

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INTESTINAL EN SALMÓN  
DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar L.*) ALIMENTADOS CON AFRECHO DE  
SOYA FERMENTADO

DANIELA AURORA ORTIZ DÍAZ

SANTIAGO, CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE PREGRADO

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INTESTINAL EN SALMÓN  
DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar L.*) ALIMENTADOS CON AFRECHO DE  
SOYA FERMENTADO

CHANGES IN INTESTINAL GENE EXPRESSION OF ATLANTIC  
SALMON (*Salmo salar L.*) FEED FERMENTED SOYBEAN MEAL

DANIELA AURORA ORTIZ DÍAZ

SANTIAGO, CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE PREGRADO

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INTESTINAL EN SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar L.*) ALIMENTADOS CON AFRECHO DE SOYA  
FERMENTADO

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

DANIELA AURORA ORTIZ DÍAZ

PROFESOR GUÍA	CALIFICACIONES
Sr. Jurij Wacyk G. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,8
PROFESORES EVALUADORES	
Sra. Natalia Lam P. Ingeniero en Acuicultura, Dr.	7,0
Sr. Jorge Pérez Q. Ingeniero Agrónomo. Ph. D.	6,8

Santiago, Chile.

2016

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
HIPÓTESIS.....	5
Objetivos generales.....	5
Objetivos específicos .....	5
MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
Instalaciones y condiciones de cultivo.....	6
Preparación dietas .....	6
Obtención de las muestras .....	8
Genes estudiados.....	8
Extracción RNA.....	10
Pool de RNA y síntesis de cDNA .....	10
PCR de tiempo real cuantitativo .....	10
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS.....	12
Factores anti-nutricionales (GOS, NSP y Saponinas).....	12
Perfil de amino ácidos esenciales.....	13
Expresión génica de los transportadores de nutrientes .....	14
Transportador de péptidos 1 (pept1 o SCL15A1).....	14
Transportador Sistema L de aminoácidos neutros (lat4 o SCL43A2) .....	15
Proteína de unión de ácidos grasos ( <i>fabp</i> o Fatty acid binding protein) .....	16
Niemann-Pick C1 Like 1 ( <i>npc1l1</i> ) asociado al transporte de colesterol.....	17
Co-transportador de sodio glucosa 1 (splt1 o SLC5A1) .....	18
DISCUSIÓN .....	19
CONCLUSIÓN.....	24
BIBLIOGRAFÍA .....	25
APENDICE.....	31
Crecimiento y Parámetros Productivos.....	31
Detección de interleuquina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	32

## RESUMEN

El afrecho de soya (AS) ha sido utilizado como sustituto de la harina de pescado (HP) debido a su bajo precio, disponibilidad y propiedades nutricionales, pero su nivel de inclusión ha estado limitado debido a la presencia de factores anti-nutricionales. Varias alternativas han sido planteadas para reducir los niveles de estos compuestos (Polisacáridos no derivados del almidón (NSP), alfa-Galactosidos (GOS), saponinas, lectinas, etc.) una de ellas es el pre-tratamiento de la soya mediante Fermentación en Estado Sólido (SSF), sin embargo hay poca información disponible sobre los efectos del afrecho de soya fermentada (ASF) en alimentos para salmónidos, aun mas hay pocos estudios que hagan referencia al efecto que causan las fuentes proteicas vegetales en el intestino proximal. Por ende este estudio pretende determinar el efecto de la inclusión de afrecho de soya fermentada en la dieta del salmón sobre la capacidad de absorción de nutrientes en el intestino proximal. Se utilizaron tres dietas: referencia (a base de harina de pescado) y dos dietas donde se reemplazó un 30% la dieta referencia por afrecho de soya (AS) o afrecho de soya fermentado (ASF). Se tomaron muestras de intestino proximal en los días 0, 2, 10, 20, y 50, las que fueron procesadas para la obtención de RNA y conservadas hasta su análisis mediante RT-qPCR. Los genes transportadores de nutrientes estudiados fueron *pept1*, *lat4*, *fabp*, *npc111* y *splt1*. Los resultados del presente estudio mostraron que la dieta de afrecho de soya fermentado generó una mayor expresión relativa de *pept1*, *lat4*, *npc111*, *fabp* asociado a una disminución en los niveles de NSP y saponinas provocados por el proceso de fermentación. Para los genes *pept1* y *lat4* el incremento en expresión probablemente se debió a un aumento de di-péptidos y aminoácidos (aa) libres en el lumen intestinal debido a la hidrolización de las proteínas durante la fermentación, por lo tanto su regulación parece depender de la concentración de aa en la dieta y su presencia en el lumen intestinal. Este estudio permitió concluir que la utilización de ASF en la dieta de salmón del Atlántico aumenta la expresión génica de transportadores de nutrientes como *pept1*, *lat4*, *splt1*, *npc111* y *fabp* en comparación al AS.

**Palabras Claves:** Expresión génica, Transportadores nutrientes, salmón del Atlántico.

## SUMMARY

Soybean meal has been used as a substitute of fishmeal due to low price, availability and nutritional properties but its use had been limited due to the presence of anti-nutritional factors. Several alternatives had been raised to reduce the levels of these compounds (NSP, GOS, saponins, lectins, etc.) one is the pretreatment of soybean by Solid State Fermentation (SSF), yet there is little information available about the effects of fermented soybean meal in salmonid feed, even more there are few studies that refer to the effect that cause plant protein sources in the proximal intestine. Therefore it was proposed to determine changes in gene expression of nutrient transporters in the proximal intestine of Atlantic salmon fed with fermented soybean meal. Three diets were used, control (based on fish meal) and two diets where 30% of the control diets was replaced with soybean meal or fermented soybean meal. Proximal intestine samples were sampled at days 0, 2, 10, 20 and 50 then processed to obtain RNA and stored until analysis by RT-qPCR. The nutrient transporter genes studied were *pept1*, *lat4*, *fabp*, *npc111* and *splt1*. The results showed that dietary fermented soybean meal generated greater relative expression of *pept1*, *lat4*, *npc111*, *fabp* associated with decreased levels of NSP and saponins caused by the fermentation process. For *pept1* and *lat4* genes increased expression was probably due to an increase of di-peptides and free amino acids (aa) in the intestinal lumen due to hydrolyzing proteins during fermentation, therefore their regulation seems to depend on aa concentration in the diet and its presence in the intestinal lumen. This study allows us to conclude that the use of fermented soybean meal in the diet of Atlantic salmon increases gene expression of nutrient transporters as *pept1*, *lat4*, *fabp*, *npc111* and *splt1* compared to soybean meal.

**Key Words:** Gene expression, Nutrient Transporter, Atlantic salmon.

## INTRODUCCIÓN

Encontrar nuevas fuentes de proteínas es una necesidad importante en el sector de la acuicultura con el fin de reducir la dependencia que esta industria tiene sobre la harina de pescado como componente principal en los alimentos acuícolas (HASSAAN *et al.* 2015). Tradicionalmente alternativas a las harinas de origen animal se han buscado a partir de fuentes vegetales tales como afrecho de soya, considerados como buenos sustitutos debido a su bajo precio, disponibilidad y propiedades nutricionales (LILLEENG *et al.* 2009). Sin embargo, la utilización de la soya en dietas para salmónidos ha estado limitada debido a que además de presentar deficiencias de ciertos aminoácidos esenciales se ha reportado que pueden reducir la capacidad de absorción de los nutrientes. Esto estaría asociado entre otros factores a efectos adversos sobre el tracto gastrointestinal provocados por la presencia de los factores anti-nutricionales, compuestos que además de reducir la digestibilidad de nutrientes generan problemas de palatabilidad (HASSAAN *et al.* 2015). Es así, como a nivel del tejido intestinal se ha visto que la soya puede producir cambios en la morfología y función del epitelio en el intestino de los salmones, especialmente a nivel del intestino distal, sección en la cual se genera una inflamación conocida como enteritis sub-aguda (LILLEENG *et al.* 2009). Los factores que influyen sobre la digestibilidad y absorción de una dieta con soya son variados y complejos, lo que hace necesario estudiar con mayor detalle su uso en dietas de peces carnívoros, para poder hacer un uso más eficiente de este ingrediente. Una estrategia para aumentar la absorción de nutrientes es la remoción o disminución de los factores anti-nutricionales presentes en el afrecho de soya, como por ejemplo, GOS, NSP, lectinas y saponinas, esto debido a que los peces carecen de las enzimas apropiadas para digerir adecuadamente estos compuestos y estos pueden afectar negativamente el rendimiento productivo de los peces (REFSTIE *et al.* 2005; KROGDAHL *et al.* 2010). Dentro de los efectos adversos que pueden generar este tipo de compuestos se encuentran entre otros impedir la secreción endógena de agua, electrolitos y obstruir además la actividad de las enzimas digestivas y el reciclaje de sales biliares (SINHA *et al.* 2011), disminuyendo con ello la correcta absorción de proteínas, lípidos y minerales (OSTASZEWSKA *et al.* 2005). Varias alternativas han sido planteadas para reducir los niveles de NSP, GOS y saponinas, como es el uso de extracciones con alcohol/agua una alternativa costosa, sin embargo otra tecnología que ha sido considerada es el pre-tratamiento de la soya mediante Fermentación en Estado Sólido (FES). (CHEN *et al.* 2010; OPAZO *et al.* 2012)

La FES utiliza microorganismos como bacterias, levaduras y hongos que presentan las enzimas apropiadas para reducir GOS, NSP, saponinas entre otros (OPAZO *et al.* 2012), siendo también una alternativa más económica y con potencial de industrialización. A pesar de esto, hay poca información disponible sobre los efectos del afrecho de soya fermentada en alimentos para peces (HASSAAN *et al.* 2015).

Los salmónidos y algunos otros peces han especializado estructuras anatómicas llamadas ciegos pilóricos que se encuentran en la parte anterior del intestino, aumentando el área de absorción de un tracto intestinal corto y son muy importantes para la degradación

enzimática y la absorción de los componentes del alimento. KROGDAHL *et al.* 1999 y BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2000 a través de sus estudios han reportado que la región pilórica es de gran importancia para la digestión de proteínas, además es muy probable que tenga una mayor relevancia en la digestión y absorción de nutrientes en comparación al resto del tubo gastrointestinal en salmón Atlántico. Sin embargo pocos estudios hacen referencia al efecto que causan las fuentes proteicas vegetales en esta sección del intestino (BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2000; OSTASZEWSKA *et al.* 2005). Por lo que, es importante determinar los efectos causados en esta sección específica

Generar un mejor entendimiento de los mecanismos genéticos involucrados que afectan el transporte de los nutrientes, es necesario para que en un futuro podamos mejorar la eficiencia de uso de las proteínas vegetales, a través de la comprensión del proceso en su totalidad desde cómo se afecta la actividad enzimática como también como se ven afectados los procesos de control génico. Es por esto que se ha propuesto estudiar la expresión génica de los transportadores de nutrientes, los cuales son proteínas que acarrean ya sea a través de la movilización de otros compuestos (sodio, potasio) o por su especificidad al sustrato (ácidos grasos, aminoácidos, glucosa, etc.) los nutrientes contenidos en el alimento, hacía el interior de las células intestinales para luego ingresar a la sangre o a la linfa.

Bajo este contexto se postula que el uso de afrecho de soya fermentado podría aumentar la absorción de nutrientes en comparación al uso de afrecho de soya sin fermentar, mediante la expresión de genes involucrados en el transporte intestinal.

## HIPÓTESIS

La utilización de afrecho de soya fermentado en la dieta de salmón del Atlántico aumenta la expresión génica de transportadores de nutrientes como *pept1*, *lat4*, *splt1*, *npc111* y *fabp* en comparación al Afrecho de soya sin fermentar.

### Objetivos generales

Comparar la expresión génica de transportadores de nutrientes en el intestino proximal de salmón del Atlántico alimentado con afrecho de soya fermentada y afrecho de soya

### Objetivos específicos

Cuantificar los cambios de expresión génica de los transportadores *pept1*, *lat4*, *splt1*, *npc111* y *fabp* en respuesta a la inclusión de afrecho de soya fermentada mediante qPCR.

Comparar los cambios de expresión génica de los transportadores entre la dieta referencia, afrecho de soya y afrecho de soya fermentado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Genética en Acuicultura del departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y tuvo una duración de 50 días.

### Instalaciones y condiciones de cultivo

Se utilizaron 9 estanques de fibra de vidrio, con un volumen de 150 L conectados a una estación de biofiltración (Sistema de recirculación). Se trabajó con 600 peces juveniles *Salmo salar* L. con un peso promedio de 15-18 g los cuáles fueron obtenidos del criadero de Peñaflore de Aquachile S.A. Estos fueron distribuidos aleatoriamente en los estanques, para luego ser engordados hasta un peso aproximado de 50 g con la dieta referencia, para luego ser alimentados con las dietas experimentales por 50 días. Las condiciones de cultivo y calidad del agua se monitorearon regularmente (3 veces a la semana) y los peces se mantuvieron a  $15 \pm 2$  °C bajo condiciones de fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad a una saturación de oxígeno de  $90,4 \pm 1,5$  %. Los peces se alimentaron tres veces al día (9:00, 13:00 y 17:00 h) durante seis días a la semana, manualmente y *ad libitum*. La biomasa de los estanques se redujo durante el periodo experimental debido a los muestreos realizados. Todos los peces fueron tratados de acuerdo al protocolo de bioética animal Certificado de Bioética, fecha 3 de Julio 2012 emitido por el INTA.

### Preparación dietas

Se utilizaron tres dietas (Cuadro 1), las cuales fueron asignadas al azar a tres estanques cada una. Las dietas consistieron en una dieta control categorizada como de referencia y dos dietas experimentales las cuales se componen de un 70% de la dieta de referencia y 30% del ingrediente de prueba, afrecho de soya o afrecho de soya fermentado (reducido en NSP, GOS y saponinas). Las dietas fueron formuladas por el profesor Jurij Wacyk PhD y se prepararon en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología en peces de la Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, bajo condiciones industriales estándares.

Los análisis químicos de las dietas se realizaron en base a las recomendaciones establecidas en la A.O.A.C. (1990). Para este efecto, las dietas fueron secadas hasta obtener peso constante y molidas finamente con un mortero. La humedad se determinó en horno de vacío de acuerdo al método oficial de la AOAC 934.01; la proteína cruda (nitrógeno total x 6,25) se determinó utilizando el análisis de combustión LECO mediante el método oficial AOAC 990.03; el contenido de lípidos determinado por extracción con éter de acuerdo al método oficial AOAC 920,39; el contenido de cenizas determinado de acuerdo a lo establecido en el método oficial AOAC 942.05; el E.N.N se obtuvo por diferencia. La energía total se determinó utilizando una bomba colorimétrica PARR (Parr Instruments Co., Mo-line, IL USA). El perfil de aminoácidos se determinó en base al método oficial AOAC 982.30. Todos estos análisis fueron realizados en University of Missouri Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories (Estados Unidos). Los niveles de polisacáridos no derivados

del almidón (NSP) fueron cuantificados por espectrofotometría de acuerdo a lo establecido por Englist *et al.* (1994) y analizados en las dependencia del INTA (Universidad de Chile). Los  $\alpha$ -galactosidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) fueron analizados mediante lo establecido por Bhatti *et al.* (1970); Janauer & Englmaier (1978) y Zweig & Sherma (1982). El análisis de saponinas fue determinado por cromatografía UHPLC, de acuerdo al método descrito por Hu *et al.* (2002).

Cuadro 1. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales.

Dietas	Control	Afrecho de soya	Afrecho de soya fermentado
<b>Ingredientes (g kg<sup>-1</sup>)</b>			
Harina pescado	650	455	455
Afrecho de soya	0	300	0
Afrecho de soya fermentado	0	0	300
Harina de trigo	170	119	119
Aceite pescado	151	105,7	105,7
Complejo vitaminas	5	3,5	3,5
Complejo minerales	5	3,5	3,5
Sal TM	10	7	7
Acetil Colina 60%	6	4,2	4,2
Di-fosfato cálcico	3	2,1	2,1
Oxido de itrio	0,1	0,1	0,1
<b>Análisis proximal (en base materia seca)</b>			
Materia seca (%)	5,5	6	4,5
Proteína cruda (%)	53,8	51,4	53,5
Extracto etéreo (%)	20,9	15,6	14,4
Fibra cruda (%)	0,61	1,79	2,28
E.N.N (%) <sup>a</sup>	13,1	20,9	18,9
Cenizas (g kg <sup>-1</sup> )	11,5	10,1	10,6
Energía Bruta (MJ Kg <sup>-1</sup> )	23,23	21,93	21,63

<sup>a</sup> Extracto No Nitrogenado

## Obtención de las muestras

Las muestras de intestino proximal se obtuvieron a los días 0, 2, 10, 20 y 50 del periodo experimental. Tres peces fueron seleccionados al azar de una muestra representativa de los estanques para ser sacrificados, mediante el uso de una sobre dosis de tricaina metanosulfonato (Dolical® 80%, 500 mg/L) de acuerdo al protocolo establecido por el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad de Chile, y posterior a lo cual se realizó un corte de medula espinal (NAKAYAMA *et al.* 1996). Inmediatamente después de esto se procedió a tomar las muestras del intestino proximal extrayendo su contenido. Estas muestras se dispusieron en microtubos que contenían 1mL de TRIzol® de Ambion, Life Technologies y se sumergieron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras del día 0 correspondieron al día en que se realizó el cambio de dieta referencia (dieta control) a afrecho de soya y afrecho de soya fermentado.

## Genes estudiados

Los genes estudiados en el presente estudio fueron *pept1* (transportador de di y tripeptidos), *lat4* (transportador de aminoácidos neutros), *splt1* (transportador de glucosa), *npc111* (relacionado con la absorción de colesterol) y *fabp* (transportador de ácidos grasos libres). Los genes de referencia utilizados fueron proteína ribosomal acida (*arp*), beta actina ( $\beta$ -actina) y Factor de elongación 1 alpha (*ef1- $\alpha$* ). (VANDESOMPELE *et al.* 2002; OLSVIK *et al.* 2005; KORTNER *et al.* 2011).

Cuadro 2. Secuencias de los partidores usados para RT-qPCR.

Gen	Número de acceso	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Ef (%)
<i>pept1</i>	NM_001146682 <sup>1</sup>	F: ATCATGCTGGAGGTCTGCAAG	60	97
		R: CCAGTCCATCCAGTGTTCTCT C	60	
<i>lat4</i>	SS2U042291 <sup>2</sup>	F: CAGACTGCCAAACTGAGAC	59	99,4
		R: CTGACCAACGTCCTATTG	59	
<i>splt1</i>	SS2U003657 <sup>2</sup>	F: GAATGGAATGCCCTTGTGG	60	99,1
		R: GAGTGAGAGCACTGAGAGATAG	60	
<i>npc111</i>	SS2U029776 <sup>2</sup>	F: CTACGACTCGTTGCTGTTC	61,5	103
		R: CACATCCTTCAGACTTGC	61,5	
<i>fabp</i>	BT048039.1 <sup>1</sup>	F: CCATTGTTGGAGAGGAACT	58	105
		R: GAACGTAGCTCTTCTTGG	58	
* Genes de referencia		F: Forward	Ef: Eficiencia partidores	
1 NCBI		R: Reverse		
2 Salmon Data Base		Tm: Melting Temperature		

Cuadro 2 Continuación. Secuencias de los partidores usados para RT-qPCR.

Gen	Número de acceso	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Ef (%)
<i>arp</i> *	BT058203.1 <sup>1</sup>	F: CTGAGGTGCTCGACATTACT	58	99,7
		R: CCTCTTGATCCGTTGATG	58	
<i>β-actin</i> *	AF012125.1 <sup>1</sup>	F: GAGCGCGGTTACAGTTTCAC	56	103
		R: GCCCATCTCCTGCTCAAAGT	57	
<i>efl-α</i> *	AF321836.1 <sup>1</sup>	F: GTCACCACTGAAGTCAAGT	60,5	100,5
		R: ATTGGAGGGTTCGTTCTTG	60,5	
* Genes de referencia		F: Forward		Ef: Eficiencia partidores
1 NCBI		R: Reverse		
2 Salmon Data Base		Tm: Melting Temperature		

### Diseño de partidores

Las secuencias de los genes se obtuvieron desde la base de datos NCBI correspondientes a *Salmo salar* y desde Salmondb de la Universidad de Chile ([www.salmondb.cmm.uchile.cl](http://www.salmondb.cmm.uchile.cl)). Las secuencias de los pares de partidores para cada gen se diseñaron en el portal IDT con el software PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) (Cuadro 2) y se comprobó que cumplieran con los criterios de calidad establecidos en el Cuadro 3 con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 que se encuentra disponible en la web (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Cuadro 3. Criterios para el diseño de partidores.

Criterio	Parámetro
Contenido GC <sup>1</sup>	50%-55%
Longitud	18-24 nucleótidos
Largo del amplicón	75-200 pb
ΔG de estructuras secundarias (horquillas y dímeros)	Máx. -5 Kcal/mol
Temperatura de fusión	60° C-62°C
Fuente: BUSTIN 2004	ΔG: Energía libre de Gibbs

<sup>1</sup>guanina-citocina

### **Extracción RNA**

De las muestras de intestino conservadas se tomó 100 mg de tejido el cual fue homogenizado en crio contenedores que contenían 1 ml de Trizol y 7 perlas de circonio (5 mm). Estos tubos se agitaron (2x) por 30 s a 6500 rpm y 15 segundos de reposo entre cada agitación, en un equipo Precellys 24 (Bertin Technologies). Posteriormente, se realizó la extracción de RNA según el manual de Ambion (Life Technologies™). El RNA purificado se re-suspendió en 100 uL de agua libre de nucleasas con Ribolock (inhibidor de RNAsa) en una concentración de 1U por uL de reacción. La concentración de RNA en la muestra se midió en un espectrofotómetro Epoch™ de tecnología nano el cual además permite conocer su grado de pureza a través de la relación en las mediciones de OD a 260 y 280 nm. Se comprobó también la integridad del RNA mediante una electroforesis del RNA purificado en gel denaturante de agarosa al 1%. Esta técnica permite separar los fragmentos de RNA y así evaluar si este se encuentra degradado según la presencia e intensidad de las bandas 28S y 18S correspondientes al RNA ribosomal.

### **Pool de RNA y síntesis de cDNA**

El estanque se consideró como unidad experimental y se muestrearon 3 peces por estanque en cada tiempo de muestreo. De este total de intestinos tomados, se hicieron muestras compuestas de RNA teniendo en mente la unidad experimental, considerando finalmente 117 muestras compuestas. Estas fueron utilizadas para realizar la transcripción reversa que permitió obtener cDNA a partir del RNA. Un total de 5 µg de RNA se transcribió a cDNA usando el kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase de ThermoScientific con oligodT, como partidor. El cDNA fue posteriormente usado en el PCR cuantitativo para estudiar la expresión génica de los genes mencionados anteriormente.

### **PCR de tiempo real cuantitativo**

Para el estudio de expresión relativa de los genes elegidos se utilizó un termociclador Illumina® Eco Real Time PCR. Como método de detección se usó el fluoróforo sybergreen, para ello se escogió el Kit Kapa Universal qPCR SYBR FAST de Kapa Biosyst. Las concentraciones finales de los componentes de cada reacción fueron: Master Mix, 1X (5uL), partidor directo 200 nM; partidor inverso 200 nM; cDNA total 10 ng. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 uL, con las siguientes condiciones: Un ciclo de activación de la polimerasa a 95°C x 3 min; seguido de 40 ciclos de Desnaturalización a 95°C x 3 s, Alineación, extensión a 60°C x 30s. Finalmente, se realizó la Curva de fusión con las siguientes condiciones 95°C x 15 s, 55°C x 15s, 95°C x 15s, para identificar la presencia de un solo amplicón y la ausencia de dímeros de los partidores. Previo al estudio de expresión se realizó una curva estándar con cada juego de partidores para medir la eficiencia de la reacción mediante la determinación de una regresión exponencial. Para ello se realizaron diluciones seriadas de cDNA a partir de un conjunto de muestras

seleccionadas. Luego, se realizó el estudio de expresión génica con todos los genes de interés y los de referencia. Todos los genes fueron analizados por duplicado (replicas técnicas en placa) y normalizados utilizando el método de Expresión relativa como lo describe (PFAFFL 2001).

### **Análisis estadístico**

Para la asignación de las dietas experimentales a cada estanque se utilizó un diseño completamente al azar. La expresión génica de cada punto muestreado se analizó usando el promedio de los estanques utilizando las muestras compuestas por estanque por tiempo. Todos los análisis consideraron un nivel de significancia de  $p < 0,05$  y los datos son presentados como promedios ( $n=3$ )  $\pm$  el error estándar. El modelo estadístico utilizado es el siguiente  $\gamma = \mu + Ai + Bj + ABij + Ek + \varepsilonijk$ . Se utilizaron los Modelos Generales Lineales y Mixtos para evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos experimentales para lo cual se empleó la dieta y los tiempos de muestreo como efectos fijos y el estanque como efecto aleatorio. Los datos por no presentar homoscedasticidad de varianza se procedió a utilizar un modelo heteroscedastico varPower ( $g[p, v] = |v|^p$ ) el cual se ajusta a los datos obtenidos. Se utilizó la prueba DGC (DI RIENZO *et al.* 2002) para evaluar las diferencias estadísticas según las medias entre las dietas. Los análisis se realizaron con el programa InfoStat / Estudiantil (Di Rienzo J.A *et al.* 2015) y el software estadístico R (R Development Core Team 2012).

## RESULTADOS

### Factores anti-nutricionales (GOS, NSP y Saponinas)

Los análisis de los *alfa*-galactósidos, polisacáridos no derivados del almidón y saponinas y sus niveles en los ingredientes (Cuadro 4) indicaron que la fermentación del afrecho de soya redujo la concentración de estos compuestos en la dieta. Los NSP se redujeron un 24,3% en relación al contenido presente en el afrecho de soya. Los *alfa*-galactósidos en promedio hubo una disminución de un 93,5% en comparación al afrecho de soya sin fermentar y las saponinas se lograron reducir en un 35% aproximadamente.

Cuadro 4. Niveles de GOS, NSP y Saponinas en el ingrediente.

Ingrediente	Afrecho de soya	Afrecho de soya fermentado
Carbohidratos totales (%)	12,02	9,25
$\alpha$ -galactósidos		
Rafinosa (%)	1,11±0,11 <sup>a</sup>	0,01±0,33 <sup>b</sup>
Estaquirosa (%)	4,7±0,56 <sup>a</sup>	0,01±0,01 <sup>b</sup>
NSP (%) <sup>b</sup>	13,74±1,46 <sup>a</sup>	10,4±2,7 <sup>b</sup>
Saponinas (mg/Kg)	178,68±6,83 <sup>a</sup>	67,55±1,88 <sup>b</sup>

Promedios con letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas según test de Dunn ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Polisacáridos no derivados del almidón

### Perfil de amino ácidos esenciales

En cuanto a la composición de amino ácidos esenciales en las dietas experimentales, las dietas AS y ASF presentaron niveles más bajos de treonina, metionina y lisina en comparación a la dieta control. Los niveles de fenilalanina, arginina y triptófano son mayores en las dietas de origen vegetal en comparación a la dieta control. Los niveles de valina, isoleucina, leucina e histidina son significativamente mayores en dieta de afrecho de soya fermentado.

Cuadro 5. Perfil de amino ácidos esenciales en dietas experimentales.

Dietas	Control		Afrecho de soya		Afrecho de soya fermentado	
<i>Amino Ácidos Esenciales (%)</i>						
Treonina	2,14 ±0,04	a	2,06 ±0,01	b	2,08 ±0,06	b
Valina	2,43 ±0,03	a	2,29 ±0,04	b	2,43 ±0,10	a
Metionina	1,36 ±0,07	a	1,14 ±0,07	b	1,14 ±0,01	b
Isoleucina	2,02 ±0,03	b	1,98 ±0,01	b	2,13 ±0,06	a
Leucina	3,79 ±0,06	a	3,71 ±0,01	b	3,81 ±0,13	a
fenilalanina	2,04 ±0,04	b	2,13 ±0,01	a	2,18 ±0,07	a
Lisina	3,94 ±0,08	a	3,64 ±0,00	b	3,71 ±0,13	b
Histidina	1,32 ±0,04	a	1,28 ±0,01	b	1,30 ±0,04	a
Arginina	2,97 ±0,05	b	3,08 ±0,01	a	3,08 ±0,12	a
Triptofano	0,64 ±0,04	b	0,67 ±0,01	a	0,67 ±0,01	a

Promedios con letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas según test de Dunn ( $p < 0,05$ ).

## Expresión génica de los transportadores de nutrientes

### Transportador de péptidos 1 (*pept1* o SCL15A1)

En relación a la expresión relativa de este gen se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Salvo por el primer punto de muestreo, la expresión del *pept1* en el intestino de los peces alimentados con dieta con proteína vegetal es más alta que en los peces alimentados con dieta control. En general los peces alimentados con ASF presentaron una mayor expresión relativa seguida por los peces alimentados con AS y dieta control. Las marcadas diferencias de expresión génica observadas durante los primeros 20 días disminuyen al día 50, aun cuando la significancia estadística se mantiene entre proteína de origen animal y vegetal.

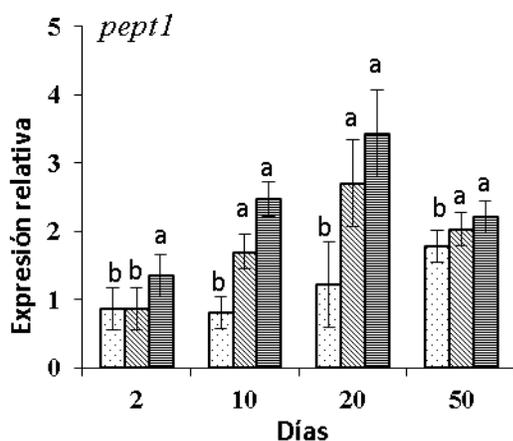


Figura 1: Expresión relativa de *pept1* en respuesta a las diferentes dietas en el tiempo a nivel de tejido proximal. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias del tejido muestreado. ( $p \leq 0,05$ ). Dieta de referencia □, Dieta Afrecho de soja ▨, Dieta Afrecho de soja fermentada ▩

### Transportador Sistema L de aminoácidos neutros (*lat4* o SCL43A2)

La expresión relativa del gen *lat4* en el intestino de los ejemplares alimentados con la dieta ASF fue mayor a los ejemplares alimentados con AS hasta los 20 días. En general no hubo grandes diferencias entre los peces alimentados con dietas AS y control durante el transcurso del estudio. En el intestino de los peces alimentados con ASF se observó un aumento de los niveles de expresión en el tiempo hasta el día 20 para luego observarse una disminución de la expresión de este gen lo que no se observó en los peces que recibieron la dieta control y AS, que mantuvieron una expresión menos variable.

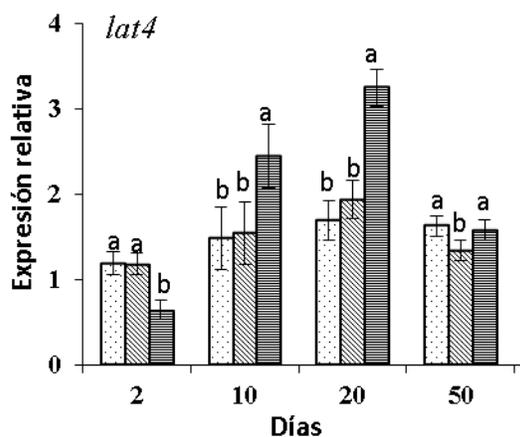


Figura 2: Expresión relativa de *lat4* en relación a las diferentes dietas en el tiempo a nivel de tejido proximal. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias del tejido muestreado. ( $p \leq 0,05$ ). Dieta de referencia □ Dieta Afrecho de soya ▨ Dieta Afrecho de soya fermentada ▤

### Proteína de unión de ácidos grasos (*fabp* o Fatty acid binding protein)

La inclusión de ASF en la dieta generó diferencias estadísticas significativas en la expresión de *fabp* en el intestino de los peces. Los peces alimentados con ASF presentaron niveles de expresión de *fabp* más altos ( $p < 0.05$ ) que el tratamiento control durante todo el periodo experimental. Estas diferencias fueron mayores en magnitud al inicio del estudio y a pesar que disminuyeron hacia el día 50, se mantuvo la significancia estadística. Por otro lado, no se observó grandes diferencias de expresión entre el tratamiento control y los peces alimentados con AS durante la duración del estudio.

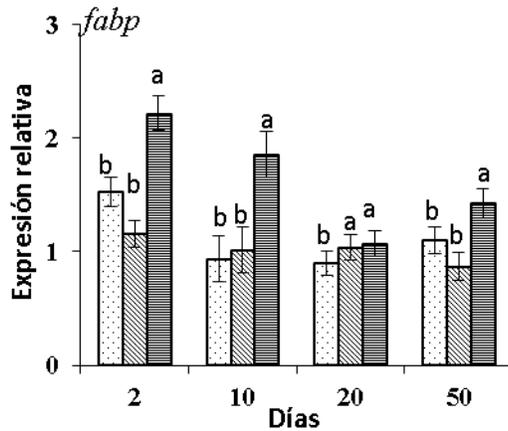


Figura 3: Expresión relativa *fabp* en relación a las diferentes dietas en el tiempo a nivel de tejido proximal. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias del tejido muestreado. ( $p \leq 0,05$ ). Dieta de referencia  Dieta Afrecho de soya  Dieta Afrecho de soya fermentada 

### Niemann-Pick C1 Like 1 (*npc1l1*) asociado al transporte de colesterol

La inclusión de proteína de origen vegetal generó diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *npc1l1*. Los peces alimentados con AS y ASF presentaron valores más altos de expresión en relación a la dieta control, durante todo el periodo experimental. Nuevamente y a pesar que la magnitud de las diferencias disminuye hacia el término del estudio, estas siguen siendo significativas, en este caso con niveles mayores de expresión para los peces alimentados con ASF. No hubo diferencias significativas entre las dietas AS Y ASF hasta el día 20 del ensayo.

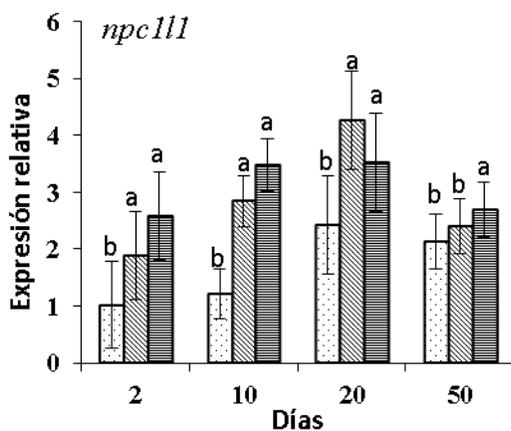


Figura 4: Expresión relativa de *npc1l1* en relación a las diferentes dietas en el tiempo a nivel de tejido proximal. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias del tejido muestreado. ( $p \leq 0,05$ ). Dieta de referencia  Dieta Afrecho de soja  Dieta Afrecho de soja fermentada 

### Co-transportador de sodio glucosa 1 (*sglt1* o SLC5A1)

Se puede observar en la figura 5 que la expresión de *sglt1* en el intestino fue más variable, sin diferencias claras entre las dietas durante la duración del ensayo. Sin embargo al igual que en los otros genes hubo un descenso en la expresión de *sglt1* entre el día 20 y 50 en las dieta referencia y ASF.

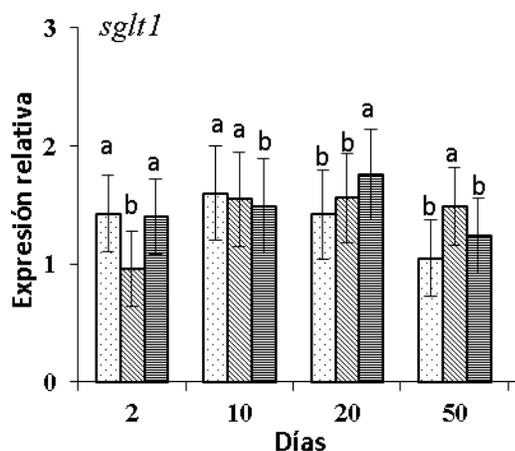


Figura 5: Expresión relativa de *sglt1* en relación a las diferentes dietas en el tiempo a nivel de tejido proximal. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias del tejido muestreado. ( $p \leq 0,05$ ). Dieta de referencia ; Dieta Afrecho de soya ; Dieta Afrecho de soya fermentada 

## DISCUSIÓN

Los efectos del uso de afrecho de soya en dietas de salmones han demostrado tener efectos complejos sobre el tracto intestinal de los peces que se pueden traducir en cambios en su rendimiento, fisiología y crecimiento. En términos de la proteína de la dieta, factores como, la fuente de proteína, su digestibilidad, perfiles de aminoácidos y la presencia de factores anti nutricionales parecen estar jugando papeles reguladores importantes (HALVER AND HARDY 2003; BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2007; KROGDAHL *et al.* 2010; WACYK *et al.* 2012). En lo que se refiere al uso de afrecho de soya en la dieta de salmónidos gran parte de la atención se ha enfocado en estudiar sus efectos sobre el intestino distal a pesar de la menor relevancia que este tiene en la absorción de nutrientes (En condiciones normales el 5-8% del total de nutrientes son absorbidos en el intestino distal (KROGDAHL *et al.* 1999)). Teniendo esto en mente es que en el presente estudio se evaluaron cambios en la expresión de genes en el intestino proximal en respuesta a la inclusión de proteínas derivadas de la soya y soya fermentada en la dieta de salmo salar. Nuestros datos muestran diferencias estadísticamente significativas en la transcripción de genes asociados con el transporte de nutrientes en respuesta a la inclusión de las diferentes dietas probadas.

En relación a *pept1* se sabe que es un transportador de di-tripeptidos ubicado en la zona apical de las células epiteliales del intestino (ROMANO *et al.* 2014). OSTASZEWSKA *et al.* (2010a) trabajando con carpa en dietas a base proteína vegetal suplementadas con di péptidos y amino ácidos reporta un aumento en la expresión del gen a diferencia de la dieta control sin suplementación y la dieta comercial usada en ese estudio. Por otro lado trabajando con trucha Ostaszewska *et al.* (2010), obtuvo resultados similares donde confirmó que la expresión de este gena está regulada por el nivel de proteína dietaria, péptidos y amino ácidos libres (OSTASZEWSKA *et al.* 2010). Por otro lado, estudios con afrecho de soya fermentada han demostrado que durante el proceso de fermentación se genera una hidrolización de la proteína (BARNES 2012; ABDUL KADER *et al.* 2012; YAMAMOTO *et al.* 2012). Esto genera un aumento de péptidos y amino ácidos libres en el lumen intestinal lo que contribuiría al aumento en la expresión de *pept1* en los peces alimentados con la dieta de soya fermentada en comparación con el control y la soya no fermentada.

Siguiendo con la absorción de péptidos y aminoácidos, *lat4* es un transportador de aminoácidos neutros tales como isoleucina, leucina, metionina y fenilalanina (BRO 2008). En este caso, al no ser un co-transportador como *pept1*, su capacidad de transporte parece ser independiente de la concentración de sodio, cloro y también del pH (BODOY *et al.* 2005), por lo tanto esta dependería de la concentración de los aminoácidos en la dieta y su concentración final a nivel luminal. Sin embargo, y de forma indirecta podría su capacidad de transporte verse modulada vía *pept1* al ser un transportador ubicado en la zona basolateral del enterocito, pudiendo de esta manera variar su expresión génica de forma similar. Como se observa en el cuadro 5 la soya fermentada tiene un incremento en la concentración de amino ácidos como leucina e isoleucina lo que está en línea con otros estudios donde al fermentar la soya dependiendo del tipo de microorganismo utilizado se

genera un incremento de ciertos aminoácidos (REFSTIE *et al.* 2005; SONG *et al.* 2008; ABDUL KADER *et al.* 2012). Esta respuesta hace interesante a futuro evaluar el cambio que se produce en los niveles de aminoácidos en diferentes condiciones de fermentación y como esto puede llegar a influir en la expresión de este transportador en peces. Cabe destacar que este estudio es el primer trabajo en el cual se evalúa y se reporta evidencia de cambios en la transcripción de este transportador en el intestino de peces.

En relación a *npcIII*, gen que codifica para un transportador de colesterol. En la literatura esta descrito que las dietas en base a harina de pescado tienen más colesterol por lo que este efecto podría estar jugando un rol en los resultados observados, siendo mayor su expresión en las dietas de origen vegetal. Al igual que en el estudio realizado por LILAND (2011) en salmones adultos (14 meses) se encontró que los niveles de *npcIII* están sobre regulados en las dietas con aceite y proteína vegetal en comparación a la dieta con aceite de pescado en el intestino medio, teniendo un comportamiento similar al encontrado en este estudio pero en la sección proximal. Este aumento se puede deber ya que al bajar los niveles de colesterol dietario el intestino intenta compensar produciendo un aumento del transportador por lo tanto aumenta los niveles de mRNA de *npcIII*. KORTNER *et al.* (2014) trabajó con salmones post-smolt y suplementó con colesterol dietas a base de proteína vegetal observándose una menor expresión del gen en la medida que aumentaba la suplementación, por lo tanto, al parecer un aumento de ingredientes de origen vegetal disminuyen los niveles dietarios de colesterol y aumenta la expresión del gen.

En el estudio de MURASHITA *et al.* (2013) con alevines de trucha arcoíris. Los peces alimentados con dietas de soya fermentada con diferentes organismos tenían niveles de colesterol en plasma más bajos en comparación a los peces alimentados con dietas a base de harina de pescado. Por otro lado, la fermentación con *Bacillus* a diferencia de todas las otras dietas en el trabajo de Murashita fue el único tipo de fermentación que tuvo niveles de ácidos biliares intestinales comparables con peces alimentados a base de harina de pescado. Los autores atribuyen este efecto a fragmentos más pequeños de proteínas generadas por esta fermentación, reduciendo la capacidad de la glicinina (Proteína presente en la soya) para unirse a ácidos biliares y reducir su re-absorción en el intestino, mejorando de esta forma la producción y reabsorción de ácidos biliares en los peces alimentados con este tipo de soya fermentada. Por otra parte se sabe que las plantas presentan fitoesteroles y fitoestanoles los cuales son estructural y fisiológicamente similares al colesterol (WANG *et al.* 2011), por lo cual al haber mayores niveles de inclusión de plantas en la dieta estos compuestos aumentan posiblemente contribuyendo a estimular una mayor expresión del gen *npcIII*, ya que también podrían ser absorbidos por este transportador por su similitud como se menciona más arriba.

Como lo demuestran varios estudios (VENOLD *et al.* 2013; KORTNER *et al.* 2012; PENN *et al.* 2011; KROGDAHL *et al.* 2003) la expresión del gen *fabp* varía y es menor en respuesta a dietas con ingredientes de origen vegetal en comparación a dietas en base a harina de pescado en el intestino distal de salmón del Atlántico. Por otro lado a nivel de intestino proximal el comportamiento parece ser diferente siendo mayor la expresión de este gen en dietas con

afrecho de soya en comparación a dietas en base harina de pescado. LILLEENG *et al.* (2007a), trabajando con bacalao (1 y 2 años edad), estudiaron el efecto de dos dietas (harina de pescado y harina de soya) sobre la expresión de genes en el intestino medio y observaron que la expresión de *fabp* es mayor en la dieta a base de soya. Cabe hacer notar que tanto en el estudio de LILLEENG *et al.* (2007b) como en el presente la dieta control (harina pescado) posee mayores niveles de lípidos por lo cual podemos suponer que el intestino genera una respuesta compensatoria en respuesta a este menor nivel de lípidos dietarios aumentando la transcripción del gen para generar un aumento del transportador a nivel de las membranas de las células intestinales. Esta evidencia indica que a pesar de la corta distancia que hay entre el intestino distal y proximal, la regulación de *fabp* presentan comportamientos diferentes al menos a nivel de expresión génica en respuesta a variaciones en la composición de la dieta.

En conjunto con el nivel de lípidos dietarios, las diferencias observadas para la expresión de *fabp* entre los peces alimentados con AS y ASF podrían estar asociadas a diferencias en la dinámica de absorción de los ácidos grasos dietarios. Una menor presencia de ácidos biliares disponibles se ha reportado en diferentes estudios cuando se incorpora AS a las dietas. Esta menor disponibilidad estaría asociada a la presencia de la glicinina la cual puede unirse a ácidos biliares y reducir su absorción en el intestino de pescado (MURASHITA *et al.* 2013) y a la presencia de saponinas, ya que estas por sus propiedades detergentes y surfactantes impiden la emulsificación de las grasas (KORTNER *et al.* 2012). Debido a la disminución de sales biliares y menor capacidad de emulsificación los ácidos grasos no pueden ser absorbidos adecuadamente, viéndose afectado su tránsito intracelularmente, lo que reflejaría la mayor expresión de *fabp* en la dieta con ASF. Cabe recordar que el ASF presentó una reducción significativa del nivel de saponinas en comparación con AS, respaldando el argumento recién presentado.

Hasta ahora se han explicado los resultados obtenidos hasta los 20 días de experimento ya que el comportamiento de todos los genes como se puede observar en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5 cambian entre los 20 y 50 días. Esta respuesta pudo estar asociada a que aproximadamente alrededor de los 20 días de alimentación con AS se ha descrito el establecimiento crónico de una condición conocida como enteritis sub-aguda o inflamación a nivel de intestino distal (LILLEENG *et al.* 2007; URÁN *et al.* 2009; PENN *et al.* 2011; CHIKWATI *et al.* 2013). Esta inflamación se caracteriza por el angostamiento de la mucosa intestinal, aumento de la proliferación y apoptosis celular, falta de vacuolas de absorción, ensanchamiento de la lámina propia, la infiltración de leucocitos, actividad enzimática reducida y la activación del sistema inmunológico. (BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2000; KROGDAHL *et al.* 2003; BAKKE-MCKELLEP *et al.* 2007) reduciéndose la capacidad de absorción de los nutrientes. Este tipo de respuesta estaría asociado a efectos adversos provocados por la presencia de factores anti-nutricionales, compuestos que además de reducir la digestibilidad de nutrientes generan problemas de palatabilidad (HASSAAN *et al.* 2015), sin embargo, aún no está del todo claro si es un compuesto o la interacción entre 2 o más factores anti-nutricionales lo que explica el cuadro en su totalidad.

Al estudiar el comportamiento de la expresión de los genes en relación a la inflamación inducida por la soya esta podría estar repercutiendo en los niveles de transcripción en el tejido proximal a diferencia de la soya fermentada donde esta inflamación parece ser mucho menor. En un estudio paralelo al presente, se estudió la presencia de *IL1-β* (indicador de inflamación) en el intestino distal de los peces, el cual se ha demostrado que durante procesos inflamatorios contribuye al desarrollo de la enfermedad en el intestino y además se correlaciona con la severidad de la inflamación (MARJARA *et al.* 2012; LI *et al.* 2013). En los resultados analizados de inmunohistoquímica se apreció una significativa disminución en los niveles de la proteína IL1-β en la dieta ASF en comparación a AS.

Ahora bien si se observan las figuras (1, 2, 3, 4 y 5) la mayoría de los genes tienen un descenso en la expresión entre los días 20 a 50 y como se mencionó anteriormente esto podría deberse a que la enteritis se está volviendo crónica en la dieta con afrecho de soya, en el caso de *npc111* entre los 20 y 50 días la expresión cambia y aumenta en afrecho de soya fermentado y continua disminuyendo sus niveles en la dieta sin fermentar. Esto se puede explicar por la reducción que se produjo de las saponinas (al fermentar la soya) responsables de afectar en mayor medida a la absorción de lípidos (KORTNER *et al.* 2012), por lo tanto en la dieta soya fermentada esta reducción a los 50 días no se observó dado que la inflamación del tejido estaba menos avanzada a diferencia de la dieta de soya donde ya es crónica y persistente. Sin embargo no hay que olvidar que aún no está claro si las saponinas en si causan inflamación en el tejido distal o es la interacción entre varios agentes como los NSP, lectinas, saponinas etc. (FRANCIS *et al.* 2001; FRANCIS *et al.* 2002; SØRENSEN *et al.* 2011) los cuales se encuentran en las plantas y se vieron reducidos por el proceso de fermentación de la soya.

En los genes *pept1* y *lat4* ambos muestran un comportamiento similar en la caída de la expresión en donde la soya fermentada y la dieta referencia presentaron niveles más altos en comparación a la soya sin fermentar, este comportamiento puede estar relacionado con el nivel de inflamación al igual que en el caso de *npc111*, repercutiendo en la expresión de estos genes en el tejido proximal.

Los niveles de expresión observados para *splt1* son más variables sin una tendencia clara en los primeros tres puntos de muestreo. Sin embargo a los 50 días, los peces alimentados con la dieta AS tuvieron niveles más altos de expresión de este gen en comparación con el resto de los tratamientos. Lo que propone PEUHKURI *et al.* (2010) es que la inflamación activa una cascada de respuestas en el intestino, IL-1β activa a los linfocitos que a su vez generan un incremento en el consumo de glucosa lo que estimula una mayor concentración de receptores de transportadores de glucosa, ya que se genera un aumento en la demanda metabólica del tejido inflamado. Al comparar este estudio y el de Peuhkuri podemos concluir que al haber un proceso de inflamación involucrado, podríamos esperar el aumento observado en el transportador de glucosa suponiendo que el proceso inflamatorio en ambas especies sea similar. Ahora bien en este estudio los resultados obtenidos mostraron un comportamiento errático en la expresión del gen en relación a las diferentes dietas donde hasta los 2 días del ensayo la expresión del gen es menor en la dieta AS en relación a la dieta control y de los 10 días en adelante la expresión aumenta en AS y disminuye en la

control. Sin embargo varios autores en estudios realizados en humanos y ratas han evidenciado vesículas contenedoras del transportador *sGLT1* (WRIGHT *et al.* 1997; KIPP *et al.* 2003), pudiéndose explicar el porqué del comportamiento de este gen en relación a las diferentes dietas en el tiempo. Al haber algún problema en la disponibilidad de sustrato para este transportador no se estaría viendo la respuesta que se genera a nivel de transcripción, ya que al haber una variación en la disponibilidad estas vesículas mantendrían un nivel adecuado de la proteína del transportador disponible para la membrana de las células intestinales.

## CONCLUSIÓN

Finalmente podemos establecer que la fermentación en estado sólido de la soya disminuye los factores anti-nutricionales como los GOS, NSP y Saponinas.

El afrecho de soya fermentada estimula mayores niveles de transcripción de los transportadores de nutrientes estudiados en comparación a la soya, sugiriendo que podría aumentar el transporte de nutrientes en el intestino proximal.

El afrecho de soya fermentada a los 50 días presenta niveles de transcripción de los transportadores de nutrientes estudiados similares a la dieta referencia, pudiendo sugerir que ambas dietas son comparables en la absorción de los nutrientes.

Se sugiere que el ASF podría ser un buen sustituto del AS en dieta de salmones, dado que se observó una mayor expresión de los genes transportadores de nutrientes en ASF a los 50 días, postulándose que podría haber un aumento en la absorción de los nutrientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDUL KADER M., KOSHIO S., ISHIKAWA M., YOKOYAMA S., BULBUL M., NGUYEN B. T., GAO J., LAINING A., 2012 Can fermented soybean meal and squid by-product blend be used as fishmeal replacements for Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)? *Aquac. Res.* **43**: 1427–1438.
- BAKKE-MCKELLEP a. M., NORDRUM S., KROGDAHL a.°, BUDDINGTON R. K., 2000 Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **22**: 33–44.
- BAKKE-MCKELLEP A. M., KOPPANG E. O., GUNNES G., SANDEN M., HEMRE G.-I., LANDSVERK T., KROGDAHL A., 2007 Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans. *J. Fish Dis.* **30**: 65–79.
- BARNES M. E., 2012 An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile rainbow trout. *Open J. Anim. Sci.* **02**: 234–243.
- BODOY S., MARTÍN L., ZORZANO A., PALACÍN M., ESTÉVEZ R., BERTRAN J., 2005 Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J. Biol. Chem.* **280**: 12002–12011.
- BRO S., 2008 Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. : 249–286.
- BUSTIN S. a, 2006 *A-Z of Quantitative PCR* (S a Bustin, Ed.). International University line, California.
- CHEN C. C., SHIH Y. C., CHIOU P. W. S., YU B., 2010 Evaluating nutritional quality of single stage- and two stage-fermented soybean meal. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **23**: 598–606.
- CHIKWATI E. M., SAHLMANN C., HOLM H., PENN M. H., KROGDAHL Å., BAKKE a. M., 2013 Alterations in digestive enzyme activities during the development of diet-induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* **402-403**: 28–37.

- FRANCIS G., MAKKAR H. P. S., BECKER K., 2001 *Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish*.
- FRANCIS G., KEREM Z., MAKKAR H. P. S., BECKER K., 2002 The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* **88**: 587.
- HALVER, JOHN AND HARDY R., 2003 *Fish Nutrition* (R Halver, John and Hardy, Ed.). Academic Press Inc, New York.
- HASSAAN M. S., SOLTAN M. a., ABDEL-MOEZ A. M., 2015 Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Anim. Feed Sci. Technol.* **201**: 89–98.
- KIPP H., KHOURSANDI S., SCHARLAU D., KINNE R. K. H., 2003 More than apical: Distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**: C737–49.
- KORTNER T. M., VALEN E. C., KORTNER H., MARJARA I. S., KROGDAHL S., BAKKE A. M., 2011 Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture* **318**: 355–363.
- KORTNER T. M., SKUGOR S., PENN M. H., MYDLAND L. T., DJORDJEVIC B., HILLESTAD M., KRASNOV A., KROGDAHL Å., 2012 Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Vet. Res.* **8**: 101.
- KORTNER T. M., BJÖRKHEM I., KRASNOV A., TIMMERHAUS G., KROGDAHL A., 2014 Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Br. J. Nutr.*: 1–15.
- KROGDAHL Å., NORDRUM S., SØRENSEN M., BRUDESETH L., RØSJØ C., 1999 Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquac. Nutr.* **5**: 121–133.
- KROGDAHL Å., BAKKE-MCKELLEP a. M., BAEVERFJORD G., 2003 Effects of graded levels

of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.). *Aquac. Nutr.* **9**: 361–371.

KROGDAHL Å., PENN M., THORSEN J., REESTIE S., BAKKE A. M., 2010 Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac. Res.* **41**: 333–344.

LI L., LIU Z., YANG X., YAN H., BAO S., FEI J., 2013 Bioluminescence imaging for IL-1 $\beta$  expression in experimental colitis. *J. Inflamm. (Lond)*. **10**: 16.

LILAND S., 2011 The effect of plant proteins and vegetable oils on the sterol metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*).

LILLEENG E., FRØYSTAD M. K., VEKTERUD K., VALEN E. C., KROGDAHL Å., 2007a Comparison of intestinal gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard fish meal or soybean meal by means of suppression subtractive hybridization and real-time PCR. *Aquaculture* **267**: 269–283.

LILLEENG E., FROYSTAD M. K., OSTBY G. C., VALEN E. C., KROGDAHL A., 2007b Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **147**: 25–36.

LILLEENG E., PENN M. H., HAUGLAND Ø., XU C., BAKKE A. M., KROGDAHL Å., LANDSVERK T., FRØYSTAD-SAUGEN M. K., 2009 Decreased expression of TGF- $\beta$ , GILT and T-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **27**: 65–72.

MARJARA I. S., CHIKWATI E. M., VALEN E. C., KROGDAHL Å., BAKKE A. M., 2012 Transcriptional regulation of IL-17A and other inflammatory markers during the development of soybean meal-induced enteropathy in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cytokine* **60**: 186–196.

MURASHITA K., AKIMOTO A., IWASHITA Y., AMANO S., SUZUKI N., MATSUNARI H., FURUITA H., SUGITA T., YAMAMOTO T., 2013 Effects of biotechnologically processed soybean meals in a nonfishmeal diet on growth performance, bile acid status, and morphological condition of the distal intestine and liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* **79**: 447–457.

- NAKAYAMA T., TOYODA T., OOI A., 1996 Delay in Rigor Mortis of red sea-bream by spinal cord destruction. *Fish. Sci.* **62**: 478–482.
- OLSVIK P. a, LIE K. K., JORDAL A.-E. O., NILSEN T. O., HORDVIK I., 2005 Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.* **6**: 21.
- OPAZO R., ORTÚZAR F., NAVARRETE P., ESPEJO R., ROMERO J., 2012 Reduction of soybean meal non-starch polysaccharides and  $\alpha$ -galactosides by solid-state fermentation using cellulolytic bacteria obtained from different environments. *PLoS One* **7**: e44783.
- OSTASZEWSKA T., DABROWSKI K., PALACIOS M. E., OLEJNICZAK M., WIECZOREK M., 2005 Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* **245**: 273–286.
- OSTASZEWSKA T., DABROWSKI K., KAMASZEWSKI M., GROCHOWSKI P., VERRI T., RZEPKOWSKA M., WOLNICKI J., 2010a The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **157**: 158–169.
- OSTASZEWSKA T., KAMASZEWSKI M., GROCHOWSKI P., DABROWSKI K., VERRI T., AKSAKAL E., SZATKOWSKA I., NOWAK Z., DOBOSZ S., 2010b The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **155**: 107–114.
- PENN M. H., BENDIKSEN E. Å., CAMPBELL P., KROGDAHL Å., 2011 High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **310**: 267–273.
- PEUHKURI K., VAPAATALO H., KORPELA R., 2010 Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. *World J. Gastroenterol.* **16**: 1057–1062.
- PFÄFFL M. W., 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 45e–45.

- REFSTIE S., SAHLSTRÖM S., BRÅTHEN E., BAEVERFIJORD G., KROGEDAL P., 2005 Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **246**: 331–345.
- RIENZO J. a. DI, GUZMAN A. W., CASANOVES F., 2002 A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* **7**: 129–142.
- ROMANO A., BARCA A., STORELLI C., VERRI T., 2014 Teleost fish models in membrane transport research: the PEPT1(SLC15A1) H<sup>+</sup>-oligopeptide transporter as a case study. *J. Physiol.* **592**: 881–97.
- SINHA A. K., KUMAR V., MAKKAR H. P. S., BOECK G. DE, BECKER K., 2011 Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* **127**: 1409–1426.
- SONG Y.-S., FRIAS J., MARTINEZ-VILLALUENGA C., VIDAL-VALDEVERDE C., MEJIA E. G. DE, 2008 Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. *Food Chem.* **108**: 571–581.
- SØRENSEN M., PENN M., EL-MOWAFI A., STOREBAKKEN T., CHUNFANG C., ØVERLAND M., KROGDAHL Å., 2011 Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquaculture* **314**: 145–152.
- URÁN P. a., SCHRAMA J. W., ROMBOUT J. H. W. M., TAVERNE-THIELE J. J., OBACH a., KOPPE W., VERRETH J. a J., 2009 Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *J. Fish Dis.* **32**: 733–744.
- VANDESOMPELE J., PRETER K. DE, PATTYN F., POPPE B., ROY N. VAN, PAEPE A. DE, SPELEMAN F., 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**: research0034.1–research0034.11.
- VENOLD F. F., PENN M. H., THORSEN J., GU J., KORTNER T. M., KROGDAHL Å., BAKKE A. M., 2013 Intestinal fatty acid binding protein (fabp2) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Localization and alteration of expression during development of diet induced enteritis.

Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. **164**: 229–240.

WACYK J., POWELL M., RODNICK K., OVERTURF K., HILL R. a., HARDY R., 2012 Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture* **356-357**: 223–234.

WANG F.-Q., YAO K., WEI D., 2011 From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones. *Soybean Heal.*: 231–252.

WRIGHT E. M., HIRSCH J. R., LOO D. D., ZAMPIGHI G. a, 1997 Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* **200**: 287–293.

YAMAMOTO T., MATSUNARI H., SUGITA T., FURUITA H., MASUMOTO T., IWASHITA Y., AMANO S., SUZUKI N., 2012 Optimization of the supplemental essential amino acids to a fish meal-free diet based on fermented soybean meal for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* **78**: 359–366.

## APENDICE

### Crecimiento y Parámetros Productivos

La estrategia utilizada en la alimentación permitió una buena disponibilidad del alimento, evitando de esta manera la competencia y la pérdida excesiva de este, cabe señalar que el consumo registrado para las distintas dietas no presentó diferencias estadísticas significativas entre ellas ( $p < 0,05$ ). El tratamiento ASF presentó una mayor aceptabilidad y consumo seguido del afrecho de soya. El siguiente cuadro (1) muestra los resultados obtenidos para cada parámetro productivo evaluado.

Cuadro 1. Parámetros Productivos de ejemplares de *Salmo salar L.* alimentados con dietas experimentales Control (HP), Soya (AS) y Soya Fermentada (ASF).

Dieta	GPP(g)	Total peso ganado	Consumo alimento	FCR	SGR (%)
HP	79.9 ± 4.9 <sup>a</sup>	3595.5 ± 223 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.04 <sup>a</sup>
AS	82.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	3703.1 ± 85 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
ASF	72.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	3269.1 ± 10 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>b</sup>

Promedios con letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ganancia de peso promedio (GPP) = (peso final – peso inicial) / peces

Total peso ganado = (peso final (g) – peso inicial (g))

Consumo de alimento = alimento consumido x 100 / 100 g masa corporal / día

Tasa crecimiento específica (SGR) = (Inpeso<sub>f</sub>(g) – Inpeso<sub>i</sub>(g)) / días x 100

Índice conversión alimento (FCR) = alimento consumido (Kg) / ganancia de peso

De acuerdo a los resultados obtenidos, los parámetros productivos FCR y SGR correspondientes a los tratamientos con inclusión de proteína vegetal presentaron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,05$ ), a diferencia de lo observado entre los resultados de la dieta AS y Control (HP) los cuales no difieren significativamente.

### Detección de interleuquina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

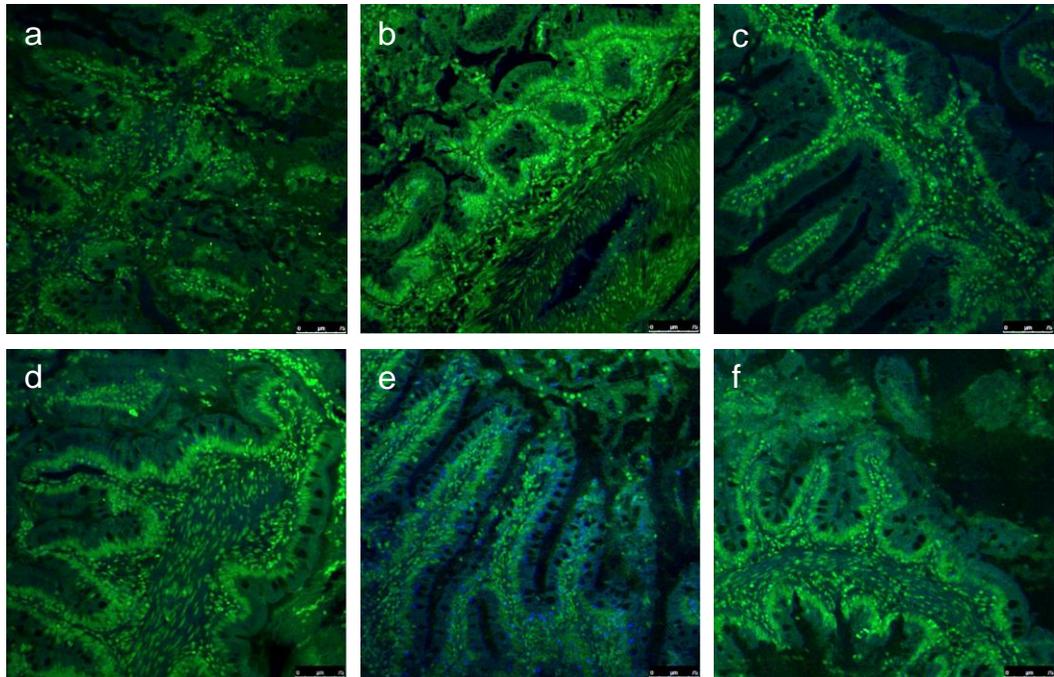


Figura 1. Detección de IL-1 $\beta$  en el intestino distal del salmón del atlántico alimentado con las dietas experimentales a los 2 y 50 días de estudio. Imágenes a, b y c corresponden al intestino distal de peces alimentados con dieta control, afrecho de soya y frecho de soya fermentado respectivamente a los 2 días estudio, mientras que las imágenes d, e y f al intestino distal de peces alimentados con dieta control, afrecho de soya y afrecho de soya fermentado respectivamente a los 50 días estudio. En estas imágenes se establecen las células positivas de IL-1 $\beta$ , en azul (verde es el contraste nuclear), provenientes del análisis densitométrico (Aumento 100X).

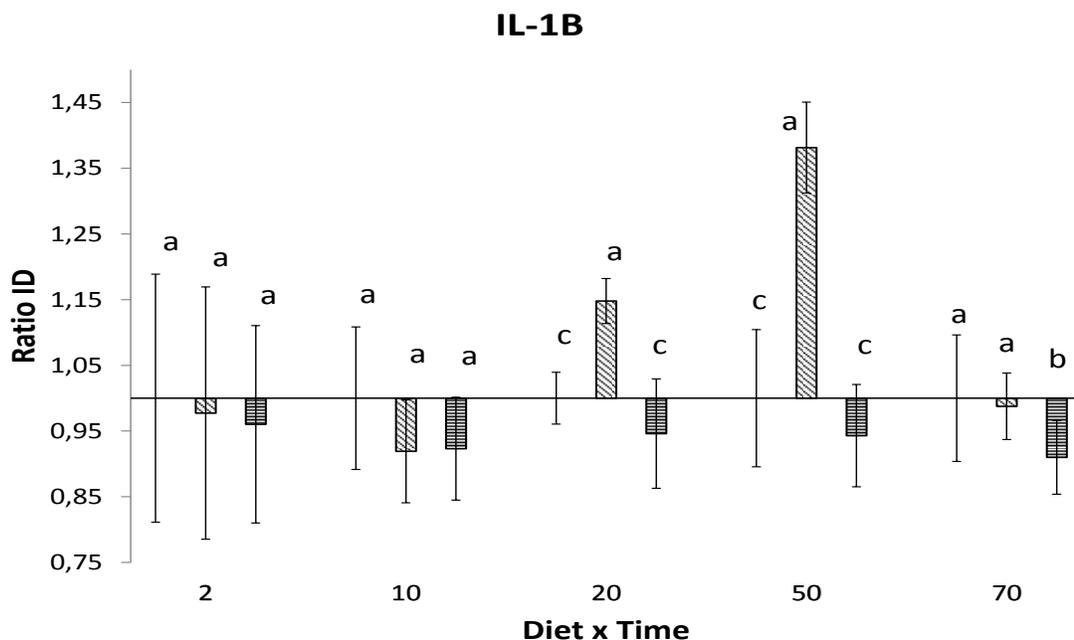


Figura 2. Densidad integrada de IL-1 $\beta$  en el intestino distal del salmón del atlántico atlántico. Dónde: corresponde dieta control , dieta de afrecho de soya y dieta de afrecho de soya fermentada . Las letras indican las diferencias estadísticas entre las dietas. Los valores son expresados como promedios  $\pm$  desviación estándar con n=3 estanques.

A nivel de intestino distal, fue posible observar diferencias en la detección de IL-1 $\beta$  entre las tres dietas experimentales y una evolución a través del tiempo de estudio. De esta manera, como se puede observar en la Figura 2 a los 2, 10 y 20 días no se detectaron diferencias significativas entre las tres dietas experimentales. Sin embargo es posible observar una tendencia a la disminución de IL-1 $\beta$  en la dieta de afrecho de soya fermentado a partir de los 10 días y que mantiene esa tendencia hasta los 50 días de estudio. Por otra parte, en la dieta de afrecho de soya se observó un aumento gradual de IL-1 $\beta$ , alcanzando una significancia estadística a los 50 días ( $p < 0,05$ ) en comparación a las otras dos dietas experimentales, como también se destaca en la Figura 1e.

