos con expresión diferencial incrementada en músculo esquelético al comparar la condición de ayuno y la de alimentación de los peces con la dieta M^PH^LC.

ID GO	Término Ontológico	Valor P	N° de anotaciones
GO:0008152	<i>metabolic process</i>	0,002	278
GO:0044238	<i>primary metabolic process</i>	0,006	228
GO:0044237	<i>cellular metabolic process</i>	0,001	220
GO:0043170	<i>macromolecule metabolic process</i>	0,001	181
GO:0044260	<i>cellular macromolecule metabolic process</i>	0,001	167
GO:0010467	<i>gene expression</i>	0,001	94
GO:0016070	<i>RNA metabolic process</i>	0,001	61
GO:0006396	<i>RNA processing</i>	0,002	27
GO:0022613	<i>ribonucleoprotein complex biogenesis</i>	0,001	19
GO:0034660	<i>ncRNA metabolic process</i>	0,002	19
GO:0030163	<i>protein catabolic process</i>	0,004	18
GO:0042254	<i>ribosome biogenesis</i>	0,001	17
GO:0034470	<i>ncRNA processing</i>	0,001	17
GO:0044257	<i>cellular protein catabolic process</i>	0,007	16
GO:0051603	<i>proteolysis involved in cellular protein catabolic process</i>	0,007	16
GO:0016072	<i>rRNA metabolic process</i>	0,001	12
GO:0006364	<i>rRNA processing</i>	0,001	12
GO:0051173	<i>positive regulation of nitrogen compound metabolic process</i>	0,007	9
GO:0006644	<i>phospholipid metabolic process</i>	0,003	8

En la tabla 18 se muestra el análisis de las categorías ontológicas de los genes que mostraron expresión disminuida en la expresión diferencial al comparar la condición de ayuno y la de alimentación con dieta M^PH^LC. En ella destaca la presencia de genes relacionados con el crecimiento (GO: 0040007) y el ciclo celular (GO: 0007049) identificando 20 y 31 anotaciones respectivamente, como los genes que codifican para la proteína aurora quinasa, la proteína

G2/mitótica-ciclina específica-B1, la proteína de control de división celular y la proteína de mantenimiento estructural del cromosoma, que presentaron una disminución de 2,8; 3; 3,1 y 3,4 veces en comparación con los peces alimentados con la dieta M^PH^LC. Dentro de los términos anotados el que presentó una diferencia significativa mayor (valor $P=0,0003$) fue el relacionado con el cambio conformacional del DNA (GO: 0071103).

Tabla 18. Resumen de los términos ontológicos asociados a los procesos biológicos con expresión diferencial disminuida al comparar la condición de ayuno y la de alimentación con dieta M^PH^LC.

ID GO	Término Ontológico	Valor P	Nº de anotaciones
GO:0044699	<i>single-organism process</i>	0,0079	279
GO:1901564	<i>organonitrogen compound metabolic process</i>	0,0021	65
GO:1901135	<i>carbohydrate derivative metabolic process</i>	0,0022	51
GO:1901566	<i>organonitrogen compound biosynthetic process</i>	0,0064	32
GO:0007049	<i>cell cycle</i>	0,0014	31
GO:1901137	<i>carbohydrate derivative biosynthetic process</i>	0,0018	30
GO:0040007	<i>Growth</i>	0,0017	20
GO:0022402	<i>cell cycle process</i>	0,0092	20
GO:0072522	<i>purine-containing compound biosynthetic process</i>	0,0028	18
GO:0022403	<i>cell cycle phase</i>	0,0077	17
GO:0000279	<i>M phase</i>	0,0021	16
GO:0006164	<i>purine nucleotide biosynthetic process</i>	0,0071	16
GO:0000280	<i>nuclear division</i>	0,0010	15
GO:0048285	<i>organelle fission</i>	0,0017	15
GO:0000087	<i>M phase of mitotic cell cycle</i>	0,0021	14
GO:0007067	<i>Mitosis</i>	0,0021	14
GO:0009611	<i>response to wounding</i>	0,0060	12
GO:0045454	<i>cell redox homeostasis</i>	0,0046	11
GO:0071103	<i>DNA conformation change</i>	0,0003	9
GO:0042060	<i>wound healing</i>	0,0076	9
GO:0007059	<i>chromosome segregation</i>	0,0097	8
GO:0033333	<i>fin development</i>	0,0058	7

Los procesos asociados a los componentes celulares que muestran regulación génica al alza al comparar la condición de ayuno y la de alimentación con dieta M^PH^LC también fueron estudiados y analizados. En la figura 34 se representan los términos ontológicos, para los cuales se identificaron 320 anotaciones relacionadas con componentes celulares (GO: 0005623), incluyendo: componentes intracelulares (GO: 0044424), como el complejo proteosómico (GO: 0000502) implicado en la degradación de proteínas. Para ésta última se identificó la expresión de genes que codifican para la proteína proteosoma 26S subunidad 10-like y la proteína proteosoma subunidad alfa tipo-4, las cuales experimentaron una inducción en su expresión de 3,3 y 2,1 veces respecto a los peces alimentados con la dieta M^PH^LC. Otro de los componentes celulares altamente

representado con una regulación al alza en peces en condición de ayuno es el relacionado con los organelos celulares (GO: 0043226), que presentó como subcomplejos componentes mitocondriales y de la matriz mitocondrial (GO: 0044429; GO: 0005759).

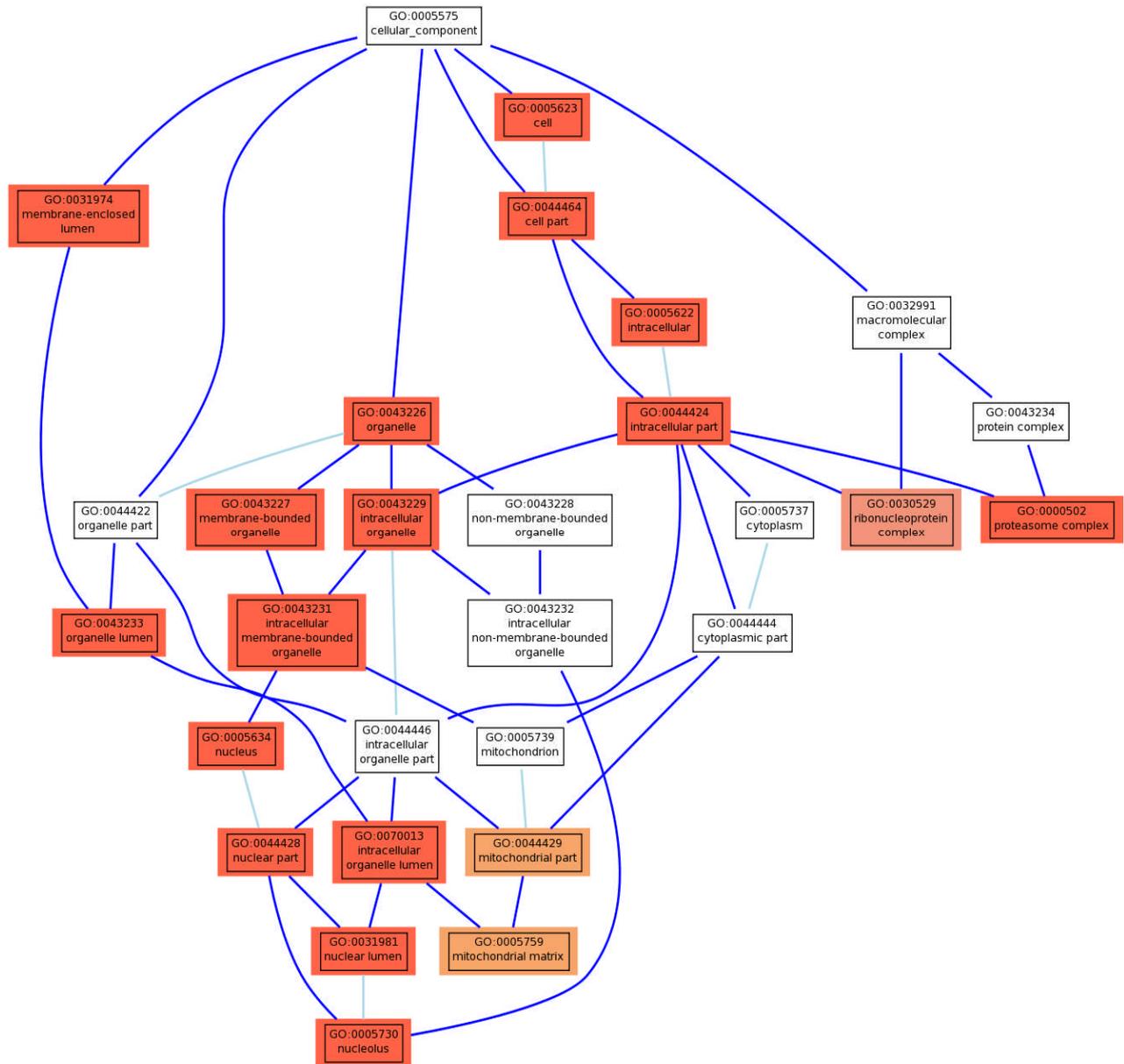


Figura 34. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta M^PH^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Los términos asociados a los componentes celulares con genes que presentaron una regulación negativa en los peces en ayuno en relación a los alimentados con la dieta M^PH^LC están incluidos en la figura 35. Se identificaron 34 anotaciones asociadas con el citoesqueleto (GO: 0005856). Los genes relacionados con este término cumplen varias funciones de importancia en la formación y el mantenimiento de filamentos intermedios, microfilamentos y microtúbulos con fines estructurales así como también con el movimiento y la división celular. Entre los genes identificados en este término GO, se encuentra el gen que codifica para la proteína *BRICK1-like* isoforma 1 y el que codifica para tubulina beta-4 *like*, las cuales presentaron una disminución en su expresión de 2,1 y 2,3 veces en los peces en ayuno.

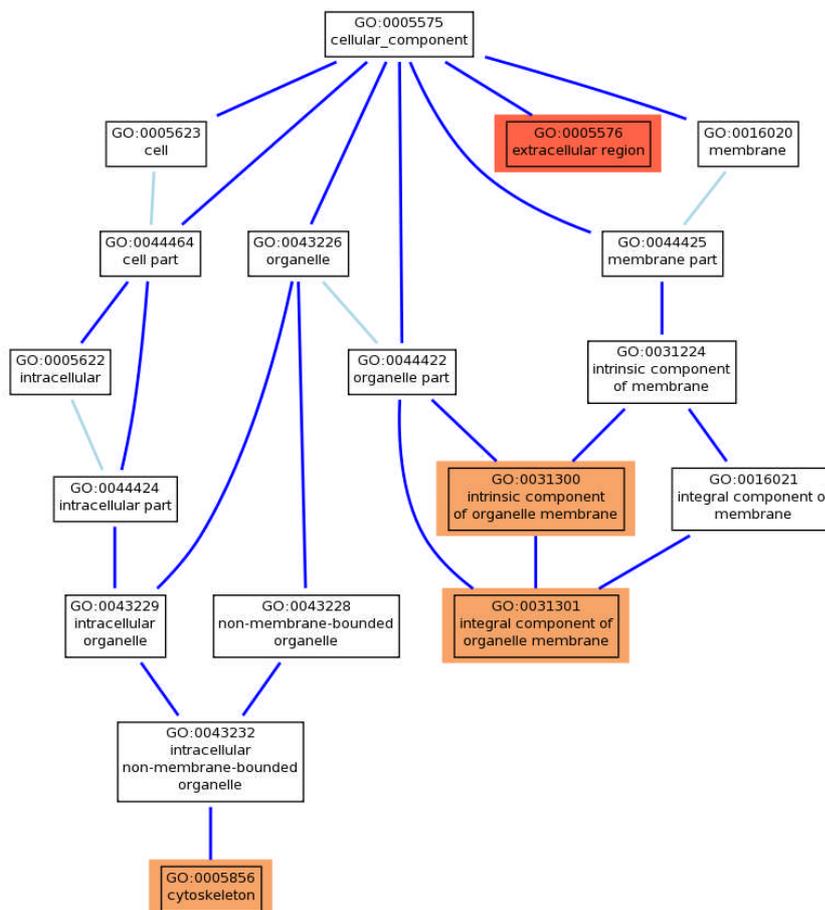


Figura 35. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta M^PH^LC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Análisis funcional de GO correspondiente a la expresión génica en músculo esquelético de peces en ayuno y peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C

El análisis ontológico también fue realizado comparando la expresión diferencial de los genes correspondientes a la comparación entre peces mantenidos en ayuno y peces alimentados con una dieta rica en carbohidratos y pobre en proteínas y lípidos (L^PL^LH^C). Los términos para funciones moleculares asociados a productos génicos al alza en ayuno se encuentran representados en la figura 36. En la figura 33 se puede observar que los términos encontrados son similares a los que se identificaron al realizar la comparativa entre ayuno y alimentación con una dieta de niveles medios de proteína, rica en lípidos y pobre en carbohidratos (M^PH^LL^C). Al realizar la comparativa con la dieta M^PH^LL^C aparecen tres términos adicionales, que corresponden a la unión de iones de zinc (GO: 0008270), con 64 anotaciones, la función molecular de unión de ATP (GO: 0005524) y por último, la función que tiene relación con la actividad helicasa dependiente de ATP (GO: 0008026), cuya principal función es el desnaturalizar el dúplex de DNA o DNA-RNA.

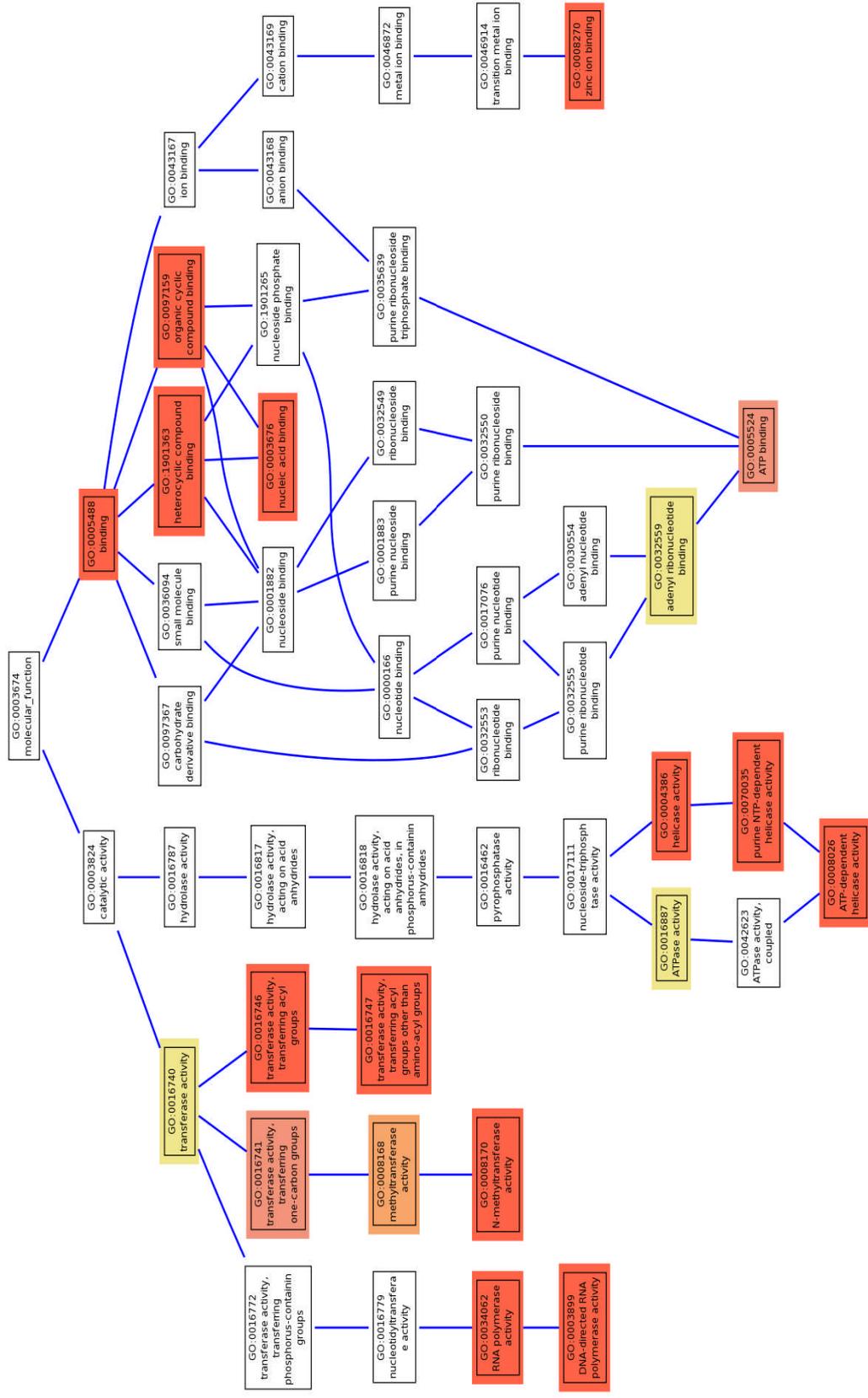


Figura 36. Análisis GO correspondiente a funciones moleculares en función de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo o esqueleto de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L¹L¹C. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que se ñalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Las funciones moleculares analizadas asociadas a genes que presentaban expresión disminuida en ayuno en relación a la alimentación con la dieta L^PL^HC se representan en la figura 37. Los procesos en que se identificó el mayor número de genes regulados correspondieron al término relacionado con la unión a proteínas (GO: 0005515), con los subcomplejos de unión a proteínas del citoesqueleto (GO: 0008092) y la funcionalidad de la actina (GO: 0003779), contabilizando un total de 177 anotaciones. La actividad antioxidante (GO: 0016209) también se vio incluida en la regulación negativa de los genes asociados al término función molecular. En el término unión a proteínas del citoesqueleto (GO: 0008092) podemos destacar la identificación del gen que codifica la proteína anexina A2-B-like isoforma X1 y la proteína dineína cadena ligera 2, citoplasmática isoforma X1, las cuales presentaron una disminución de 2 y 2,1 veces en su expresión.

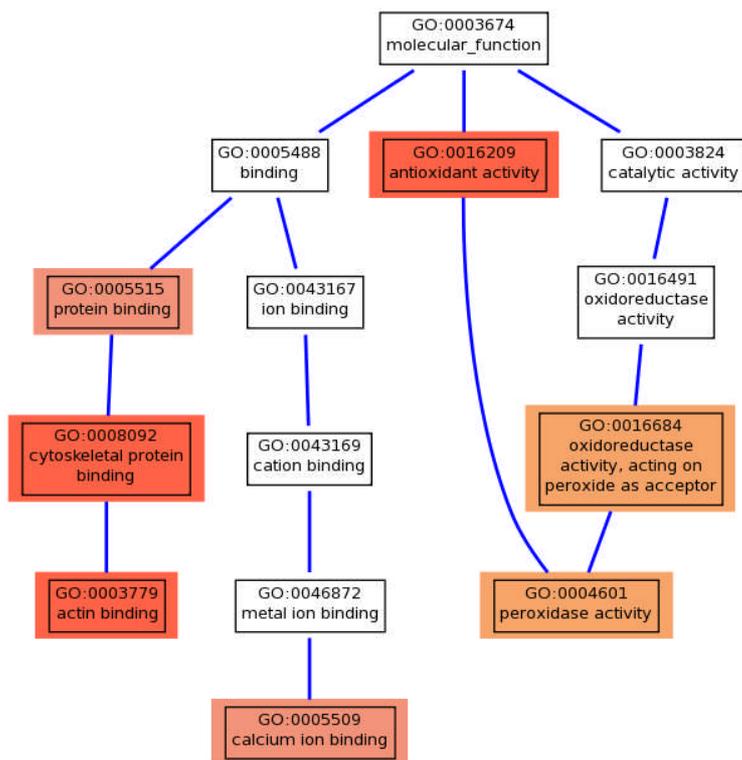


Figura 37. Análisis GO correspondiente a funciones moleculares basado en función de genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L^PL^HC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

En lo que respecta al análisis y representación de los procesos biológicos correspondientes a los genes que presentaron expresión incrementada en ayuno en comparación con la de los peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C (Figura 38), destacan principalmente los procesos metabólicos (GO: 0008152), con 297 anotaciones que incluyen procesos metabólicos a nivel celular (GO: 0044237) y procesos metabólicos primarios (GO: 0044238). De forma similar a lo observado en el análisis realizado al comparar la condición de ayuno frente a los peces alimentados con la dieta con niveles medios de proteína, aparecieron representados los términos relacionados con el procesamiento de RNA no codificante (ncRNA) (GO: 0034470) y RNA ribosomal (rRNA) (GO: 0006364), identificándose un total de 24 anotaciones para dichos términos o procesos biológicos, entre los que identificamos el gen que codifica para la proteína dimetiladenosina transferasa 1 mitocondrial-*like* isoforma X1(6,7), y para la proteína 3 transducina beta-*like* isoforma X1, las cuales incrementaron 6,7 y 3,4 veces respectivamente en peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L^PL^LH^C.

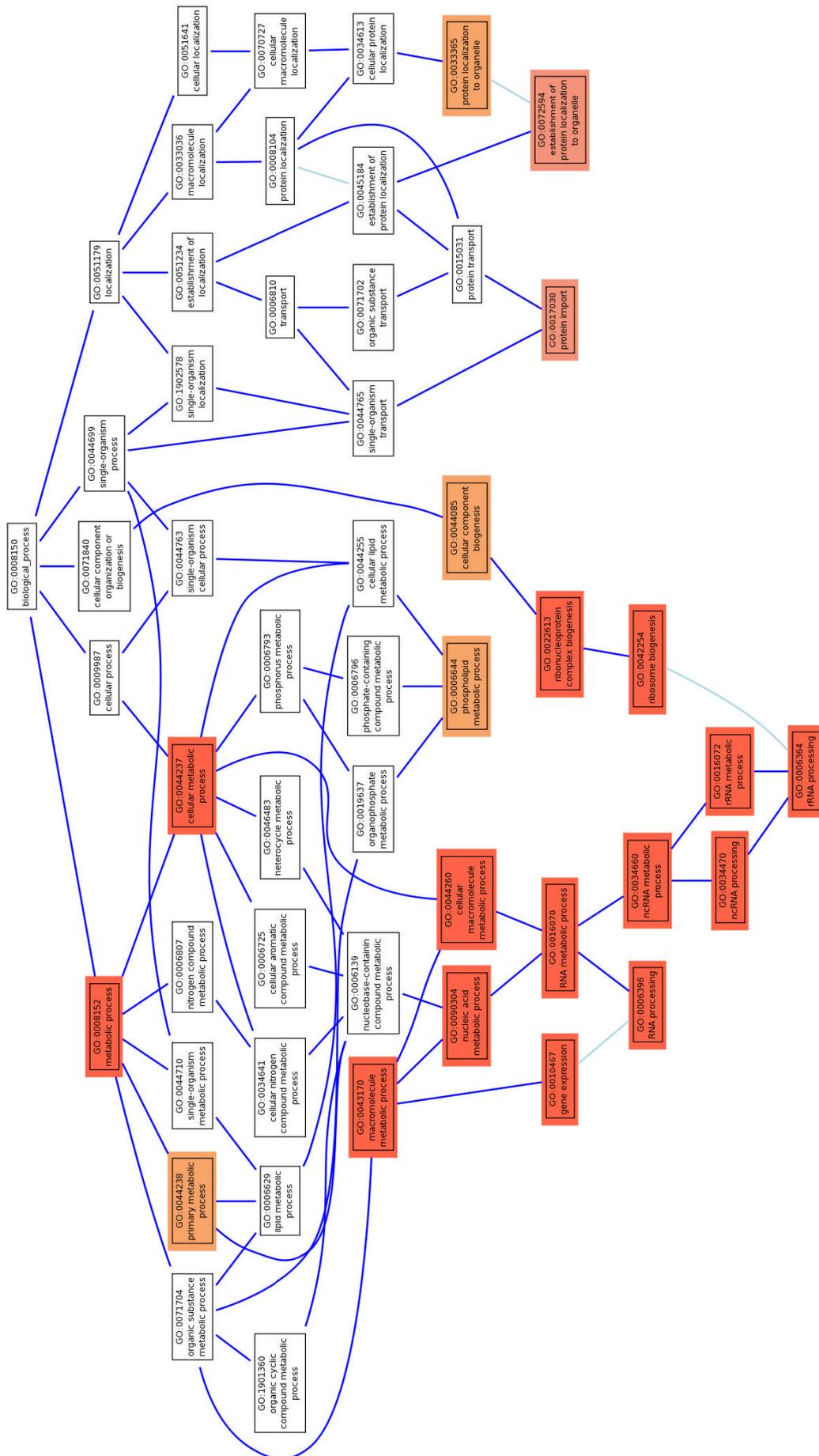


Figura 38. Análisis GO correspondiente de procesos biológicos basado en el análisis de genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L¹L¹H^c. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

El análisis realizado sobre los genes que presentaron expresión disminuida en ayuno vs. alimentación con la dieta L^PL^LH^C se resume en la tabla 19. Se pueden observar genes relacionados principalmente con procesos biológicos como el crecimiento (GO: 0040007), morfogénesis y desarrollo de estructuras anatómicas (GO: 0009653; 0048856), así como también implicados en el desarrollo del sistema circulatorio (GO: 0072359) y en procesos de división nuclear y mitosis (GO: 0000280; 0007067).

Tabla 19. Términos ontológicos asociados a procesos biológicos con genes de expresión disminuida al comparar la condición de ayuno y la de alimentación con la dieta L^PL^LH^C

ID GO	Término Ontológico	Valor P	Nº de anotaciones
GO:0044699	<i>single-organism process</i>	0,0009	260
GO:0032501	<i>multicellular organismal process</i>	0,0021	90
GO:0044707	<i>single-multicellular organism process</i>	0,0027	87
GO:0048856	<i>anatomical structure development</i>	0,0017	69
GO:0044767	<i>single-organism developmental process</i>	0,0042	65
GO:1901564	<i>organonitrogen compound metabolic process</i>	0,0033	59
GO:0048731	<i>system development</i>	0,0039	55
GO:1901135	<i>carbohydrate derivative metabolic process</i>	0,0003	44
GO:0009653	<i>anatomical structure morphogenesis</i>	0,0081	39
GO:0007049	<i>cell cycle</i>	0,0012	29
GO:1901566	<i>organonitrogen compound biosynthetic process</i>	0,0097	29
GO:1901137	<i>carbohydrate derivative biosynthetic process</i>	0,0077	26
GO:0072358	<i>cardiovascular system development</i>	0,0035	21
GO:0072359	<i>circulatory system development</i>	0,0035	21
GO:0040007	<i>Growth</i>	0,0012	19
GO:0009165	<i>nucleotide biosynthetic process</i>	0,0086	19
GO:0001944	<i>vasculature development</i>	0,0008	18
GO:0001568	<i>blood vessel development</i>	0,0008	18
GO:0000279	<i>M phase</i>	0,0066	14
GO:0000280	<i>nuclear division</i>	0,0042	13
GO:0048285	<i>organelle fission</i>	0,0064	13
GO:0000087	<i>M phase of mitotic cell cycle</i>	0,0090	12
GO:0007067	<i>Mitosis</i>	0,0090	12
GO:0045454	<i>cell redox homeostasis</i>	0,0076	10
GO:0048589	<i>developmental growth</i>	0,0064	9
GO:0007059	<i>chromosome segregation</i>	0,0049	8
GO:0071103	<i>DNA conformation change</i>	0,0067	7

Los términos relacionados con la ontología de los componentes celulares están representados en la figura 39, donde se observa una alta representatividad para términos principalmente relacionados a nivel intracelular (GO: 0005622) y de membrana (GO: 0031974). Al comparar la cantidad de términos representados con los realizados en otras condiciones, se puede concluir que el contraste entre ayuno y alimentación con la dieta L^PL^LH^C dio lugar a una mayor cantidad de términos con expresión diferencial significativa: 342 anotaciones fueron identificadas como componentes celulares, de los cuales 313 son de ubicación intracelular (GO: 0044424).

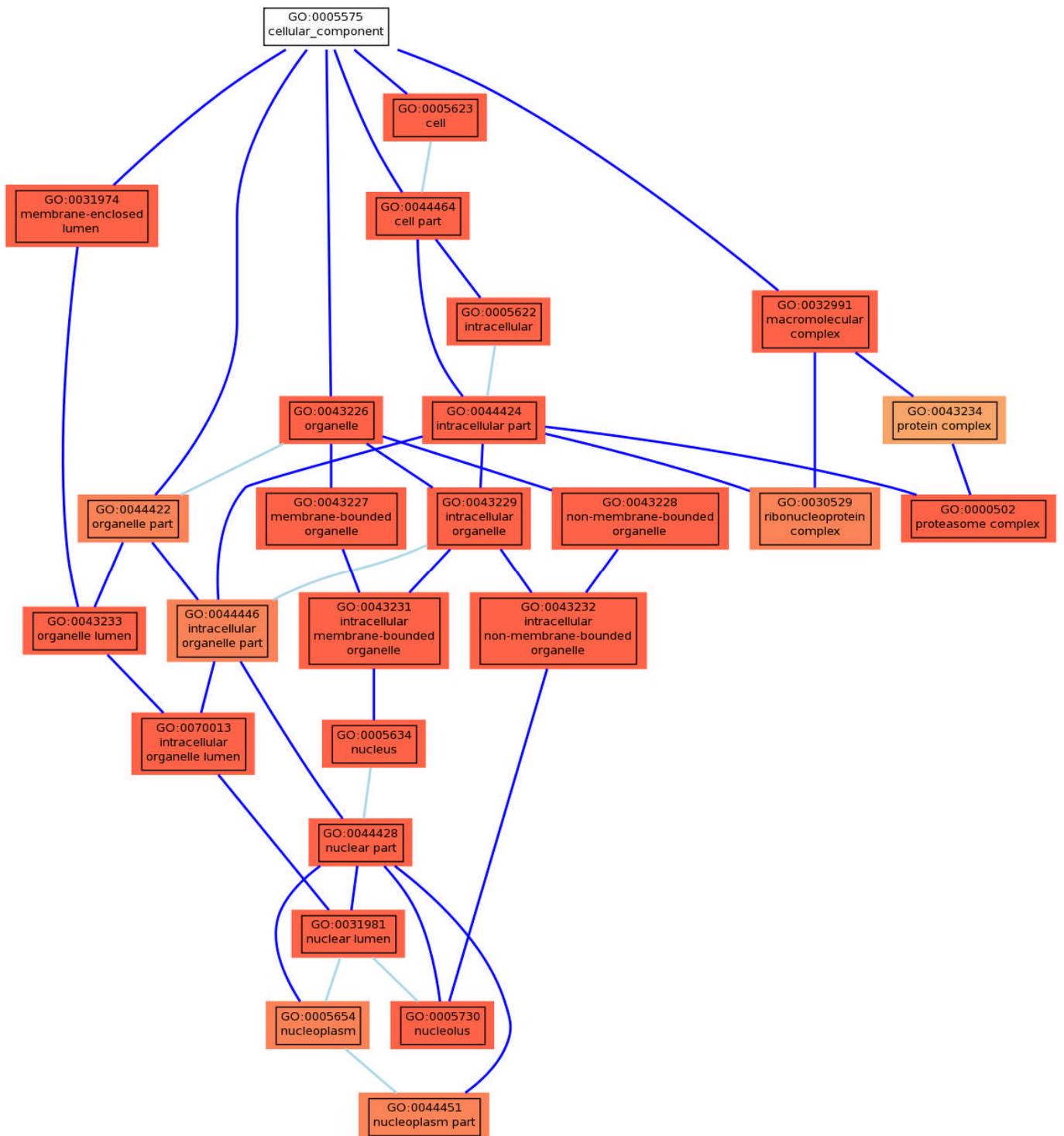


Figura 39. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de los genes con expresión diferencial incrementada en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L^PL^HC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

Los términos ontológicos con expresión diferencial de genes a la baja relacionados con componentes celulares están representados en la figura 40. Se identificaron 199 anotaciones relacionadas con la membrana (GO: 0016020). A su vez, para el término relacionado con la organización y desarrollo del citoesqueleto (GO: 0005856) fueron identificadas 31 anotaciones con expresión génica a la baja, destacando el gen que codifica actina gamma 1, la cual disminuyó en 3,6 su expresión génica.

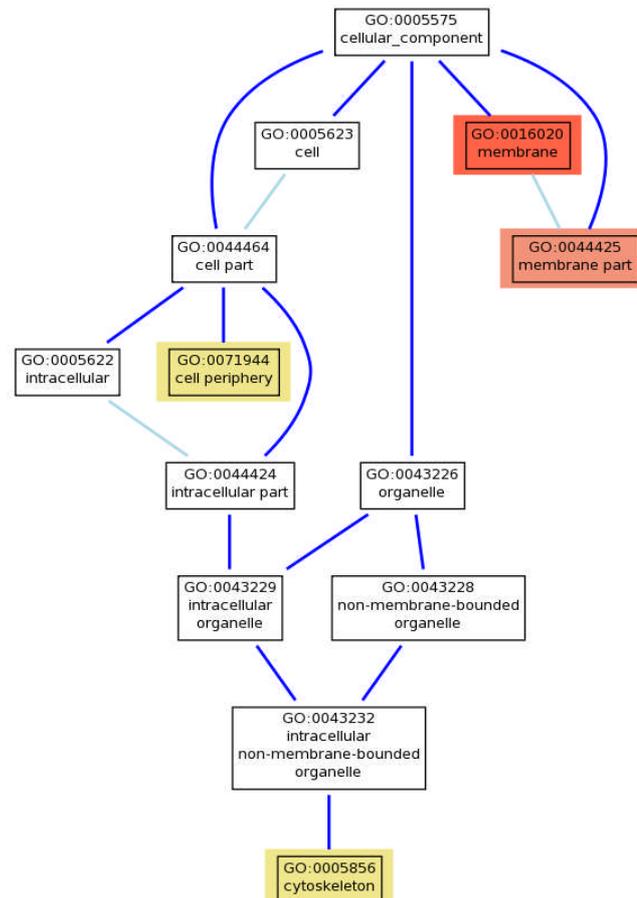


Figura 40. Análisis GO correspondiente a componentes celulares en función de genes con expresión diferencial disminuida en el músculo esquelético de peces en ayuno respecto a los alimentados con la dieta L^PL^HC. Líneas de color azul oscuro muestran los términos relacionados y asociados. Los procesos que son “parte de” están conectados mediante la línea de color celeste. La intensidad de colores de los cuadros que señalan las categorías, representan niveles significativos, siendo los colores más oscuros los más significativos.

4.6 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVE EN EL CRECIMIENTO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN DORADA

Los resultados obtenidos mediante los datos transcriptómicos de músculo esquelético de dorada, han otorgado información valiosa en cuanto a procesos y vías metabólicas implicadas en la regulación de diferentes funciones fisiológicas, por medio de la utilización de herramientas ontológicas, y a través de la base de datos de vías metabólicas KEGG. Debido al carácter general de la

información obtenida de los datos transcriptómicos, y por medio de la utilización de la tecnología de *microarrays* pudimos analizar la expresión génica en diferentes condiciones de alimentación y/o mantenimiento de los peces. Nuestros resultados indican que la mayor cantidad de genes expresados diferencialmente se observó al realizar la comparación de los peces en ayuno frente a los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales, lo cual es esperable debido a las diferencias extremas que presentaron las dos condiciones de mantenimiento. Por otra parte, al comparar y analizar los datos de expresión diferencial entre dietas mediante la GO, fue posible observar la presencia de un menor número de genes comparado con los anotados entre peces en ayuno y alimentados con las tres dietas experimentales. Sin embargo, los resultados dan cuenta de una expresión diferencial en los genes anotados en la GO al comparar las dietas de alto contenido en carbohidratos y baja proporción de proteína y lípidos con la dieta de alta cantidad de proteínas y baja cantidad de lípidos y carbohidratos. Por otra parte, en términos de crecimiento somático los resultados indican una regulación metabólica en función de la presencia de los macronutrientes en las dietas suministradas. El análisis GO de los *microarrays* permite resaltar el efecto del estado nutricional, de manera muy clara en el caso del ayuno, sobre la expresión de genes implicados en crecimiento, desarrollo, morfogénesis y ciclo celular en músculo esquelético de *S. aurata*. Estos cambios fueron corroborados mediante el análisis por RT-qPCR de genes específicos de crecimiento cuyas secuencias fueron obtenidas a partir de nuestros datos transcriptómicos, así como también de las bases de datos públicas.

Nuestros resultados indican que en músculo esquelético de juveniles de dorada, el ayuno y la alimentación con las dietas $H^P L^L C$, $M^P H^L C$ y $L^P L^H C$ durante 23 días (experimento 1) afectaron la expresión de genes relacionados con la familia de MRFs.

4.6.1 Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de MyoD2 y Myf5

El ayuno promovió un descenso significativo de los niveles de mRNA de MyoD2 y Myf5 respecto a los peces alimentados. La expresión del gen MyoD2 en los peces en ayuno descendió un 90 % respecto a los valores observados en los peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$. De manera similar, los peces mantenidos en condición de ayuno mostraron una disminución en la expresión del gen Myf5, mostrando el 68 % de la correspondiente a los peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$. En cuanto al efecto de la composición de la dieta, los mayores niveles de expresión de ambos genes fueron observados en los peces alimentados con las dietas $M^P H^L C$ y $H^P L^L C$. En cuanto a la expresión del gen MyoD2 observamos diferencias significativas entre los peces alimentados con dichas dietas y los que habían sido alimentados con la dieta de baja inclusión de proteína ($L^P L^H C$). Sin embargo, no

se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen Myf5 entre los peces alimentados con los tres tipos de dietas (Figura 41).

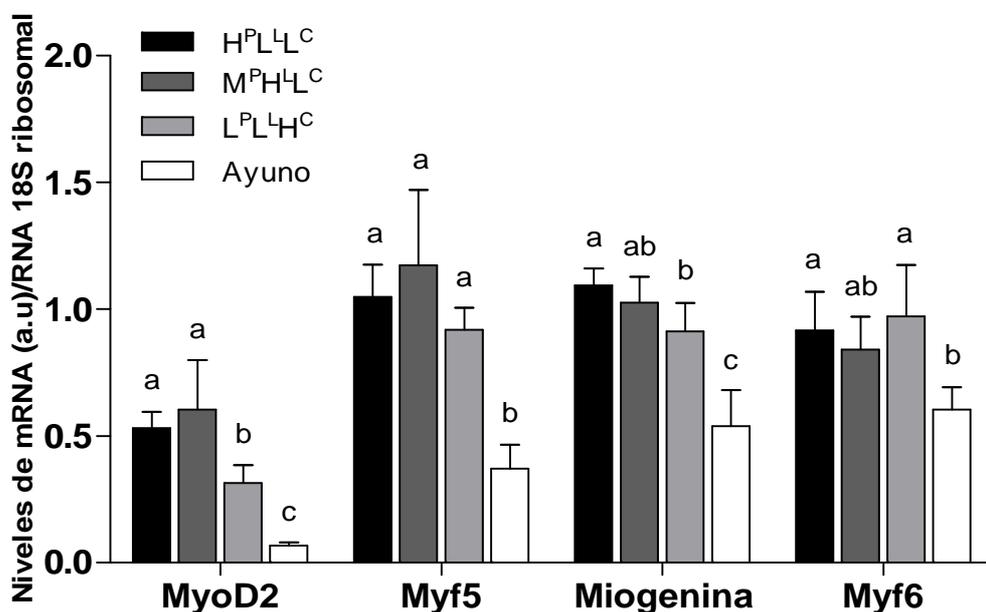


Figura 41. Expresión de MyoD2, Myf5, Miogenina y Myf6 en músculo esquelético de juveniles de *Sparus aurata* en ayuno o alimentados con las dietas H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC durante 23 días. Los niveles de mRNA de cada gen fueron determinados mediante qRT-PCR. El nivel mRNA de cada gen se normalizó utilizando RNA ribosomal 18S. Los resultados se expresan como la media ± DE (n= 4-6 peces). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. u.a.: unidades arbitrarias.

4.6.2 Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de Miogenina y Myf6

Los peces que habían permanecido en ayuno presentaron un descenso en la expresión de miogenina de un 48 % respecto a los alimentados con la dieta de mayor contenido proteico. La expresión génica de miogenina mostró los valores más elevados en músculo de los peces alimentados con la dieta de más alto contenido en proteína (H^PL^LC), siendo el nivel de expresión significativamente diferente al de los peces alimentados con la dieta L^PL^HC. La expresión de miogenina a nivel de mRNA fue un 16 % más elevada en los peces alimentados con la dieta H^PL^LC en comparación con los que ingerían la dieta de bajo contenido proteico (L^PL^HC) (Figura 42).

Los niveles de mRNA observados para el gen Myf6 en los peces alimentados con las diferentes dietas fueron similares. Si bien no se detectaron diferencias significativas entre los valores en peces alimentados con la dieta M^PH^LC y los mantenidos en condición de ayuno, los alimentados con dietas

H^PL^LC y L^PL^HC presentaron una expresión 35 y 38 % superior al de los peces que permanecieron en ayuno (Figura 41).

4.6.3 Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión génica de miostatina y folistatina

Con el fin de identificar genes que pueden modular y estar implicados en la regulación del crecimiento en músculo esquelético de *S. aurata*, se analizó la expresión de Mst y Fst. En la figura 43 se observa que la expresión de Mst disminuyó en peces alimentados con la dieta de niveles medios de proteína M^PH^LC (figura 42A). Siendo esta la dieta que presentó los mejores parámetros de crecimiento. En los grupos de peces alimentados con las dietas H^PL^LC y L^PL^HC, la expresión de Mst fue más elevada que en los peces alimentados con la dieta M^PH^LC, valores un 65 % y 71 % superiores en los peces alimentados con las dietas H^PL^LC y L^PL^HC, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los peces alimentados con la dieta M^PH^LC y los peces en ayuno.

En lo que respecta a la Fst, los peces alimentados con las dietas H^PL^LC y M^PH^LC muestran una expresión más elevada que los alimentados con la dieta L^PL^HC y los peces mantenidos en ayuno (Figura 42B). En los peces en ayuno, los niveles de mRNA fueron un 50 % de los valores observados en el músculo esquelético de los peces alimentados con la dieta H^PL^LC. No se observaron diferencias significativas entre los peces alimentados con la dieta de más bajo contenido en proteína y los sometidos a ayuno ni entre los alimentados con las dietas de contenido alto y medio de proteína.

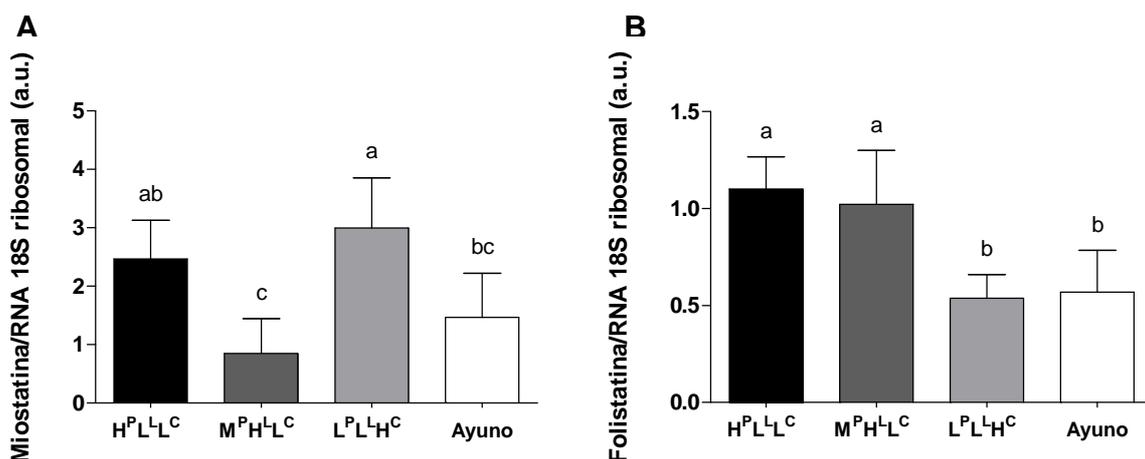


Figura 42. Niveles de mRNA de genes de la superfamilia de factores transformantes de crecimiento- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) en músculo esquelético de *Sparus aurata*:(A) Mst y (B) Fst. Los resultados fueron determinados mediante qRT-PCR. Los niveles de mRNA de los diferentes genes relativo a los niveles de RNA ribosomal 18S se expresan como la media \pm DE en músculo esquelético procedentes de 4

a 6 peces. Letras diferentes sobre las barras de desviación indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. u.a.: unidades arbitrarias.

4.6.4 Efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre los perfiles de expresión génica de los receptores 1 y 2 de GH, IGF-1 y GLUT4

Con la finalidad de determinar el efecto de la composición de la dieta sobre la expresión de receptores de GH, se analizaron los niveles de expresión génica de GHR1 y GHR2. La expresión de ambos genes en músculo esquelético se vio afectada por la composición de la dieta (Figura 43). GHR1 mostró valores de expresión un 41 % más elevado en los peces alimentados con la dieta de mayor contenido de proteínas. Entre las dietas $M^P H^L C$ y $L^P L^H C$ no se observaron diferencias significativas. Los niveles de expresión más bajos correspondieron a los peces mantenidos en ayuno, con un descenso del 75 % respecto a la dieta $H^P L^L C$ (Figura 43A). En relación a la expresión de GHR2, los valores más bajos se detectaron en peces alimentados con dietas de alto y medio nivel de inclusión de proteínas ($H^P L^L C$ y $M^P H^L C$), presentando en ambos casos un descenso en la expresión del 46 % en comparación con los peces alimentados con la dieta $L^P L^H C$. En los peces en situación de ayuno, la expresión de GHR2 mostró valores muy superiores a los observados en los peces alimentados, con niveles de expresión un 75 % superiores a los de los peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$ (Figura 43B).

Asimismo, se determinó el efecto de las diferentes condiciones nutricionales en los niveles de mRNA de IGF-1 en músculo esquelético de *S. aurata*. Los niveles de expresión más elevados se detectaron en peces alimentados con las dietas que mostraron los mejores perfiles de crecimiento, los alimentados con las dietas $M^P H^L C$ y $H^P L^L C$ (Figura 43C). Las doradas que permanecieron en condiciones de privación de alimento experimentaron un descenso significativo en los niveles de mRNA de IGF-1 de un 85 % en relación a los valores de peces alimentados con la dieta $M^P H^L C$.

Por otra parte, los niveles de expresión de GLUT4 más elevados se detectaron en los peces alimentados con la dieta $H^P L^L C$, que presentaban un incremento del 43 % en los niveles de mRNA respecto a de los peces alimentados con la dieta $L^P L^H C$. La expresión de GLUT4 en peces alimentados descendió a medida que disminuía la cantidad de proteína en la dieta. Sin embargo, los valores de expresión en peces en ayuno mostraron niveles similares a los de los alimentados con las dietas $H^P L^L C$ y $M^P H^L C$ (Figura 43D).

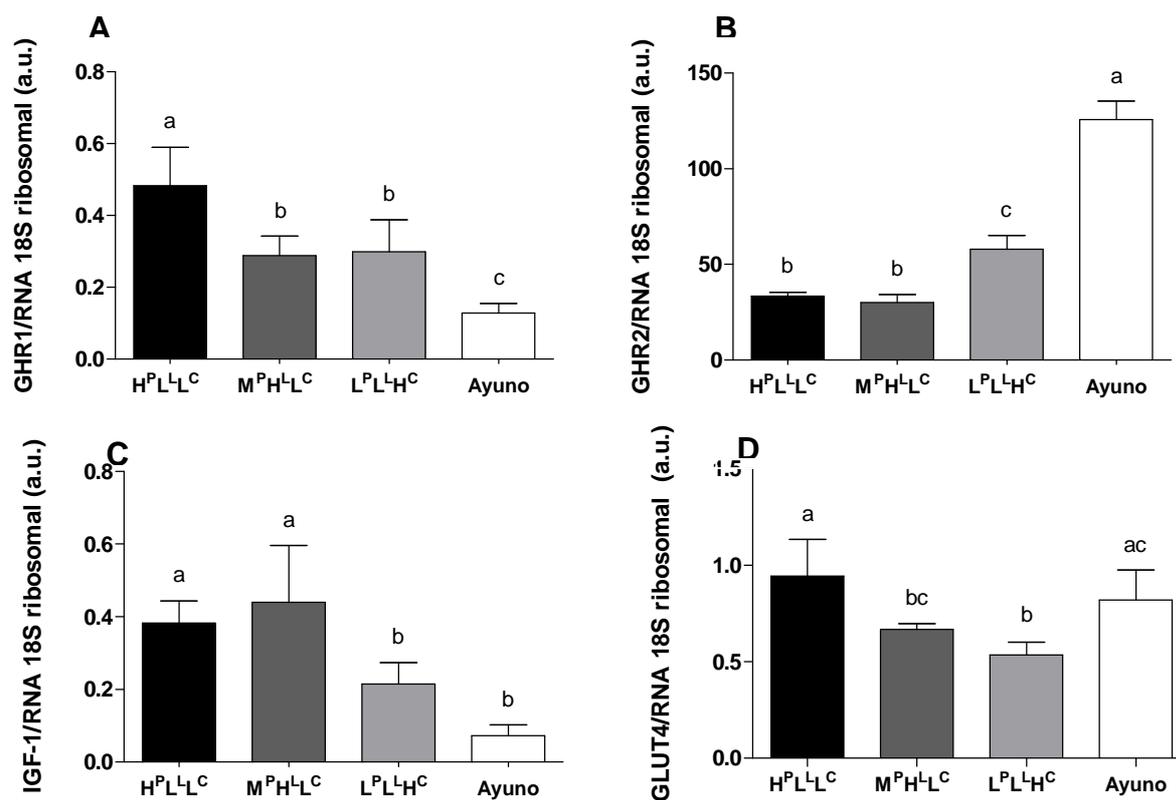


Figura 43. Niveles de mRNA de (A) GHR1, (B) GHR2, (C) IGF-I y (D) GLUT4 en músculo esquelético de *S. aurata*. Los valores fueron determinados mediante qRT-PCR. Los niveles de mRNA de los diferentes genes relativos a los niveles de RNA ribosomal 18S, se expresan como la media \pm DE en músculo esquelético procedentes de 4 a 6 peces. Letras diferentes sobre las barras de desviación indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. u.a.: unidades arbitrarias.

4.6.5. Efecto del ayuno y la composición de la dieta en las vías de señalización Akt/TOR en músculo esquelético

El efecto del estado nutricional y la composición de la dieta se ha estudiado también sobre la regulación de la vía de señalización Akt/TOR. La expresión de mTOR a nivel de mRNA más elevada en músculo de *S. aurata* correspondió a peces alimentados con la dieta de más alto contenido de proteína, mientras que en los peces en situación de ayuno y los alimentados con la dieta L^PL^HC se observaron niveles de mRNA significativamente bajos, 57 % y 51 %, respectivamente, comparados con los detectados tras la ingesta de la dieta H^PL^LC (Figura 44A).

La distribución tisular de mTOR en diferentes tejidos de *S. aurata* fue determinada en bazo, branquias, cerebro, corazón, tejido adiposo, hígado, intestino, músculo esquelético y riñón mediante

RT-qPCR. Los valores de expresión más elevados correspondieron a músculo esquelético seguido de cerebro y corazón, mientras que los más bajos se detectaron en hígado, tejido adiposo e intestino (Figura 44B). Por otra parte, el patrón de expresión de Akt y S6 en músculo esquelético mostró un comportamiento similar al indicado para mTOR (Figuras 44C y D). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de Akt entre peces alimentados y en ayuno. Con la finalidad de validar el comportamiento del efecto de los diferentes tratamientos, se analizó fosforilación y proteína total para Akt y S6 mediante la aplicación de la técnica *Western blot* en músculo esquelético de juveniles de dorada.

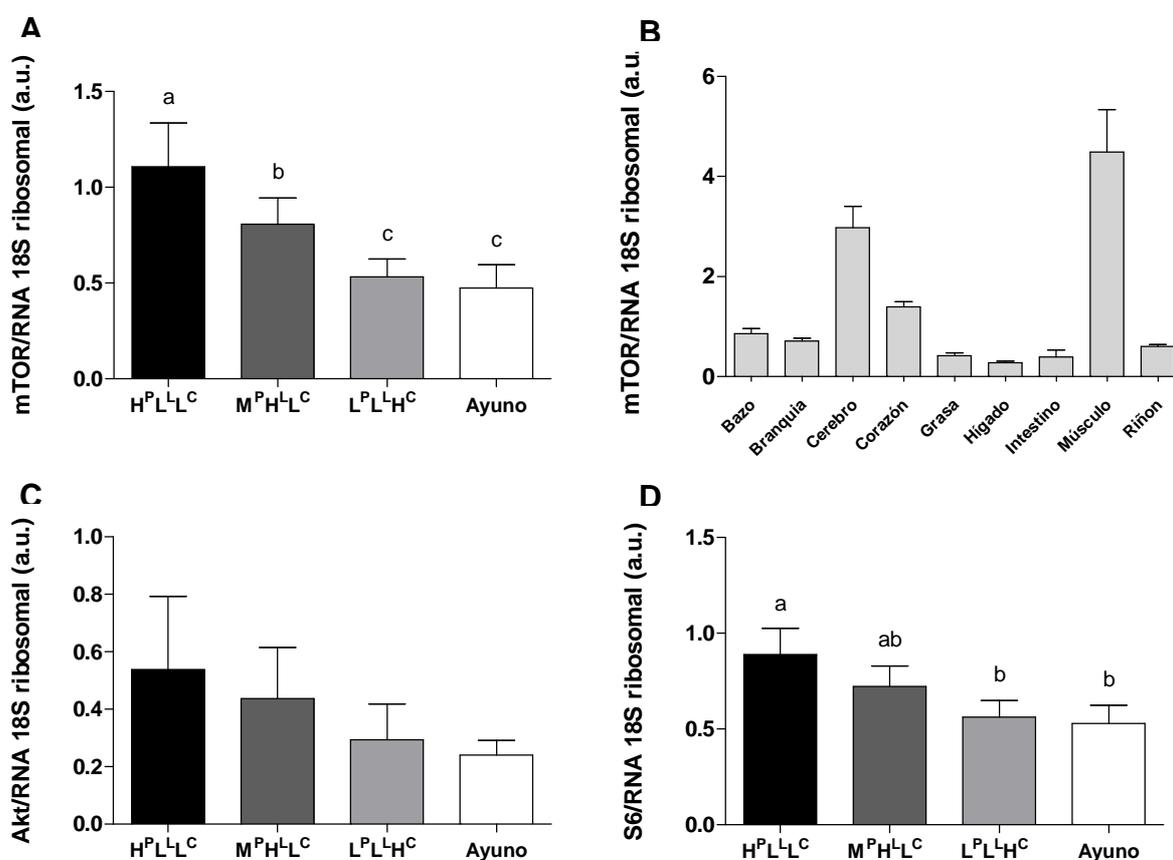


Figura 44. Niveles de mRNA de genes presentes en la vía de señalización Akt/TOR en músculo esquelético de *S. aurata*. (A) mTOR, (B) Expresión de mTOR en diferentes tejidos, (C) Akt y (D) S6. Los valores fueron determinados mediante qRT-PCR. Se presentan los niveles de mRNA de los diferentes genes relativos a los niveles de RNA ribosomal 18S, mediante la media \pm DE para músculo esquelético procedentes de 4 a 6 peces. Letras diferentes sobre las barras de desviación indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. u.a.: unidades arbitrarias.

Como se observa en la figura 45A, los peces alimentados con dietas de contenido alto y medio de proteína (H^PL^LC y M^PH^LC) mostraron un grado superior de fosforilación en la Serina473 de

Akt que los alimentados con la dieta L^PL^LH^C, lo que indicaría mayor activación. Por otra parte, en los peces en ayuno la fosforilación de Akt fue similar a la correspondiente a los alimentados con dietas H^PL^LL^C y M^PH^LL^C. La proteína S6 mostró valores de fosforilación en Serina240/244 significativamente más elevados en los peces alimentados con la dieta M^PH^LL^C que los peces alimentados con las dietas H^PL^LL^C y L^PL^LH^C y los mantenidos en ayuno (Figura 45B). El grado de fosforilación de S6 en Serina240/244 en peces alimentados con las dietas H^PL^LL^C y L^PL^LH^C fueron un 76 y 93 % inferiores al observado en los alimentados con la dieta M^PH^LL^C. Por otra parte, la fosforilación de S6 fue prácticamente indetectable en las muestras procedentes de peces que habían permanecido en ayuno.

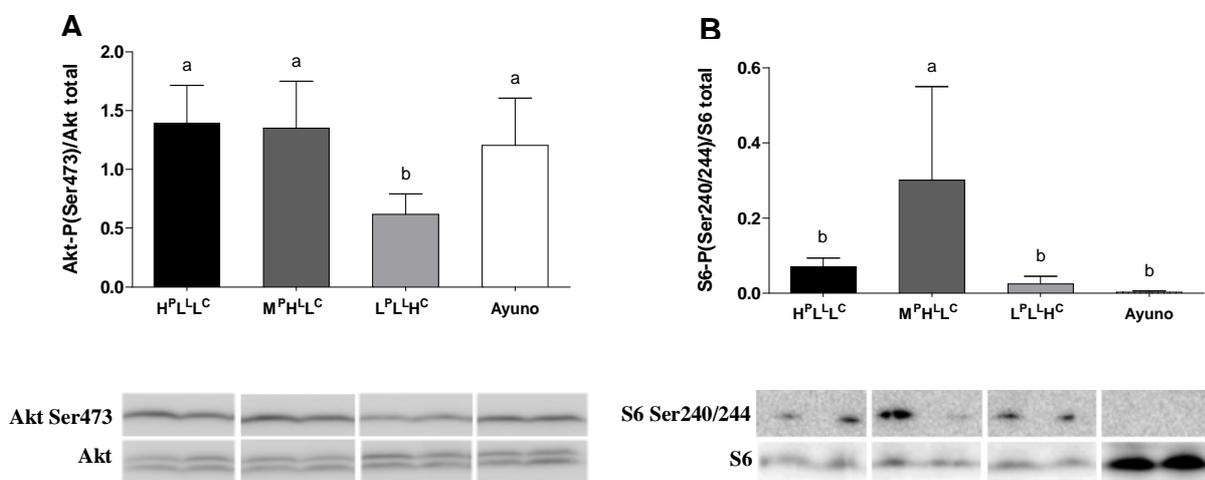


Figura 45. Efecto de la composición de la dieta y el ayuno en la fosforilación de las proteínas Akt y S6, detectada mediante *Western blot* en músculo esquelético de *S. aurata*. En ordenadas se representa la relación entre proteína fosforilada y proteína total. Los resultados corresponden a la media \pm DE (n=4 peces). Letras diferentes sobre las barras de desviación indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. .

4.6.6 Efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión de genes relacionados con autofagia

Después de 23 días de ayuno, los niveles de mRNA correspondientes a los genes *gabarapl1* y LC3B mostraron valores de expresión significativamente incrementados en relación a los peces alimentados con las dietas H^PL^LL^C y M^PH^LL^C. En los peces alimentados con las dieta de bajo contenido de proteína (L^PL^LH^C) los valores fueron similares a los de los peces en ayuno, tratamientos en que los peces mostraron los perfiles de crecimiento más bajos comparado con las otras dietas suministradas. Para ambos genes, se observó que los niveles de expresión fueron más bajos en los peces alimentados con las dietas que promovieron mayor crecimiento de los peces (dietas H^PL^LL^C y M^PH^LL^C)

(Figura 46 A y B), no mostrando diferencias significativas la expresión de *gabap1* y de LC3B en las muestras de peces alimentados con dichas dietas.

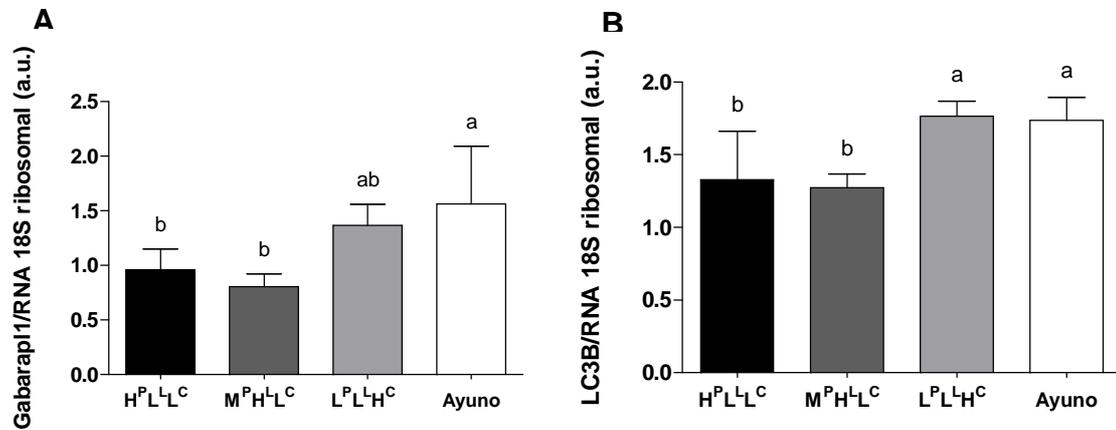


Figura 46. Efecto de la composición de la dieta y el ayuno en la expresión de genes relacionados con autofagia en músculo esquelético de *S. aurata*. (A) *Gabarap1* y (B) LC3B. Los valores fueron determinados mediante qRT-PCR. Los niveles de mRNA de los genes son relativos a los niveles de RNA ribosomal 18S, siendo expresados como la media \pm DE en músculo esquelético procedentes de 4 a 6 peces. Letras diferentes sobre las barras de desviación indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las diferentes condiciones. u.a.: unidades arbitrarias.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 TRANSCRIPTOMA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA

En los últimos años, las investigaciones y la comprensión del transcriptoma asociado a las distintas etapas del desarrollo y condiciones de crecimiento de diferentes especies de organismos que no representan modelos de experimentación han crecido enormemente. En esta línea, estudios a nivel genómico y transcriptómico relacionados con las condiciones nutricionales han sido realizados en algunos peces teleósteos, como es el caso del bacalao del Atlántico (*Gadus Morhua*) (Morais *et al.*, 2012), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (De Santis *et al.*, 2015), y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Olsvik *et al.*, 2013).

En *S. aurata* son escasos los trabajos transcriptómicos relacionados con el efecto del estado nutricional. Garcia de la Serrana *et al.* (2012) estudiaron el transcriptoma en el músculo esquelético de doradas adultas y juveniles. Estos últimos, mantenidos en acuarios a diferentes temperaturas (21, 11 y 33 °C) y alimentados con una dieta comercial. El presente estudio, representa la primera caracterización transcriptómica realizada, mediante la plataforma de pirosecuenciación 454, de una biblioteca de cDNA normalizada construida a partir de RNA total aislado de muestras de juveniles de *S. aurata* en ayuno y alimentados con dietas de diferente composición nutricional.

En el presente estudio, hemos obtenido 691433 lecturas de elevada calidad a partir de dos rondas de secuenciación de sendas bibliotecas de cDNA normalizadas de músculo esquelético de dorada. La realización de dos rondas obedeció a que el *run 1* generó un número y tamaño de lecturas bastante limitado, probablemente debido a la utilización por parte del servicio de secuenciación de un protocolo para el que no tenían experiencia previa. Ante esto, se realizó una segunda ronda de secuenciación (*run 2*) utilizando el protocolo correspondiente a una versión del *kit* de la casa comercial Evrogen (Moscú, Rusia), para el que sí tenían experiencia previa, y con el cual se obtuvieron resultados muy mejorados y de elevada calidad. De esta manera, el número de lecturas que proporcionó el *run 2* fue un 93% mayor que el *run 1*. El número de pares de bases leídas del *run 2* fue superior en un 80% respecto al *run 1*. Sin embargo a pesar de presentar una cobertura limitada, la calidad de los datos obtenidos en el *run 1* permitió su uso y análisis en conjunto con los datos del *run 2*. La longitud promedio de nuestras secuencias considerando ambas rondas de secuenciación (*run 1 + run 2*) en la etapa previa a la eliminación de oligonucleótidos y adaptadores fue de 399 pb, valor superior al promedio de los tamaños de secuencias reportados para peces, como 345 pb para trucha arcoíris (*O. mykiss*) o 317,8 pb para rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Salem *et al.*, 2010; Pereiro *et al.*, 2012). Nuestros resultados en el *run 2* (508 pb) fueron similares a los presentados por

Chen *et al.* (2015) en pez gato (*Pelteobagrus fulvidraco*), que indican un tamaño promedio en las secuencias de 449,5 pb.

En un trabajo realizado por Calduch-Giner *et al.* (2013) con *S. aurata* alimentadas con una dieta comercial, se analizó el transcriptoma de diversos tejidos, entre los cuales en músculo esquelético la longitud media de las secuencias obtenidas, previo al ensamblado, fue de 294 pb, valor significativamente menor al observado en nuestro estudio. Cuando dichos autores analizaron el tamaño de las secuencias obtenidas después de realizar el proceso de ensamblado, que tiene como finalidad alinear los múltiples fragmentos obtenidos en el proceso de pirosecuenciación, la longitud promedio de las secuencias que obtuvieron fue de 968 pb. Esta longitud es similar a la obtenida por Garcia de la Serrana *et al.* (2012), quien en juveniles de *S. aurata* alimentados con una dieta comercial y mantenidos en acuarios a una temperatura de 21 °C obtuvieron una longitud media de 936 pb. En nuestros estudios con *S. aurata*, la longitud media de los *contigs* fue de 1281 pb para el transcriptoma de músculo esquelético y de 1237 pb para el transcriptoma incrementado híbrido. En el caso de los *isotigs*, nuestros resultados indicaron una longitud promedio de 1390 pb en músculo y 1330 en el híbrido. Garcia de la Serrana *et al.* (2012) reportaron un valor N50, longitud en pb de al menos el 50 % de las secuencias ensambladas, de 1269 pb. En otras especies, en las cuales se ha utilizado la plataforma de secuenciación 454 se han reportado valores de N50 variables. Por ejemplo, Pereiro *et al.* (2012) determinaron una N50 de 756 pb en rodaballo, mientras que Garcia de la Serrana y Johnston, (2013) reportaron un valor N50 de 1891 pb en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) transgénico. En nuestro estudio la N50 determinada para los *contigs* fue de 1390 pb para músculo y 1377 pb para el híbrido. Por otra parte, la N50 de los *isotigs* fue 1491 pb para músculo y 1315 pb para hígado. Contrastando los resultados reportados por diversos autores, para diversas especies, nuestros valores indican que el ensamblado de nuestras secuencias es de elvada calidad.

Por otra parte, Garcia de la Serrana *et al.* (2012) y Calduch-Giner *et al.* (2013) reportan valores inferiores a los obtenidos en nuestros estudios en lo que respecta al número total de lecturas determinadas, 439734 y 447166 respectivamente. Sin embargo, es posible encontrar valores muy dispares en los estudios realizados en otras especies de peces, como carpa común (*Cyprinus carpio*) en la cual fueron obtenidas 2116226 lecturas (Ji *et al.*, 2012) y solea senegalense (*Solea senegalensis*) para la cual se obtuvieron 3774412 lecturas. En el caso de la carpa se analizaron 12 tipos de tejidos diferentes en un mismo *pool*, y en el de solea se realizó un *pool* de tejidos relacionados con el sistema inmune, la capacidad de osmorregulación y el sistema reproductor.

Del total de las secuencias obtenidas en este estudio, después de eliminar oligonucleótidos de secuenciación y adaptadores, el 70 % fueron ensambladas. Este porcentaje es similar al obtenido en

S. aurata por Calduch-Giner *et al.* (2013) y superior al reportado por Garcia de la Serrana *et al.* (2012) que lograron ensamblar el 43 % de las secuencias obtenidas. Sin embargo, a diferencia de dorada, en otras especies de peces se ha ensamblado un porcentaje mayor de secuencias, pudiendo llegar hasta el 88% (Chen *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, un total de 4799 *isotigs* del transcriptoma de músculo esquelético de dorada fueron asignados a una categoría ontológica (GO). En la categoría ontológica de función molecular, en el transcriptoma muscular observamos que las subcategorías más representadas fueron unión a proteínas, con un 25 % de las secuencias anotadas, unión a nucleótidos (13 %), actividad hidroxilasa (12 %) y actividad transferasa (12 %). Resultados similares fueron descritos por Garcia de la Serrana *et al.* (2012) para dorada en la categoría de función molecular (unión a proteínas, 35 %; unión a nucleótidos, 13 %; actividad hidrolasa, 13 %; y actividad transferasa, 10 %).

El análisis KEGG llevado a cabo con nuestros datos transcriptómicos reveló una alta representación de secuencias que codifican para enzimas relacionadas en el proceso de fosforilación oxidativa, metabolismo de purinas, señalización del receptor de células T y la vía de la glucólisis/gluconeogénesis. La diversidad de rutas y procesos metabólicos observados en este estudio puede ser explicado por las diferentes condiciones de mantenimiento de las doradas: ayuno prolongado y alimentación con dietas de diferente composición de nutrientes. Posiblemente, las diferentes condiciones nutricionales causan una respuesta adaptativa en el músculo esquelético de juveniles de *S. aurata*, promoviendo procesos como la reparación tisular, la organización del citoesqueleto y el crecimiento (Calduch-Giner y Davey, 2010). Estas respuestas, además de considerar que el músculo esquelético es un tejido con elevada demanda energética (Kunz, 2001), se reflejan en la mayoría de los términos relacionados con los procesos biológicos analizados en GO, como es el caso de procesos de oxidación-reducción, así como en la alta representación de transcritos que participan en el proceso de fosforilación oxidativa.

A fin de validar la utilidad de la información genómica obtenida por secuenciación del transcriptoma de doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales, nos propusimos determinar el efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre la expresión de genes implicados en la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa y translocación de ATP desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana en músculo esquelético de dorada. En el momento en que se realizaron estos estudios, no se disponía de información genómica previa en las bases de datos para ninguno de los genes analizados a tal fin en esta tesis, consecuencia de la escasez de información genómica pública disponible para la dorada.

En mamíferos, la regulación y la importancia de la actividad mitocondrial ha sido ampliamente estudiada (Zong *et al.*, 2002; Gnaiger, 2009). En ratas de Lange *et al.* (2006) observaron un incremento en la fosforilación de AMPK después de seis horas de privación de alimento. En este sentido, AMPK es considerada un regulador central del metabolismo celular en eucariotas, que resulta activada cuando la producción de ATP disminuye (Carling, 2004). En respuesta a cambios energéticos la AMPK promueve las vías catabólicas que son capaces de generar ATP, e inhibe las vías anabólicas que son consumidoras de energía (Jornayvaz y Shulman, 2010; Mihaylova y Shaw, 2012). Se ha demostrado que la activación de AMPK en el músculo esquelético es un precursor del incremento del citocromo C, transportador electrónico mitocondrial. También se ha reportado un aumento en el número de mitocondrias (Bergeron *et al.*, 2001; Jäger *et al.*, 2007).

En peces teleósteos, Fuentes *et al.* (2013) estudiaron la implicación de leptina, AMPK y la fosforilación oxidativa en el metabolismo celular y el crecimiento del músculo esquelético de *Paralichthys adspersus*. Después de someter los peces a diferentes periodos de ayuno y realimentación, los autores reportaron un incremento en la cantidad de proteína citocromo C oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria) y de la ATP sintasa durante el transcurso de la tercera semana de ayuno. Por otro lado, la expresión de NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) presentó valores variables en cada semana tanto en peces en ayuno como en los realimentados. En otro estudio realizado en ratones tratados con β -guanidinopropionico, el cual provoca una reducción en la relación ATP/AMP intramuscular y simula un estado fisiológico de deficiencia energética, se observó un aumento en la cantidad de proteína citocromo C por *Western blot* (Zong *et al.*, 2002). Estos estudios van en la misma dirección de lo observado en nuestros resultados con respecto a la regulación positiva del citocromo C oxidasa en condiciones de ayuno.

Recientemente Bermejo-Nogales *et al.* (2015) analizaron 88 genes (entre ellos, 3 de los analizados en esta tesis doctoral y que fueron publicados recientemente mientras realizábamos los estudios de expresión génica: citocromo b-c1 subunidad 10 isoforma A, NADH-ubiquinona deshidrogenasa 1 beta subcomplejo 8 y citocromo C oxidasa subunidad 5B) relacionados con la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa en músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado de juveniles de *S. aurata* mantenidos en condiciones de ayuno y realimentación durante 10 días. Un componente del complejo I, la NADH-ubiquinona deshidrogenasa 1 beta subcomplejo 8 (*NDUFB8*), mostró en condición de ayuno un incremento de expresión a nivel de mRNA. Por otra parte, la expresión del citocromo b-c1 subunidad 10, isoforma A (*UQCR11-A*), componente del complejo III, también fue superior en condiciones de privación de alimento, comportamiento similar al que

observamos en nuestro estudio. Los autores también determinaron la expresión de 23 genes (20 subunidades enzimáticas y 3 proteínas de ensamblaje) del complejo IV de la cadena respiratoria, reportando un incremento para la mayoría cuando los peces se mantenían en ayuno. La CoQ10 o ubiquinona, actúa principalmente como un antioxidante, estabilizador de membrana (Zaki, 2014) y participa en la maquinaria celular para producir ATP, proporcionando de esta manera la energía necesaria para la contracción muscular y otras funciones celulares vitales (Crane, 2001). Los altos niveles de expresión de coenzima Q 10 observados en nuestro estudio en peces alimentados, estaría en consonancia con el incremento de su síntesis a partir de la dieta a diferencia de los peces mantenidos en condición de ayuno prolongado, en los cuales la producción de energía se vería limitada.

Resultados recientes, similares a los reportados en nuestro estudio, han demostrado que en condiciones de ayuno la expresión de la caja de unión a ATP está incrementada. Kulkarni *et al.* (2014), observaron tanto en hepatocitos en cultivo *in vitro* como en tejido hepático de ratón un incremento en la expresión de la caja de unión a ATP tras 18 horas en ayuno. El ayuno condujo a la degradación de lípidos, aumentando la acumulación de bilirrubina, así como también de ácidos biliares y nucleótidos cíclicos, los cuales son los sustratos principales para la familia de proteínas de la caja de unión al ATP.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, nuestros datos sugieren que las mitocondrias presentes en el músculo esquelético de peces sometidos a ayuno prolongado son capaces de sintetizar el ATP mediante un incremento de la expresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa, promoviendo así una respuesta adaptativa crónica ante situaciones de estrés nutricional como la privación o restricción calórica.

En el caso de los peces alimentados con las diferentes dietas, si bien no se observaron cambios significativos en la expresión génica del citocromo C oxidasa subunidad 5B, se evidenció una tendencia a disminuir en los peces con los mejores perfiles de crecimiento, los peces alimentados con las dietas de niveles altos y medios de proteína y bajo en niveles de carbohidratos ($H^P L^L C$ y $M^P H^L C$). Situación similar fue la observada en la expresión génica de la caja de unión a ATP subfamilia G miembro 2 isoforma X1, para la cual fue posible establecer diferencias significativas entre los peces alimentados con las dietas $H^P L^L C$ y $M^P H^L C$ respecto a los alimentados con bajos niveles de proteína y altos niveles de carbohidratos ($L^P L^H C$). De esta manera, las dietas suministradas a los peces fueron capaces de promover una respuesta adaptativa en función de los diferentes niveles de inclusión de nutrientes. En relación a nuestros resultados, la expresión de los genes que codifican para citocromo C oxidasa subunidad 5B y caja de unión a ATP subfamilia G sugiere que

dichos genes podrían ser biomarcadores del estado nutricional y de interés para estudios relacionados con la optimización del uso de los nutrientes de la dieta en la producción de dorada.

5.2 METABOLISMO INTERMEDIARIO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

Nuestros resultados indican que una mayor inclusión de carbohidratos en la dieta a expensas de lípidos y/o proteínas mostró un aumento en la concentración de glucosa en plasma 24 horas después desde la última ingesta de alimento. Específicamente, los peces alimentados con la dieta que presentó un 37 % de carbohidratos mostraron los valores más altos, lo cual va en concordancia con lo propuesto por diversos autores, como Moon, (2001) quién señala que dietas suministradas en truchas arcoíris con una proporción de carbohidratos superiores al 30 %, son capaces de inducir de manera prolongada una hiperglicemia postprandial, lo cual repercute en el crecimiento. Nuestros resultados reflejan una capacidad limitada para asimilar los carbohidratos por parte de los peces que presentan hábitos alimenticios carnívoros, como es el caso de la dorada. Por otra parte, los niveles de incorporación óptimos de carbohidratos han sido analizados y estudiados, observando que en la mayoría de las especies el porcentaje de inclusión debe ser menor al 20 % (Wilson, 1994; Polakof *et al.*, 2012) con el fin de mantener la homeostasis del metabolismo de la glucosa, altamente dependiente en peces del estatus nutricional.

En el medio natural, muchas especies de peces se ven en la necesidad de pasar por períodos prolongados de ayuno relacionados con migración o etapas reproductivas. En este sentido, el glucógeno se convierte en la principal fuente de reserva energética. En nuestro estudio, las doradas sometidas a ayuno 23 días presentaron valores de glucógeno en músculo esquelético significativamente menores respecto a los peces alimentados con las diferentes dietas. Estos resultados se corresponden con lo observado por Peres *et al.* (1999) quienes inyectaron glucosa intraperitonealmente en doradas y lubinas observando una marcada disminución del contenido de glucógeno en el músculo 72 horas después del tratamiento. Un comportamiento similar fue reportado por (Montserrat *et al.*, 2007) quién, en dorada, tras 4 semanas de ayuno observó un descenso significativo de las reservas de glucógeno muscular. Resultados similares fueron reportados por Lim y Ip, (1989), quienes consideran que la disminución en el glucógeno muscular de *Boleophthalmus boddarti* sometido a ayuno indicaría que este sustrato sería el primer combustible utilizado en la actividad muscular.

En cuanto a las actividades de enzimas glucolíticas/gluconeogénicas analizadas en el músculo esquelético, si bien se observa una tendencia a aumentar en los valores de la PK en los peces alimentados con la dieta rica en carbohidratos, los valores no presentan diferencias significativas con

los observados en los peces alimentados con las otras dietas. Nuestros resultados son similares a los observados por Kamalam *et al.* (2012) en músculo esquelético de trucha arcoíris sometidas a un régimen de alimentación con dietas en presencia y ausencia de carbohidratos (entre 0 y 20 % de inclusión). Kamalam *et al.* (2012) observaron una moderada hiperglicemia en los peces cuya dieta era rica en carbohidratos. Sin embargo, no observaron diferencias significativas en la expresión muscular de genes que codifican para enzimas glucolíticas (PK y PFK-1). Estos resultados confirman que la ausencia de efectos significativos por parte de la dieta sobre la actividad de enzimas glucolíticas, podría indicar una capacidad limitada del músculo esquelético en la regulación de la utilización de glucosa, respuesta que también fue observada por otros autores (Panserat *et al.*, 2009; Marandel *et al.*, 2015). A diferencia del músculo esquelético, nuestro grupo de investigación ha observado que *S. aurata* tolera la sustitución parcial de proteínas por carbohidratos mediante la modulación de enzimas relacionadas con la glucólisis/gluconeogénesis en hígado. En particular, dietas pobres en proteínas y ricas en carbohidratos incrementaron la actividad hepática de las enzimas PFK-1 y PK, mientras que disminuyó la actividad de ALT, enzima que supone un nexo de unión entre el metabolismo de aminoácidos, el de carbohidratos y el energético. La ALT junto con la AST son cuantitativamente las más importantes aminotransferasas en el hígado de los peces teleósteos (Metón *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2007). Sin embargo, considerando las diferentes concentraciones de proteínas incluidas en las dietas experimentales utilizadas en esta tesis, el músculo esquelético no parece ser un tejido metabólicamente sensible a cambios en la concentración de aminoácidos en la dieta, al menos en los rangos utilizados en este trabajo.

5.3 CRECIMIENTO Y APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES

En el presente estudio, hemos analizado el estado nutricional de juveniles de dorada alimentados con diferentes dietas mediante la determinación de diferentes parámetros de crecimiento. Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones estudiadas, es posible observar diferencias significativas en el peso final, la SGR, el FCR y la FER, resultados que estarían en consonancia con las diferencias en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de cada dieta formulada.

De las tres dietas analizadas, las que contenían niveles altos y medios de proteína mostraron ser las que promovían mayores valores para los parámetros anteriormente indicados. En este sentido, Fernández *et al.* (2007) reportaron que los niveles mayores de peso final, SGR y FER en juveniles de dorada alimentados con tres dietas experimentales con cantidades de carbohidratos variables, se presentaban con dietas con un 54 % de proteína y un 18 % de carbohidratos (proporciones de inclusión similares fueron utilizadas en la dietas experimentales H^PL^LC y M^PH^LC), en

comparación con dietas con 47 o 63 % de contenido de proteína y 26 o 5 % de carbohidratos. La misma tendencia fue observada por Bou *et al.* (2014) para los parámetros SGR y FCR, analizando dietas con diferentes proporciones de lípidos y carbohidratos suministradas a doradas. Los valores correspondientes al PER y a la PR indican que la dieta M^PH^LC presentó el mejor rendimiento comparado con el resto de dietas experimentales. Un comportamiento similar ha sido observado en juveniles de *Pagrus pagrus* (Schuchardt *et al.*, 2007), trucha arcoíris (Kamalam *et al.*, 2012), y *S. aurata*, en donde El-Husseiny *et al.* (2013) evaluaron la utilización de lípidos y proteína de seis dietas con diferentes proporciones de nutrientes durante un período de alimentación de 58 días. Los resultados obtenidos por dichos autores muestran una correcta utilización de las proteínas como fuente de energía cuando otras fuentes están en proporciones limitadas o simplemente no están disponibles.

Los CDAs, fueron estimados tanto a partir de determinaciones de la utilización de los nutrientes de la dieta como de muestras de heces. Los valores correspondientes a fósforo, Ca, C, proteína y materia seca no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, lo que podría deberse a que las materias primas (harina de pescado, almidón y aceite de pescado) de las diversas dietas han sido previa y ampliamente utilizadas y probadas en la fabricación de dietas comerciales. Sin embargo, se observó una tendencia a la baja en los valores correspondientes al Ca, C y materia seca en los peces alimentados con la dieta de bajo contenido en proteínas y elevado en carbohidratos. Los valores de CDA en nuestras dietas clasificados de mayor a menor serían: M^PH^LC > H^PL^LC > L^PL^HC, lo cual indica una correlación positiva con el peso final y el FCR.

Los carbohidratos, como se ha mencionado anteriormente, son generalmente mal utilizados por los peces carnívoros (Wilson, 1994). Esto, sumado al alto nivel de carbohidratos en la dieta L^PL^HC, que presenta un 41 % de inclusión de dicho nutriente, podría estar influyendo en los bajos valores de digestibilidad. Además, varios autores señalan que una alta inclusión de carbohidratos afecta el crecimiento final, hecho que se ve reflejado en el peso medido al final del período de alimentación en los peces correspondientes a la alimentación con una dieta rica en carbohidratos.

En general, los valores de digestibilidad determinados en este experimento representan niveles bajos en relación a otros estudios (Fernandez *et al.*, 1999; Couto *et al.*, 2012). Una explicación para este hecho podría radicar en el error propio que puede representar la colección de las muestras de heces mediante el procedimiento de *stripping*, que puede llevar a coleccionar materia no digerida o contaminar las muestras con restos de epitelio intestinal, dando como resultado una subestimación de los coeficientes de digestibilidad aparente (Storebakken *et al.*, 1998).

5.4 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA EN EL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN DE GENES

El desarrollo de las técnicas genómicas durante los últimos años ha hecho posible obtener y analizar datos a gran escala. El uso de esta tecnología se ha utilizado principalmente para realizar estudios de genómica funcional en organismos modelo (Altmann *et al.*, 2001; Furlong *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente se han llevado a cabo investigaciones en especies de peces no modelo de alto valor comercial, como es el caso de *S. aurata* (Calduch-Giner y Davey, 2010; Calduch-Giner *et al.*, 2012), *Solea senegalensis* (Cerdeira *et al.*, 2008) y trucha arcoíris (Salem *et al.*, 2006).

Con el fin de identificar genes con potencial uso como biomarcadores de la modulación y crecimiento del músculo esquelético, en la presente tesis se abordó el diseño y la construcción personalizada de *microarrays* de oligonucleótidos para analizar cambios en el patrón global de expresión de genes en doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales. Los *microarrays* fueron diseñados a partir de las secuencias obtenidas en el análisis transcriptómico, utilizando tres 60-meros para analizar la expresión de cada una de las anotaciones transcriptómicas. La identificación de los genes con expresión diferencial se llevó a cabo en 4 estados de alimentación (peces en ayuno y peces alimentados durante 23 días con las dietas H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC).

Muchos experimentos de análisis de expresión diferencial con *microarrays* usan un diseño indirecto (también llamado diseño de referencia) que tiene como ventaja poder realizar un análisis e interpretación fácil sin necesidad de usar extensas herramientas estadísticas. Sin embargo, para incrementar la fiabilidad de variaciones pequeñas de expresión entre condiciones, el diseño directo para realizar comparaciones entre tratamientos es el diseño mas adecuado (Yang y Speed, 2002). El presente estudio fue realizado utilizando el diseño directo.

Diversos estudios de análisis de expresión mediante el uso de *microarrays* han sido aplicados en diferentes especies de animales sometidos a restricción calórica o privación de alimento (Martin *et al.*, 2009; Lkhagvadorj *et al.*, 2010). Sin embargo, la utilización de *microarrays* en estudios nutricionales aplicados a *S. aurata* es muy escasa. En este sentido, diversos estudios se han centrado principalmente en dilucidar la expresión diferencial de genes en estados de desarrollo temprano (fases larvales) (Sarropoulou *et al.*, 2005) y validación de *microarrays* (Ferraresso *et al.*, 2008). Uno de los pocos estudios relacionados con el efecto de la disponibilidad de nutrientes es el realizado por (Calduch-Giner *et al.*, 2014). Los resultados observados en este estudio mostraron una capacidad de respuesta ante cambios nutricionales por parte del músculo esquelético, menor a la observada en el tejido cardiaco y en el músculo rojo en peces alimentados con una dieta comercial.

Los resultados obtenidos en esta tesis, tras el análisis de *microarrays*, en relación con la expresión diferencial de genes, muestran diferencias entre los tratamientos y las condiciones de mantenimiento a la que fueron sometidos los peces. Esto se ve reflejado en el número total de genes con expresión diferencial al alza o a la baja entre peces alimentados con dietas de diferente composición y, de manera más evidente, entre peces en ayuno y alimentados. Los genes expresados diferencialmente fueron sometidos a un análisis funcional, acorde a sus clasificaciones ontológicas. En este sentido, los resultados observados en el análisis GO en los peces sometidos a regímenes de alimentación con las dietas experimentales H^PL^LC, M^PH^LC y L^PL^HC en comparación con los peces en ayuno, indican una expresión al alza en genes relacionados con el crecimiento, su regulación, organización del citoesqueleto y desarrollo de estructura anatómica, entre las anotaciones ontológicas más importantes. Estos resultados indican la modulación, formación y crecimiento experimentado por el músculo esquelético en los peces alimentados, mediante la síntesis de proteína y la correspondiente degradación, procesos que son propios de un organismo bien nutrido. Sin embargo, al analizar las anotaciones descritas en los términos ontológicos presentes en peces en ayuno respecto a los alimentados, fue posible observar importantes cambios a nivel global en la expresión diferencial de una gran cantidad de genes. De esta manera, un total de 10781 anotaciones mostraron expresión diferencial entre el ayuno vs. dieta H^PL^LC, 9844 entre ayuno vs. M^PH^LC y 9445 entre ayuno vs. L^PL^HC.

Estos resultados van en concordancia con los observados en el músculo esquelético por Caldusch-Giner *et al.*,(2014). En las anotaciones correspondientes a las funciones moleculares, la actividad antioxidante y la de unión a proteínas están reguladas al alza en los peces alimentados en comparación con los sometidos a ayuno. Resultados similares fueron observados en el análisis ontológico realizado por (García de la serrana *et al.*, 2015) en salmon coho transgénico.

Sin embargo, tal y como es de esperar, al realizar el contraste entre las dietas se observan muchos menos genes con expresión diferencial que en el contraste ayuno vs. alimentación. Al realizar los análisis utilizando un valor *P* ajustado < 0,05, la comparación L^PL^HC vs. H^PL^LC presentó 95 anotaciones con expresión diferencial, la comparación M^PH^LC vs. H^PL^LC 37 y la comparación L^PL^HC vs. M^PH^LC 4. La cantidad de anotaciones con expresión diferencial aumenta considerablemente al utilizar un valor *P* (no ajustado) < 0,05, para el cual se detectaron 4772 anotaciones con expresión diferencial en el caso de la comparación M^PH^LC vs. H^PL^LC, 3978 para la comparación L^PL^HC vs. H^PL^LC y 2436 para la comparación L^PL^HC vs. M^PH^LC.

Al analizar la expresión diferencial de anotaciones génicas específicas entre los peces alimentados con las tres dietas experimentales, podemos observar un aumento en la expresión del

gen que codifica para la ATPasa de sodio-potasio, subunidad A isoforma 1, en los peces alimentados con niveles medios o baja cantidad de proteína, respecto a los peces a los cuales se les suministró una dieta rica en proteína. En músculo esquelético, la ATPasa de sodio-potasio ha sido identificada como un importante transportador de iones, y su actividad está regulada principalmente por la contracción muscular asociada al ejercicio (Clausen, 2003). En este sentido, nuestros datos indican que la composición nutricional de las dietas, específicamente las dietas de niveles bajos y medios de proteína afectan de forma significativa la expresión positiva de dicha proteína.

Los resultados observados en el análisis de *microarrays*, en relación con la expresión diferencial de genes en los peces alimentados con la dieta de baja cantidad de proteína y alta cantidad de carbohidratos (L^PL^LH^C), en comparación con los peces alimentados con las dietas H^PL^LC y M^PH^LC, indican una disminución en la expresión de genes relacionados con el crecimiento y desarrollo del músculo esquelético. Este es el caso del gen que codifica para la proteína 2 asociada al citoesqueleto y el que codifica para la proteína colágeno tipo X alfa 1, para las cuales se observó un descenso de 1,6 y 5,5 veces en su expresión, respectivamente. La modulación de estos genes está directamente relacionada con los parámetros de crecimiento analizados, para los cuales los peces alimentados con la dieta L^PL^LH^C presentaron los valores menores de peso total al término del tratamiento, SGR y FCR.

5.5 EFECTO DEL AYUNO Y LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVES EN EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El análisis de cambios en el patrón de expresión global de genes en función del estado nutricional nos ha mostrado un importante efecto del ayuno y la composición de la dieta sobre genes implicados en el crecimiento y desarrollo muscular en la dorada. A fin de validar los resultados observados en el estudio del análisis de expresión génica por *microarrays* en relación a genes implicados en crecimiento muscular, en esta tesis abordamos la determinación de la expresión de los genes MyoD2, Myf5, miogenina y Myf6 mediante RT-qPCR en muestras de músculo esquelético de peces en ayuno y alimentados 23 días con dietas de diferente composición (experimento 1).

Rowlerson y Veggetti. (2001) señalan que la proliferación de los mioblastos y la hiperplasia ocurre durante todo el proceso de crecimiento. Sin embargo, en el crecimiento de los peces teleósteos, la proliferación de los mioblastos se produce principalmente en dos períodos. El primero, ocurre en la etapa de alevín, en las primeras etapas de crecimiento, y el segundo ocurre durante el estadio de desarrollo juvenil, incrementando de esta manera el número de fibras del músculo esquelético. En nuestros estudios de investigación observamos un incremento de la expresión génica de MyoD2 en el músculo esquelético de juveniles de dorada alimentadas con dietas con un nivel alto

y medio de proteínas ($H^P L^L C$ y $M^P H^L C$). Dichas dietas son las que mostraron mejor comportamiento de crecimiento. Por otra parte, un incremento similar fue observado en la expresión génica de Myf5. MyoD y Myf5 son esenciales para iniciar la regulación de la miogénesis, mientras que miogenina y Myf6 son expresados más tarde, durante la etapa de diferenciación (Tan and Du, 2002). De esta manera, MyoD2 podría ser utilizado como un biomarcador para evaluar el crecimiento de *S. aurata* en cultivo.

García de la serrana *et al.* (2014) observó patrones de expresión génica similares en doradas alimentadas durante 30 días con una dieta comercial y en un grupo mantenido en ayuno por el mismo período de tiempo. El ayuno, al igual que en nuestro estudio, promovió una marcada atrofia muscular, reduciendo drásticamente los niveles de expresión de MyoD2 y Myf5. Sin embargo, el efecto no fue tan acusado en la expresión de miogenina y de Myf6, resultados similares fueron observados por Alami-Durante *et al.* (2010) en trucha arcoíris, no observando cambios significativos en la expresión de la miogenina. En resumen, nuestros resultados indican expresión diferencial de diferentes miembros de los MRFs en función del estado nutricional y la composición de la dieta. En relación a los nutrientes de la dieta, los tratamientos con las dietas de niveles medios y altos de proteína ($M^P H^L C$ y $H^P L^L C$) promovieron una mayor expresión de MyoD2, Myf5 y miogenina. La modulación de la expresión de los MRFs tiene consecuencias importantes para el crecimiento muscular, dado que van a controlar transcripcionalmente genes clave en la miogénesis en la dorada.

La Mst, también denominada factor diferenciador del crecimiento 8, se expresa exclusivamente en el músculo esquelético, inhibiendo el crecimiento y la diferenciación celular (Seilliez *et al.*, 2012). En nuestros estudios, los niveles más bajos de Mst correspondieron al músculo de los peces alimentados con la dieta con niveles medios de proteína y mayor contenido lipídico ($M^P H^L C$). Este resultado está de acuerdo con el papel que juega este factor de crecimiento en el músculo esquelético. Cuando su expresión es baja no regula negativamente el crecimiento, y permite la inducción de la hipertrofia del tejido muscular. La función de la Mst quedó demostrada en ratones, en donde McPherron *et al.* (1997), mediante la delección del gen Mst, observó un dramático crecimiento de la masa muscular. Los animales mutantes aumentaron dos veces su tamaño en relación a los ratones salvajes. En pez zebra (*Danio rerio*), Fuentes *et al.* (2013a), mediante la inactivación transitoria del gen que codifica para la Mst, observó un resultado similar, provocando también una hipertrofia muscular.

En cuanto a los niveles de Mst en las doradas mantenidas en ayuno prolongado, fue sorprendentemente menor al presentado por las dietas ricas en proteína ($H^P L^L C$) y carbohidratos ($L^P L^H C$) y, aunque no significativamente, mostró una tendencia a presentar valores incrementados

comparado con los peces alimentados con una dieta con nivel medio de proteína y rica en lípidos (M^PH^LC). Investigaciones llevadas a cabo por otros autores en diversas especies, indican una variabilidad en los niveles de expresión en peces privados de alimento, variabilidad que depende de la especie y del período de ayuno. García de la serrana *et al.* (2014) observó un aumento en la expresión de Mst después de 30 días de permanecer en condiciones de ayuno. Por otra parte, en trucha arcoíris ayunadas y realimentadas no se observó un cambio significativo en la expresión génica (Chauvigné *et al.*, 2003). Un estudio realizado en tilapias adultas en condiciones de alimentación y ayuno durante 28 días, no generaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de Mst (Rodgers *et al.*, 2003). Por tanto, el efecto del ayuno sobre los niveles de Mst en peces no está aun bien esclarecido. Es también posible que el período de privación de alimento establecido durante el diseño experimental no sea suficiente para inducir cambios en este factor de crecimiento y pueda explicar resultados aparentemente contradictorios.

Fst, miembro de la superfamilia de factores del crecimiento β , ha demostrado ser un potente antagonista de la acción de Mst (Amthor *et al.*, 2004). Estudios en trucha arcoíris sobreexpresando la Fst han mostrado un incremento en la masa muscular asociada a procesos de hipertrofia e hiperplasia (Medeiros *et al.*, 2009). De acuerdo a nuestros resultados, los peces que experimentaron un mayor crecimiento somático, junto a los mayores valores en los parámetros de crecimiento analizados, fueron observados en los peces en los que el nivel de expresión de la Fst fue superior (dietas con contenido medio o alto de proteínas y pobre en carbohidratos, M^PH^LC y H^PL^LC). Por el contrario, en la dieta con bajos niveles de proteína y rica en carbohidratos (L^PL^LH^C) la expresión genica de la Fst fue significativamente menor al resto de peces alimentados, y similar a la de los peces sometidos a ayuno. Estos resultados sugieren que la expresión de Fst está implicada en la regulación del crecimiento muscular en la dorada, mostrando su expresión fuerte dependencia de la composición de la dieta suministrada a los peces.

En el proceso de desarrollo y crecimiento muscular, los factores de crecimiento de tipo IGF cumplen un papel fundamental. En esta tesis, analizamos la expresión génica de IGF-1 en el músculo esquelético de peces sometidos a diferentes condiciones nutricionales. Se observó el mayor nivel de expresión génica en los peces alimentados con la dieta M^PH^LC, dieta que promovió el mayor crecimiento somático. En la dorada, los niveles de expresión en los peces alimentados con las tres dietas experimentales, muestran una correlación positiva con las tasas de crecimiento. Resultados similares fueron observados por Dyer *et al.* (2004) quien determinó las concentraciones de IGF-1 en plasma en barramundi (*Lates calcarifer*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*); como en la dorada, los resultados también mostraron una correlación positiva con la tasa de crecimiento y la concentración de proteína presente en las dietas suministradas. Acorde con la relación entre IGF-1 y el crecimiento

muscular, estudios *in vitro* desarrollados en células musculares de *S. aurata* tratadas con IGF-1 muestran una regulación positiva en la proliferación y el crecimiento celular (Vélez *et al.*, 2014). Por otra parte, y en concordancia con nuestros resultados, Metón *et al.* (2000), Pérez-Sánchez *et al.* (1995) reportaron en doradas mantenidas en condición de ayuno una marcada disminución de IGF-1 a nivel de mRNA y de sus niveles en plasma. Todos estos resultados indican que la expresión de IGF-1 en músculo es altamente dependiente de la condición nutricional y la composición de la dieta, por lo que parece constituir también un factor clave en el control del crecimiento muscular de dorada.

El análisis de expresión génica de GHR1 y GHR2 en músculo esquelético, presentó un patrón de expresión altamente variable en función de las condiciones nutricionales de los peces. Los mayores niveles de expresión observados para GHR1 fueron observados en los peces alimentados con la dieta de alta cantidad de proteína y baja cantidad de carbohidratos ($H^P L^L C$), mientras que los peces alimentados con las dietas $M^P H^L C$ y $L^P L^H C$ presentaron niveles significativamente más bajos. Los niveles de mRNA de GHR2 mostraron un comportamiento opuesto al de GHR1, detectándose la mayor expresión de manera significativa en la dieta $L^P L^H C$. Por otra parte, los peces mantenidos en condición de ayuno presentaron valores significativamente más bajos en relación a los peces alimentados. Por el contrario, la expresión de GHR2 aumento significativamente tras 23 días de ayuno. Nuestros estudios demuestran por primera vez un elevado grado de dependencia de la expresión de los GHRs en la composición de la dieta. En cuanto al efecto del ayuno sobre la expresión de GHR1 y GHR2 en dorada, Saera-Vila *et al.* (2005), reportaron resultados similares a los nuestros. Delgadin *et al.* (2015), en peces de la especie *Cichlasoma dimerus* alimentados durante cuatro semanas con una dieta comercial y mantenidos en ayuno por el mismo periodo de tiempo, también reportaron resultados similares a los nuestros en los niveles de expresión de GHR2. El control nutricional de la expresión de los genes que codifican para GHRs indica que podrían ser de utilidad para desarrollar estudios biotecnológicos encaminados a optimizar el uso de los nutrientes en las dietas de doradas en cultivo.

En relación a la función de la proteína GLUT4 en el metabolismo y el crecimiento muscular, previamente se ha reportado su presencia principalmente en músculo esquelético, así como su regulación por insulina e IGF-1, que inducen la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Díaz *et al.*, 2009). Su principal función radica en el transporte de glucosa a través de la membrana. En peces, el músculo esquelético es el lugar principal para la captación de glucosa, (Díaz *et al.*, 2007), contribuyendo de esta manera a la homeostasis de la glucosa en sangre (Zorzano *et al.*, 2005). Como se observa en nuestros resultados, la expresión génica de GLUT4 es regulada por las condiciones nutricionales. Los valores más elevados de expresión de GLUT4 los detectamos en los peces alimentados con la dieta de mayor contenido de proteína y menor de carbohidratos, mientras que

para los peces alimentados con las otras dos dietas los valores fueron significativamente menores. Los valores de glucosa en suero de peces alimentados con la dieta alta en proteína/pobre en carbohidratos eran inferiores a los de los peces alimentados con las dietas de mayor contenido en carbohidratos y menor de proteína, lo que podría indicar que GLUT4 estaría colaborando en el manteniendo de los niveles de glucosa en el organismo. En peces mantenidos en ayuno, la expresión génica de GLUT4 fue similar a la observada en la dieta rica en proteína y pobre en carbohidratos. Resultados similares fueron observados por Hall *et al.* (2006) para bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) al estudiar regímenes de alimentación, realimentación y ayuno, detectando, al igual que en nuestro estudio, un aumento significativo en los niveles de GLUT4 en peces sometidos a ayuno durante dos meses. En ratas mantenidas en ayuno durante 3 días el comportamiento fue similar Neufers *et al.* (1993). Una explicación para este hecho, sería que ante una situación extrema de supervivencia, los peces en ayuno necesitan una adaptación para mantener un transporte de glucosa que pueda asegurar las mínimas necesidad fisiológicas, lo cual conlleva a un aumento en la expresión de GLUT4. De hecho, la expresión de GLUT4 se incrementa cuando hay actividad contractil (Slentz *et al.*, 1992b). En este sentido, los peces son animales que no pasan períodos en que están estáticos, y aunque estén en situación de privación de alimento cualquier estímulo externo les puede provocar movimiento adicional. Por lo tanto, aún en ayuno mantienen la actividad contráctil, lo que podría determinar la expresión elevada de GLUT4.

Los efectos de los nutrientes de las diferentes dietas suministradas (peces alimentados y en ayuno) sobre el crecimiento muscular fueron estudiados analizando también la vía de señalización AKT/mTOR. Nuestros resultados en relación al grado de fosforilación de AKT, indican que la vía resulta activada en peces alimentados con las dietas con niveles altos y medios de proteína y pobres en carbohidratos. Estos resultados son congruentes con datos reportados por (Glass, 2003a) que indican que la activación de la proteína quinasa AKT es capaz de desencadenar un gran número de respuestas biológicas, entre las que se encuentran la proliferación celular y la contribución a la hipertrofia muscular. De acuerdo con esta hipótesis, los peces sometidos a los tratamientos de alimentación con la dieta M^PH^LC y, en menor medida, la dieta H^PL^LC fueron los que mostraron mayor crecimiento. Por otra parte, se ha descrito que la fosforilación de AKT se induce por factores de crecimiento, como por ejemplo IGF-1 (Glass, 2005). La acción de IGF-1 induce la fosforilación de PI3K, la cual se encuentra por encima en la vía de activación de AKT, estableciendo de esta manera la cascada de señalización llamada IGF-1/PI3K/AKT. De esta manera, cada componente presente en dicha cascada de señalización se presenta como un potencial mediador clave en el aumento de masa muscular (Stitt *et al.*, 2004). Nuestros estudios de determinación de la expresión de IGF-1 indican una buena relación con los valores de fosforilación de AKT lo que apoyaría la correcta función de los

mecanismos asociados a la cascada de señalización mencionada, que estarían siendo modulados principalmente por la acción de los macronutrientes, en este caso la proteína. Un estudio en trucha arcoíris llevado a cabo por Seiliez *et al.* (2011), confirma lo señalado anteriormente. Mediante la técnica *western blot* observaron un aumento en la fosforilación de AKT tanto en hígado como en músculo esquelético en truchas alimentadas con dietas de niveles altos y medios de proteína a expensas de la inclusión de carbohidratos. Sin embargo, en relación a los niveles de fosforilación de AKT en peces en condición de ayuno, nuestros resultados indican una activación de AKT tras 23 días de ayuno, alcanzando valores similares a las dietas M^PH^LC y H^PL^LC. Seiliez *et al.* (2011) observaron una disminución significativa de la fosforilación de AKT peces en ayuno tanto en hígado como en músculo esquelético en relación a las demás condiciones de alimentación. La activación de AKT en ayuno podría ser necesaria para el mantenimiento de la supervivencia celular (Song *et al.*, 2005), y sería mediada por la acción de mTORC2, fosforilando AKT (Yang and Guan, 2007; Yang *et al.*, 2015), e implicando por tanto la regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas (Revisado por Vadlakonda *et al.*, 2013). De ser así, podríamos indicar que AKT podría ser activado por un mecanismo independiente de los aminoácidos, principalmente cuando el organismo se encuentra en una situación energética desfavorable, provocando un desequilibrio en la homeostasis, como puede ser un período de ayuno prolongado. Sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos, especialmente *in vivo* para poder comprender y analizar la función de los mecanismos implicados en la regulación de mTORC2.

mTORC1 tiene como principal función la síntesis de proteínas, siendo regulado entre otros factores, por la disponibilidad de aminoácidos y el balance energético (Glass, 2005). En el presente estudio, para determinar la actividad y funcionalidad de este complejo, se estimaron las diferencias en el estado de fosforilación de la proteína ribosomal S6, componente de la cascada activada por mTORC1. Las condiciones de alimentación afectaron la expresión de S6 en el músculo esquelético de las doradas. La cantidad de proteína S6 inmunorreactiva, cuantificada por *western blot*, correlaciona positivamente con los pesos finales alcanzados por los peces alimentados con las dietas experimentales utilizadas. La dieta con el mejor perfil de crecimiento fue la dieta de contenido medio en proteína, elevado en lípidos y pobre en carbohidratos (M^PH^LC). Nuestros resultados guardan similitud con los reportados por Seiliez *et al.* (2011), quienes observaron niveles elevados de fosforilación de la proteína ribosomal S6 en trucha arcoíris alimentadas con dietas de alto contenido proteico. Por otra parte Dai *et al.* (2013) en trucha arcoíris alimentadas con una dieta comercial, observó diferencias significativas en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasa 1 (proteína que se encuentra por encima de la cascada en la vía de activación de S6) y en la proteína ribosomal S6. Ambas proteínas fueron fosforiladas y reguladas positivamente en el grupo realimentado. El

mismo comportamiento fue indicado en un trabajo publicado recientemente, llevado a cabo en cerdos alimentados con dietas que diferían en sus niveles de proteínas. En dicho trabajo se observó un aumento en el nivel de fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasa 1 proporcional a la cantidad de proteína de la dieta (Columbus *et al.*, 2015). En resumen, nuestros resultados sugieren que mTORC1 está implicado en el crecimiento muscular de la dorada promoviendo la activación por fosforilación de diversas proteínas clave en la regulación del crecimiento, función en la que la proporción de nutrientes incluidos en el diseño de las dietas presenta un papel relevante.

Se ha descrito que la disponibilidad limitada de nutrientes, junto con factores que puedan inducir estrés celular, provoca una disminución o inhibición de la actividad y funciones de mTORC1, lo cual conlleva a la necesidad de activar un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas como es la autofagia (Goodman *et al.*, 2011; Zoncu *et al.*, 2011). En nuestros estudios, detectamos que la activación e inhibición de mTORC1 resultó modulada de acuerdo a los niveles de fosforilación de la proteína ribosomal S6. En los peces en ayuno y alimentados con una dieta pobre en proteínas/rica en carbohidratos, la expresión de mTORC1 fue prácticamente nula.

Con el fin de determinar si la baja expresión de mTORC1 en los peces en ayuno implica la activación del proceso de autofagia, nos propusimos medir los niveles de expresión de dos genes que codifican para proteínas implicadas en dicho proceso: Gabarapl1 y LC3B. La expresión de ambos genes resultó regulada positivamente, tanto en los peces sometidos a ayuno como en los alimentados con la dieta de bajos niveles de proteína y altos en carbohidratos. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en trucha arcoíris por Seiliez *et al.* (2011) que observaron niveles elevados de expresión de LC3B en peces en ayuno y también elevados para Gabarapl1 en peces en ayuno y peces alimentados con una dieta baja en proteína. Por otra parte, experimentos *in vitro* con células de peces mantenidas en cultivo en presencia de niveles limitados de aminoácidos muestran la implicación de la proteína LC3B en procesos de autofagia (Yabu *et al.*, 2012).

En base a los estudios realizados podemos señalar que las diferentes condiciones de mantenimiento de las doradas utilizadas en este trabajo, fueron capaces de modular diversos mecanismos asociados a la capacidad de crecimiento y supervivencia durante el ayuno prolongado. El estudio de procesos relacionados con mTORC2 y su relación con las condiciones de estrés, privación de nutrientes y con la proteína AKT ayudarán en el futuro a esclarecer los mecanismos relacionados con la privación de nutrientes y sus efectos.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. El análisis transcriptómico realizado mediante de secuenciación 454 de bibliotecas de cDNA normalizadas preparadas a partir de RNA aislado de músculo esquelético de doradas (*Sparus aurata*) en ayuno prolongado y alimentadas con dietas de diferente composición, permitió obtener un total de 691433 secuencias de alta calidad, correspondientes a 275,9 Mb. Se ensamblaron 383320 secuencias nucleotídicas que generaron un total de 40010 anotaciones únicas, que comprendieron, 9708 *contigs* y 30302 *singletons*. La N50 de *contigs* e *isotigs* fue 1390 y 1491 pb, respectivamente.
2. Un total de 4799 *isotigs* del transcriptoma de músculo esquelético de dorada fueron asignados a una categoría GO. En procesos biológicos, los *isotigs* más representados correspondieron a procesos de oxidación-reducción, ciclo celular y división celular. Dentro de la categoría de funciones moleculares los más abundantes correspondieron a: Unión a proteínas, unión a nucleótidos, actividad hidrolasa y actividad transferasa.
3. El análisis KEGG de los datos transcriptómicos de músculo esquelético de dorada permitió asignar 728 secuencias a 73 rutas metabólicas. La ruta metabólica con un mayor número de anotaciones representadas correspondió al metabolismo de nucleótidos.
4. La utilidad de la información transcriptómica para estudios nutricionales en la dorada se corroboró al analizar el efecto del ayuno y la composición de la dieta en la expresión de genes relacionados con la cadena de transporte de electrones (subunidad 8 del subcomplejo NADH deshidrogenasa 1 β , citocromo b-c1 subunidad 10-like isoforma 2, citocromo C oxidasa subunidad 5B), la fosforilación oxidativa (ATP sintasa subunidad β , caja de unión a ATP subfamilia G miembro 2 isoforma X1, CoQ10) y la translocación de ATP desde el espacio mitocondrial al intermembrana (ADP/ATP translocasa 3-like). En músculo de dorada, el ayuno causó incremento en la expresión de los genes que codifican para el citocromo b-c1 subunidad 10-like isoforma 2, citocromo C oxidasa subunidad 5B y caja de unión a ATP subfamilia G miembro 2 isoforma X1 en relación a los peces alimentados. La expresión de citocromo C oxidasa subunidad 5B y caja de unión a ATP subfamilia G mostró fuerte dependencia de la composición de la dieta: ambos genes presentaron niveles de mRNA incrementados en los peces alimentados con la dieta de menor contenido proteico y mayor cantidad de carbohidratos.

5. La actividad de enzimas implicadas en la glucólisis/gluconeogénesis no mostró diferencias significativas en músculo de doradas alimentadas con dietas de diferente composición de nutrientes. En peces sometidos a ayuno prolongado la actividad de las enzimas glucolíticas PK y PFK-1 disminuyó en relación a la observada en los peces alimentados.
6. Las doradas alimentadas con las dietas H^PL^LC y M^PH^LC presentan valores de peso final, SGR y FER más elevados que los peces alimentados con la dieta L^PL^HC. La FCR mayor correspondió a los peces a los que se les suministró la dieta M^PH^LC.
7. No se observaron diferencias significativas en la digestibilidad de nutrientes de las diferentes dietas. Sin embargo, los peces alimentados con la dieta M^PH^LC mostraron valores superiores en cuanto a la digestibilidad de fósforo, calcio, carbono y materia seca.
8. Los estudios con *microarrays*, diseñados a partir de la información transcriptómica híbrida (músculo esquelético-hígado) previamente analizada, permitieron realizar análisis de GO. El ayuno promovió una expresión diferencial al alza en genes de las funciones moleculares actividad antioxidante y unión a proteínas. Al realizar la comparación entre peces alimentados con dietas de diferente composición, se observó que la alimentación con dietas de alto/medio contenido en proteínas y bajo contenido de carbohidratos promovió un incremento en la expresión de genes asociados a funciones implicadas en crecimiento, regulación, organización del citoesqueleto y desarrollo de estructura anatómica.
9. En músculo esquelético de dorada la expresión de genes relacionados con la regulación de la miogénesis (MRFs) resultó modulada por las condiciones nutricionales, composición de la dieta y ayuno prolongado. La expresión de MyoD2 más elevada correspondió a peces alimentados con la dieta M^PH^LC, con la que se observaron los mejores valores de SGR y FCR. En los peces alimentados con dieta L^PL^HC la expresión génica de MyoD2 es inferior a la observada en los alimentados con dieta M^PH^LC, y su expresión fue aún menor en los peces sometidos a ayuno. Por lo que, MyoD2 podría representar un potencial biomarcador de crecimiento para *S. aurata* en cultivo.
10. En músculo esquelético de dorada la expresión de IGF-1 a nivel de mRNA, al igual que MyoD2, presentó diferencias significativas en función de las condiciones nutricionales. Peces alimentados con la dieta M^PH^LC presentaron los niveles de expresión más elevados,

los niveles más bajos se observaron en los peces en ayuno y los alimentados con las dietas L^PL^HC. La expresión muscular de los genes que codifican para GHR1 y GHR2 fue altamente dependiente del estado nutricional y la composición de la dieta. Los niveles de mRNA de GHR1 se encuentran disminuidos significativamente en peces en ayuno y, entre los peces alimentados, en aquellos a los que se les suministró una dieta pobre en proteína y rica en carbohidratos. La expresión de GHR2 presentó un comportamiento opuesto a GHR1: incrementa en ayuno y con las dietas con bajo contenido proteico y elevado contenido en carbohidratos.

11. Los cambios en el estado de fosforilación de AKT y S6 indican modulación de su actividad en función de la composición de la dieta. La fosforilación de AKT es superior en peces alimentados con dietas de niveles altos y medios de proteína y baja cantidad de carbohidratos. La fosforilación de S6 es superior en peces alimentados con la dieta de niveles medios de proteína y baja cantidad de carbohidratos. El incremento de fosforilación de AKT, observado en la condición de ayuno hacen necesario más estudios para determinar su implicación.
12. La expresión de citocromo C oxidasa subunidad 5B, caja de unión a ATP subfamilia G, GHRs y MyoD2 en músculo esquelético podría ser de utilidad en futuros estudios para mejorar la utilización de los nutrientes de la dieta en el cultivo de dorada.

7. REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

- Abboudi T, Mambrini M, Larondelle Y, Rollin X. 2009. The effect of dispensable amino acids on nitrogen and amino acid losses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry fed a protein-free diet. *Aquaculture* **289**: 327–333.
- Alami-Durante H, Wrutniak-Cabello C, Kaushik SJ, Médale F. 2010. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **156**: 561–8.
- Albors OL, Alcázar G, Abdel I. 2005. Revisión: desarrollo y crecimiento de la musculatura axial de la lubina *Dicentrarchus labrax* L. *AN. VET. (Murcia)* **54**: 35–54.
- Al-khalili L, Chibalin A V, Yu M, Nyle C, Zierath JR, Krook A, Chibalin A V, Yu M, Sjo B, Zierath JR, et al. 2004. MEF2 activation in differentiated primary human skeletal muscle cultures requires coordinated involvement of parallel pathways. : 1410–1416.
- 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.
- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K. 2004. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Developmental biology* **270**: 19–30.
- Apponi LH, Corbett AH, Pavlath GK. 2011. RNA-binding proteins and gene regulation in myogenesis. *Trends in pharmacological sciences* **32**: 652–8.
- Armand A-S, Della Gaspera B, Launay T, Charbonnier F, Gallien CL, Chanoine C. 2003. Expression and neural control of follistatin versus myostatin genes during regeneration of mouse soleus. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **227**: 256–65.
- Asche F. 2008. Farming the sea. *Marine Resource Economics* **23**: 527–547.
- 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.
- Aurelio Ortega. 2008. Cultivo de Dorada. *cuadernos de acuicultura*. Instituto Español de Oceanografía.
- Baanante IV, Garcia de Frutos P, Bonamusa L, Fernandez 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.
- Ballantyne, JS, 2001. Amino acid metabolism, En Wright, P.A.m Anderson, P.M. (Eds.). *Fish physiology*. Academic Press, San Diego, 77-107.
- Barresi MJF, D'Angelo JA, Hernández LP, Devoto SH. 2001. Distinct mechanisms regulate slow-muscle development. *Current Biology* **11**: 1432–1438.
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI, Cad-KS. 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **6**: 1340–1346.

- 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. *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. Part A, Molecular & integrative physiology* **145**: 181–7.
- 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 M. 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.
- Braun T, Gautel M. 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**: 349–61.
- Brent AE, Tabin CJ. 2004. White meat or dark? *Nature genetics* **36**: 8–10.
- Brosnan JT. 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* **133**: 2068S–2072.
- Calduch-Giner J, Davey G. 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 J a, Sitjà-Bobadilla A, Davey GC, Cairns MT, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. 2012. Dietary vegetable oils do not alter the intestine transcriptome of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), but modulate the transcriptomic response to infection with *Enteromyxum leei*. *BMC genomics* **13**: 470.
- Calduch-Giner J a, 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.
- Calduch-Giner J a, Echassériau Y, Crespo D, Baron D, Planas J V, Prunet P, Pérez-Sánchez J. 2014. Transcriptional assessment by microarray analysis and large-scale meta-analysis of the metabolic capacity of cardiac and skeletal muscle tissues to cope with reduced nutrient availability in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* **16**: 423–35.
- 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.
- Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences* **29**: 18–24.
- 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.
- Castillo J, Codina M, Martínez ML, Navarro I, Gutiérrez J. 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **286**: R935–41.

- Cerda J, Mercade J, Lozano JJ, Manchado M, Tingaud-Sequeira A, Astola A, Infante C, Halm S, Vinas J, Castellana B, et al. 2008. Genomic resources for a commercial flatfish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): EST sequencing, oligo microarray design, and development of the bioinformatic platform Soleamold. *BMC Genomics* **9**: 508.
- Cerdà J, Manchado M. 2013. Advances in genomics for flatfish aquaculture. *Genes & nutrition* **8**: 5–17.
- Chauvigné F, Gabillard JC, Weil C, Rescan PY. 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology* **132**: 209–215.
- Chen Jyh-Yih, Tsai Hsiu-Lan, Chang Chi-Yao, Wang Iyh-i, Shen Shih-Chieh, and, Wu Ien-Ieih. 1998. Isolation and Characterization of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Insulin-Like Growth Factors Gene and Proximal Promoter Region. **17**: 359–376.
- Chen MH, Lin G, Gong H, Weng C, Chang C, Wu J. 2001. The characterization of prepro-Insulin-like growth factor-1 Ea-2 expression and Insulin-like growth factor-1 genes (devoid 81 bp) in the zebra fish (*Danio rerio*) q. **268**: 67–75.
- Chen X, Mei J, Wu J, Jing J, Ma W, Zhang J, Dan C, Wang W, Gui J-F. 2015. A comprehensive transcriptome provides candidate genes for sex determination/differentiation and SSR/SNP markers in yellow catfish. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* **17**: 190–8.
- Clark K a, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annual review of cell and developmental biology* **18**: 637–706.
- Clausen T. 2003. Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiological reviews* **83**: 1269–1324.
- Cole DW, Cole R, Gaydos SJ, Gray J, Hyland G, Jacques ML, Powell-Dunford N, Sawhney C, Au WW. 2009. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International journal of hygiene and environmental health* **212**: 369–77.
- Columbus D, Steinhoff-Wagner J, Suryawan A, Nguyen H, Hernandez-Garcia A, Fiorotto ML, Davis T. 2015. Impact of prolonged leucine supplementation on protein synthesis and lean growth in neonatal pigs. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **309**: E601–E610.
- Couto A, Enes P, Peres H, Oliva-Teles A. 2012. Temperature and dietary starch level affected protein but not starch digestibility in gilthead sea bream juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**: 595–601.
- Cowey CB. 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* **124**: 1–11.
- Crane F. 2001. Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition* **20**: 591–598.
- Dai W, Panserat S, Mennigen J a, Terrier F, Dias K, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2013. Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signalling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of experimental biology* **216**: 4483–92.
- Datta SR, Dudek H, Xu T, Masters S, Haian F, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231–241.
- Dave G, Johansson-Sjöbeck L, 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**: 423–30.

- Davenport J, Black K, Burnell G, Cross T, Culloty S, Ekaratne S, Furness B, Mulcahy M, Thetmeyer H. 2003. Aquaculture: the ecological issues. *Ecological Issues Series*.
- De Frutos PG, 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.
- Delalande JM, Rescan PY. 1999. Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Development Genes and Evolution* **209**: 432–437.
- Delgadin T, Pérez Sirkin D, Di Yorio M, Arranz S, Vissio P. 2015. GH, IGF-I and GH receptors mRNA expression in response to growth impairment following a food deprivation period in individually housed cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Fish physiology and biochemistry* **41**: 51–60.
- Díaz M, Antonescu C, Capilla E, Klip A, Planas J. 2007. Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **148**: 5248–57.
- Díaz M, Vraskou Y, Gutiérrez J, Planas J. 2009. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**: R794–800.
- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* **30**.
- Drakenberg K, Sara V, Falkmer S, Gammeltoft S, Maake C, Reinecke M. 1993. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regulatory Peptides* **43**: 73–81.
- Duan C. 1998a. Conference : Nutritional and Developmental Roles of Insulin-like Growth Factors between Species Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors. : 306–314.
- Duan C. 1998b. Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors in Fish. *J. Nutr.* **128**: 306S–.
- Dyer A, Barlow C, Bransden M, Carter C, Glencross B, Richardson N, Thomas PM, Williams K, Carragher J. 2004. Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture* **236**: 583–592.
- Edmondson D, Olson E. 1993. Helix-Loop-Helix Proteins as Regulators of Muscle-specific Transcription. *Society* **268**: 755–758.
- 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. *J. Biol. Chem.* **260**: 14173–14179.
- El- Husseiny O, Elhammady A, Tolba S, Suloma A. 2013. Lipid and protein utilization by gilthead sea bream (*Sparus aurata* L .) under flow-through system with regard to environmental impact Animal Production Dept , Faculty of Agriculture , Cairo University , Egypt . Fish Nutrition Lab , Inland Water and Aqua. **8**: 307–320.
- 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.
- FAO, 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO Roma, Italia.

- Fauconneau B, Paboeuf G. 2000. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and tissue research* **301**: 459–463.
- FEAP. 2014. Annual report 2014. *FEAP Aquaculture, Liege, Belgium*.
- Feng Z, Zhang H, Levine A, Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8204–8209.
- Fernandez F, Miquel G, Martinez R, Serra E, Guinea J, Narbaiza J, 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*. *The Journal of nutrition* **129**: 1053–1059.
- Fernández F, Miquel G, Guinea J, Mar´nez 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 G, 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.
- Ferraresso S, Vitulo N, Mininni AN, Romualdi C, Cardazzo B, Negrisolo E, Reinhardt R, Canario AVM, Patarnello T, Bargelloni L. 2008. Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *BMC genomics* **9**: 580.
- Fingar DC, Blenis J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**: 3151–3171.
- Freedland RA. 1967. Effect of progressive starvation on rat liver enzyme activities. *The Journal of nutrition* **91**: 489–95.
- Fuentes E, Björnsson B, Valdés J, Einarsdottir I, Lorca B, Alvarez M, Molina A. 2011. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **300**: R1532–42.
- Fuentes E, Pino K, Navarro C, Delgado I, Valdés JA, Molina A. 2013a. Transient inactivation of myostatin induces muscle hypertrophy and overcompensatory growth in zebrafish via inactivation of the SMAD signaling pathway. *Journal of biotechnology* **168**: 295–302.
- Fuentes E, Safian D, Einarsdottir IE, Valdés JA, Elorza A a, Molina A, Björnsson BT. 2013b. 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. *General and comparative endocrinology* **186**: 172–80.
- Funkenstein B, Rebhan Y, Skopal T. 2009. Molecular cloning and characterization of follistatin in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Molecular biology reports* **36**: 501–11.
- Furlong E, Andersen E, Null B, White K, Scott M. 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.

- Futami, R., Muñoz-Pomer, A., Viu, J.M., Domínguez-Escribà, L., Covelli, L., Bernet, G.P. Sempere J.M., Moya, A., Llorens C. 2011. GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases. *Biotechnologia Bioinformatics*: 1–5.
- Garcia de la Serrana D, Johnston I a. 2013. Expression of heat shock protein (Hsp90) paralogues is regulated by amino acids in skeletal muscle of Atlantic salmon. *PLoS one* **8**: e74295.
- Garcia de la Serrana D, Estévez A, Andree K, Johnston I a. 2012. Fast skeletal muscle transcriptome of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC genomics* **13**: 181.
- Garcia de la serrana D, Devlin RH, Johnston I a. 2015. RNAseq analysis of fast skeletal muscle in restriction-fed transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): an experimental model uncoupling the growth hormone and nutritional signals regulating growth. *BMC Genomics* **16**: 564.
- García de la serrana D, Codina M, Capilla E, Jiménez-Amilburu V, Navarro I, Du S-J, Johnston I a, Gutiérrez J. 2014. Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **167**: 90–9.
- 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. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**: 4–15.
- Glass D. 2003a. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology* **5**: 87–90.
- Glass DJ. 2003b. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in Molecular Medicine* **9**: 344–350.
- Glass DJ. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**: 1974–84.
- Glenn TC. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* **11**: 759–769.
- Gnaiger E. 2009. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1837–45.
- Goetz FW, MacKenzie S. 2008. Functional genomics with microarrays in fish biology and fisheries. *Fish and Fisheries* **9**: 378–395.
- 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.
- Goodman C a, Mayhew DL, Hornberger T a. 2011. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cellular signalling* **23**: 1896–906.
- Gutiérrez J, Plisetskaya EM. 1991. Insulin binding to liver plasma membranes of coho salmon during smoltification. *General and Comparative Endocrinology* **82**: 466–475.
- Hall JR, Short CE, Driedzic WR. 2006. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *The Journal of experimental biology* **209**: 4490–4502.

- Hall MN. 2008. mTOR-what does it do? *Transplantation proceedings* **40**: S5–8.
- Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development* **25**: 1895–1908.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **18**: 1926–45.
- Hollway GE, Bryson-Richardson RJ, Berger S, Cole NJ, Hall TE, Currie PD. 2007. Whole-Somite Rotation Generates Muscle Progenitor Cell Compartments in the Developing Zebrafish Embryo. *Developmental Cell* **12**: 207–219.
- Huo Y, Iadevaia V, Proud CG. 2011. Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis. *Biochemical Society transactions* **39**: 446–450.
- Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. 2006. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* **127**: 125–137.
- Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12017–22.
- Jewell JL, Russell RC, Guan K-L. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**: 133–9.
- Ji P, Liu G, Xu J, Wang X, Li J, Zhao Z, Zhang X, Zhang Y, Xu P, Sun X. 2012. Characterization of common carp transcriptome: sequencing, de novo assembly, annotation and comparative genomics. *PloS one* **7**: e35152.
- 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.
- Johnston I, Vieira V, Abercromby M. 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *The Journal of experimental biology* **198**: 1389–403.
- Johnston I a. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* **177**: 99–115.
- Johnston I a. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of experimental biology* **209**: 2249–64.
- Johnston I a, Hall TE. 2004. Mechanisms of Muscle Development and Responses to Temperature Change in Fish Larvae. *American Fisheries Society Symposium* **40**: 85–116.
- Johnston I a, Fernández D a, Calvo J, Vieira VL a, North AW, Abercromby M, Garland T. 2003. Reduction in muscle fibre number during the adaptive radiation of notothenioid fishes: a phylogenetic perspective. *The Journal of experimental biology* **206**: 2595–2609.
- Johnston I a, Bower NI, Macqueen DJ. 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of experimental biology* **214**: 1617–28.
- Johnston IANA. 1981. Structure and Function of Fish Muscles. *Vertebrate Locomotion Ž. Symp. Zool. Soc. Lond. Academic Press, London*: 71–113.

- Jornayvaz F, Shulman G. 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* **47**: 1–15.
- Kamalam BS, Medale F, Kaushik S, Polakof S, Skiba-Cassy S, Panserat S. 2012. Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *The Journal of experimental biology* **215**: 2567–78.
- 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.
- Kiessling A, Ruohonen K, Bjørnevik M. 2006. Muscle fibre growth and quality in fish. *Archives Animal Breeding* **49**: 137–146.
- Kim J, Guan K-L. 2011. Amino acid signaling in TOR activation. *Annual review of biochemistry* **80**: 1001–1032.
- Kulkarni SR, Donepudi AC, Xu J, Wei W, Cheng QC, Driscoll M V, Johnson D a, Johnson J a, Li X, Slitt AL. 2014. Fasting induces nuclear factor E2-related factor 2 and ATP-binding Cassette transporters via protein kinase A and Sirtuin-1 in mouse and human. *Antioxidants & redox signaling* **20**: 15–30.
- Kunz WS. 2001. Control of oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1504**: 12–19.
- De Lange P, Farina P, Moreno M, Ragni M, Lombardi A, Silvestri E, Burrone L, Lanni A, Goglia F. 2006. Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**: 2579–81.
- 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.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274–293.
- Lee SJ, McPherron a C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9306–11.
- Lempiäinen H, Halazonetis TD. 2009. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *The EMBO journal* **28**: 3067–3073.
- Li J, Kim SG, Blenis J. 2014. Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metabolism* **19**: 373–379.
- Lim ALL, Ip YK. 1989. Effect of fasting on glycogen metabolism and activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in the mudskipper *Boleophthalmus boddarti*. *Journal of Fish Biology* **34**: 349–367.
- Lkhagvadorj S, Qu L, Cai W, Couture OP, Barb CR, Hausman GJ, Nettleton D, Anderson LL, Dekkers JCM, Tuggle CK. 2010. Gene expression profiling of the short-term adaptive response to acute caloric restriction in liver and adipose tissues of pigs differing in feed efficiency. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **298**: R494–R507.
- Lo J, Lee S, Xu M, Liu F, Ruan H, Eun A. 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.
- Luo W, Brouwer C. 2013. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* **29**: 1830–1831.

- Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G, Patarnello T. 2001a. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509, 36-40
- Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, Mascarello F, Patarnello T. 2001b. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 3: 224–30.
- Manning B, Cantley L. 2007. AKT/PKB Signalling: Navigating Downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
- Marandel L, Seiliez I, Veron 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*: 253–263.
- Mardis ER. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics* 9: 387–402.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben L a, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, et al. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–80.
- Martin B, Pearson M, Brennehan R, Golden E, Wood W, Prabhu V, Becker KG, Mattson MP, Maudsley S. 2009. Gonadal transcriptome alterations in response to dietary energy intake: Sensing the reproductive environment. *PLoS ONE* 4.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17: 10–12.
- Masanori Nagai SI. 1972. Carbohydrate Metabolism in Fish. 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.
- Masayuki Furuichi YY. 1982. Effect of Insulin on Blood Sugar Levels of Fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48: 1289–1291.
- McGoogan BB, Gatlin DM. 2000. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 182: 271–285.
- McPherron A, Lawler A, Lee S. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. : 83–90.
- Medeiros EF, Phelps MP, Fuentes FD, Bradley TM. 2009. Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297: R235–42.
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante I V. 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*). *The British journal of nutrition* 82: 223–32.
- Metón I, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante I V. 2000. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Journal of nutrition* 130: 757–760.
- Mihaylova MM, Shaw RJ. 2012. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. 13: 1016–1023.

- 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 Y-W. 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.
- Montserrat N, Gómez-Requeni P, Bellini G, Capilla E, Pérez-Sánchez J, Navarro I, Gutiérrez J. 2007. Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **267**: 188–198.
- Montserrat N, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J. 2012. Metabolic Effects of Insulin and IGFs on Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Muscle Cells. *Frontiers in endocrinology* **3**: 55.
- Moon T. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **129**: 243–9.
- Morais S, Edvardsen RB, Tocher DR, Bell JG. 2012. Transcriptomic analyses of intestinal gene expression of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed diets with Camelina oil as replacement for fish oil. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **161**: 283–93.
- Morgan JE, Partridge T a. 2003. Muscle satellite cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **35**: 1151–1156.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS genetics* **3**: e79.
- Nadjar-Boger E, Funkenstein B. 2011. Myostatin-2 gene structure and polymorphism of the promoter and first intron in the marine fish *Sparus aurata*: evidence for DNA duplications and/or translocations. *BMC genetics* **12**: 22.
- 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.
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, 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, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K, et al. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 15103–10.
- Neufers PD, Carey J, Dohm GL. 1993. Transcriptional Regulation of the Gene for Glucose Transporter GLUT4 in Skeletal Muscle. *Biochemistry* **268**: 13824–13829.
- 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.
- Olson E, Klein W. 1994. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes & Development*: 1–8.

- Olsvik P a, Hemre G-I, Waagbø R. 2013. Exploring early micronutrient deficiencies in rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by next-generation sequencing technology--from black box to functional genomics. *PLoS one* **8**: e69461.
- 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, Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2002. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1579**: 35–42.
- Panserat S, Skiba-Cassy S, Seiliez I, Lansard M, Plagnes-Juan E, Vachot C, Aguirre P, Larroquet L, Chavernac G, Médale F, et al. 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **297**: R707–R715.
- Pereiro P, Balseiro P, Romero A, Dios S, Forn-Cuni G, Fuste B, Planas J V, Beltran S, Novoa B, Figueras A. 2012. High-throughput sequence analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) transcriptome using 454-pyrosequencing for the discovery of antiviral immune genes. *PLoS one* **7**: e35369.
- Peres H, Gonçalves P, Oliva-teles A. 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **179**: 415–423.
- Pérez-Sánchez J, Martí-Palanca H, Kaushik SJ. 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Journal of nutrition* **125**: 546–552.
- Plisetskaya EM. 1998. Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **121**: 3–11.
- Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW. 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* **182**: 1015–45.
- 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.
- Reinecke M, Collet C. 1998. The Phylogeny of the Insulin-like Growth Factors. *International Review of Cytology* **183**: 1–94.
- Rescan PY. 2001. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **130**: 1–12.
- Rescan PY. 2005. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *General and comparative endocrinology* **142**: 111–6.
- Rodgers BD, Garikipati DK. 2008. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine reviews* **29**: 513–34.
- Rodgers BD, Weber GM, Kelley KM, Levine MA, Buel D. 2003. Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae ; short-term fasting elevates. *Am. J. Physiol., Regul.* **284**: 1277-1286.

- Rommel C, Clarke A, Zimmermann S, Yancopoulos D, Glass DJ. 1999. Differentiation Stage – Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt. *Science* **286**: 1738–1742.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry* **242**: 84–89.
- Rønnestad I. 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture* **227**: 147–164.
- Rowlerson a., Radaelli G, Mascarello F, Veggetti a. 1997. Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell and Tissue Research* **289**: 311–322.
- Rudnicki A, Schnegelsberg J, Stead H, Braun T, Arnold H, Jaenisch R. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**: 1351–1359.
- Sabatini M. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature reviews. Cancer* **6**: 729–734.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner J-A, Pérez-Sánchez J. 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and comparative endocrinology* **142**: 193–203.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Prunet P, Pérez-Sánchez J. 2009. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **154**: 197–203.
- Salem M, Kenney PB, Rexroad CE, Yao J. 2006. Microarray gene expression analysis in atrophying rainbow trout muscle: a unique nonmammalian muscle degradation model. *Physiological genomics* **28**: 33–45.
- Salem M, Rexroad CE, Wang J, Thorgaard GH, Yao J. 2010. Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC genomics* **11**: 564.
- Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. 2007. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell* **25**: 903–915.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)* **320**: 1496–501.
- Sánchez A, Villa MCR De. 2008. A Tutorial Review of Microarray Data Analysis. *Bioinformatics*: 1–55.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. 2004. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* **117**: 399–412.
- De Santis C, Bartie KL, Olsen RE, Taggart JB, Tocher DR. 2015. 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*). *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* **15**: 1–11.
- 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**: 182–91.
- Šášík R, Woelk CH, Corbeil J. 2004. Microarray truths and consequences. *Journal of molecular endocrinology* **33**: 1–9.

- Scheepers A, Joost H, Schürmann A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* **28**: 364–371.
- Schuchardt D, Vergara JM, Fernández-Palacios H, Kalinowski CT, Hernández-Cruz CM, Izquierdo MS, Robaina L. 2007. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **14**: 1-9
- 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**: R733–43.
- Seiliez I, Sabin N, Gabillard J-C. 2012. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblasts. *Molecular and cellular endocrinology* **351**: 220–6.
- Shamblott MJ, Chen TT. 1992. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. **89**: 8913–8917.
- Silva JLT, Giannocco G, Furuya DT, Lima GA, Moraes PAC, Nacheff S, Bordin S, Britto LRG, Nunes MT, Machado UF. 2005. NF-kappaB, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Molecular and cellular endocrinology* **240**: 82–93.
- Slentz CA, Gulve EA, Rodnick KJ, Henriksen EJ, Youn JH, Holloszy JO. 1992a. Glucose transporters and maximal transport are increased in endurance-trained rat soleus. *J Appl Physiol* **73**: 486–492.
- Slentz CA, Gulve EA, Rodnick KJ, Henriksen EJ, Youn JH, Holloszy JO. 1992b. Glucose transporters and maximal transport are increased in endurance-trained rat soleus. *J Appl Physiol* **73**: 486–492.
- Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**: 59–71.
- Staal GE, van Berkel TJ, Nijessen JG, Koster JF. 1975. Normalisation of red blood cell pyruvate kinase in pyruvate kinase deficiency by riboflavin treatment. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **60**: 323–327.
- Stellabotte F, Dobbs-McAuliffe B, Fernández D a, Feng X, Devoto SH. 2007. Dynamic somite cell rearrangements lead to distinct waves of myotome growth. *Development (Cambridge, England)* **134**: 1253–1257.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* **14**: 395–403.
- Storebakken T, Kvien I., Shearer K., Gridale-Helland B, Helland S., Berge G. 1998. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*): evaluation of different faecal collection methods. *Aquaculture* **169**: 195–210.
- Sturgill TW, Cohen A, Diefenbacher M, Trautwein M, Martin DE, Hall MN. 2008. TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryotic Cell* **7**: 1819–1830.
- Tan X, Du SJ. 2002. Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Development genes and evolution* **212**: 207–17.
- 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 Part 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. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 31615–31620.
- Vadlakonda L, Dash A, Pasupuleti M, Anil Kumar K, Reddanna P. 2013. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Frontiers in Oncology* **3**: 1–9.
- Vargas-Chacoff L, Astola a, Arjona FJ, Martín del Río MP, García-Cózar F, Mancera JM, Martínez-Rodríguez G. 2009. Pituitary gene and protein expression under experimental variation on salinity and temperature in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **154**: 303–8.
- Vélez EJ, Lutfi E, Jiménez-Amilburu V, Riera-Codina M, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J. 2014. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *General and comparative endocrinology* **205**: 296–304.
- Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH. 1995. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *The Journal of cell biology* **128**: 563–76.
- Wang H, Liu D, Cao P, Lecker S, Hu Z. 2010. Atrogin-1 Affects Muscle Protein Synthesis and Antidiabetes Drug Berberine. **59**.
- 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.
- Watabe S. 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology* **55**: 1–18.
- Weinberg ES, Allende ML, Kelly CS, Abdelhamid a, Murakami T, Andermann P, Doerre OG, Grunwald DJ, Riggelman B. 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development (Cambridge, England)* **122**: 271–280.
- 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. *J. Nutr.* **117**: 280–285.
- Woo S-Y, Kim D-H, Jun C-B, Kim Y-M, Haar E Vander, Lee S, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. 2007. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**: 25604–25612.
- Wright, Jr. JR, 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.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471–84.
- Yabu T, Imamura S, Mizusawa N, Touhata K, Yamashita M. 2012. Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* **14**: 491–501.

- Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. 2015. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Reports* **12**: 937–943.
- Yang Q, Guan K-L. 2007. Expanding mTOR signaling. *Cell research* **17**: 666–681.
- Yang YH, Speed T. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature reviews. Genetics* **3**: 579–588.
- Zaki NM. 2014. Strategies for oral delivery and mitochondrial targeting of CoQ10. *Drug delivery* **00**: 1–14.
- Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. 2000. Regulation of cellular growth by the dTOR. *Genes & Development*: 2712–2724.
- Zhu K, Wang H, Wang H, Gul Y, Yang M, Zeng C, Wang W. 2014. Characterization of muscle morphology and satellite cells, and expression of muscle-related genes in skeletal muscle of juvenile and adult *Megalobrama amblycephala*. *Micron (Oxford, England : 1993)* **64**: 66–75.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**: 21–35.
- Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15983–7.
- Zorzano a, Palacin M, Guma a. 2005. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **183**: 43–58.

8. ANEXOS



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



Albert Caballero-Solares^a, Ivan Viegas^b, María C. Salgado^c, Ana M. Siles^c, Alberto Sáez^c, Isidoro Metón^c, Isabel V. Baanante^c, Felipe Fernández^{a,*}

^a Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Center for Neurosciences and Cell Biology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

^c Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2014

Received in revised form 24 March 2015

Accepted 26 March 2015

Available online 31 March 2015

Keywords:

Glutamate

Glutamine

Fish metabolism

Protein retention

Sparus aurata

ABSTRACT

The present study evaluates the effect of dietary glutamate and glutamine supplementation on growth performance, body composition and expression of key enzymes involved in the hepatic metabolism of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish were fed for 52 days with four diets, which were identical in composition except for a 4% supplementation with glutamate (GLU diet), glutamine (GLN diet), carbohydrate (CHO diet) or bovine serum albumin (BSA diet). Glutamate and glutamine supplementation improved feed conversion ratio and protein retention compared to carbohydrate supplementation, and, in the case of glutamate, protein retention was improved over that of fish fed the protein supplemented diet. Feeding CHO and GLU diets resulted in up-regulation of glucokinase and lipogenic enzymes compared to fish fed GLN and BSA diets. Consistently, fish fed CHO or GLU diets showed higher triglyceride levels in serum and liver, and feeding the GLU diet resulted in higher body fat content than in fish fed GLN or BSA diets. The liver of fish fed GLN or BSA diets showed increased glutamate dehydrogenase activity in the direction of the glutamate oxidation. In contrast to fish fed the BSA diet, increased glutamate oxidation did not reduce free glutamine and glutamate levels in the liver of fish fed the GLN diet, suggesting that glutamine intake exceeded liver's energy requirements. In conclusion, glutamate supplementation improved hepatic glucose metabolism, whereas supplemented glutamine seems to be preferentially oxidized over amino acids derived from dietary protein, thus promoting higher protein retention in both cases. Our findings indicate that glutamate and glutamine could partly replace dietary protein and that glutamate supplementation could also facilitate protein replacement by carbohydrates in fish feeds.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glutamine and glutamate are non-essential amino acids (NEAA) with relevant functions in animal physiology and metabolism (Rezaei et al., 2013; Wu, 2010). Glutamate plays a key role in the amino acid metabolism through its conversion to α -ketoglutarate or other NEAA. These conversions are mediated by different transaminases and glutamate dehydrogenase (Brosnan, 2000; Brosnan and Brosnan, 2009). By the action of these enzymes, carbon skeletons from amino acids can be used to replenish TCA cycle or derived to glucose production through the gluconeogenic pathway. Glutamate is an important precursor of glutathione, a major intracellular antioxidant. It also acts as a signaling molecule regulating appetite and digestion. In addition, glutamate is

an important neurotransmitter in the central nervous system of mammals (Brosnan and Brosnan, 2013; Burrin and Stoll, 2009; Torii et al., 2013).

Glutamine can be synthesized from glutamate by glutamine synthetase and converted to glutamate by glutaminase (Newsholme et al., 2003). In mammals, glutamine synthesis and catabolism play important roles in regulating ammonia levels and in acid-base homeostasis (Taylor and Curthoys, 2004). Moreover, glutamine is almost essential for cell proliferation both as an energy substrate and as a precursor of purine and pyrimidine nucleotides (Li and Gatlin, 2006; Wu et al., 2011). In mammals, glutamine metabolism activates the mammalian target of rapamycin (mTOR), a Ser/Thr protein kinase involved in cell growth, metabolism and protein synthesis (Durán and Hall, 2012; Fumarola et al., 2005; Wu et al., 2013).

Research on amino acid requirements of reared fish has to date largely focused on essential amino acids (EAA), given that their deficiency have negative effects on fish growth, health and development (Li et al., 2009). Nevertheless, growing evidence points to a significant

* Corresponding author at: Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934021514; fax: +34 934111438.

E-mail address: ffernandez@ub.edu (F. Fernández).

role of NEAA in fish nutrition. Optimum dietary levels of NEAA have been found to improve protein utilization and growth in different fish species (Green et al., 2002; Peres and Oliva-Teles, 2006; Schuhmacher et al., 1995). Indeed, appropriate levels of NEAA in the diet can spare EAA from being catabolized by fish (Abboudi et al., 2009; Conceição et al., 2002; Kim et al., 1992; Rønnestad et al., 2003). Only a few studies have addressed the metabolic role of a specific NEAA on fish nutrition. However, it is already known that dietary NEAA levels have important metabolic effects, such as sustaining gluconeogenic and lipogenic fluxes (Figueiredo-Silva et al., 2010; Kirchner et al., 2003; Moyano et al., 1991).

The effect of supplementing diets with glutamate or glutamine in mammals has been studied mainly in piglets, with little published work on fish. In both mammals and fish, studies to date have focused on the role of these two amino acids as energy sources for intestinal cells and tissues (Ando, 1988; Blachier et al., 2009; Burrin and Stoll, 2009; Reeds et al., 2000), and the derived beneficial effects on the maintenance of the intestinal structure and function (Cabrera et al., 2013; Cheng et al., 2011, 2012; Pohlenz et al., 2012; Qiyu et al., 2011; Rezaei et al., 2013; Shan et al., 2012; Wu et al., 2011; Yan and Qiu-Zhou, 2006). A significant part of the glutamate and glutamine absorbed by the intestine is transported to the liver (Brosnan, 2003), the major organ involved in nutrient assimilation and transformation into oxidizable substrates, such as glucose and fatty acids, that can be utilized by the whole body.

In piglets, glutamine and glutamate supplementation enhance feed efficiency and growth, whereas their reported effects on fish growth performance have to date been inconclusive. Glutamate supplementation has been reported to either increase (Hughes, 1985; Oehme et al., 2010), decrease (Figueiredo-Silva et al., 2010; Mambrini and Kaushik, 1994), or having no effect on fish growth performance (Kirchner et al., 2003). There is a stronger evidence that glutamine promotes growth in fish (Cheng et al., 2012; Qiyu et al., 2011; Schuhmacher et al., 1995; Wang et al., 2011; Yan and Qiu-Zhou, 2006).

The aim of the present study was to analyze the effect of glutamate and glutamine supplementation on growth performance and their role in the expression of key enzymes involved in the liver metabolism of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). Such knowledge could be helpful to evaluate the possible role of glutamine and glutamate in sparing dietary protein.

2. Materials and methods

2.1. Diets

Four isoenergetic diets supplemented with 4% glutamate (GLU), glutamine (GLN) or bovine serum albumin (BSA) at the expense of dietary carbohydrate contents (CHO) were fed to *S. aurata* juveniles (Table 1). CHO and BSA diets were designed as controls to assess the effect of substituting dietary carbohydrates and proteins, respectively, by glutamate or glutamine.

Differences in the amino acid composition of diets were negligible (Table 2), except for diets GLU and GLN, which presented higher levels of glutamate and glutamine, respectively.

2.2. Feeding trial and sampling

Gilthead seabream (*S. aurata*) juveniles (3.7 ± 0.5 g body weight, $n = 186$) were obtained from Piscimar (Burriana, Spain) and distributed in twelve seawater aquaria of 260 l, 15–17 fish per aquarium. Fish maintenance conditions were as previously described in Fernández et al. (2007). Fish were acclimated for two weeks to facility conditions and fed a commercial diet Microbaq-15 (Dibaq Group, Spain; 51% crude protein, 21% crude fat, 14% carbohydrates). Each experimental diet was randomly assigned to three aquaria. The fish were fed for 52 days with a daily ration equivalent to 4% body weight (BW), divided into two meals (at 9.30 and 15.30 h) from Monday to Friday. On

Table 1
Composition and proximate analysis of the experimental diets.

	CHO	GLU	GLN	BSA
<i>Formulation (%)</i>				
Brown fish meal ^a	70.0	70.0	70.0	70.0
Fish oil ^b	12.7	12.7	12.7	12.7
Starch ^c	14.2	10.2	10.2	10.2
Glutamate ^d	–	4.0	–	–
Glutamine ^d	–	–	4.0	–
Albumin ^d	–	–	–	4.0
Carrageenan ^d	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture ^e	0.9	0.9	0.9	0.9
Vitamin mixture ^f	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Chemical analysis (% dry weight, DW)</i>				
Crude protein	51.9	55.6	56.1	55.9
Carbohydrate ^g	18.3	14.0	13.6	14.1
Crude fat	18.4	18.8	18.9	18.9
Ash	11.3	11.6	11.4	11.1
Gross energy (kJ/g DW) ^h	22.8	23.0	23.1	23.2

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

^b Fish oil from A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

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

^d L-glutamic acid, L-glutamine, bovine serum albumin and iota carrageenan from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

^e Mineral mixture (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.

^f Vitamin mixture (mg/kg): choline chloride, 1200; myo-inositol, 400; ascorbic acid, 200; nicotinic acid, 70; all-rac-tocopherol acetate, 60; calcium pantothenate, 30; riboflavin, 15; pyridoxin, 10; folic acid, 10; menadione, 10; thiamin-HCl, 8; all-trans retinol, 2; biotin, 0.7; cholecalciferol, 0.05; cyanocobalamin, 0.05.

^g Carbohydrates were calculated by difference.

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

weekends, the fish were fed a single meal of 2% BW. Fish well accepted all diets and consumed the ration within 10–15 min completely. Fish from each aquarium were individually weighed every 7–10 days to adjust feed ration. Fish were not fed the days they were weighed.

For initial and final whole-body composition analysis, 12 fish were sacrificed in the beginning, and another 5 fish were taken from each aquarium and sacrificed at the end of the experiment. Prior to sampling, fish were fasted for 24 h to ensure complete evacuation of the gut. Fish were sacrificed by anesthesia overdose (MS-222), ground and kept at –20 °C until analysis. The remaining fish were anesthetized by immersion in seawater with 70 mg/l of MS-222. Once anesthetized, fish were sacrificed by cervical section, and immediately dissected to obtain blood and liver samples. Serum from blood samples was recovered after centrifugation (4000 rpm for 15 min) and stored at –20 °C.

Table 2
Amino acid composition (% DW) of the experimental diets.

	CHO	GLU	GLN	BSA
Arg	3.2	3.0	3.0	3.3
His	1.9	1.8	1.8	1.9
Lys	3.9	3.7	3.7	4.2
Thr	2.2	2.1	2.1	2.3
Ile	2.0	1.9	1.8	2.0
Leu	3.6	3.4	3.4	3.9
Val	2.4	2.3	2.3	2.5
Met	1.4	1.3	1.4	1.4
Phe	1.9	1.7	1.8	2.1
Cys	0.1	0.2	0.2	0.4
Tyr	1.5	1.4	1.4	1.6
Asx ^a	4.5	4.2	4.3	4.7
Glx ^b	6.3	9.9	10.1	6.9
Ala	2.9	2.7	2.8	3.0
Gly	2.9	2.7	2.8	2.9
Ser	1.9	1.8	1.9	2.0
Pro	1.8	1.6	1.7	1.9

^a Asx is the sum of Asn and Asp, since Asn is converted to Asp during hydrolysis.

^b Glx is the sum of Gln and Glu, since Gln is converted to Glu during hydrolysis.

Liver samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. All experimental procedures followed the guidelines of the Animal Use Committee of the University of Barcelona.

2.3. Food and whole-body composition

Grounded samples of feed and fish were dried at 70°C until constant weight to calculate moisture content. Dried samples were analyzed for nitrogen (N) content with a Carlo Erba NA 2100 elemental analyzer (CE Instruments, Italia). Crude protein was calculated multiplying N content by a factor of 6.25. Crude fat was extracted with petroleum ether using a Soxtec HT 1043 extraction unit (Foss Tecator, Denmark) and then weighed to calculate their contribution to whole dry weight. For ash content determination, weighed samples were incinerated in a muffle furnace (Hobersal 12PR/300, Hobersal, Spain) at 450°C for 12 h and then weighed again.

To analyze dietary amino acid composition, feed samples were hydrolyzed at 105°C for 24 h in vacuum-sealed tubes with 6 M-HCl containing 0.4% (w/v) phenol. An internal standard of 2.5 mM- α -aminobutyric acid was added prior to hydrolysis. Amino acids were analyzed by HPLC using the AccQTag pre-column derivatization method. Acid hydrolysis converts glutamine and asparagine to glutamate and aspartate, respectively. For this reason, these amino acids have been represented as Glx (sum of glutamine and glutamate) and Asx (sum of asparagine and aspartate) in Table 2.

2.4. Metabolites in liver and serum

Serum glucose and triglycerides were determined with commercial kits (Glucose MR, Triglycerides MR; Linear Chemicals, Montgat, Spain). For liver glycogen and triglycerides analysis, 50 mg of powdered tissue was homogenized in 0.6 M-perchloric acid (1/5, w/v) with a PTA-7 Polytron (position 2–3, 10 s). An aliquot of the homogenate (100 μl) was incubated with amyloglucosidase following the method described by Keppler and Decker (1974) to convert glycogen into glucose. For triglyceride determination, 50 μl of the homogenate were neutralized with 10 μl of 1 M- KHCO_3 . After the addition of 190 μl of 0.5% (v/v) NP-40, the mix was incubated at 80°C for 5 min. After removal of insoluble material by centrifugation at 13 000 g for 2 min, glucose and triglycerides were analyzed as described for the serum samples.

To determine liver free glutamate and glutamine content, 25 mg of the powdered tissue was homogenized in 1.5 M-perchloric acid (1/10, w/v) and then centrifuged at 10 000 g for 15 min. Supernatants were assayed for glutamate and glutamine with a commercial kit (GLN-1, Sigma-Aldrich, MO, USA).

2.5. Liver enzyme activity assays

Fish livers were individually homogenized, and the activity of selected key enzymes involved in hepatic metabolism was analyzed. Crude extracts for assays were obtained by homogenization of powdered frozen liver (1/5, w/v) in ice-cold buffer (50 mM-Tris-HCl pH 7.5; 4 mM-EDTA; 50 mM-NaF; 0.5 mM-PMSF; 1 mM-DTT; 250 mM-sucrose) using a Polytron (position 3–4, 10 s). Then, homogenates were centrifuged at 13 000 g for 45 min at 4°C , supernatants were collected, and the upper lipid layer and the cell debris pelleted at the bottom were discarded. For glucokinase (GK; EC 2.7.1.12) activity assay, 100 mM-KCl was added to the homogenization buffer and the crude extracts were filtered through a Sephadex G-25 column.

Alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) activities were determined using commercial kits (ALT-GPT BR and AST-GOT BR, respectively; Linear Chemicals, Montgat, Spain). Activities of GK, 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) and glucose 6-phosphate dehydrogenase

(G6PDH, EC 1.1.1.49) were assayed as previously described (Caseras et al., 2000; Metón et al., 1999).

GDH activity was measured both in the oxidative (α -ketoglutarate formation, GDHox) and the reductive (glutamate formation, GDHred) direction. GDHox activity was assayed by a method adapted from Gómez-Requeni et al. (2003). To this end, 4 μl of homogenate was added to a reaction mixture containing 20 mM-L-glutamate, 1 mM-NAD⁺, 1 mM-ADP and 100 mM-hydrazine buffered with 175 mM-Tris-HCl (pH 9). GDHred activity was assayed as previously described in Bibiano Melo et al. (2006).

All enzyme activity assays were performed at 30°C and followed at 340 nm using a COBAS MIRA S spectrophotometric analyzer (Hoffman-La Roche, Switzerland). Protein content in the extracts was determined by the method of Bradford (1976), with bovine serum albumin as standard. Enzyme activity is expressed as U per g of protein.

2.6. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total mRNA from liver samples was isolated using the Speedtools Total RNA Extraction Kit (Biotools, Spain). The RNA quantity and quality were determined spectrophotometrically at 260/280 nm using a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). cDNA templates for qRT-PCR analysis were obtained from 2 μg of total RNA, after 1 h incubation at 37°C , using M-MLV RT (Promega, USA), in the presence of an RNase inhibitor (RNasin, Promega) and random hexamer primers.

Quantitative real-time PCR was performed to detect variations in the expression of genes encoding the enzymes in Section 2.5, as well as cytosolic acetyl-CoA carboxylase (ACC1, EC 6.4.1.2), using gene-specific oligonucleotides (Table 3). PCR amplification was carried out in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), 0.4 μM of each primer, 10 μl of Power SYBR Green (Applied Biosystems) and 1.6 μl of $10\times$ diluted cDNA, in a final volume of 20 μl . For each sample, PCR was performed in duplicate and gene expression calculated by the standard $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. *S. aurata* ribosomal subunit 18 (18S) and elongation factor 1 α (EF1 α) were chosen as reference genes to normalize expression levels of targets between different samples. Since normalization with 18S and EF1 α gave the same results, the normalized values presented in this study are referred to 18S gene.

Table 3
Primers used for gene expression analysis by real-time RT-PCR.

Gene	Accession number	Primer	
18 s	AM490061	Forward	TTACGCCATGTGTCTGCTGAG
		Reverse	AGGATTCTGCATGATGGTCACC
GK	AF169368	Forward	TGTGTCAGTCTCAACTCGACC
		Reverse	AGGATCTGTCTTACCATGTGGAT
PFK-1	KF857580	Forward	TGCTGGGGACAAAACGAACTCTTCC
		Reverse	AAACCTCCGACTACAAGCAGAGCT
PK	KF857579	Forward	CAAAGTGGAAAGCCGGCAAGGG
		Reverse	GTCGCCCTGGCAACCATAAAC
FBPase-1	AF427867 ¹	Forward	CAGATGGTGAGCCGTGTGAGAAGGATG
		Reverse	GCCGTACAGAGCGTAACCAAGCTGCC
G6PDH	JX073711	Forward	TGATGATCCAACAGITTCCTA
		Reverse	GCTCGTCTGACACACTGA
ACC1	JX073712	Forward	CCCAACTTCTTACCACAG
		Reverse	GAAGTGGAACTTACTACTAC
cALT1	AY206502	Forward	GCGAGCCTAGTGAGCAACTGATATC
		Reverse	CCGCTCGTGGACTACGGGACCACGA
cAST	KM014670	Forward	TGGAAGGGTAACTGAAAGACC
		Reverse	GGTCCCGGGGTGCCAGACC
GDH	JX073708	Forward	GGTATCCACGGTCTGATCTCAGCC
		Reverse	GAGACCCACATTACCAAGCCCTG

cALT1, cytosolic ALT isoform 1; cAST, cytosolic AST isoform.

¹ From Panseerat et al. (2002).

2.7. Calculations

Specific growth rate (SGR, %/day) was calculated as $SGR = 100(\exp^G - 1)$, where $G = \ln(W1 / W0) / T$, $W0$ and $W1$ are the initial and final fish weight (g), and T is the number of days between weightings (Hardy and Barrows, 2002). Feed Intake (g/fish) was calculated as total dry feed intake (g) / number of fish. Relative feed intake (RFI, g/Kg ABW/day) was calculated as total dry feed intake (g) / average body weight (ABW, kg) / T (day), where $ABW = (W1 + W0) / 2$. Feed conversion ratio (FCR) was calculated as dry feed intake (g)/wet weight gain (g). Protein retention (PR, %) was the (body protein gain (g) / protein intake (g)) $\times 100$. Fat retention (FR, %) was the (body fat gain (g) / fat intake (g)) $\times 100$. The Hepatosomatic Index (HSI, %) was calculated as (liver fresh weight (g) / fish body weight (g)) $\times 100$.

2.8. Statistical analysis

Data were statistically analyzed using SPSS 19.0 (SPSS Inc.). For variables with one average value per aquarium, statistical differences among diets were analyzed by one-way ANOVA. For variables with multiple independent values per aquarium, data were submitted to two-way ANOVA with the 'aquarium' random factor being nested to the main factor 'diet'. When statistical differences were found, one- and two-way ANOVAs were followed by Tukey's post-hoc test to identify differences among mean values. The accepted level of significance was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Growth performance and whole body composition

Final weight, growth rate and feed intake of *S. aurata* juveniles were not statistically different among the four dietary treatments (Table 4). However, fish fed the GLU or the GLN diet showed better FCR and protein retention than fish fed the CHO diet. Protein retention in fish fed GLU diet was even higher than in fish fed BSA diet. The GLU diet increased lipid retention significantly, compared to GLN and BSA diets. The fish from the GLU group consumed less feed per unit weight than those of the CHO group. Moreover, feeding the GLU diet resulted in a higher hepatosomatic index (HSI).

Fish fed GLN diet presented higher body protein content than fish fed GLU or CHO, but similar to the content found in fish fed BSA (Table 4). Fish fed GLU diet showed higher fat content than those fed GLN or BSA diets, but similar to values found in fish fed CHO diet. Fish moisture and ash content were similar for all diets.

3.2. Metabolites in serum and liver

Fish fed GLN presented serum glucose levels similar to those found in fish fed BSA, but significantly higher than those found in fish fed diets CHO or GLU (Table 5). Liver glycogen and triglyceride contents were significantly higher in fish fed diets CHO and GLU, compared to animals fed either the GLN or the BSA diet. The livers of fish fed CHO, GLU and GLN diets showed similar values of free glutamate and glutamine, but values for fish fed BSA were significantly lower.

3.3. Liver enzyme activity and gene expression

Considering the key enzymes involved in glycolysis/gluconeogenesis, the highest GK activity and mRNA levels were found in fish fed diets GLU and CHO (Fig. 1). PFK-1 and PK activities and expression levels were lower in fish fed GLN, compared to fish fed the other diets. Fish fed GLU or GLN diets showed lower FBPase-1 mRNA levels than fish fed BSA, but similar to the levels found in fish fed CHO.

Hepatic lipogenesis was significantly affected by the composition of the diet (Fig. 2). Fish fed CHO gave higher G6PDH activity and mRNA levels than fish fed GLN or BSA, but similar to values found in the fish fed GLU diet. In comparison to fish fed CHO or BSA diets, ACC1 expression was down-regulated in the fish fed the GLN diet, and up-regulated in fish fed the GLU diet.

Activity and mRNA abundance of cytosolic ALT (cALT1) and cytosolic AST (cAST) were lower in the livers of fish fed CHO, GLU or GLN diets compared to fish fed the BSA diet (Fig. 3). GDH activity determined in the direction of glutamate formation (GDHred) was significantly lower in fish fed GLU or GLN than in fish fed CHO or BSA diets. Consistently, the lowest GDH mRNA levels were found in the liver of fish fed the amino acid-supplemented diets. However, when GDH activity was determined in the direction of the glutamate oxidation (GDHox), fish fed GLN and BSA diets showed the highest activity values.

4. Discussion

S. aurata juveniles fed the four diets did not present significant differences in final weight or specific growth rate (SGR). The fact that the overall nutrient composition and energy content of the diets were matched could explain these results. Moreover, activities of enzymes that control key rate-limiting steps of nutrient assimilation have been shown to vary with dietary composition (Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999; present work), possibly explaining the maintenance of relatively constant growth rates for different diets. Another reason for SGR similarities could reside in the restricted feeding regime applied to

Table 4
Data on growth performance, nutrient retention and whole-body composition of *Sparus aurata* fed the four experimental diets.

	CHO	GLU	GLN	BSA	p^1
Initial body weight (g)	6.34 \pm 0.10	6.30 \pm 0.13	6.40 \pm 0.17	6.46 \pm 0.08	0.811
Final body weight (g)	14.25 \pm 0.22	15.48 \pm 0.37	15.05 \pm 0.24	14.64 \pm 0.33	0.083
SGR (%/day)	1.57 \pm 0.04	1.74 \pm 0.08	1.66 \pm 0.02	1.59 \pm 0.03	0.102
FI (g/fish)	13.86 \pm 0.43	12.45 \pm 0.56	13.35 \pm 0.46	13.10 \pm 0.42	0.273
RFI (g/kg ABW/day)	28.44 \pm 0.55 ^a	24.87 \pm 1.24 ^b	26.62 \pm 0.18 ^{ab}	26.48 \pm 0.12 ^{ab}	0.039
HSI	1.12 \pm 0.04 ^b	1.51 \pm 0.04 ^a	1.13 \pm 0.03 ^b	1.16 \pm 0.03 ^b	<0.001
FCR	1.91 \pm 0.08 ^a	1.43 \pm 0.07 ^b	1.54 \pm 0.04 ^b	1.66 \pm 0.08 ^{ab}	0.013
PR (% intake)	17.07 \pm 0.46 ^c	23.24 \pm 0.60 ^a	21.25 \pm 0.53 ^{ab}	19.58 \pm 0.98 ^{bc}	0.004
LR (% intake)	30.81 \pm 4.74 ^{ab}	42.72 \pm 1.12 ^a	25.47 \pm 1.91 ^b	25.29 \pm 4.08 ^b	0.021
<i>Whole body composition (% fresh weight. FW; % dry weight. DW)</i>					
Moisture (% FW)	68.63 \pm 1.07	68.36 \pm 0.62	70.24 \pm 0.17	69.45 \pm 0.31	0.235
Crude protein (% DW)	52.64 \pm 0.62 ^c	55.08 \pm 0.66 ^{bc}	59.80 \pm 0.55 ^a	57.50 \pm 0.37 ^{ab}	<0.001
Crude fat (% DW)	29.99 \pm 1.40 ^{ab}	33.00 \pm 0.65 ^a	26.44 \pm 0.97 ^b	26.97 \pm 1.44 ^b	0.014
Ash (% DW)	11.88 \pm 0.25	11.51 \pm 0.03	12.48 \pm 0.51	12.27 \pm 0.42	0.121

Values are expressed as means \pm standard errors of the mean for three replicate groups of fish. Different superscript letters indicate significant differences between means. SGR: specific growth rate; FI: feed intake; RFI: relative feed intake; HSI: hepatosomatic index; FCR: feed conversion ratio; PR: protein retention; FR: fat retention.

¹ P value from ANOVA significance tests.

Table 5Metabolites concentrations in serum and liver of *Sparus aurata* fed the different experimental diets. Glycogen content in liver is expressed as mg of glucose per g fresh weigh (fw) of tissue.

	CHO	GLU	GLN	BSA	P ¹
<i>Serum</i>					
Glucose (mg/dL)	72.49 ± 5.57 ^b	80.01 ± 5.38 ^b	101.9 ± 6.34 ^a	89.85 ± 6.07 ^{ab}	0.008
Triglycerides (mg/dL)	842.2 ± 49.51 ^a	698.5 ± 49.93 ^{ab}	434.4 ± 30.75 ^c	572.4 ± 39.96 ^{bc}	<0.001
<i>Liver</i>					
Glycogen (mg/g fw)	89.89 ± 3.04 ^a	102.3 ± 6.42 ^a	67.60 ± 4.16 ^b	68.65 ± 3.87 ^b	<0.001
Triglycerides (mg/g fw)	5.24 ± 0.35 ^a	4.81 ± 0.14 ^a	3.25 ± 0.49 ^b	2.99 ± 0.30 ^b	<0.001
Glutamate (μmol/g fw)	7.89 ± 0.64 ^a	9.44 ± 0.91 ^a	9.79 ± 0.83 ^a	3.39 ± 0.16 ^b	<0.001
Glutamine (μmol/g fw)	4.49 ± 0.67 ^a	4.58 ± 0.47 ^a	5.05 ± 0.49 ^a	0.79 ± 0.17 ^b	<0.001

Values are expressed as means ± standard errors of the mean for 8–10 fish. Different superscript letters indicate significant differences between means.

¹ P value from ANOVA significance tests.

the fish. Growth differences might have been accentuated if the fish were fed *ad libitum*, considering that free amino acids usually act as feeding stimulants for fish (Li et al., 2009). However, differences in feed intake would have masked the specific effects of glutamate and glutamine on growth performance and the intermediary metabolism of *S. aurata*, which was the main objective of the present study.

Final weight, SGR and feed intake were similar but not identical for the four groups of fish. Small and non-significant differences in growth and feed intake resulted in small but significant differences in other growth performance parameters. Glutamate and glutamine supplementation improved FCR of *S. aurata* juveniles compared to the control diet supplemented with carbohydrate. These results are in agreement with studies in other fish species reporting that glutamate and glutamine supplementation improved growth and feed efficiency (Cheng et al., 2012; Hughes, 1985; Oehme et al., 2010; Qiyu et al., 2011; Wang et al., 2011; Yan and Qiu-Zhou, 2006).

Glutamate and glutamine supplementation improved protein retention in *S. aurata* juveniles, compared to the control diet supplemented with carbohydrate. This was an expected result considering that a moderate increase of dietary NEAA may improve fish growth performances,

by sparing EAA from being utilized as energy substrates (Abboudi et al., 2009; Conceição et al., 2002; Kim et al., 1992; Rønnestad et al., 2003). In the case of glutamate supplementation, the level of protein retention by fish was even better than the values obtained with the protein supplemented diet. This result can be attributed to the specific functional properties of glutamate and the induced changes in the metabolic machinery that are discussed below.

Our results with juveniles *S. aurata* show clear differences between glutamine and glutamate supplementation with respect to the regulation of liver glucose and lipid metabolism. All measured glycolytic enzymes showed down-regulation of mRNA levels and activity when the fish were fed the GLN diet (Fig. 4). In contrast, only GK mRNA expression and activity decreased in the fish fed the BSA diet. Furthermore, glutamine supplementation resulted in the highest serum glucose levels, which could be indicative of lower glycolytic capacity.

Glucose phosphorylation to glucose 6-phosphate by hepatic GK is a key step in glycogen synthesis and pentose phosphate pathway. Consistently, livers of fish fed the GLN diet showed lower glycogen content, as well as reduced G6PDH mRNA and activity values, compared to fish fed CHO or GLU diets. Given that oxidative pentose phosphate pathway is a

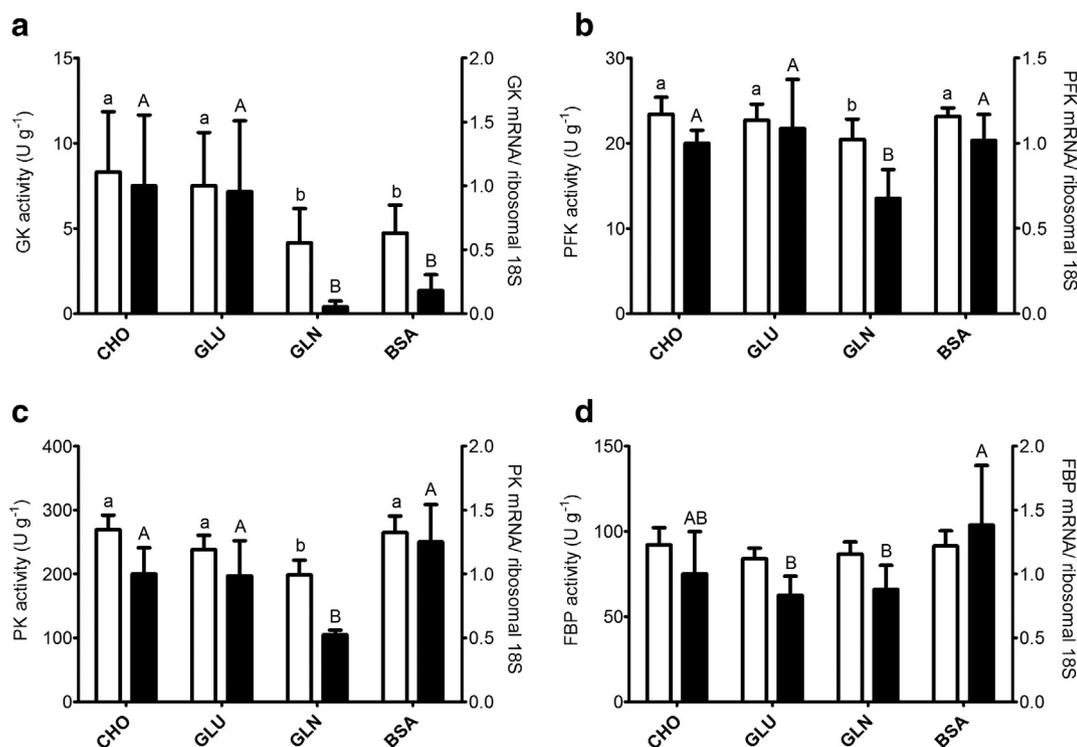


Fig. 1. Effect of different experimental diets on the activity and mRNA levels of (a) GK, (b) PFK-1, (c) PK and (d) FBPase-1 in liver of *Sparus aurata*. White and black bars represent mean values of enzyme activity (n = 12) and expression (n = 8), respectively. Error bars correspond to S.E.M. Different small and capital letters indicate significant differences (P < 0.05) in activity and mRNA levels, respectively.

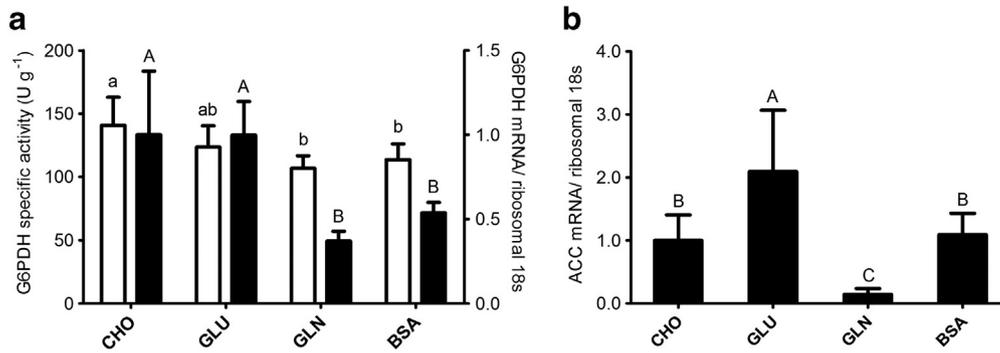


Fig. 2. Effect of different experimental diets on the activity and mRNA levels of (a) G6PDH and (b) ACC1 in liver of *Sparus aurata*. White and black bars represent mean values of enzyme activity ($n = 12$) and expression ($n = 8$), respectively. Error bars correspond to S.E.M. Different small and capital letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in activity and mRNA levels, respectively.

major producer of NADPH for fatty acid synthesis, a reduction in the pentose phosphate pathway activity is consistent with the low hepatic ACC1 mRNA levels observed in fish fed the GLN diet.

Fish fed GLN presented low levels of triglycerides in serum and liver, as well as low body fat content, supporting down-regulation of the lipogenic pathway. In contrast, fish fed GLU diet showed an up-regulation of GK expression, similar to that of fish fed CHO. Consistent with GK data, livers of fish fed GLU diet presented high glycogen content and up-regulation of G6PDH expression. Furthermore, glutamate supplementation promoted lipid synthesis and retention as seen by enhanced ACC1 mRNA levels, high body fat content, and increased triglyceride levels in serum and liver (Fig. 4).

The present study reports for the first time a significant effect of glutamate supplementation on the glycolytic enzymes activities and expressions in fish species. In humans, glutamate supplementation improves glucose metabolism (Di Sebastiano et al., 2013). In weaned piglets, glutamine supplementation down-regulates liver PK expression

(Xiao et al., 2012). Glutamate and glutamine have been proposed to regulate glycolysis and lipogenesis through the mediation of different cell signaling pathways (Meijer, 2003; Newsholme et al., 2003). Glutamine activates mTOR signaling (Durán and Hall, 2012; Fumarola et al., 2005; Wu et al., 2013), which mediates the transcriptional up-regulation of GK and fatty acid synthase (FAS, EC 2.3.1.85) in rainbow trout (Dai et al., 2013).

In vitro experiments, with cultured trout hepatocytes, indicated that GK and FAS up-regulation, through mTOR activation, is dependent on the presence of insulin (Lansard et al., 2010, 2011). Plasma insulin levels were not measured in the present study. However, increased glycolysis, glycogenesis and lipogenesis in fish fed the GLU diet, are consistent with the effects of insulin reported for fish (Caruso and Sheridan, 2011). So far, no effect of glutamate and glutamine on plasma insulin levels has been reported in fish. However, other amino acids such as arginine, alanine and methionine have shown higher insulinotropic activity in comparison to increased glucose levels (Andoh, 2007). In mammals,

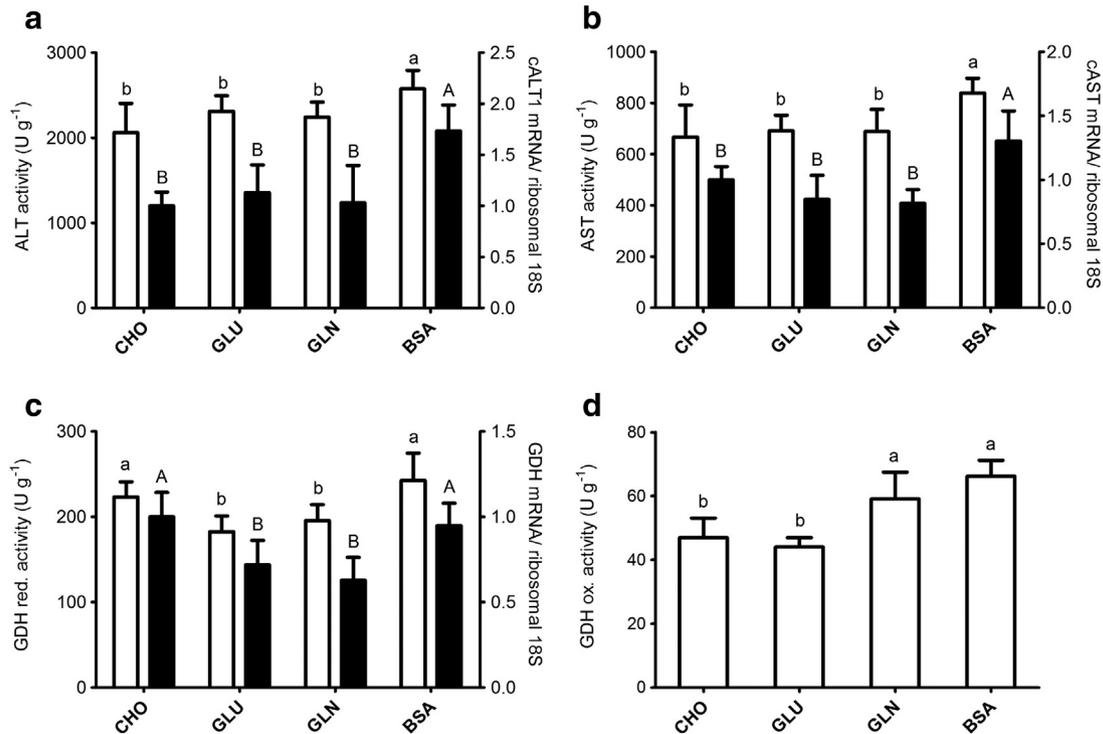


Fig. 3. Effect of different experimental diets on the activity and mRNA levels of (a) ALT, (b) AST and (c,d) GDH in liver of *Sparus aurata*. White and black bars represent mean values of enzyme activity ($n = 12$) and expression ($n = 8$), respectively. Error bars correspond to S.E.M. Different small and capital letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in activity and mRNA levels, respectively.

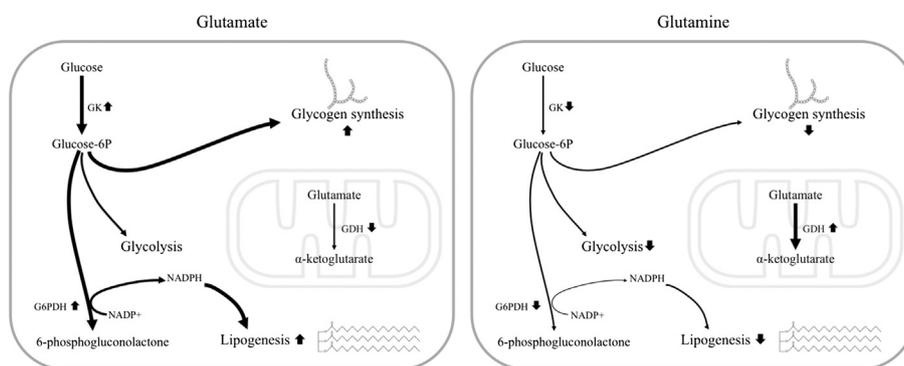


Fig. 4. Effect of glutamate and glutamine supplementation on the *Sparus aurata* liver intermediary metabolism.

glutamate and glutamine have been reported to enhance calcium-dependent insulin exocytosis caused either by glucose or leucine (Wiederkehr and Wollheim, 2012). Although the molecular mechanisms that explain the role of glutamate and glutamine in modulating glucose metabolism are still unclear (Wiederkehr and Wollheim, 2012), our findings support that dietary glutamate participates in the regulation of glucose metabolism in fish.

In the present study, hepatic FBPase-1 activity and gene expression were unaffected by differences in dietary carbohydrate content. These results are in agreement with previous studies indicating that gluconeogenesis in fish liver is poorly inhibited by dietary carbohydrate (Caseras et al., 2002; Enes et al., 2009; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999; Polakof et al., 2012). Poor regulation of FBPase-1 is thought to be one of the main causes for the low utilization of dietary glucose by fish. Indeed, FBPase-1 expression in the liver of *S. aurata* juveniles was not affected by glutamate or glutamine supplementation, despite both being major substrates for hepatic gluconeogenesis (Newsholme et al., 2003). PFK-1 and FBPase-1 regulate the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate substrate cycle. According to our results, the expression of these enzymes indicates that glycolysis is up-regulated in fish fed the GLU diet while it is down-regulated in fish fed the GLN diet (Fig. 4).

Other studies about the effect of glutamate supplementation on the gluconeogenic pathway in carnivorous fish produced inconclusive results. Kirchner et al. (2003), and Gómez-Requeni et al. (2003) found that glutamate supplementation did not affect the activity and gene expression of FBPase-1 and glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9). However, Kirchner et al. (2003) reported a significant reduction in the activity of mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.32). In contrast, Figueiredo-Silva et al. (2010) found that PEPCK activity was up-regulated in fish fed a diet supplemented with glutamate and aspartate.

According to the present results, amino acid metabolism appears to be differently affected depending on the nature of the supplemented nitrogen source. Liver ALT and AST expression levels indicate that glutamate or glutamine supplementation did not up-regulate transamination, compared to dietary supplementation with purified protein (BSA diet). Furthermore, previous research on NEAA supplementation to fish feeds did not show any effect on hepatic ALT and AST activity (Figueiredo-Silva et al., 2010; Gómez-Requeni et al., 2003; Peres and Oliva-Teles, 2006). This insensitivity of hepatic transaminase activities to dietary glutamate and glutamine may reflect the fact that a significant portion of dietary glutamate and glutamine is deaminated in the intestine of fish (Ando, 1988), as it is the case in mammals (Burrin and Stoll, 2009).

In the present study, glutamate/glutamine supplementation down-regulated GDHred activity and GDH mRNA levels. This result suggests that hepatic demand for glutamate was satisfied to a greater extent by dietary intake in relation to *de novo* synthesis. This situation opposes

to what was found in fish fed CHO or BSA diets. In contrast, according to GDHox activity values, glutamate was oxidized at higher rates in the liver of fish fed GLN or BSA diets than in fish fed CHO or GLU diets. Thus, GDHred and GDHox activities were affected differently by diet composition. Consistently, previous research on dietary glutamate supplementation to fish showed a similar decrease of the deaminating activity of GDH (Figueiredo-Silva et al., 2010).

The trend in GDHox activity among dietary treatments is coherent with the inverse trend in GK activity. Accordingly, fish fed GLN or BSA diets had a greater demand for glutamate as an energy source, whereas increased glycolysis in fish fed CHO or GLU diets probably decreased such demand. Increased GDHox activity in fish fed the GLN diet was not probably enough to reduce free glutamate and glutamine concentration in the liver, as it was the case in the fish fed the BSA diet. Therefore, glutamine intake would have exceeded liver's energy requirements, which in turn may have spared other dietary amino acids from being catabolized, thus improving protein retention of fish.

In conclusion, dietary supplementation with glutamate or glutamine improved protein utilization in *S. aurata* juveniles through different metabolic mechanisms. In the fish fed the glutamine supplemented diet, the liver seems to catabolize excess glutamine preferentially over amino acids derived from dietary protein. Instead, glutamate supplementation increased protein retention probably by improving hepatic glucose metabolism. Future studies will help to unravel the molecular basis of the observed glutamate-dependent stimulation of glycolysis, and whether this effect could facilitate protein replacement by carbohydrates in diets for farmed fish without compromising growth and feed utilization.

Acknowledgments

The present study was supported by the MICINN (Spain) BIO2009-07589 and MEC (Spain) AGL2012-33305 (co-funded by the European Regional Development Fund, ERDF, EC) grants. A.C.-S. was recipient of a Ph.D. fellowship from the Universitat de Barcelona. The authors would like to thank to Piscimar (Burriana, Spain) for providing the fish juveniles, and to the Aquarium of Barcelona for providing filtered seawater. Nitrogen, amino acid, and ash analysis were performed at the Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT UB). The Soxhlet extraction unit for crude fat determination was kindly lent by the Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Authors' responsibilities were as follows: A.C.-S. and F.F. designed the study. A.C.-S. and F.F. conducted the feeding trial; A.C.-S. analyzed growth performance and whole-body composition; A.C.-S. and I.V. carried out the biochemical analysis; M.C.S., A.M.S. and A.S. contributed to the biochemical analysis; A.C.-S., F.F., I.V.B. and I.M. analyzed the data and interpreted the results; A.C.-S.

drafted the manuscript. F.F., I.V.B. and I.M. revised and approved the final version of the manuscript. None of the authors have any conflicts of interest to declare.

References

- Aboudi, T., Mambrini, M., Larondelle, Y., Rollin, X., 2009. The effect of dispensable amino acids on nitrogen and amino acid losses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry fed a protein-free diet. *Aquaculture* 289, 327–333.
- Ando, M., 1988. Amino acid metabolism and water transport across the seawater eel intestine. *J. Exp. Biol.* 138, 93–106.
- Andoh, T., 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 308–317.
- Bibiano Melo, J.F., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., 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.
- Blachier, F., Boutry, C., Bos, C., Tomé, D., 2009. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 814S–821S.
- Bradford, M.M., 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.
- Brosnan, J.T., 2000. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J. Nutr.* 130, 988.
- Brosnan, J.T., 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* 133, 2068S–2072S.
- Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 2009. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 857–861.
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2013. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 45, 413–418.
- Burrin, D.G., Stoll, B., 2009. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 850–856.
- Cabrera, R.A., Usry, J.L., Arellano, C., Nogueira, E.T., Kutschenko, M., Moeser, A.J., Odle, J., 2013. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 1–13.
- Caruso, M.A., Sheridan, M.A., 2011. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 227–247.
- Caseras, A., Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta* 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*). *Br. J. Nutr.* 88, 607–614.
- Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin III, D.M., 2011. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 319, 247–252.
- Cheng, Z., Gatlin III, D.M., Buentello, A., 2012. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 362–363, 39–43.
- Conceição, L.E.C., Rønnestad, I., Tonheim, S.K., 2002. Metabolic budgets for lysine and glutamate in unfed herring (*Clupea harengus*) larvae. *Aquaculture* 206, 305–312.
- Dai, W., Panserat, S., Mennigen, J.A., Terrier, F., Dias, K., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2013. Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signalling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 216, 4483–4492.
- Di Sebastiano, K.M., Bell, K.E., Barnes, T., Weeraratne, A., Premji, T., Mourtzakis, M., 2013. Glutamate supplementation is associated with improved glucose metabolism following carbohydrate ingestion in healthy males. *Br. J. Nutr.* 2165–2172.
- Durán, R.V., Hall, M.N., 2012. Glutaminolysis feeds mTORC1. *Cell Cycle* 11, 4107.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539.
- Fernández, F., Miquel, A.G., 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 1–10.
- Figueiredo-Silva, A.C., Corraze, G., Kaushik, S., Peleteiro, J.B., Valente, L.M.P., 2010. Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids* 39, 1401–1416.
- Fumarola, C., Monica, S.L., Guidotti, G.G., 2005. Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Role of glutamine and of cell shrinkage. *J. Cell. Physiol.* 204, 155–165.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Caldich-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749–767.
- Green, J.A., Hardy, R.W., Brannon, E.L., 2002. The optimum dietary essential: nonessential amino acid ratio for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which maximizes nitrogen retention and minimizes nitrogen excretion. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 109–115.
- Hardy, R.W., Barrows, F.T., 2002. Diet formulation and manufacture. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish nutrition*, Third ed. Academic Press, New York, p. 588.
- Hughes, S.G., 1985. Evaluation of glutamic acid and glycine as sources of nonessential amino acids for lake trout (*Salvelinus namaycush*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 81, 669–671.
- Keppeler, D., Decker, K., 1974. Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed. Academic Press, New York, pp. 1127–1131.
- Kim, K., Grimshaw, T.W., Kayes, T.B., Amundson, C.H., 1992. Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid-degrading enzymes and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 107, 89–105.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 134, 337–347.
- 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.
- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Dias, K., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2011. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J. Nutr.* 141, 75–80.
- Li, P., Gatlin III, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251, 141–152.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43–53.
- Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1994. Partial replacement of dietary protein nitrogen with dispensable amino acids in diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 109, 469–477.
- Meijer, A.J., 2003. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *J. Nutr.* 133, 2057S–2062S.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 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.
- Moyano, F.J., Cardenete, G., De la Higuera, M., 1991. Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 100, 759–762.
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M.R., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2003. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem. Funct.* 21, 1–9.
- Oehme, M., Grammes, F., Takle, H., Zambonino-Infante, J.L., Refstie, S., Thomassen, M.S., Rørvik, K.A., Terjesen, B.F., 2010. Dietary supplementation of glutamate and arginine to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) increases growth during the first autumn in sea. *Aquaculture* 310, 156–163.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2002. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* 1579, 35–42.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 256, 395–402.
- Pohlenc, C., Buentello, A., Bakke, A.M., Gatlin III, D.M., 2012. Free dietary glutamine improves intestinal morphology and increases enterocyte migration rates, but has limited effects on plasma amino acid profile and growth performance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 370–371, 32–39.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B* 182, 1015–1045.
- Qiyu, X., Qing, Z., Hong, X., Chang'an, W., Dajiang, W., 2011. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion / absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* × *Huso dauricus*). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 721–726.
- Reeds, P.J., Burrin, D.G., Stoll, B., Jahoor, F., 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J. Nutr.* 130, 978.
- Rezaei, R., Knabe, D.A., Tekwe, C.D., Dahanayaka, S., Ficken, M.D., Fielder, S.E., Eide, S.J., Lovering, S.L., Wu, G., 2013. Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs. *Amino Acids* 44, 911–923.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147–164.
- Schuhmacher, A., Münch, M., Gropp, J.M., 1995. Non-essential amino acid sources in crystalline amino acid diets for trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 11, 317–321.
- Shan, Y., Shan, A., Li, J., Zhou, C., 2012. Dietary supplementation of arginine and glutamine enhances the growth and intestinal mucosa development of weaned piglets. *Livest. Sci.* 150, 369–373.
- Taylor, L., Curthoys, N.P., 2004. Glutamine metabolism: role in acid-base balance. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 32, 291–304.
- Torii, K., Uneyama, H., Nakamura, E., 2013. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *J. Gastroenterol.* 48, 442–451.
- Wang, C.A., Xu, Q.Y., Xu, H., Zhu, Q., Yang, J.L., Sun, D.J., 2011. Dietary L-alanyl-L-glutamine supplementation improves growth performance and physiological function of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* × *A. baerii*. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 727–732.
- Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., 2012. Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic β -cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 128–137.
- Wu, G., 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 1, 31–37.

- Wu, G., Bazer, F.W., Johnson, G.A., Knabe, D.A., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Li, X.L., Wang, J.J., 2011. Triennial Growth Symposium: important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J. Anim. Sci.* 89, 2017–2030.
- Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J., Yin, Y., 2013. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44, 1107–1113.
- Xiao, Y.P., Wu, T.X., Sun, J.M., Yang, L., Hong, Q.H., Chen, A.G., Yang, C.M., 2012. Response to dietary L-glutamine supplementation in weaned piglets: a serum metabolomic comparison and hepatic metabolic regulation analysis. *J. Anim. Sci.* 90, 4421–4430.
- Yan, L., Qiu-Zhou, X., 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256, 389–394.