

UCH-FC  
Biotecnología  
C.796  
C.I.



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN FAMILIAS DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN ACEITE VEGETAL**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de ingeniera en Biotecnología Molecular

Valentina Rocío Córdova Alarcón

Director de Seminario de Título

Dra. Natalia Lam Pasten

Co-Director de Seminario de Título

Dra. Pilar Ulloa Huilcamán

Profesor Patrocinante

Dr. Marco Méndez Torres

Enero 2017

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

**VALENTINA ROCÍO CÓRDOVA ALARCÓN**

**“EFECTO EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN FAMILIAS DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN ACEITE VEGETAL”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Natalia Lam Pasten  
**Director Seminario de Título**

Dra. Pilar Ulloa Huilcamán  
**Co-Directora Seminario de Título**

Dr. Marco Méndez Torres  
**Prof. Patrocinante del Seminario de Título**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman  
**Presidente y Evaluadora**

Dra. Julieta Orlando  
**Evaluadora**



Santiago de Chile, Enero 2017

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Acuicultura de <i>Salmo salar</i> e Inclusión de Aceites Vegetales en la Dieta de los Peces .....	1
1.2 Lípidos y el Metabolismo en Peces .....	6
1.2.1 Consumo y Transporte .....	8
1.2.2 Almacenamiento .....	9
1.2.3 Elongación y Desaturación .....	10
1.2.4 $\beta$ oxidación.....	11
1.3 Genómica Nutricional en Salmónidos .....	13
1.4 Hipótesis .....	17
1.5 Objetivo General.....	18
1.6 Objetivos Específicos.....	18
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>19</b>
2.1 Obtención de Muestras y Dietas.....	19
2.2 Selección de Familias de <i>Salmo salar</i> para el Estudio de Expresión Génica...20	
2.3 Muestras, Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	21
2.4 Selección de Genes Candidatos.....	22

2.5 Diseño de Partidores.....	23
2.6 PCR cuantitativo en tiempo real, RT-qPCR.....	23
2.7 Análisis estadístico .....	26
<b>3. Resultados .....</b>	<b>27</b>
3.1 Selección de Genes Candidatos.....	27
3.2 PCR cuantitativo en tiempo real, RT-qPCR.....	27
3.3 Análisis de Expresión Relativa de los Genes de Interés.....	32
3.3.1 Comparación de la expresión génica de todos los individuos alimentados con dieta VO versus los alimentados con dieta FO.....	32
3.3.2 Comparación de la expresión génica de las familias FPBV (F17 y F19) alimentados con la dieta VO versus individuos de las mismas familias alimentados con la dieta FO .....	34
3.3.3 Comparación de la expresión génica entre las familias FPBV versus las familias APBV.....	38
<b>4. Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Dietas experimentales, ingredientes y composición química.....	20
<b>Tabla 2.</b> Variables de crecimiento de las familias seleccionadas medidas luego de 60 días de alimentación con dietas experimentales.....	21
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados para la amplificación de los genes candidatos de interés.....	24
<b>Tabla 4.</b> Descripción de los genes candidatos seleccionados para su análisis por RT-qPCR.....	28
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en la comparación de todos los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal (n=10) versus todos los individuos alimentados con dieta de aceite de pescado (n=10).....	32
<b>Tabla 6.</b> Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en los individuos de la familia 17 alimentados con dieta control de aceite de pescado (n=3) y dieta de aceite vegetal (n=3).....	35
<b>Tabla 7.</b> Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en los individuos de la familia 19 alimentados con dieta control de aceite de pescado (n=3) y dieta de aceite vegetal (n=3).....	37
<b>Tabla 8.</b> Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en las familias con cambios en contra del valor de cría (n=4) y con cambios a favor del valor de cría (n=6) alimentadas con dieta de aceite vegetal.....	40

<b>Tabla 9.</b> Resumen de resultados de los cambios de expresión relativa en respuesta a la dieta VO con respecto a la dieta FO.....	44
<b>Tabla 10:</b> Resumen de resultados de los cambios de expresión relativa en respuesta a la dieta VO entre las familias con distinto genotipo (familias con cambios en contra del valor de cría <i>versus</i> familias con cambios a favor del valor de cría).....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de lípidos comunes.....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema del metabolismo de lípidos y enzimas participantes.....	10
<b>Figura 3.</b> Ruta de síntesis de ácidos grasos altamente insaturados y enzimas participantes.....	11
<b>Figura 4.</b> Ejemplo de curvas de amplificación y <i>melting</i> de las 20 muestras analizadas, obtenidas por RT-qPCR del gen <i>ef1a<math>\beta</math></i> ; y curva estándar de 7 diluciones seriadas de 10 muestras elegidas al azar pertenecientes a las familias estudiadas, para RT-qPCR del gen <i>ef1a<math>\beta</math></i> .....	31
<b>Figura 5.</b> Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal <i>versus</i> dieta de aceite de pescado.....	33

- Figura 6.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 33
- Figura 7.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al transporte de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado.....34
- Figura 8.** Patrón de expresión relativa del gen *cyp7a*, involucrado en el metabolismo de colesterol, al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado.....34
- Figura 9.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos en la familia 17 al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 35
- Figura 10.** Patrón de expresión relativa del gen *cpt1* involucrado en la oxidación de ácidos grasos en la familia 17 al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 35
- Figura 11.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al metabolismo de colesterol, de la familia 17 al comparar individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 36
- Figura 12.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al metabolismo de colesterol, de la familia 19 al comparar individuos alimentados con dieta VO vs FO.... 36

- Figura 13.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado.....36
- Figura 14.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al transporte de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 37
- Figura 15.** Patrón de expresión relativa del gen *ppara*, involucrado en la oxidación de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta de aceite vegetal *versus* dieta de aceite de pescado..... 37
- Figura 16.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos al comparar las familias con cambio en contra del valor de cría *versus* familias con cambio a favor del valor de cría alimentadas con dieta de aceite de pescado.....38
- Figura 17.** Patrones de expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de colesterol al comparar las familias con cambio en contra del valor de cría *versus* familias con cambio a favor del valor de cría alimentadas con dieta VO..... 39
- Figura 18.** Patrón de expresión relativa del gen *apoa4*, involucrado en el transporte de ácidos grasos, al comparar las familias con cambio en contra del valor de cría *versus* familias con cambio a favor del valor de cría alimentadas con dieta VO..... 39
- Figura 19.** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos al comparar las familias con cambio a favor del valor de cría *versus* familias con cambio en contra del valor de cría alimentadas con dieta VO..... 39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico C20:4
APBV	Cambios Contra el Valor de Cría ( <i>Against Predictive Breeding Value</i> )
cDNA	Cadena Complementaria de Ácido desoxiribonucleico (sintetizada a partir de mRNA)
CT	Crossing Threshold
DE	Diferencialmente Expresados
DHA	Ácido Docosahexaenoico C22:6
EPA	Ácido Eicosapentanoico C20:5
FO	Aceite de Pescado ( <i>Fish Oil</i> )
FPVB	Cambios A Favor del Valor de Cría ( <i>Favor Predictive Breeding Value</i> )
HUFA	Ácidos Grasos Altamente Insaturados ( <i>Highly Unsaturated Fatty Acids</i> )
LC-PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga ( <i>Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MUFA	Ácidos Grasos Monoinsaturados ( <i>Monounsaturated Fatty Acids</i> )
PBV	Valor de Cría ( <i>Predictive Breeding Value</i> )
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PL	Fosfolípidos
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados ( <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
RNA	Ácido Ribonucleico
TAG	Triacilglicéridos
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>Very Low Density Lipoprotein</i> )
VO	Aceite Vegetal ( <i>Vegetable Oil</i> )

## RESUMEN

Debido a la baja disponibilidad de aceite y harina de pescado y al aumento del costo de éstos, es que es de gran importancia buscar nuevas fuentes de nutrientes para la dieta de los peces de cultivo. El uso de aceites vegetales se presenta como una buena alternativa en reemplazo del aceite animal debido a su alta disponibilidad y bajo costo, contribuyendo además a una actividad acuícola más sustentable.

En el presente estudio se evaluó la expresión hepática de genes involucrados en el metabolismo y homeostasis de lípidos mediante PCR en tiempo real cuantitativo (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) en familias de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), que fueron seleccionadas previamente por su respuesta en crecimiento luego de ser alimentadas con dieta alta en aceite vegetal de semillas de raps (*Brassica napus*). Los resultados indican que la dieta afecta el metabolismo de lípidos mediante el aumento en la expresión de los genes *acaca*,  $\Delta 6fada$ , *fasn* y *apoa4a*, involucrados en la síntesis y transporte de ácidos grasos, y la disminución en la expresión de los genes *cpt1*, *cyp7a* y *ppara*, que participan en la oxidación de ácidos grasos y señalización PPAR. Además, las distintas familias difieren en su respuesta transcripcional a la dieta con aceite vegetal, dependiendo de su *background* genético, sugiriendo distintos mecanismos de adaptación a la dieta. Este estudio podrá contribuir al desarrollo de futuras estrategias de alimentación de salmón del Atlántico mediante la identificación de genes candidatos asociados al metabolismo de lípidos en aquellos individuos que responden mejor ante dietas vegetales, y en el futuro la identificación de variantes alélicas en estos genes para incorporarlos en programas de mejoramiento genético utilizando dietas con alto contenido de aceite vegetal.

## ABSTRACT

Due to low availability of fish oil and fish meal, and the rising cost of them it is very important to seek new sources of nutrients to feed cultured salmon. The use of vegetable oils is presented as a good alternative to replace fish oil due to its high availability and low cost, while contributing to a more sustainable aquaculture. In the present study we evaluated the effect of a diet high in vegetable rape seed oil on the hepatic expression of genes involved in lipid metabolism and homeostasis by quantitative real-time PCR, RT-qPCR, in different families of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) which were previously selected according to their growth response to the vegetable oil based diet. The results indicate that diet affects lipid metabolism by increasing the expression of genes *acac $\alpha$* ,  *$\Delta 6fad\alpha$* , *fasn* and *apoa4 $\alpha$* , involved in the synthesis and transport of fatty acids, and decreasing the expression of genes *cpt1*, *cyp7a* and *ppar $\alpha$* , involved in fatty acid oxidation and PPAR signaling. Furthermore, different salmon families differ in their transcriptional response to vegetable oil based diet, depending on their genetic background, suggesting different mechanisms of adaptation to vegetable oil diet. This study could contribute to the development of future strategies for Atlantic salmon feed, through the identification of candidate genes involved in lipid metabolism in those individuals who respond best to the diet, and in the future the identification of allelic variants of these genes to incorporate them in genetic improvement programs using diets with high content of vegetable oils.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Acuicultura de *Salmo salar* e Inclusión de aceites vegetales en la dieta de los peces

El salmón del Atlántico, *S. salar*, es un pez carnívoro de alto valor comercial, generalmente cultivado en sistemas intensivos de cultivo. En Chile, es la especie de cultivo de mayor importancia económica, posicionando al país como el segundo productor a nivel mundial de esta especie. Es una especie introducida, cuyas primeras fases de cultivo se inician en agua dulce o piscicultura y luego es trasladada al mar para su proceso de engorda por un período de 15 a 20 meses, con el fin de cosecharse con un peso de 4,5 a 5 kilos. En Chile, su cultivo se ubica entre la X y XII regiones y se comercializa principalmente a los mercados de Estados Unidos, Brasil y Unión Europea, bajo el formato de fresco o congelado en filetes o entero (SalmonChile, 2013).

Las dietas y la alimentación en general representan el ítem de mayor costo en la mayoría de los sistemas de cultivo tanto de peces como crustáceos (FAO, 2006). Desde sus inicios, los salmones en cultivo han sido alimentados en un 100% con alimentos comerciales de alta energía y con proteínas de alta calidad (Tacon 2002, Deutsch y cols. 2007), los cuales han sido elaborados principalmente con harina y aceite de pescado, recursos obtenidos exclusivamente de la captura industrial de peces, la que ha llegado a su máximo sostenible, con una producción que crece más lento que la acuicultura (Pickova & Morkore, 2007). La tasa de crecimiento de la actividad acuícola es de 8,5%

por año, por lo que los suplementos para las dietas deben crecer a tasas similares para compensar la demanda (Tacon & Metian, 2008).

La producción anual de aceite y harina de pescado en los últimos 20 años ha sido en promedio 1,3 y 6,5 millones de toneladas métricas, respectivamente (Hardy, 2010). Alrededor del 88,5% de la producción mundial de aceite de pescado (FO, por sus siglas en inglés) es utilizada por la acuicultura (Tacon & Metian, 2008), por lo que, si esta actividad sigue creciendo y expandiéndose al mundo entero, la demanda de harina y aceite de pescado pronto excederá los suministros actuales, aumentando los precios y limitando así la acuicultura (FAO, 2006). Es por esto que el futuro de la actividad acuícola recae fuertemente en reducir la dependencia en el aceite y harina de pescado mediante la investigación de nuevas fuentes de proteína y aceites vegetales (VO, por sus siglas en inglés) alternativos y que puedan significar mejoras en la salud y el crecimiento de los peces, así como beneficios económicos para los productores (Turchini y *co/s.* 2009). Además, se debe considerar que las dietas para salmónidos deben ser elaboradas con materias primas que permitan cubrir sus requerimientos nutricionales y optimizar su crecimiento (Webster & Chorn, 2002). Las fuentes vegetales, cuya producción mundial es suficiente para cumplir con las necesidades alimenticias de los cultivos en un futuro, se presentan como una buena alternativa en reemplazo al alimento de origen animal.

El salmón del Atlántico en etapa de crecimiento tiene un requerimiento mínimo de 46,5% de proteína y 18% de lípidos en la dieta (Salazar, 1994; Von Baer y *co/s.* 2004), con un 1 a 2% de n-3 y 1% de n-6 para prevenir signos de deficiencia de ácidos grasos (Lowell, 1998), ya que éstos son esenciales para el crecimiento normal, la utilización del alimento y la viabilidad reproductiva de los peces (Higgs & Dong, 2000). Los proveedores de

alimento para peces ofrecen dietas formuladas para salmón y trucha que contienen aproximadamente desde un 38 a 50% de proteína, según la etapa de cultivo en que se encuentren los peces, asegurando un óptimo equilibrio en el contenido de proteínas y energía con una excelente relación costo-beneficio (BioMar, 2012). Entre las características nutricionales más relevantes de la harina de pescado se encuentra su elevado contenido proteico y su composición de aminoácidos, permitiendo asegurar una alta tasa de crecimiento de los peces. Por otro lado, el aceite de pescado constituye la mayor fuente de lípidos en las dietas, sin embargo, su obtención es más limitada que la harina de pescado. Actualmente, los aceites vegetales son considerados la alternativa más sostenible para el reemplazo del aceite de pescado en los alimentos acuícolas debido a su creciente producción y en grandes volúmenes, alta disponibilidad y sostenidos precios (Fountoulaki y cols. 2009), además, son renovables, pueden ser de origen confiable y de menor costo (Miller y cols. 2008).

En los alimentos comerciales de *Salmo salar*, los lípidos de la dieta representan la mayor fuente de energía, y deben incluir ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) esenciales como 18:3(n-3), 18:2(n-6), y especialmente ácido eicosapentanoico (EPA, C20:5) y ácido docosahexanoico (DHA, C22:6) de la serie n-3 y ácido araquidónico (AA, C20:4) de la serie n-6 para permitir el correcto desarrollo y crecimiento de células y tejidos (Sargent y cols. 1995). La serie n-3 de ácidos grasos son esenciales para un óptimo crecimiento y eficiencia de alimentación, así como también poseen efectos positivos sobre la respuesta inmune a bajas temperaturas, funciones cardiovasculares y el desarrollo neuronal y visual en los peces. Mientras que los ácidos grasos del tipo n-6 sintetizan prostaglandinas que presentan importantes funciones

reproductivas y sobre la regulación respiratoria, así como también favorecen la resistencia a enfermedades a altas temperaturas (Heen y cols., 1993). Por lo tanto, la relación n-3/n-6 en la dieta de los peces debe ser adecuada para un buen desarrollo del pez y una mantención adecuada de sus funciones (Higgs & Dong, 2000; Bell y cols. 2003).

Es por esto que cualquier sustitución de FO por VO en la dieta de estos individuos debe ser llevada a cabo de tal manera que asegure que se mantengan las cualidades que hacen al salmón en cultivo una opción alimenticia saludable, como altos niveles de 20:5(n-3) y 22:6(n-3) (Bell y cols. 2003).

Mediciones de la capacidad de  $\beta$  oxidación en salmónidos sugiere que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (MUFAs) como 16:0, 16:1, 18:1(n-9), 18:2(n-6) y 22:1(n-11), presentes en alta concentración en aceites vegetales, son los sustratos preferidos para la producción de energía (Henderson, 1996). Mientras que 22:6(n-3) en todos los tejidos y 20:5(n-3) en hígado, presentan mínima  $\beta$  oxidación (Stubhaug y cols. 2005).

Los aceites vegetales carecen de n-3 LC-PUFA (ácidos grasos  $\omega$ -3 altamente insaturados de cadena larga), abundantes en FO y esenciales para el crecimiento normal de los peces y característicos en el valor nutritivo de la carne de salmón. Cultivar peces con un alto porcentaje de aceite vegetal resultaría en una reducción en los niveles de ácidos grasos del tipo omega 3, comprometiendo los efectos que produce en los consumidores humanos (Menoyo y cols. 2005). Hoy en día hay evidencia suficiente que el consumo elevado de ácidos grasos del tipo n-3, especialmente 20:5(n-3) y 22:6(n-3), y el consumo reducido de ácidos grasos del tipo n-6, principalmente 18:3(n-6), pueden

tener beneficios significativos para la salud humana, como efectos preventivos de enfermedades coronarias, artritis reumatoide, cáncer, desarrollo neuronal y desórdenes del ánimo (Connor, 2000; Simopoulos, 1999).

El aceite vegetal no contiene ácidos grasos poliinsaturados con más de 18 carbonos, a diferencia del aceite de pescado, que posee en su mayoría ácidos grasos con cadenas de 20 y 22 carbonos. Conocer los efectos de los aceites vegetales en el metabolismo de lípidos es importante para mantener la salud de los peces y los beneficios que éstos le entregan a los consumidores humanos.

Varios estudios han demostrado una exitosa crianza de salmones que consumen dietas altas en aceites vegetales por periodos de hasta 30 semanas, sin afectar su crecimiento y salud (Bell y cols. 2001; Bell y cols. 2002; Torstensen y cols. 2000). Además, se ha establecido que estos individuos tienen la capacidad de convertir los ácidos grasos 18:3(n-3) y 18:2(n-6) presentes en la dieta vegetal, a ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados, como 20:5(n-3), 22:6(n-3) y 20:4(n-6) (Bell y cols. 1997, 2001).

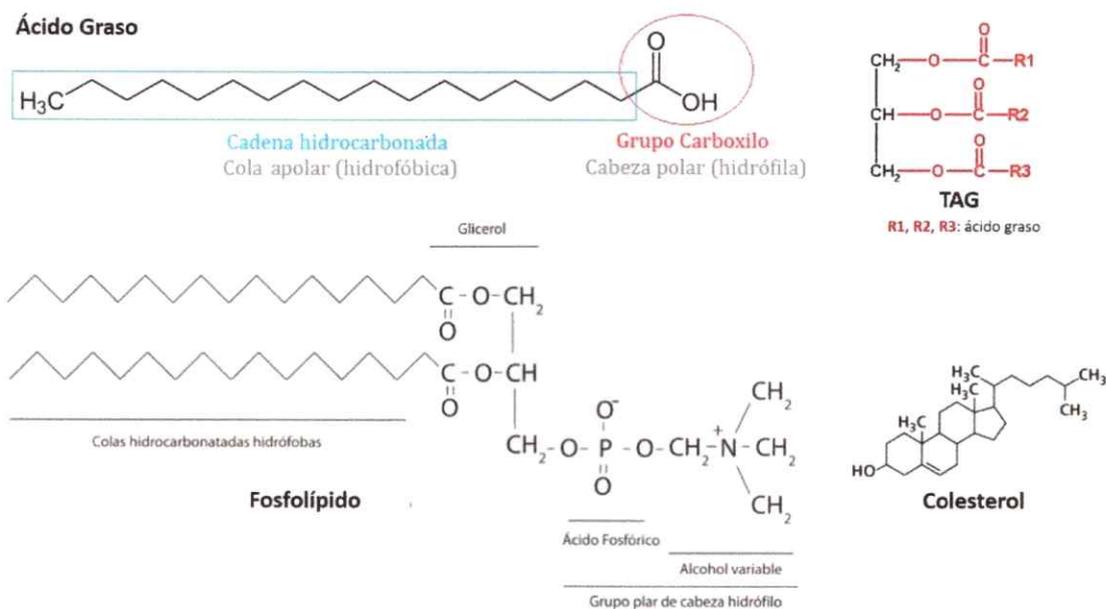
Se ha encontrado que la sustitución de FO por VO en más de un 66%, se traduce en una reducción considerable de los niveles de 20:5(n-3) y 22:6(n-3) en la carne así como también reducción en el crecimiento y en el valor nutricional de *Salmo salar* (Bell y cols. 2003; Pratoomyot y cols. 2011). Se ha visto también que la categoría funcional más afectada por la dieta es el metabolismo, principalmente el metabolismo de lípidos y carbohidratos, seguido de la respuesta inmune y el tráfico intracelular (Pratoomyot y cols. 2008; Torstensen y cols. 2004). Es por esto que se presenta como una buena estrategia de alimentación de los cultivos la mezcla de ambos aceites para compensar las pérdidas nutricionales que resulta sustituyendo por completo el aceite de pescado de la dieta, ya

que un suministro inadecuado de nutrientes en la dieta puede ocasionar un retraso o un detenimiento total del crecimiento de los peces.

## **1.2 Lípidos y el Metabolismo en Peces**

Los lípidos incluyen una variedad de moléculas que son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua, son compuestos orgánicos que contienen ácidos grasos esterificados en grupos alcohol y en grupos amino. Los lípidos poseen funciones estructurales siendo parte de las membranas celulares, son precursores de hormonas esteroideas y eicosanoides, actúan como transportadores de sustancias liposolubles, y son utilizados para la producción y almacenamiento de energía. Recientemente se ha demostrado que los lípidos juegan un importante papel como reguladores de la expresión génica y mediadores en otros procesos como la inflamación y neuroprotección, actividades desconocidas para estos nutrientes décadas atrás (Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2012). Los lípidos animales, incluyendo los de peces, pueden dividirse en dos grupos: lípidos polares y neutros. La mayoría de los lípidos polares se encuentran en las membranas celulares y comprenden principalmente a los fosfolípidos. Los lípidos neutros, que sirven principalmente como fuente de energía, incluyen a los monoacil-, diacil-, y triacil- gliceroles (triacilglicéridos, TAG), moléculas compuestas por 3 ácidos grasos esterificados a los tres grupos alcohol del glicerol, esteroides, ácidos grasos libres y ésteres (Henderson & Tocher, 1987; Tocher, 2003) (Figura 1). A temperatura ambiente, los TAG pueden ser sólidos, formando las grasas, o líquidos, formando parte de los aceites.

Los ácidos grasos consisten en una cadena de carbonos con un grupo metil en un extremo y un grupo carboxil en el otro extremo (Figura 1). La cantidad de moléculas de carbono y el número de dobles enlaces determinan las propiedades de cada ácido graso.



**Figura 1:** Estructura de lípidos comunes. Estructura básica de un ácido graso, fosfolípido, triacilglicérido (TAG) y colesterol. (Modificada de Castaños, E., 2015)

Los ácidos grasos saturados no poseen dobles enlaces, los monoinsaturados poseen un doble enlace y los poliinsaturados poseen dos o más dobles enlaces. Los ácidos grasos que constituyen los lípidos en peces, son ricos en cadenas largas, altamente insaturadas (HUFA) que poseen funciones importantes en la nutrición animal, tanto de los peces como humanos, ya que son la principal fuente de omega 3. Los ácidos grasos saturados más predominantes en las grasas animales son 16:0 y 18:0, los cuales constituyen principalmente los fosfoglicéridos en las membranas celulares; sin embargo, se puede encontrar un variado rango de cadenas carbonatadas desde C12 a C24. Lo mismo

ocurre con los ácidos grasos monoinsaturados, que van desde C14 a C24, siendo los más predominantes y componentes de los fosfoglicéridos 18:1n-9 y 16:1n-7. En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los más representativos en peces son el ácido araquidónico 20:4n-6 y su precursor metabólico, ácido linoleico 18:2n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 junto a su precursor metabólico ácido  $\alpha$ -linoleico 18:3n-3, considerados ácidos grasos esenciales en todos los vertebrados (Trattner, 2009). En salmónidos se ha demostrado que el largo y el grado de insaturación de los ácidos grasos definen el destino metabólico de éstos (Kiessling & Kiessling, 1993; Bell *y cols.* 1997).

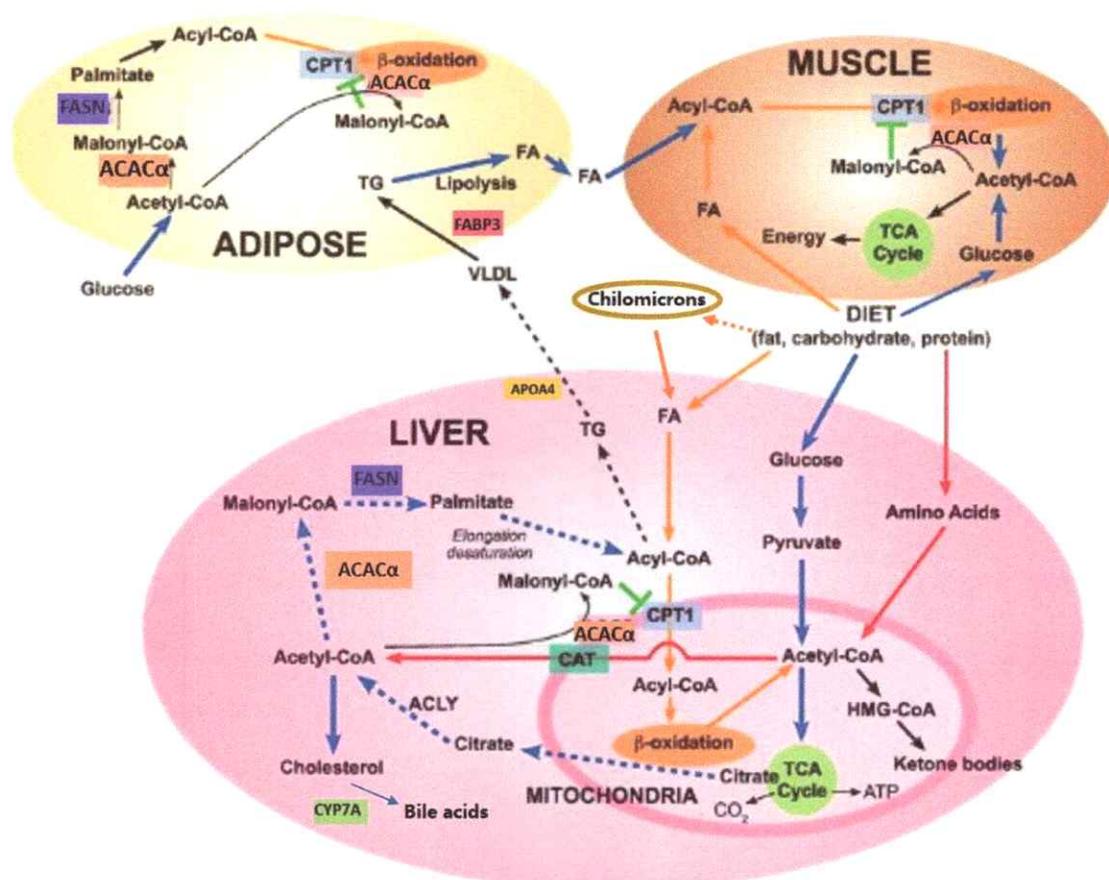
### **1.2.1 Consumo y Transporte**

Los lípidos al ser ingeridos, sufren de hidrólisis extracelular llevada a cabo por lipasas y colipasas en el lumen del estómago, intestino y ciego. El glicerol y los ácidos grasos de menos de 10 carbonos son absorbidos por los enterocitos, mientras que los ácidos grasos más largos son clivados y emulsificados por ácidos biliares para formar micelas. Éstas son transportadas desde el lumen a las vellosidades de los enterocitos, se disocian a ácidos grasos los cuales por difusión ingresan a estas células, donde son reesterificados y agrupados con proteínas para formar los quilomicrones. Los lípidos son transportados desde los enterocitos mayoritariamente en quilomicrones y el resto en lipoproteínas de baja densidad (VLDL, *very low density lipoprotein*) mediante la vena porta hepática hasta el hígado, donde son metabolizados o distribuidos directamente en VLDL a otros tejidos mediante la vena aorta (Babin & Vernier, 1989; Roberts, 2002; Torstensen *y cols.*, 2000).

Se han propuesto dos mecanismos de transporte de lípidos desde el espacio extracelular al intracelular, difusión o transporte mediado por proteínas; este último requiere de una translocasa de ácidos grasos o una proteína transportadora de ácidos grasos (Van Nieuwenhoven y cols., 1996). Los lípidos también pueden ser incorporados a las células mediante la familia de genes receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Hussain, 2001). Una vez dentro de la célula, los ácidos grasos de cadena larga y otros componentes hidrofóbicos son transportados por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, *fatty acid binding protein*), las cuales han sido identificadas en músculo e intestino de salmón (Jordal y cols., 2006), y deben ser activados a su forma acil-CoA por la acil-CoA sintasa para su posterior modulación o almacenamiento como TAG (Figura 2).

### 1.2.2 Almacenamiento

Uno de los posibles destinos de los ácidos grasos en el metabolismo hepático de Salmón del Atlántico, es la incorporación de lípidos celulares tales como TAG y fosfolípidos (PL, *phospholipids*). La biosíntesis de TAG y PL es por lo general igual en peces y mamíferos, la cual ocurre en el retículo endoplásmico. En salmónidos, los lípidos son almacenados como TAG en el tejido adiposo y adipocitos en el músculo (Zhou y cols., 1995) (Figura 2) o son secretados al plasma como VLDL, como por ejemplo ocurre en hepatocitos (Babin & Vernier, 1989), mientras que los fosfolípidos son utilizados como constituyente de membranas celulares.



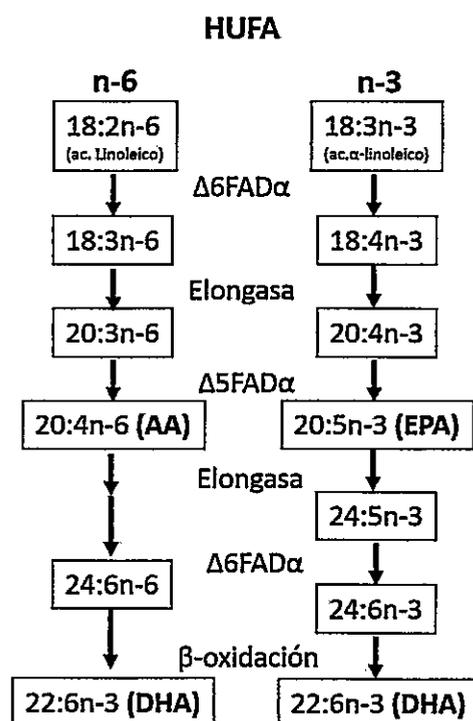
**Figura 2:** Esquema del metabolismo de lípidos y las enzimas participantes. FA: ácidos grasos, TG: triacilglicéridos CAT: carnitina acetyl-CoA, TCA cycle: ciclo de Krebs.

Modificada de Wakil & Abu-Elheiga, 2009.

### 1.2.3 Elongación y Desaturación

Los sustratos esenciales para la elongación y desaturación de los ácidos grasos del tipo n-6 y n-3 son 18:2n-6 y 18:3n-3. Se requieren las mismas enzimas para la catálisis de ambos tipos; sin embargo, la afinidad de éstas enzimas es mayor por aquellos ácidos grasos de la serie n-3.

La síntesis de los ácidos grasos de cadena larga ocurre en la fracción microsomal del hígado, excepto por la reacción de acortamiento de cadena para formar 22:6n-3 (DHA), esto ocurre en los peroxisomas mediante  $\beta$  oxidación (Figura 3).



**Figura 3:** Ruta de síntesis de ácidos grasos altamente insaturados y enzimas participantes.

#### 1.2.4 $\beta$ oxidación

Una vez almacenados, los lípidos son catabolizados mediante  $\beta$  oxidación, la cual produce calor cuando ocurre en los peroxisomas y ATP cuando ocurre en mitocondrias. En primer lugar, el ácido graso debe ser activado a su forma acil-CoA, el cual para atravesar la membrana externa de la mitocondria debe ser convertido a acilcarnitina por la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI). Acilcarnitina es transferido a la membrana mitocondrial interna con la ayuda de la enzima carnitina/acilcarnitina

translocasa y convertida a acil-CoA por la enzima CPTII, acil-CoA entra en el proceso de  $\beta$  oxidación (Froyland y cols. 1998). La  $\beta$  oxidación en peroxisomas actúa mayormente en ácidos grasos de cadena larga, los que posteriormente pueden ser oxidados por la mitocondria o como un paso de la síntesis de DHA (Torstensen y cols. 2000). Se ha demostrado en trucha arcoíris que la  $\beta$  oxidación en mitocondrias es selectiva en cuando a los ácidos grasos a oxidar, teniendo mayor preferencia como sustrato a los ácidos grasos saturados (Kiessling & Kiessling, 1993). Los principales productos de la  $\beta$  oxidación de acil-CoA son acetato en peroxisomas y oxalacetato y maleato en mitocondrias, según estudio en hepatocitos de rata (Leighton y cols. 1989). La  $\beta$  oxidación es mayor en músculo rojo, seguido de hígado, mientras que la menor actividad oxidativa se encuentra en músculo blanco (Froyland y cols. 2000).

Los lípidos y los ácidos grasos que los componen son, junto a las proteínas, los mayores constituyentes orgánicos de los peces, siendo el contenido de lípidos mayor que el de proteínas, lo que refleja el gran rol que poseen los lípidos y ácidos grasos como fuente de energía para el crecimiento de los peces, incluyendo reproducción y movimiento (migración). Los lípidos son la fuente que aporta mayor energía metabolizable, mantienen la estructura e integridad de la membrana celular, transportan vitaminas y son la fuente de ácidos grasos esenciales, necesarios para el crecimiento normal de los peces. La deficiencia de ácidos grasos provoca una reducción del crecimiento, de la sobrevivencia de los peces y una conversión alimenticia pobre causando además otros problemas en salmónidos como hígado graso y pálido, despigmentación dérmica, incremento del contenido de agua en el músculo, hinchazón de las mitocondrias y bajos niveles de hemoglobina (Tacon, 1985).



El lípido más importante en todos los animales, incluyendo los peces, que no contiene ácidos grasos es el colesterol, siendo la dieta la mayor fuente de este compuesto. Es el compuesto más común de los hidrocarburos tetracíclicos, conocidos como esteroides, y puede existir sin ser esterificado como componente esencial de las membranas celulares o almacenado en forma de lípido neutro esterificado a un ácido graso. El colesterol es un componente esencial de la membrana celular y por lo tanto crítico para la viabilidad y crecimiento celular. Es también el precursor por el cual esteroides y ácidos biliares son sintetizados. Su inclusión en micelas, formadas por ácidos biliares en el intestino, facilita la entrada tanto de colesterol como de ácidos grasos a los enterocitos. En estas células, los lípidos son incorporados en quilomicrones y luego secretados a la linfa para su distribución en el torrente sanguíneo. En el hígado, el colesterol es utilizado para la síntesis de ácido biliar o reincorporado en lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, que son luego liberadas en el sistema circulatorio. Se ha estudiado que los ácidos grasos poliinsaturados afectan la transcripción génica mediante cambios en la composición de la membrana y señalización, producción de eicosanoides, estrés oxidativo, activación de receptores nucleares o modificaciones covalentes de factores de transcripción específicos (Jump y cols. 1996). Por lo que la falta de estos ácidos grasos también puede tener un efecto significativo en estas u otras funciones celulares.

### **1.3 Genómica Nutricional en Salmónidos**

Con el objetivo de implementar estrategias productivas que permitan la selección de individuos que realicen un mejor aprovechamiento de dietas con nutrientes vegetales, en los últimos años se han realizado estudios en trucha arcoíris y salmón del Atlántico utilizando familias, conducentes a evaluar la respuesta transcripcional a ingredientes

vegetales en la dieta. Las familias en peces están compuestas por individuos que poseen la misma base o *background* genético, los cuales son por lo general hermanos completos. Palti y cols. (2006) evaluaron la respuesta de crecimiento en 20 familias de trucha arcoíris alimentadas con una dieta basada en la inclusión de proteína vegetal sin encontrar diferencias significativas entre familias, y sugiriendo que aquellas cepas comerciales que obtenían un mayor crecimiento con proteína animal, debiesen mantener su mejorado rendimiento al ser alimentadas con la dieta vegetal. Pierce y cols. (2008) evaluaron el crecimiento de 95 familias de trucha arcoíris alimentadas con inclusión de proteína y aceite vegetal, encontrando interacción significativa entre genotipo y dieta, lo que significa que las familias que obtienen un mayor crecimiento con la dieta basada en harina y aceite de pescado, no son necesariamente las mismas familias que crecerán más con la dieta vegetal, ya que hay un componente genético que está influyendo en la respuesta. Leaver y cols. (2011) evaluaron la respuesta transcripcional en 48 familias de salmón del Atlántico ante la inclusión de aceites vegetales, y Morais y cols. (2011a; 2011b) estudiaron la respuesta genotipo-específica de dos familias contrastantes genéticamente de *Salmo salar*, evaluando la respuesta transcripcional del hígado a la sustitución de FO por aceite VO. Dichos estudios concluyeron que existen diferencias en los resultados obtenidos entre las familias de los peces, revelando que no todas las familias responden igual ante el reemplazo, y que el *background* genético de los individuos afectaría la respuesta fisiológica de los peces a la dieta vegetal.

El uso de programas de mejoramiento genético para mejorar rasgos de importancia comercial es cada vez más común en la acuicultura, combinando selección genética con cambios en la formulación de alimentos comerciales como aumento en los niveles de

aceite de pescado, puede ser una estrategia viable para satisfacer la demanda mundial de peces de cultivo sin comprometer el bienestar animal o el valor nutricional (Gjedrem & Baranski, 2009).

Se sugiere que podría existir una interacción genotipo-dieta sobre el crecimiento de peces alimentados con dietas con nutrientes vegetales. Además, se han realizado otros estudios en trucha arcoíris utilizando ingredientes alternativos en la dieta con el objetivo de determinar una posible interacción genética-nutricional (Panserat y cols. 2008), concluyendo que existe la capacidad de combinar el uso de la genética con herramientas nutricionales para alcanzar un óptimo crecimiento en diferentes familias de salmónidos.

En el presente estudio, se buscó cuantificar la expresión de genes candidatos involucrados en vías metabólicas y de señalización relacionadas con el metabolismo de lípidos que se vean afectados por el reemplazo de FO por VO en la dieta en distintas familias de *Salmo salar*.

La estrategia de genes candidatos consiste en el estudio dirigido a un gen funcional del que se conoce o que se tiene sospecha que tiene un rol en el fenotipo de interés (Fitzpatrick y cols. 2005). En este estudio los genes candidatos a estudiar fueron identificados y seleccionados a partir de un análisis de RNAseq en un estudio previo (Lam y cols., manuscrito en preparación). En dicho estudio, ejemplares de 35 familias de *S. salar* fueron alimentados con una dieta con 50% de aceite vegetal (VO) y una dieta control (FO), transcurridos 60 días se estimó la ganancia de peso y se comparó entre ejemplares de la misma familia alimentados con dieta VO y FO. Posteriormente se estimó el valor de cría (PBV) para el rasgo ganancia de peso y se estableció un ranking del PBV con ambas dietas. El valor de cría se refiere al efecto genético aditivo de un

rasgo, que corresponde al valor de los genes que serán transferidos a la progenie, se entiende también como el desempeño promedio de la progenie de acuerdo al rasgo medido. Es un valor que se utiliza para la elección de reproductores de acuerdo a rasgos de interés (Gondro, 2016). En familias que presentaron mejor y peor respuesta en crecimiento con la dieta VO, o un mayor y menor valor del PBV, respectivamente, con dieta VO, se analizó el transcriptoma hepático mediante RNAseq, encontrándose mayoritariamente genes diferencialmente expresados del metabolismo lipídico. A partir de estos resultados se realizó una revisión y selección de genes candidatos de interés que participen en el metabolismo y homeostasis de lípidos a ser estudiados en el presente trabajo.

Los resultados del presente estudio podrán contribuir al desarrollo de futuras estrategias de alimentación de salmón del Atlántico mediante la identificación de genes candidatos asociados a metabolismo de lípidos en aquellos individuos que respondan mejor ante dietas vegetales en comparación a dietas con aceite de pescado y en el futuro, la identificación de variantes alélicas en estos genes para incorporarlos en programas de mejoramiento genético utilizando dietas con alto contenido de VO.

#### **1.4 Hipótesis**

La inclusión de ingredientes vegetales como aceite de semillas de raps en la dieta de *Salmo salar*, provocará cambios a nivel de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en comparación a individuos alimentados con dieta de aceite de pescado, contribuyendo a un metabolismo eficiente y sin afectar el crecimiento de estos individuos.

### **1.5 Objetivo General**

Evaluar el efecto de una dieta alta en aceite vegetal, mediante la cuantificación de la expresión génica de genes involucrados en el metabolismo y homeostasis de lípidos en familias de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

### **1.6 Objetivos Específicos**

1. Identificar y seleccionar del transcriptoma hepático de salmón del Atlántico genes diferencialmente expresados involucrados en el metabolismo de lípidos en individuos alimentados con dieta VO.
2. Desarrollar y estandarizar un protocolo de RT-qPCR para los genes diferencialmente expresados seleccionados involucrados en el metabolismo de lípidos.
3. Cuantificar la expresión de genes involucrados en el metabolismo y homeostasis de lípidos de salmón del Atlántico alimentados con dieta VO y FO.
4. Comparar la respuesta a la dieta VO y FO en la expresión génica en distintas familias de *Salmo salar*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de Muestras y Dietas

Las muestras para el presente estudio se obtuvieron a partir de un ensayo nutricional realizado el año 2010, en 35 familias de *Salmo salar*. Estas familias fueron provistas por la empresa Aqua Chile S.A. Al comienzo del experimento los peces de cada familia fueron pesados y distribuidos al azar en dos estanques al aire libre en el centro experimental de Castro de BioMar Chile, cuidando que todas las familias estuviesen representadas en ambos estanques. Los peces de cada estanque fueron alimentados durante dos meses con dos dietas, una para cada estanque, la primera fue una dieta comercial control con 100% proteína proveniente de harina de pescado (HP) y 100% de lípidos provenientes de aceite de pescado, llamada FO (n=504), y la segunda, una dieta vegetal (VO), con 100% de la proteína proveniente de harina de pescado, y los lípidos provenientes 50% de aceite de pescado y 50% de aceite vegetal de semilla de raps (n=502). La composición de cada dieta se detalla en la Tabla 1. Después de dos meses, los peces de ambos estanques fueron pesados y se calculó la ganancia de peso ( $\Delta$ Peso) y el valor de cría (PBV) de cada familia para este rasgo. Según estos cálculos, el total de los individuos alimentados con dieta VO presentaron un mayor crecimiento con una ganancia de peso promedio de  $134,15 \pm 53,53$  g y un peso final promedio de 289,84 g, que los individuos alimentados con la dieta FO, con una ganancia de peso de  $106,85 \pm 49,12$  g y un peso promedio final de 237,45 g (Villalobos, S., 2012).

**Tabla 1:** Dietas experimentales, ingredientes y composición química.

Dieta Ingredientes (% p/p)	Dieta Control	Dieta Vegetal
	FO (100% HP, 100% FO)	VO (100%HP, 50% FO /50% VO)
Harina de Pescado	40,0	40,0
Aceite de Pescado	23,5	11,3
Aceite Vegetal	-	11,3
Trigo	16,6	16,8
Harina de Plumas	7,0	7,0
Harina de Visceras	7,3	7,3
Gluten de Maíz	-	-
Girasol	-	-
Soya Desgrasada	-	-
Micro Nutrientes	2,3	2,5
<b>Composición Química (%)</b>		
Proteínas	39,0	39,0
Lípidos	29,6	28,8
Cenizas	7,1	7,1
Fibra	0,6	0,6
Humedad	10,5	11,0
Proteína digestible (%)	33,1	33,1
Energía digestible (%)	18,8	18,8

% p/p: porcentaje peso/peso, HP: Harina de pescado

## 2.2 Selección de familias de *Salmo salar* para el estudio de la expresión génica

Se seleccionaron las familias con el mayor cambio en el valor de cría al ser alimentados con la dieta VO. Se seleccionaron las familias 17 y 19, que aumentaron su valor de PBV (FPBV, *change in favor of the predicted breeding value*) al ser alimentadas con VO en

comparación con el valor de PBV obtenido con la dieta FO y a las familias 24 y 34 que disminuyeron su valor de PBV (APBV, *change against of the predicted breeding value*) al ser alimentadas con la dieta VO en comparación al PBV obtenido con la dieta FO. Con fines comparativos se utilizaron de 4 a 6 muestras de ejemplares de cada una de las familias mencionadas alimentadas tanto con dieta VO y FO, sumando un total de 20 muestras analizadas. El detalle de las variables de crecimiento medidas en un estudio previo (Villalobos, S., 2012), se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Variables de crecimiento de las familias seleccionadas medidas luego de 60 días de alimentación con dietas experimentales. Peso final promedio, ganancia de peso promedio y PBV calculado para cada familia.

Familia	PBV	Dieta FO		PBV	Dieta VO		PBV	Sig.
		Peso Final ± s.d	ΔPeso ± s.d		Peso Final ± s.d	ΔPeso ± s.d		
17	FPBV	225,7 ±44,9	77,6 ±26,3	-11,4	300,2 ±88,8	137,8 ±55,3	9,5	A
19	FPBV	278,4 ±68,0	121,2 ±42,5	1,2	305,0 ±79,8	147,7 ±53,9	20,9	B
24	APBV	227,7 ±41,1	108,2 ±44,9	3,4	257,0 ±68,3	104,6 ±51,5	-12,2	C
34	APBV	218,1 ±25,8	118,5 ±63,4	6,6	297,1 ±89,8	132,7 ±59,6	2,2	A

Las distintas letras indican promedios de Δpeso significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ΔPeso: ganancia de peso, s.d: desviación estándar, PBV: valor de cría.

### 2.3 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

Se extrajo el hígado de cada individuo de las familias seleccionadas y se realizó una extracción de RNA total con trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración y pureza de cada extracción por espectrofotometría en Epoch (Biotek). Las muestras fueron conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2  $\mu\text{g}$  de RNA total se trató con DNasa I, libre de RNasa (Thermos Scientific) y luego se realizó la retrotranscripción utilizando el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermos Scientific), utilizando oligo(dT) para la reacción. Finalmente, el cDNA de cada muestra fue diluido 1:10 con

agua DEPC y se midió su concentración mediante espectrofotometría en Epoch (Biotek). La visualización del cDNA se realizó en geles de agarosa al 1%, cargando 5  $\mu$ L de cada muestra, con tinción con bromuro de etidio y utilizando un transiluminador UV (Fotodyne Incorporated).

## 2.4 Selección de genes candidatos

Para la selección de genes se utilizó la información del análisis de RNAseq realizado previamente (Lam y cols., manuscrito en preparación) con las familias alimentadas con dieta VO, el cual reveló que las familias que cambian a favor el lugar en el ranking del valor de cría para ganancia de peso (FPBV), presentaron 105 genes diferencialmente expresados (DE) comparadas con las familias que su valor de cría cambió en contra del valor de cría (APBV) con la dieta VO. El análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) mostró que la categoría más representada correspondió a metabolismo de lípidos, específicamente biosíntesis de ácidos grasos, seguido de la respuesta inmune y la transducción de señales y el transporte molecular. A partir de estos resultados, se seleccionaron aquellos genes DE que tuviesen un rol esencial en el metabolismo completo de los ácidos grasos, desde su transporte, biosíntesis y oxidación. Además, se incluyeron genes que no presentaron expresión diferencial, pero han sido estudiados por otros autores y poseen un papel relevante en el metabolismo lipídico. Los genes *acaca*, *cpt1*, *fasn*,  *$\Delta 6$ fada*, *fabp3*, *cyp7a* y *ppary* presentaron expresión diferencial según el análisis de RNAseq, los primeros 5 están involucrados en el metabolismo de lípidos, mientras que *cyp7a1* y *ppary* participan en la vía de señalización de PPAR junto a *ppara*, *srebp* y *apoa4*, genes que no presentaron expresión diferencial. Por último, como genes de referencia se seleccionaron tres genes *housekeeping*:  *$\beta$ actina*, *ef1a $\alpha$*  y *ef1a $\beta$* , que han sido utilizados previamente en estudios de otros autores en *S. salar* (Olsvik y cols.

2005). El detalle de cada uno de los genes seleccionados se muestra en la sección Resultados.

## 2.5 Diseño de partidores

Para cada gen seleccionado y para los genes *housekeeping* se obtuvieron los partidores de la literatura o fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-BLAST de NCBI y el programa Amplifix 1.6.2 (Jullien, 2013) (Tabla 3). La especificidad de los partidores fue revisada utilizando el algoritmo de alineamiento de secuencias BLAST (Altschul y *cols.* 1990) y confirmado por PCR convencional con el cDNA. El diseño de partidores se realizó bajo los siguientes criterios, con el fin de obtener productos de PCR adecuados para su posterior análisis por qPCR:

1. Tamaño del amplificado entre 50 - 150 pb.
2. Temperatura óptima de unión de los partidores 60 °C
3. Tamaño de los partidores entre 17 – 25 pb.
4. No deben formar horquillas ni ser complementarios entre sí, de manera que no formen dímeros.
5. Porcentaje de GC superior a 40%.

## 2.6 PCR cuantitativo en tiempo real, RT-qPCR

Se realizó un *two-step* qPCR en el equipo Eco (Illumina), en el cual la reacción de retrotranscripción y amplificación se realizan por separado. El RT-qPCR cuantifica el DNA o RNA de una muestra mediante emisión fluorescente. Es una técnica con alto rango dinámico, gran sensibilidad, altamente específica y posee poco procesamiento post amplificación. Para la reacción de amplificación se utilizó el kit Maxima SYBR

**Tabla 3:** Partidores utilizados para la amplificación de los genes candidatos de interés.

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño partidor (pb)	Tm (°C)	GenBank Accession Nº	Referencia
<i>acaca</i>	GGCAGAGACATCTGCTAACG	20	56	XP_001919815.3	*
	ACAAGGTCAGCTGGCAGAAT	20	56		
<i>cyp7a</i>	AAGACCATGCTGGCTGAGAACTTG	24	60	BT059202.1	*
	GCCTTGCTCAGGTCATTGAAGGTT	24	60		
<i>cptf</i>	GTACCAGCCCCGATGCCTTCAT	22	60	AM230810	Norambuena 2015
	TCTCTGTGCGACCCTCTCGGAA	22	60		
<i>fabp3</i>	CACCGCTGACGACAGGAAA	19	56	AY509548	*
	TGCACGTGAACCATCTTACCA	21	56		
<i>fasn</i>	ACCGCCAAGCTCAGTGTGC	19	56	DW551395	Norambuena 2015
	CAGGCCCCAAAGGAGTAGC	19	56		
<i>Δ6fada</i>	CCCCAGACGTTTGTGTCAG	19	56	AY458652	Zheng 2005
	CCTGGATTGTTGCTTTGGAT	20	56		
<i>ppara</i>	TCCTGGTGGCCTACGGATC	19	56	DQ294237	Kleveland 2006
	CGTTGAATTCATGGCGAACT	21	56		
<i>ppary</i>	CATTGTCAGCCTGTCCAGAC	20	56	AJ416951	Kleveland 2006
	TTGCAGCCCTCACAGACATG	20	56		
<i>srebp</i>	GCCATGCGCAGGTTGTTCTTCA	23	60	TC148424	Morais 2011
	TCTGGCCAGGACGCATCTCACACT	24	60		
<i>apo4</i>	CCCAAACCAACACCCTCCT	20	56	BT047465	Morais 2012
	GGTTTATATTTCTACCCTGCAC	23	56		
<i>effaβ</i>	GATGGTAACGCCAACGGT	18	60	BG933853	*
	ACCGCCGATTTGTAGACAT	20	60		
<i>effaα</i>	ACGCCAATGGTGTGACTCTG	20	60	NM_001123629.1	*
	GCCCACAGGTACAGTTCCAA	20	60		
<i>bactin</i>	GAGCGCGTTACAGTTTCAC	20	56	NM_001123525.1	*
	GCCCATCTCCTGCTCAAAGT	20	56		

\*Partidores diseñados en este trabajo.

Green/ROX qPCR Master Mix (Thermos), con una modificación del volumen final de reacción de 12  $\mu$ L, con 2  $\mu$ L de cDNA, 0,3  $\mu$ M de cada partidor y 6  $\mu$ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. El perfil térmico utilizado para la amplificación fue: 95 °C por 10 min, seguido de 50 ciclos a 95 °C por 15 s y 56 °C o 60 °C dependiendo del gen (Tabla 3) por 1 min, para terminar, se incluyó una etapa de disociación a 95 °C por 15 s, 53 o 56 °C por 15 s y 95°C por 5 min para asegurar la amplificación de un único producto. Se verificó la especificidad de cada amplificación mediante análisis de curvas de *melting* y la ausencia de dímeros de partidor, mediante el software EcoStudy (Illumina). Todas las muestras fueron ensayadas para todos los genes en triplicado (3 réplicas biológicas) y se realizaron dos réplicas técnicas. En cada placa se incluyó un control negativo sin cDNA para confirmar la ausencia de contaminantes. Además, se incluyó una muestra extra en duplicado en cada placa para disminuir la varianza inter-ensayos. Los datos fueron analizados mediante el método comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Livak & Schmittgen, 2001), modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como la diferencia relativa entre una condición experimental y control (Wong & Medrano, 2005). Ct (*Cycle threshold*) representa el ciclo de amplificación al cual la emisión fluorescente sobrepasa el umbral e indica el número de copias de material inicial en la muestra.

Se realizó una curva estándar para cada gen con el mismo perfil térmico, graficando los valores de Ct versus el logaritmo en base 10 de 7 distintas diluciones de una solución con 10 muestras control (alimentadas con FO), con esto se obtuvo la eficiencia de cada partidor con la fórmula  $E=10^{(-1/\text{slope})}$  (Pfaffl, 2001), dato que se incluye en el modelo matemático utilizado para el análisis. Todos los partidores tuvieron una eficiencia de amplificación entre 83 a 100%.

Para la normalización y análisis de los datos de expresión de RT-qPCR de los genes de interés, se cargaron los datos de expresión relativa de los genes de referencia en el software geNorm (Vandermompele, de peter, 2002), el cual calcula los valores de estabilidad de expresión génica, y elige aquellos genes de referencia cuya expresión es constante entre tratamientos.

### **2.7 Análisis estadístico**

La significancia estadística de la expresión relativa de cada gen fue medida mediante el software REST (Pfaffl y cols., 2002) con una prueba de randomización de a pares al azar (10.000 randomizaciones), con una corrección de la eficiencia y un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con significancia de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 3.1 Selección de Genes Candidatos

Los criterios de selección de los genes candidatos a analizar en este estudio son que éstos se encontraran diferencialmente expresados según el análisis de RNAseq previo (Lam y cols., manuscrito en preparación) al alimentar a los individuos con dieta VO, que participen en el metabolismo y homeostasis de lípidos en *S.salar* y que hayan sido identificados en la secuencia genómica de esta especie (SalmonDB, Di Genova y cols., 2011). Sin embargo, también fueron incorporados genes que no se encontraron DE en el análisis de RNAseq, pero que han sido estudiados por otros autores y pueden tener un rol importante en la adaptación de *S. salar* a la dieta VO. Dicho esto, los genes candidatos seleccionados para cuantificar su expresión mediante RT-qPCR se detallan en la Tabla 4.

### 3.2 PCR cuantitativo en tiempo real, RT-qPCR.

Los genes de referencia para el análisis de expresión relativa, escogidos por su expresión constante entre tratamientos fueron  $\beta$ -actina y *ef1a $\beta$* . *ef1a $\alpha$*  no fue utilizado para la normalización de los resultados de expresión génica debido a que su expresión no fue uniforme entre los tratamientos (dieta FO y VO). Tanto los genes de referencia como los genes de estudio amplificaron fragmentos específicos y no formaron dímeros de partidor, evidenciado por las curvas de *melting* obtenidas, con un único *peak*. Además, se realizó una curva estándar para cada gen a partir de la cual se obtuvo la eficiencia de amplificación de éstos, datos que se muestran en la Tabla 5 (Página 32). A continuación, se muestra un ejemplo de curva de amplificación, curva de *melting* y curva estándar (Figura 4 A, B y C) obtenidas al amplificar el gen *ef1a $\beta$* .

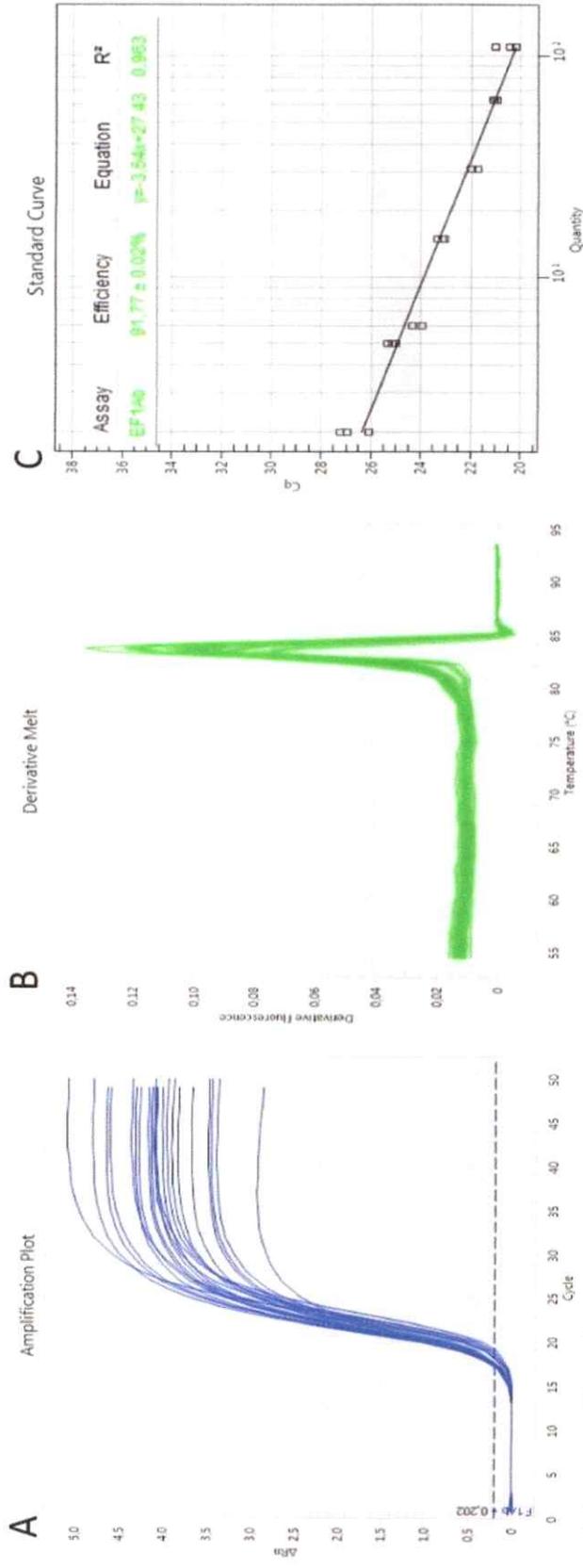
**Tabla 4:** Descripción de los genes candidatos seleccionados para su análisis por RT-qPCR.

Gen	GenBank ID	Producto génico y función fisiológica	Resultado (logFC)	RNAseq
<b>Transporte de ácidos grasos</b>				
<i>fabp3</i>	2170	<i>Fatty acid binding protein 3</i> , proteína de unión a ácidos grasos que participa en la captación, metabolismo y/o transporte de ácidos grasos de cadena larga. Responsables de la modulación del crecimiento y proliferación celular, relacionado a la señalización PPAR.	2,55 (F17 vs F24) -1,72 (F24 vs F34)	
<i>apoA4</i>	337	Apolipoproteína A-IV, componente fundamental de HDL y quilomicrones, encargados del transporte de ácidos grasos y colesterol desde la pared externa del intestino hacia el hígado. Posee un rol en la secreción de quilomicrones y VLDL y su catabolismo. Actúa como receptor de lípidos, cofactores enzimáticos, o ligandos para el consumo celular mediado por receptores.	No se encontró en RNAseq.	
<b>Síntesis de ácidos grasos</b>				
$\Delta 6$ <i>fada</i>	100136441	Delta 6 desaturasa, desaturasa de membrana que cataliza la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), introduce dobles enlaces en el extremo carboxil de los ácidos grasos. Su expresión está regulada por PPAR $\alpha$ y SREBP.	1,98 (F17 vs F19) 2,33 (F24 vs F24)	
<i>acaca</i>	31	Acetil-CoA carboxilasa $\alpha$ , cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, paso limitante en la síntesis de ácidos grasos. Se encuentra altamente expresada en tejidos lipogénicos donde desempeña 3 funciones principales: biotín carboxilasa, transportadora de biotín carboxil y carboxiltransferasa.	-1,15 (FPBV vs APBV) 1,32 (F177 vs F24) -1,95 (F24 vs F34)	
<i>fasn</i>	335859	Sintasa de ácidos grasos, proteína multifuncional con 7 actividades catalíticas y una proteína portadora del grupo acil. La principal función es catalizar la síntesis de ácidos grasos de cadena larga como palmitato a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH.	2,49 (F17 vs F24)	

<b>β-oxidación de ácidos grasos</b>	
<i>cpt1</i>	<p>100136416</p> <p>Carnitina palmitoiltransferasa I. El sistema CPT controla la transferencia de ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria. CPTI se localiza en la membrana externa de la mitocondria y es considerada una enzima limitante en el proceso de oxidación de ácidos grasos. Su actividad está bajo control alosterico de malonil-CoA, sustrato para la síntesis de ácidos grasos, cuya acumulación inhibe la actividad de CPTI. Además, la expresión de <i>cpt1</i> está bajo el control del receptor de hormona tiroidea y PPARα.</p>
<b>Síntesis de Colesterol</b>	
<i>cyp7a</i>	<p>1581</p> <p>Citocromo P450, familia 7, subfamilia A, monooxigenasa que cataliza varias reacciones involucradas en el metabolismo de drogas y síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. CYP7A es una proteína de membrana del retículo endoplásmico que cataliza el primer paso, paso limitante, en la vía del colesterol en el hígado para la síntesis de ácidos biliares, mecanismo para la remoción de colesterol del cuerpo.</p>
<i>srebp</i>	<p>793274</p> <p><i>Sterol regulatory element binding protein</i>, se requiere para la activación transcripcional de la vía de síntesis de colesterol y lípidos. A altos niveles de colesterol se inhibe la maduración (clivaje) de SREBP y a bajos niveles de colesterol, ésta molécula madura viaja al núcleo donde actúa como activador transcripcional de genes que tienen implicancia en la biosíntesis de colesterol y su captura (Desvergne y cols. 2006)</p>
<b>Receptores nucleares PPAR: reguladores del metabolismo de lípidos</b>	
<i>ppara</i>	<p><i>Peroxisome proliferator-activated receptor α</i>, regulador transcripcional mayor de la oxidación de ácidos grasos. Su mayor expresión se encuentra en tejido adiposo e hígado. Los genes blancos de PPARα constituyen un set de genes que participan en muchos, si no todos, los procesos del catabolismo de ácidos grasos, incluyendo el transporte de ácidos grasos, unión intracelular, activación mediante la formación de acil-CoA, catabolismo en peroxisomas y</p>
	<p>-2,01 (F17 vs F24)</p> <p>-3,38 (F17 vs F24) -3,16 (F17 vs F34) -3,16 (F19 vs F24) -1,75 (F19 vs F34) -1,89 (F24 vs F34)</p> <p>No se encontró en RNAseq.</p> <p>No se encontró en RNAseq.</p>

		mitocondrias via $\beta$ -oxidación (Desvergne y cols. 2006). La privación de alimento en los peces, provoca un aumento en la expresión y actividad de PPAR $\alpha$ , lo que estimula la $\beta$ -oxidación.	
<i>ppary</i>		<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> y regulador del almacenamiento de ácidos grasos y adipogénesis. PPARy se expresa principalmente en tejido adiposo y tiene como blanco al gen codificador de aP2 ( <i>adipocyte fatty acid binding protein</i> ), lipoproteína lipasa, acil-CoA sintasa y proteína transportadora de ácidos grasos. También se ha visto que PPARy posee un rol en la exportación de colesterol en macrófagos (Desvergne y cols. 2006).	-1,33 (F17 vs F24)

Los valores de RNAseq (+/-) corresponden a la sobre expresión o bajo expresión respectivamente de los transcritos en la última familia mencionada.



**Figura 4:** Ejemplo de curvas de amplificación (**A**) y *melt* (**B**) de las 20 muestras analizadas, obtenidas por RT-qPCR del gen *ef1aβ*; curva estándar (**C**) de 7 diluciones seriadas de 10 muestras elegidas al azar pertenecientes a las familias estudiadas, para RT-qPCR del gen *ef1aβ*. Curvas obtenidas por el software EcoStudy (Illumina).



### 3.3 Análisis de Expresión Relativa de los Genes de Interés

Para evaluar el efecto de la dieta en las 4 familias seleccionadas sobre la expresión relativa de los genes de interés, se realizaron tres análisis comparativos que incluyen:

- 3.3.1** Comparación de la expresión génica de todos los individuos analizados alimentados con dieta VO versus todos los individuos analizados alimentados con dieta FO.

**Tabla 5:** Valores promedio de amplificación Ct obtenidos para cada gen en la comparación de todos los individuos alimentados con dieta VO (n=10) versus todos los individuos alimentados con dieta FO (n=10).

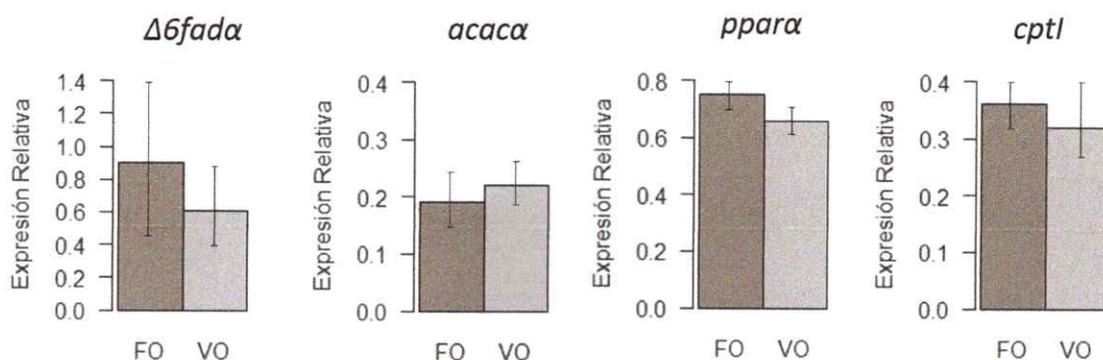
Gen	E (%)	Dieta FO	Dieta VO	Expresión (logFC)	p-value
		Ct promedio $\pm$ sd	Ct promedio $\pm$ sd		
<i>ppary</i>	83	25,7 $\pm$ 1,4	25,9 $\pm$ 1,9	0,98	0,594
<i>ppara</i>	81	26,7 $\pm$ 1,3	25,8 $\pm$ 1,5	0,98	0,016*
<i>apoa4</i>	97	19,5 $\pm$ 2,9	16,5 $\pm$ 1,5	1,13	0,015*
$\Delta 6fad\alpha$	100	20,6 $\pm$ 1,0	20,8 $\pm$ 3,1	0,68	0,041*
<i>fabp3</i>	100	16,0 $\pm$ 1,0	22,2 $\pm$ 2,0	0,61	0,016*
<i>fasn</i>	100	26,9 $\pm$ 1,5	24,8 $\pm$ 3,3	1,35	0,057
<i>cyp7a</i>	100	25,1 $\pm$ 2,4	26,5 $\pm$ 2,3	0,93	0,047*
<i>cpt1</i>	97	26,0 $\pm$ 1,6	26,5 $\pm$ 1,8	0,89	0,016*
<i>srebp</i>	100	26,1 $\pm$ 1,1	26,5 $\pm$ 1,4	1,01	0,323
<i>acaca</i>	100	32,5 $\pm$ 2,7	30,7 $\pm$ 1,3	1,17	0,000*

E=eficiencia, Ct=Cycle threshold, sd=desviación estándar, logFC=logaritmo fold change, \*representa diferencias significativas entre promedios según test de ANOVA  $p < 0,05$ .

Al comparar la expresión diferencial de los individuos alimentados con la dieta VO *versus* los individuos alimentados con la dieta FO, se encontraron 7 de los 10 genes estudiados con expresión diferencial estadísticamente significativa (Tabla 5).

Con respecto a la biosíntesis de ácidos grasos, el transcrito del gen  $\Delta 6fad\alpha$ , a diferencia de otros estudios (Xue y cols. 2015), resultó sub-expresado en la dieta VO en comparación a la dieta FO (Figura 5), con un logFC de 0,68. El transcrito del gen *acaca*

aumentó su expresión 1,17 veces en los individuos alimentados con la dieta VO, indicando una mayor conversión de ácidos grasos a DHA.



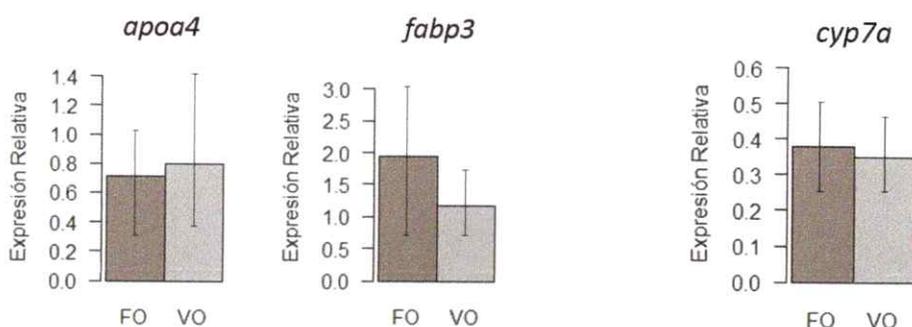
**Figura 5:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada categoría.

**Figura 6:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada

Los genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos resultaron bajo expresados en los individuos alimentados con la dieta VO, obteniendo valores de logFC de 0,89 y 0,98 para los genes *cptl* y *ppara*, respectivamente (Tabla 5, Figura 6). Estos resultados indican que la dieta afecta el metabolismo de lípidos de *Salmo salar*, disminuyendo la  $\beta$ -oxidación, en conjunto en peroxisomas y mitocondrias.

En cuanto al transporte de ácidos grasos, el gen *apoa4* resultó sobre-expresado en los individuos alimentados con la dieta VO, mientras que el gen *fabp3* disminuyó su expresión en la misma dieta, con un logFC de 0,61 (Tabla 5, Figura 7).

En relación al metabolismo de colesterol, el único gen que resultó diferencialmente expresado, disminuyendo su expresión en esta comparación es el gen *cyp7a* (Figura 8), cuya función es utilizar el colesterol disponible para transformarlo en ácidos biliares.



**Figura 7:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al transporte de ácidos grasos al comparar todos los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada categoría.

**Figura 8:** Patrón de expresión relativa del gen *cyp7a*, involucrado en el metabolismo de colesterol, al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada categoría.

### 3.3.2 Comparación de la expresión génica de las familias FPBV (F17 y F19) alimentadas con la dieta VO (n=6) versus individuos de las mismas familias alimentadas con la dieta FO (n=6).

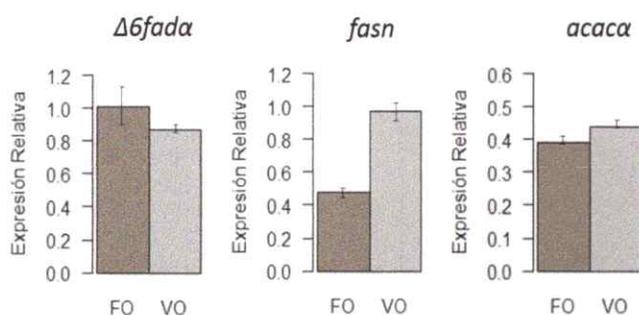
Al comparar la expresión diferencial de los individuos de las familias 17 y 19 (FPBV) alimentados con la dieta VO *versus* ejemplares de las mismas familias, pero alimentados con la dieta FO, se observó que la dieta VO afecta la expresión de distintos genes en las familias FPBV (Tabla 6 y 7). La familia 17 presentó una disminución significativa en la expresión del gen  $\Delta 6fad\alpha$  (Figura 9), mientras que en la familia 19 (Figura 13, página 36) se observó sobre-expresado, sugiriendo una respuesta genotipo-específica a la dieta. El resto de los transcritos relacionados a la síntesis de ácidos grasos en la familia 17, como el del gen *fasn* resultó sobre expresado en los individuos alimentados con la dieta VO, con un logFC de 2,02, mientras que el gen *acac $\alpha$*  aumentó su expresión en éstos 1,12 veces, ambos favoreciendo la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Figura 13).

**Tabla 6:** Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en los individuos de la familia 17 alimentados con dieta control FO (n=3) y dieta VO(n=3).

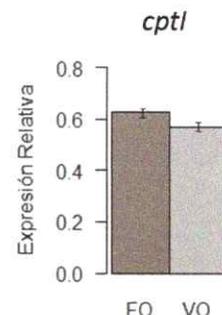
Gen	Dieta FO	Dieta VO	Expresión (logFC)	p-value
	Ct promedio $\pm$ sd	Ct promedio $\pm$ sd		
<i>ppary</i>	24,5 $\pm$ 0,7	26,2 $\pm$ 0,6	1,31	0,107
<i>ppara</i>	24,6 $\pm$ 0,4	27,7 $\pm$ 1,0	0,94	0,330
<i>apoa4</i>	18,3 $\pm$ 1,8	18,2 $\pm$ 1,2	1,15	0,094
$\Delta 6fada$	19,7 $\pm$ 0,9	22,9 $\pm$ 0,4	0,86	0,000*
<i>fabp3</i>	19,6 $\pm$ 0,1	21,4 $\pm$ 0,1	1,19	0,001*
<i>fasn</i>	24,4 $\pm$ 0,4	19,8 $\pm$ 0,6	2,02	0,017*
<i>cyp7a</i>	23,2 $\pm$ 0,3	26,8 $\pm$ 3,0	1,04	0,015*
<i>cptl</i>	24,7 $\pm$ 0,4	29,8 $\pm$ 0,9	0,89	0,000*
<i>srebp</i>	25,4 $\pm$ 0,9	25,6 $\pm$ 1,1	1,10	0,001*
<i>acaca</i>	30,4 $\pm$ 3,7	31,2 $\pm$ 2,1	1,12	0,010*

E=eficiencia, Ct=Cycle threshold, sd=desviación estándar, logFC=logaritmo fold change,

\*representa diferencias significativas entre promedios según test de ANOVA  $p < 0,05$



**Figura 9:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos en la familia 17 al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=3 en cada categoría.

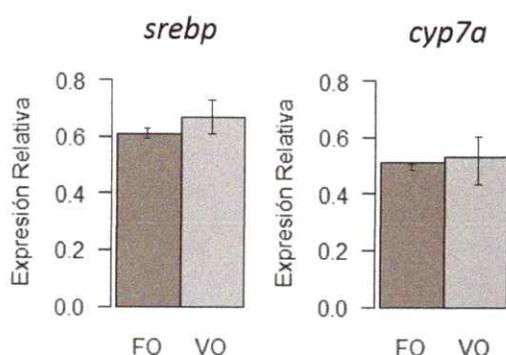


**Figura 10:** Patrón de expresión relativa del gen *cptl* involucrado en la oxidación de ácidos grasos en la familia 17 al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=3 en cada categoría.

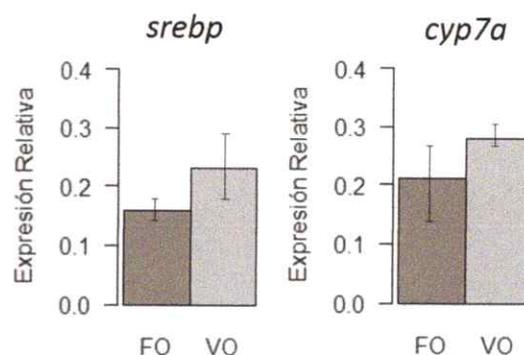
La baja expresión del gen *cptl*, involucrado en la activación de ácidos grasos para su oxidación en mitocondrias, sugiere una baja actividad oxidativa en este organelo en la familia 17 (Figura 10).

En ambas familias, los genes que participan en la biosíntesis de colesterol (*srebp*, *cyp7a*) aumentan su expresión con la dieta VO (Figura 11 y 12). *srebp* presentó cambios en su

expresión de 1,10 y 1,45 para las familias 17 y 19 respectivamente (Tabla 6 y 7), mientras que *cyp7a* obtuvo un logFC de 1,29 en la familia 19 (Tabla 7)

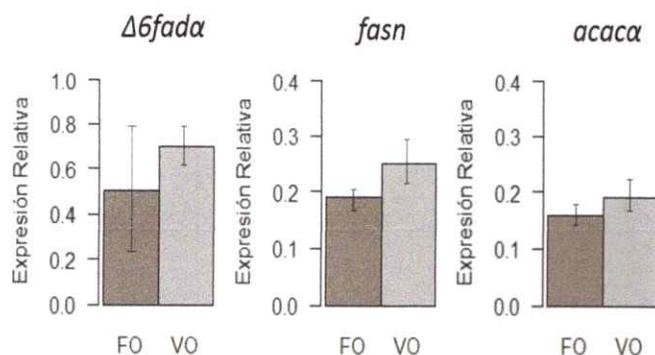


**Figura 11:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al metabolismo de colesterol, de la familia 17 al comparar individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=3 en cada categoría.



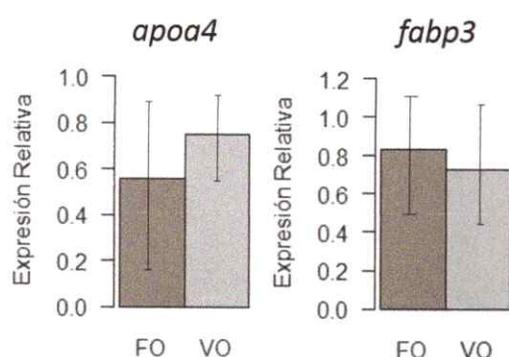
**Figura 12:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al metabolismo de colesterol, de la familia 19 al comparar individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=3 en cada categoría.

En la familia 19 se encontraron más genes diferencialmente expresados que en la familia 17 en respuesta a la dieta VO. Todos los genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos de cadena larga en esta familia se vieron sobre-expresados con diferencias estadísticamente significativas,  $\Delta 6fada\alpha$  (logFC 1,41), *fasn* (logFC 1,29) y *acaca* (logFC 1,24) (Tabla 7, Figura 13). En esta familia también se vieron afectados por la dieta genes asociados al transporte de ácidos grasos (Figura 14), el transcrito del gen *apoa4* resultó

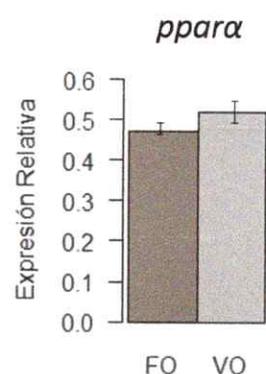


**Figura 13:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=3 en cada categoría.

sobre-expresado con un logFC de 1,34 y *fabp3* disminuyó su expresión 0,88 veces (Figura 14). En relación a la oxidación de ácidos grasos, ésta sólo se vio afectada en peroxisomas, donde el gen *pparα* se encuentra sobre expresado (Figura 15).



**Figura 14:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados al transporte de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada categoría.



**Figura 15:** Patrón de expresión relativa del gen *ppara*, involucrado en la oxidación de ácidos grasos en la familia 19 al comparar los individuos alimentados con dieta VO vs FO. Las barras representan el error estándar de n=10 en cada categoría.

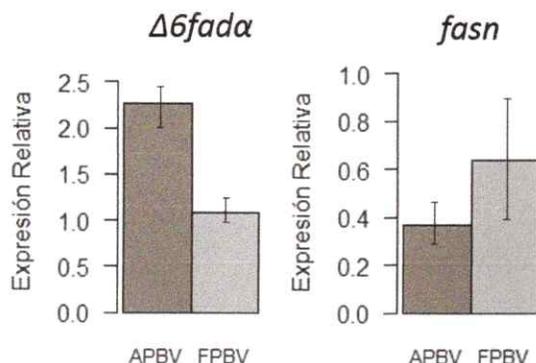
**Tabla 7:** Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en los individuos de la familia 19 alimentados con dieta control FO (n=3) y dieta VO (n=3).

Gen	Dieta		Expresión (logFC)	p-value
	FO	VO		
<i>ppary</i>	Ct promedio ± sd	Ct promedio ± sd		
	25,6 ± 0,9	26,2 ± 0,4	1,00	0,225
<i>ppara</i>	27,5 ± 0,6	25,7 ± 0,5	1,11	0,042*
<i>apoa4</i>	20,8 ± 3,6	17,2 ± 0,8	1,34	0,036*
<i>Δ6fadα</i>	21,0 ± 0,8	21,7 ± 2,3	1,41	0,032*
<i>fabp3</i>	20,2 ± 0,4	21,4 ± 1,2	0,88	0,002*
<i>fasn</i>	28,3 ± 1,0	25,9 ± 0,8	1,29	0,001*
<i>cyp7a</i>	26,8 ± 1,9	24,8 ± 0,9	1,29	0,039*
<i>cpt1</i>	26,2 ± 1,4	26,8 ± 1,2	1,10	0,641
<i>srebp</i>	29,3 ± 1,2	25,9 ± 0,8	1,45	0,001*
<i>acacα</i>	33,8 ± 1,6	30,2 ± 0,3	1,24	0,003*

E=eficiencia, Ct=crossing point, SD=desviación estándar, logFC=logaritmo fold change, \*representa diferencias significativas entre promedios según test de ANOVA p<0,05

### 3.3.3 Comparación de la expresión génica entre las familias FPBV (n=6) versus las familias APBV (n=4) alimentadas con dieta VO.

Al comparar la expresión diferencial de los ejemplares de las familias 17 y 19 (FPBV) versus los ejemplares de las familias 24 y 34 (APBV) alimentados con la dieta VO, se puede observar que las familias FPBV y APBV responden de forma diferente a la inclusión de VO en la dieta. Los genes *ppara* (FC: 0,91), *cpt1* (FC: 0,85), *apoa4* (FC: 1,93) y  $\Delta 6fad$  (FC: 0,48) disminuyen su expresión en las familias FPBV en comparación con las familias APBV (Tabla 8, página 40), sugiriendo una baja actividad de biosíntesis de ácidos grasos (Figura 16),  $\beta$ -oxidativa (Figura 19) y de transporte de ácidos grasos (Figura 18).

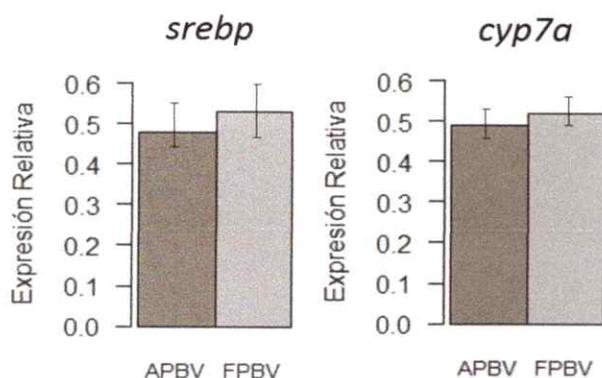


**Figura 16:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos al comparar las familias FPBV vs APBV alimentadas con dieta VO. Las barras representan el error estándar para n=4 (APBV) y n=6 (FPBV).

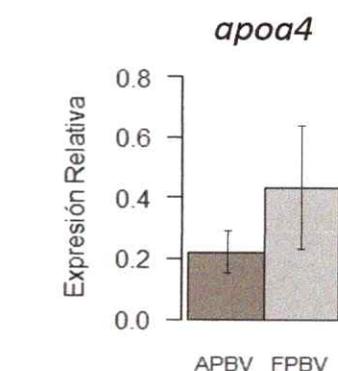
Por otro lado, la sobre-expresión de *cyp7a* y *srepb* en las familias FPBV en comparación a las familias APBV, sugiere una mayor actividad de biosíntesis y metabolismo de colesterol en respuesta a la dieta VO en dichas familias (Figura 17).

En cuanto al transporte intra y extra celular de lípidos, solo se obtuvo una sobre-expresión del transcrito del gen *apoa4* en las familias FPBV, indicando que existiría un eficiente transporte de ácidos grasos y colesterol, absorbidos desde la dieta, desde la membrana externa del intestino hacia el lumen del hígado (Figura 18).

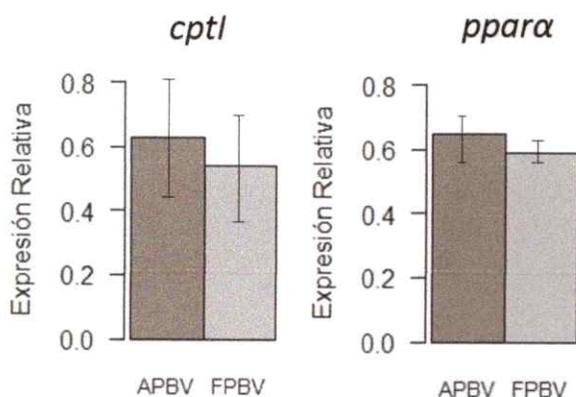
En las familias APBV se encuentran sobre-expresados genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos (*ppar $\alpha$*  y *cpt1*) (Figura 19). La sobre-expresión de *ppar $\alpha$*  también influye en la abundante expresión de  $\Delta 6fad$ , sugiriendo una alta conversión de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, abundantes en la dieta VO, a ácidos grasos de cadena larga.



**Figura 17:** Patrones de expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de colesterol al comparar las familias FPBV vs APBV alimentadas con dieta VO. Las barras representan el error estándar para n=4 (APBV) y n=6 (FPBV).



**Figura 18:** Patrón de expresión relativa del gen *apoa4*, involucrado en el transporte de ácidos grasos, al comparar las familias FPBV vs APBV alimentadas con dieta VO. Las barras representan el error estándar para n=4 (APBV) y n=6 (FPBV).



**Figura 19:** Patrones de expresión relativa de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos al comparar las familias FPBV vs APBV alimentadas con dieta VO. Las barras representan el error estándar para n=4 (APBV) y n=6 (FPBV).

**Tabla 8:** Valores promedio de amplificación (Ct), obtenidos para cada gen en las familias APBV y FPBV alimentadas con dieta VO.

Gen	Dieta	Familia APBV	Familia FPBV	Expresión (logFC)	p-value
		Ct promedio $\pm$ sd	Ct promedio $\pm$ sd		
<i>ppary</i>	VO	25,9 $\pm$ 2,1	26,2 $\pm$ 0,3	1,01	0,432
<i>ppara</i>	VO	24,5 $\pm$ 0,8	27,2 $\pm$ 1,6	0,91	0,042*
<i>apoa4</i>	VO	15,4 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 1,6	1,93	0,002*
$\Delta 6fad\alpha$	VO	17,3 $\pm$ 1,0	23,7 $\pm$ 1,4	0,48	0,000*
<i>fabp3</i>	VO	22,4 $\pm$ 2,9	22,0 $\pm$ 1,2	1,15	0,059
<i>fasn</i>	VO	24,4 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 2,1	1,70	0,018*
<i>cyp7a</i>	VO	27,4 $\pm$ 2,3	24,6 $\pm$ 1,2	1,07	0,010*
<i>cptl</i>	VO	24,5 $\pm$ 1,2	28,2 $\pm$ 2,3	0,85	0,041*
<i>srebp</i>	VO	27,5 $\pm$ 1,5	25,8 $\pm$ 1,0	1,09	0,038*
<i>acaca</i>	VO	29,7 $\pm$ 1,3	30,9 $\pm$ 1,8	0,98	0,274

E=eficiencia, Ct=Cycle threshold, sd=desviación estándar, logFC=logaritmo fold change, \*representa diferencias significativas entre promedios según test de ANOVA  $p < 0,05$

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue analizar el perfil de expresión génica en el hígado de familias de *S. salar* alimentadas por un periodo de 60 días con una dieta alta en aceite vegetal de semillas de raps en reemplazo del aceite de pescado. Se estudió el hígado ya que es el principal órgano involucrado en la utilización de nutrientes y es el centro del metabolismo intermediario en animales, cumple un rol importante en la absorción nutricional a partir de la dieta, y tiene funciones particulares en la distribución de lípidos de la dieta, síntesis de lípidos *de novo* y participa en las vías de detoxificación y excreción (Panserat y cols. 2009).

Se utilizó RT-qPCR para cuantificar la expresión de los genes seleccionados desde las vías del metabolismo de lípidos afectadas por la inclusión de aceite vegetal de semillas de raps en la dieta de *S. salar*, según análisis de RNAseq previo a este estudio (Lam y cols., manuscrito en preparación). El uso de herramientas moleculares y genómicas se ha vuelto muy importante para detectar cambios fisiológicos y mecanismos bioquímicos imposibles de detectar a nivel macroscópico. De las tecnologías genómicas disponibles en la actualidad, RT-qPCR es considerada una técnica de alta sensibilidad, especificidad y cuantificación reproducible de ácidos nucleicos, la que permite la detección y cuantificación de bajas concentraciones de mRNA y así elucidar cambios muy pequeños en la expresión génica (Pfaffl y cols. 2002). Sin embargo, una variedad de parámetros técnicos como calidad de RNA y cDNA, especificidad del partidador, eficiencia de reacción y los genes utilizados para normalización condicionan en gran medida la calidad de los resultados de RT-qPCR. Esta herramienta permite aumentar el conocimiento de cómo



la nutrición influye en los procesos metabólicos y el control homeostático de los lípidos debido al cambio de dieta en familias de salmón del Atlántico.

Debido a la disminución de las capturas de peces silvestres destinados para elaborar aceite y harina de pescado y el aumento de los precios de estas materias primas, es que muchas de las investigaciones de la industria acuícola apuntan a encontrar nuevas fuentes alimenticias con alta disponibilidad y que no comprometan la salud de los peces y la calidad de la carne en salmónidos y otras especies de cultivo. Es así que, varios autores han estudiado la respuesta de los peces al reemplazo de FO por VO en la dieta, como aceite de semillas de raps (Bell y *co/s.* 2001; Jordal y *co/s.* 2005), de linaza (Bell y *co/s.* 2001; Rosenlund y *co/s.* 2001), de palma, girasol (Torstensen y *co/s.* 2000), camelina (Xue y *co/s.* 2015), entre otras. Estos estudios han evaluado los factores de crecimiento, análisis de expresión génica y composición de ácidos grasos en distintos tejidos. Han demostrado que es posible reemplazar FO por VO, ya sea una mezcla de aceites de distintos orígenes o de uno solo, sin afectar el crecimiento o la eficiencia de alimentación en los peces. Similares resultados se encontraron en este estudio, donde los peces alimentados con VO obtuvieron incluso una mayor ganancia de peso comparado con los peces alimentados con FO.

Los aceites vegetales no contienen ácidos grasos del tipo omega 3 con más de 18 carbonos y más de tres dobles enlaces, éstos, contienen altos niveles de ácidos grasos saturados, MUFA y ácidos grasos del tipo omega 6 (Torstensen y *co/s.* 2000). En este contexto, el aceite de semillas de raps se presenta como una buena alternativa sustentable de reemplazo del aceite de pescado ya que posee niveles moderados de 18:2(n-6) y 18:3(n-3), a una razón de 2:1 respectivamente, y abundante 18:1(n-9) (Bell y

*cols.* 2001), y ha sido utilizada con éxito en varios estudios previos (Bell y *cols.* 2001; Bell y *cols.* 2003; Torstensen y *cols.* 2004). Posee una alta disponibilidad, siendo el tercer vegetal con mayor producción de aceite en el mundo, luego del aceite de soya y palma (FAO, 2015). Hay poca información disponible sobre la influencia de los ácidos grasos de origen vegetal sobre la absorción, el transporte y la utilización de ácidos grasos en salmón del Atlántico. Se ha reportado que la digestibilidad de ácidos grasos saturados y MUFA en peces, es en general menor comparado con la digestibilidad de PUFA, ya que la absorción de ácidos grasos aumenta con el aumento en la saturación y en el largo de éstos (Torstensen y *cols.* 2000).

El análisis general de los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 9), indicaría que el proceso de síntesis de ácidos grasos de cadena larga estaría involucrado en la respuesta a la inclusión de VO en la dieta, dado el aumento en los niveles de transcrito de los genes involucrados en este proceso. Esto se debería principalmente a la carencia parcial de este tipo de ácidos grasos en la dieta VO, por lo que aumentaría la síntesis de PUFA a partir de los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos predominantes en la dieta VO. Estos resultados son positivos para considerar el reemplazo de FO por VO en la dieta de los peces de cultivo, ya que los peces compensarían la falta de PUFA en la dieta mediante el aumento de la síntesis de éstos a partir de los sustratos disponibles. La habilidad de conversión de ácidos grasos de 18:3(n-3) y 18:2(n-6) predominantes en la dieta VO, a sus productos de cadena larga 20:5(n-3), 22:6(n-3) y 20:4(n-6), ha sido evaluada y establecida con éxito en salmón del Atlántico, mediante marcaje de ácidos grasos con  $^{14}\text{C}$  (Bell y *cols.* 2001). Además, los ácidos grasos del tipo (n-6) y (n-3) poseen una habilidad única de suprimir la transcripción de genes hepáticos que codifican enzimas

lipogénicas y glicolíticas (Clarke y cols. 1997), por lo que la baja concentración de este tipo de ácidos grasos en la dieta VO reduciría esta supresión, lo que se traduce en un aumento en la expresión de genes como  $\Delta 6fad$ , *fasn* y *acaca* que participan en la vía de síntesis de ácidos grasos de cadena larga, en comparación a los individuos alimentados con la dieta control FO. Estos efectos de supresión de la transcripción por parte de los ácidos grasos (n-6) y (n-3) pueden ser eliminados en 3 horas al quitar estos PUFA de la dieta (Jump y cols. 1994), esta respuesta transcripcional tan rápida sugiere que los ácidos grasos modulan directamente eventos nucleares en vez de cambios en las vías de señalización por alteraciones en la composición de las membranas celulares (Clarke y cols. 1997).

**Tabla 9:** Resumen de resultados de los cambios de expresión relativa en respuesta a la dieta VO con respecto a la dieta FO.

Ruta	gen	VO vs FO	Familia 17	Familia 19
Transporte de ácidos grasos	<i>fabp3</i>	0,61	1,19	0,88
	<i>apoa4</i>	1,13	1,15	1,34
Síntesis de ácidos grasos	<i>6fad</i>	0,68	0,86	1,41
	<i>fasn</i>	1,35	2,02	1,29
	<i>acac</i>	1,17	1,12	1,24
Oxidación de ácidos grasos	<i>pparj</i>	0,98	1,31	1
	<i>ppara</i>	0,98	0,94	1,11
	<i>cpt1</i>	0,89	0,89	1,1
Metabolismo de Colesterol	<i>srebp</i>	1,01	1,1	1,45
	<i>cyp7a</i>	0,93	1,04	1,29

Valores corresponden al logFC, color rojo representa sobre-expresión, color verde representa sub-expresión.

Las actividades de desaturación y elongación de 18:3(n-3) en hepatocitos aumentarían cuando salmón del Atlántico es alimentado con distintos grados de sustitución de FO por

aceite de semillas de raps o una mezcla 1:1 de aceite de semillas de raps y linaza, en comparación a hepatocitos de individuos alimentados con aceite de pescado (Bell y cols. 2001; Tocher y cols. 2001). La expresión de  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas y elongasas también se ve aumentada de manera gradual al aumentar la cantidad de aceite vegetal (Zheng y cols. 2004). En este estudio la familia que respondió al aumento en la expresión de desaturasas fue la 19, con una sobre expresión del gen  $\Delta 6fada\alpha$ .

En la familia 19 el número de genes diferencialmente expresados es mayor, indicando un mayor efecto de la dieta sobre la biosíntesis de ácidos grasos, donde los tres genes seleccionados ( $\Delta 6fada\alpha$ , *fasn* y *acaca*) involucrados en este proceso se vieron significativamente sobre expresados, lo que corrobora tanto lo encontrado en el análisis de RNAseq (Lam y cols., manuscrito en preparación) como lo encontrado por otros estudios (Xue y cols. 2015). Estudios que han medido tanto la expresión génica como la actividad enzimática de genes relacionados a la vía de biosíntesis de HUFA, han demostrado que los niveles de HUFA en los tejidos de salmón se ven reducidos al reemplazar FO por VO (Leaver y cols. 2008), y los niveles de mRNA de desaturasas, como  $\Delta 6fada\alpha$  se ven incrementados junto con la síntesis de HUFA. La sobre expresión del gen  $\Delta 6fada\alpha$  en la familia 19 con la dieta VO se puede explicar por la baja concentración de n-3 LC-PUFA, conocidos inhibidores de  $\Delta 6$  desaturasa en particular (Seilliez y cols. 2001), lo que disminuye dicha inhibición permitiendo la aumentada expresión de este gen.

Por otro lado, al comparar los ejemplares alimentados con dieta VO vs FO (Tabla 9), y entre familias FPBV vs APBV (Tabla 10), se observó una disminución en la expresión de  $\Delta 6fada\alpha$ , lo cual podría deberse a que la afinidad de las enzimas de desaturación y

elongación es mayor por los ácidos grasos de la serie n-3 (Stubhaug y cols. 2005), escasos en la dieta VO. Sin embargo, el gen *fasn* se encuentra sobre expresado en todas las comparaciones (excepto familia 17), junto con el gen *acaca*, el cual participa en un paso limitante de la síntesis de ácidos grasos, lo que significa que hay una eficiente conversión de los ácidos grasos disponibles en la dieta VO a ácidos grasos de cadena larga (>22C), sugiriendo que la síntesis de DHA estaría involucrada en la respuesta a la dieta. La baja expresión de los genes  $\Delta 6fad$  y *acaca* en la familia 17, ambos relacionados a la síntesis de ácidos grasos, podría deberse a una pobre adaptación metabólica de esta familia a los nuevos ingredientes vegetales en la dieta.

**Tabla 10:** Resumen de resultados de los cambios de expresión relativa en respuesta a la dieta VO entre las familias con distinto genotipo (FPBV vs APBV).

Ruta	gen	FPBV vs APBV
Transporte de ácidos grasos	<i>fabp3</i>	1,15
	<i>apoa4</i>	1,93
Síntesis de ácidos grasos	<i>6fad</i>	0,48
	<i>fasn</i>	1,7
	<i>acac</i>	0,98
Oxidación de ácidos grasos	<i>pparj</i>	1,01
	<i>ppara</i>	0,91
	<i>cpt1</i>	0,85
Metabolismo de Colesterol	<i>srebp</i>	1,09
	<i>cyp7a</i>	1,07

Valores corresponden al logFC, color rojo representa sobre-expresión, color verde representa sub-expresión.

El análisis de expresión mediante RT-qPCR indica que el proceso de transporte de ácidos grasos podría estar implicado en la mejor respuesta en crecimiento de las familias FPBV en comparación a las familias APBV, ya que los genes *fabp3* y *apoa4*, que

participan en el transporte de ácidos grasos intra y extra celular, respectivamente, mostraron sobre-expresión en las familias FPBV alimentadas con dieta VO (Tabla 10) al igual que lo observado en el estudio de RNAseq previo (Lam y cols., manuscrito en preparación).

Otro de los mecanismos del metabolismo de lípidos más afectado por la dieta VO en este y otros estudios en *S. salar*, es la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La expresión de transcritos génicos relacionados a la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas y mitocondrias se ve reducida cuando se compara a los ejemplares alimentados con dieta VO vs FO, lo cual está relacionado con la compensación de la falta de ácidos grasos de cadena larga en la dieta VO, mediante la evasión de las vías de oxidación de los ácidos grasos de cadena larga recién sintetizados y la re-dirección de estos a la síntesis de DHA, evidenciado por la constante sobre expresión del transcrito de la enzima ACAC $\alpha$  en todas las comparaciones.

En las familias FPBV también se puede inferir una menor respuesta oxidativa tanto en mitocondrias como peroxisomas, evidenciado por la sub-expresión de los genes *cptI* y *ppara* (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Xue y cols. (2015), donde mediante análisis de expresión del transcriptoma hepático de *S. salar* alimentados con una dieta con 100% de reemplazo de FO por aceite de *Camelina sativa*, observaron la sub expresión del gen *cptI* cuya expresión se sugiere, es modulada por la cantidad de LC-PUFA presentes en la dieta. Un patrón de expresión similar de *cptI* fue reportado en trucha arcoíris, donde la alimentación de peces con una dieta alta en PUFA aumentó significativamente la expresión de *cptI* en músculo, hígado y tejido adiposo (Morash y

*cols.* 2009). En el análisis de RNAseq previo a este estudio también se encontró el gen *cpt1* bajo expresado al comparar la familia 17 (FPBV) con la 24 (APBV) (Tabla 4).

Algunos estudios han reportado un aumento de la actividad de  $\beta$ -oxidación en peces alimentados con dieta VO versus los alimentados con dieta FO (Stubhaug y *cols.* 2007; Stubhaug y *cols.* 2005). Sin embargo, en el presente estudio se observó una menor expresión del gen *cpt1* en los individuos alimentados con dieta VO en todas las comparaciones a excepción de la familia 19 (Tabla 9 y 10). CPTI activa y transporta ácidos grasos de cadena larga hacia la matriz mitocondrial, una etapa limitante en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, y su disminución en la expresión podría deberse a la baja concentración de ácidos grasos de cadena larga presentes en la dieta VO, por lo que se evita la oxidación de estos ácidos grasos recién sintetizados, ayudando a compensar dicho déficit mediante la conservación de nutrientes y energía, lo que llevaría al pez a aumentar la eficiencia de utilización de estos nutrientes. Además, la baja expresión de los genes relacionados a la  $\beta$ -oxidación está relacionada con la sobre-expresión del transcrito del gen *acaca*, encargado de la síntesis de ácidos grasos convirtiendo acil-CoA en malonil-CoA, siendo este último el principal inhibidor de la actividad de CPTI (Figura 2). Esto también corrobora los resultados del análisis de RNAseq, donde disminuyó la expresión de los genes relacionados a las vías de degradación de ácidos grasos.

Otras de las razones porque el gen *cpt1* se encuentra sub-expresado, está relacionada con que se ha reportado que los ácidos grasos altamente insaturados 20:5(n-3) y 22:6(n-3) inducen la  $\beta$ -oxidación en mitocondrias 2 a 4 veces más que 18:2(n-6) y 18:3(n-3) (Jump y *cols.* 1996), por lo que a pesar de que estos últimos se encuentran en mayor

concentración, los reducidos niveles de 20:5(n-3) y 22:6(n-3) en la dieta VO en comparación a la dieta FO, estarían incidiendo en la disminución en la expresión relativa del mRNA del gen *cptI*.

Se sabe que la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas se realiza principalmente en el hígado del salmón (Froyland y cols. 2000). En la familia 19 aumentó la expresión transcripcional de *PPAR $\alpha$*  (Tabla 9), principal regulador de  $\beta$ -oxidación en peroxisomas y mayor regulador del metabolismo de lípidos y homeostasis de energía. *PPAR $\alpha$*  une ácidos grasos, los que pueden servir como monitores de los niveles de ácidos grasos intracelulares y así, *PPAR $\alpha$*  opera en el genoma para controlar vías metabólicas específicas como biosíntesis, oxidación y transporte de ácidos grasos (Jump y cols. 1999), funciones que también se encuentran sobre expresadas en esta familia. Además, se ha reportado que los ácidos grasos 16:0 y 18:1(n-9) son sustratos preferidos para la  $\beta$ -oxidación en peroxisomas, razón por la cual se puede ver afectado el gen *ppara*.

Por otro lado, la sobre-expresión del transcrito del gen *ppara* coincide con la sobre-expresión relativa de genes de transporte (*apoa4*) y síntesis de ácidos grasos ( *$\Delta 6$ fada*, *fasn*, *acaca*), cuya expresión es modulada por el regulador transcripcional *PPAR $\alpha$* .

Existe la hipótesis de que la composición de ácidos grasos en la dieta que inducen la  $\beta$ -oxidación, aumentarían la utilización de proteína, aportando energía a través de la oxidación de lípidos, dejando las proteínas para crecimiento muscular (Torstensen y cols., 2000), por lo que la formulación de dietas con ácidos grasos específicos que promuevan el crecimiento y la buena calidad de los peces mediante la combinación de ingredientes tanto vegetales como animales se presentan como una buena alternativa

para mejorar la producción en peces de cultivo. Además, apoya a esta evidencia el mayor peso conseguido por los individuos alimentados con la dieta VO.

Otra de las vías que también estaría implicada en la repuesta a la dieta es la síntesis de colesterol y la conversión de éste a ácidos biliares. La dieta VO posee bajos niveles de colesterol (menores que la dieta FO) por lo que la biosíntesis de este lípido debe verse aumentada para mantener la integridad celular de los peces. El gen *srebp*, que se requiere para la activación transcripcional de la vía de biosíntesis de colesterol y HUFA (Horton y cols. 2003), en este estudio presentó sobre-expresión en los individuos alimentados con dieta VO en todas las comparaciones (Tabla 9 y 10). La actividad de *srebp* es controlada por los niveles celulares de colesterol por lo que la reducción de colesterol en las membranas celulares (a partir de la dieta) gatillarían el clivaje proteolítico del enlace de membrana de SREBP y éste sería traslocado al núcleo donde induciría la transcripción de genes asociados a las vías de síntesis de colesterol y HUFA. Se ha comprobado en mamíferos, que *srebp* está positivamente correlacionado e induce la expresión de las 12 enzimas implicadas en la vía de biosíntesis de colesterol (Sakakura y cols. 2001). Esto sugiere fuertemente que los individuos alimentados con dieta VO en este estudio, responden a los bajos niveles de colesterol en la dieta. Además, se ha reportado que los ácidos grasos saturados, predominantes en la dieta VO, aumentan los niveles de colesterol en el plasma (Grundy & Denke, 1990).

Otros estudios de expresión génica en salmones alimentados con dieta VO realizados por medio de microarreglos y RT-qPCR encontraron otros genes involucrados en la vía de biosíntesis de colesterol sobre expresados (tres enzimas: IPP, escualeno epoxidasa y latosterol oxidasa), y la regulación de otras vías, como la reducción en la síntesis de

ácidos biliares, también puede contribuir a la compensación de colesterol (Leaver y cols. 2008). En este estudio la expresión del transcrito de *cyp7a*, encargado de convertir el colesterol en ácidos biliares, se ve disminuida en los individuos alimentados con VO (comparación 1), ayudando a mantener los niveles de colesterol (Tabla 9). Cambios en el transporte de ácidos biliares, si hay, pueden tener consecuencias en la digestión de lípidos, absorción y transporte en el intestino, lo que puede explicar la acumulación de lípidos en enterocitos, evidenciado previamente en salmones alimentados con dieta VO (Caballero y cols. 2002).

Al comparar los patrones de expresión génica de las familias 19 y 17 (Tabla 9), cuyo valor de cría fue mayor al ser alimentadas con dieta VO, éstas tuvieron mejor respuesta en crecimiento con la dieta VO (comparación 2), la diferencia en la cantidad y la clase de genes que se observan diferencialmente expresados en estas familias, con el mismo fenotipo (FPBV), sugiere que existirían respuestas específicas de cada familia a la dieta, dependiendo de su genotipo. Morais y cols. (2009; 2011) mediante estudios de RT-qPCR en dos familias de *S. salar*, atribuyó este tipo de diferencias a que la actividad de las distintas vías biosintéticas podrían depender del genotipo del pez, obteniendo así familias con respuestas de distinta magnitud. Las principales diferencias entre las familias 17 y 19 están relacionadas a la  $\beta$ -oxidación y transporte de ácidos grasos, categorías que se encuentran sobre expresadas en la familia 19. Estos resultados indican que esta última familia posee una mayor respuesta a la dieta VO y podría incluso adaptarse mejor a esta, ya que es la única familia que presentó sobre expresión del gen  $\Delta 6fada$ , actor principal de la conversión de ácidos grasos de 18C a LC-PUFA. La familia 19 por lo demás presentó mayor ganancia de peso que el resto de las familias al ser

alimentadas con dieta VO, por lo que esta familia se presenta como una buena candidata para la búsqueda de marcadores moleculares que permitan seleccionar aquellas familias que mejor respondan a la dieta con ingredientes vegetales y que obtengan un mejorado desempeño en cuanto a crecimiento, factor de conversión del alimento, concentración de ácidos grasos de relevancia en la carne, etc., características que deberían ser medidas en estudios futuros.

Entre las familias FPBV y APBV se encontraron diferencias significativas en la expresión de 7 de los 10 genes analizados. Estas diferencias indican que existen familias mejor adaptadas o que poseen una mejor respuesta metabólica a la sustitución de FO por aceite vegetal de semillas de raps.  $\Delta 6fad\alpha$  posee la mayor diferencia en su patrón de expresión entre estas familias, siendo el doble en las familias APBV (Tabla 10), lo cual podría determinar aquellas familias mejor adaptadas al cambio de dieta, sin embargo, mayor conocimiento sobre la composición de ácidos grasos en distintos tejidos y/o estudios de expresión en intestino y músculo serían necesarios para dicha determinación.

A pesar de los cambios y las compensaciones nutricionales que provoca la dieta VO en *Salmo salar*, se ha propuesto que los peces crecidos con dietas con VO por la mayor parte de su ciclo de vida, sean alimentados, en una etapa final previa a la cosecha, con dietas basadas en FO como la mayor fuente de lípidos para nivelar la composición de ácidos grasos final en los tejidos y los niveles de ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega 3 como EPA y DHA, ideales para el consumo humano (Bell y cols. 2003; Glencross y cols. 2003). Bell y cols. (2003) demostró que los peces recuperan los niveles de ácidos grasos en el músculo en un 80% al ser alimentados por 20 semanas con FO

luego de ser alimentados con una dieta 100% VO por 50 semanas, restaurando los niveles de DHA y EPA a valores similares a los encontrados en individuos alimentados solo con FO.

El colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) son componentes funcionales críticos en las membranas celulares y son precursores importantes de lípidos bioactivos para la mantención de la homeostasis, señalización celular, respuesta inmune y respuesta inflamatoria (Simopoulos, 2008), y los efectos a largo plazo de la reducción de esos nutrientes esenciales en la salud y bienestar de los peces, incluyendo el salmón del Atlántico, son todavía desconocidos. Es por esto que cualquier sustitución de FO con VO debe realizarse de tal manera que asegure y mantenga la calidad de la carne, la salud y bienestar de los peces en cultivo que lo hace tan atractivo para el consumo humano. Además, que no signifique una baja en la producción, es decir, que se mantenga o mejore el crecimiento de los peces y así motivar el uso de ingredientes vegetales en las grandes empresas salmoneras.

Tanto este como otros estudios (Bell y *cols.*, 1998; Bell y *cols.*, 2001; Karalazos y *cols.*, 2007; Torstensen y *cols.*, 2004) han demostrado que es factible el reemplazo de FO en la dieta de salmónidos en cultivo por VO de semillas de raps sin afectar la tasa de crecimiento de los peces. Bell y *cols.* (2001), evaluaron además la tasa de conversión del alimento y lesiones histopatológicas en hígado, corazón, músculo y riñón, sin encontrar diferencias significativas en los peces alimentados con VO en relación al control. Tampoco se han observado diferencias significativas en la deposición de carotenoides en la carne de salmónidos alimentados con VO de semillas de raps (Bell y *cols.*, 1998), lo que sí se ha encontrado con otras dietas vegetales como aceite de soya

(Hardy y cols., 1987). Se ha medido tanto el contenido de proteínas como de lípidos en el músculo de *S. salar*, *Salverinus fontinalis* (Trucha de arroyo) y *Oncorhynchus tshawytscha* (Salmón Chinook) alimentados 100% con aceite de semillas de raps, encontrándose pequeñas diferencias con respecto a la dieta FO, sin embargo, esto no compromete la salud, el bienestar y la calidad de los peces (Bell y cols., 2001).

Este estudio contribuye a una mayor comprensión de las bases moleculares de la homeostasis de los ácidos grasos en *S. salar*, al utilizar dietas vegetales sustentables, efectivas y eficientes, siendo estos individuos capaces de sobrellevar y compensar las deficiencias nutricionales del aceite de semillas de raps. Sin embargo, se requiere un mayor análisis de la composición de ácidos grasos en la carne de los peces (EPA y DHA), medición del consumo y de la digestibilidad de los ácidos grasos presentes en la dieta, para corroborar la mantención de la calidad nutricional de los peces en cultivo y poder seleccionar aquellas familias con mayor deposición de ácidos grasos omega 3. Estos resultados indican que es posible identificar aquellas familias mejor adaptadas a formulaciones alternativas de la dieta de los salmónidos, y que sean apropiadas para futuros programas de selección génica. Además, los genes candidatos seleccionados podrían ser utilizados en nutrigenómica mediante la búsqueda de variantes alélicas que estén presentes en aquellos individuos que aumentaron la ganancia de peso al ser alimentados con la dieta VO, con el fin de desarrollar marcadores moleculares asociados al rasgo crecimiento, que permitan la selección de los peces que respondan mejor a la dieta según la expresión génica de las vías del metabolismo de lípidos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la inclusión de ingredientes vegetales como aceite de semillas de raps en la dieta de salmónidos provoca cambios en la expresión de genes relacionados al metabolismo de lípidos, lo que indicaría que existen mecanismos de acción a nivel fisiológico para compensar las bajas nutricionales de la dieta VO.

Considerando los genes candidatos estudiados, relacionados al metabolismo de lípidos, se concluye que las funciones fisiológicas, mecanismos o vías metabólicas más afectadas por la dieta VO son la biosíntesis de ácidos grasos, degradación de ácidos grasos, transporte de ácidos grasos y otros lípidos y biosíntesis de colesterol.

La respuesta transcripcional que resultó significativa a lo largo de las distintas comparaciones realizadas, es la sobre-expresión de genes relacionados a la biosíntesis y transporte de colesterol, probablemente en respuesta al déficit de este lípido en la dieta experimental.

La carencia de ácidos grasos de cadena larga en el aceite vegetal de la dieta VO podría explicar la sobre-expresión de genes relacionados a la síntesis de ácidos grasos, en especial la síntesis de DHA, evidenciado por la constante sobre-expresión del transcrito de *acaca*.

La diferencia en el patrón de expresión génica en el hígado entre familias con el mismo fenotipo (FPBV), indica una respuesta genotipo-específica a la dieta VO.

La diferencia en el patrón de expresión génica de los genes seleccionados en el hígado de familias con distinto fenotipo (FPBV versus APBV), sugiere que existen familias con diferentes habilidades de adaptación a los cambios en la dieta, lo que hace posible la selección de aquellas familias mejor adaptadas y que mejor aprovechen y metabolicen los nutrientes obteniendo iguales o mejores tasas de crecimiento que los individuos alimentados con dietas comerciales de origen animal, y que puedan ser incluidas en programas de mejoramiento genético.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410
- Babin, P.J. & Vernier, J.M. (1989). Plasma-lipoproteins in fish. *Journal of Lipid Research* 30(4), 467-489.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W. & Sargent, J.R. (1997). The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing Parr-Smolt transformation. *Lipids* 32(5), 515-525.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Webster, J.L., McGhee, F., Millar, R.M., Sargent, J.R. (1998). Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 19;46(1):119-127.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, 131, 1535–1543.
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., ... Sargent, J. R. (2002). Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, 132, 222–230.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Henderson, R. J., Dick, J. R., & Crampton, V. O. (2003). Altered fatty acid compositions in atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2793–2801.
- BioMar. (2012). Línea de productos y servicios, BioMar, Chile. Disponible en: <http://www.biomar.com/es-CL/BioMar-Chile/Species-and-products/Lineas-de-Productos>. [visita 15.12.2014]
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. and Izquierdo, M.S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 214: 253-271.
- Castañón, E. (2015). Lidia con la química (y la física). *Blog de Wordpress.com* disponible en: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/tag/lipidos/> [visita 22.08.16]

- Chinetti-Gbaguidi, G., Rigamonti, E., Helin, L., Mutka, a L., Lepore, M., Fruchart, J. C., Staels, B. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls cellular cholesterol trafficking in macrophages. *Journal of Lipid Research*, 46(12), 2717-2725.
- Clarke S.D., Turini M., Jump D. (1997). Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57(1): 65-69.
- Connor, W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1), 171S-175S.
- Desvergne B., Michalik L., Wahli W. (2006). Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews* 86: 465-514
- Deutsch, L., Gräslund, S., Folke, C., Troell, M., Huitric, M., Kautsky, N. and Level, L. (2007). Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change* 17: 238-249.
- FAO (2006). FAO Fisheries Circular No 1018. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0604e/a0604e00.pdf> [visita 20.03.2015]
- FAO (2015). Oilseeds and Oilseed Products. OECD-FAO Agricultural Outlook 2015. [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2015-8-en](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-8-en)
- Frøyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, O. & Berge, R.K. (1998). Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and Acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 33(9), 923-930.
- Frøyland, L., Lie, O. & Berge, R.K. (2000). Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* 6(2), 85-89.
- Fundación Chile. (2003). Cadenas Alimentarias: Ingredientes vegetales para la alimentación de salmones. *Fundación Chile (Ed)*. Santiago, Chile. 97p.
- Fundación Observatorio Español de Acuicultura. (2012). La nutrición y alimentación en piscicultura, publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Editorial Paraninfo pp 165-178.
- Gjedrem, T., & Baranski, M. (2009). Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. *Springer Science & Business Media*, 221p.
- Glencross BD, Tocher DR, Matthew CA, Bell JG. (2014) Interactions between dietary docosahezaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on

- performance and fatty acid retention in post-smolt Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry* 40;1213-27.
- Gondro, C. (2016) Introduction to breeding and genetics. School of rural and environmental science, University of New England, Australia. <http://jvanderw.une.edu.au/gene351.htm> [visita 18.08.16].
- Grundy S.M., & Denke M.A. (1990) Dietary Influences on Serum Lipids. *Journal of Lipid Research* 31, 1149-1172.
- Hardy, R.W., Scott, T.M., Harrell, L.W. (1987). Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture* 65:267-277.
- Hardy, R.W. and Barrows, F.T. (2002). Diets Formulation and Manufacture. pp.505-600. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W. (Ed). *Fish Nutrition. 3rd ed. Academic Press, California, EEUU.* 839p.
- Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41(5): 770-776.
- Heen, K., Monahan, R. L. y Utter, F. (1993). Salmon Aquaculture. *Halsted Press* (Ed). New York, EEUU. 278p.
- Henderson, R.J. & Tocher, D.R. (1987). The lipid-composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research* 26(4), 281-347.
- Henderson, R. J. (1996). Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*, 49(1), 5-22.
- Higgs, D.A. and Dong, F.M. 2000. Lipids and fatty acids. pp.476-496. In: Stickney R.R. (Ed). *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, UK. 1063p.
- Horton, J. D., Shah, N. a, Warrington, J. a, Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12027-12032.
- Hussain, M.M., Kedeas, M.H., Singh, K., Athar, H. & Jamali, N.Z. (2001). Signposts in the assembly of chylomicrons. *Frontiers in Bioscience* 6, 320-331.
- Jordal, A.-E. O., Torstensen, B. E., Tsoi, S., Tocher, D. R., Lall, S. P., & Douglas, S. E. (2005). Dietary Rapeseed Oil Affects the Expression of Genes Involved in Hepatic

- Lipid Metabolism in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Nutrition*, 135(10), 2355–2361.
- Jordal, A.E.O., Hordvik, I., Pelsers, M., Bemlohr, D.A. & Torstensen, B.E. (2006). FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology* 145(2), 147-158.
- Jordal, A. E. O., Lie, O., & Torstensen, B. E. (2007). Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 114–130.
- Jump D.B., Clarke S.D., Thelen A., Liimatta M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research* 35: 1076-1084.
- Jump D.B., Clarke S.D., Thelen A., Liimatta M., Ren B., Badin M. (1996) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Progress in Lipid Research* 35(3):227-41.
- Jump D.B., Thelen A., Ren B., Mater M. (1999) Multiple mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 60(5&6), 345-349.
- Kiessling, K.H. & Kiessling, A. (1993). Selective utilization of fatty-acids in rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71(2), 248-251.
- Kleveland E.J., Ruyter B., Vegusdal A., Sundvold H., Berge R.K., Gjoen T. (2006) Effects of 3-thia fatty acids on expression of some lipid related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology* 145:239-248.
- Lam, N., Araneda, C., Di Genova, A., Cortés, M.P., Ulloa, P., Córdova, V., Maass, A., Iturra, P. (manuscrito en preparación). Liver transcriptome profile in Atlantic salmon families with different response to growth with an oil-plant diet.
- Leaver, M.J., Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Diez, A., Favre-Krey, L., Ezaz, M.T., Bautista, J.M., Tocher, D.R. & Krey, G. (2005). Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology* 146(7), 3150-3162.
- Leaver, M. J., Bautista, J. M., Björnsson, B. T., Jönsson, E., Krey, G., Tocher, D. R., & Torstensen, B. E. (2008a). Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 16(1), 73–94.

- Leaver, M. J., Villeneuve, L. A., Obach, A., Jensen, L., Bron, J. E., Tocher, D. R., & Taggart, J. B. (2008b). Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 9, 299.
- Leaver, M. J., Taggart, J. B., Villeneuve, L., Bron, J. E., Guy, D. R., Bishop, S. C., ... Tocher, D. R. (2011). Heritability and mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid deposition in the flesh of Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 6(1), 62–69.
- Leighton, F., Bergseth, S., Rortveit, T., Christiansen, E.N. & Bremerll, J. (1989). Free Acetate production by rat hepatocytes during peroxisomal fatty acid and dicarboxylic acid oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 264(18), 10347-10350.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lowell, T. (1998). Nutrition and feeding of fish . *Kluwer Academic Publishers (Ed). Boston, EEUU*. 54p.
- Menoyo D., López-Bote C.J., Obach A., Bautista JM. (2005). Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism and oxidative stability of Atlantic salmon. *Journal of Animal Sciences* 83(12);2853-62
- Miller, M.R., Nichols, P.D. and Carter, C.G. (2008). n-3 Oil sources for use in aquaculture – alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutrition Research Reviews* 21: 85-96.
- Morais, S., Pratoomyot, J., Taggart, J. B., Bron, J. E., Guy, D. R., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2011). Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 12(1), 255.
- Morais, S., Pratoomyot, J., Torstensen, B. E., Taggart, J. B., Guy, D. R., Gordon Bell, J., & Tocher, D. R. (2011). Diet  $\times$  genotype interactions in hepatic cholesterol and lipoprotein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to replacement of dietary fish oil with vegetable oil. *British Journal of Nutrition*, 106(10), 1457–1469.
- Morais, S., Taggart, J. B., Guy, D. R., Bell, J., & Tocher, D. R. (2012). Hepatic transcriptome analysis of inter-family variability in flesh n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content in Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 13(1), 410.

- Norambuena F., Morais S., Emery J.A., & Turchini G.M. (2015) Arachidonic Acid and Eicosapentanoic Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon as Affected by Water Temperature. *PLoS One* 10(11): e0143622.
- Olsvik P.A., Lie K.K., Jordal A.O., Nielsen T.O., Hordvik I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology* 6:21.
- Palti, Y., Silverstein, J.T., Wieman, H., Phillips, J.G., Barrows, F.T. and Parsons, J.E. (2006). Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 255: 548-556.
- Panserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerré, D., Kaushik, S. (2008). Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. *The British Journal of Nutrition*, 100, 953–967.
- Panserat, S., Hortopan, G. a., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Corraze, G. (2009). Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture*, 294(1-2), 123–131.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
- Pickova, J., & Mørkøre, T. (2007). Alternate oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 256–263.
- Pierce, L. R., Palti, Y., Silverstein, J. T., Barrows, F. T., Hallerman, E. M., & Parsons, J. E. (2008). Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 278(1-4), 37–42.
- Pratoomyot, J., Bendiksen, E. Å., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2010). Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 305(1-4), 124–132.
- Roberts, R.J. (2002). Nutritional physiology. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. *Fish Nutrition*. 3<sup>rd</sup> Edition, San Diego, EE.UU: Academic Press. pp. 368-453.

- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, 14(11), 1293–1307.
- Rosenlund, G., Obach, a, Sandberg, M. G., Standal, H., & Tveit, K. (2001). Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 32, 323–328.
- Salazar, J. (1994). Bases de datos para formulación de dietas. Cap.20. In: Castro, E. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. *Serie FAO No. 16*. 269p.
- Sargent, J. R., Bell, J. G., Bell, M. V., Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3-4), 183–198.
- Sargent, J. R., & Tacon, A. G. (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58(2), 377–383.
- Seilliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., & Bergot, P. (2001). Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a delta 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130(1), 83–93.
- Simopoulos, A.P. (1999). New products from the agri-food industry: the return of n-3 fatty acids into the food supply. *Lipids* 34, 297-301.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233, 674-688.
- Stubhaug, I., Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R., & Torstensen, B. E. (2005). Fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes and influence of dietary vegetable oil. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734(3), 277–288.
- Tacon, A.J. (2002). Thematic review of feeds and feed management practices in shrimp aquaculture. 69p. In: *Consortium program on shrimp farming and the environment. Roma, Italia, 2002*.
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285(1-4), 146–158.
- Tocher, D. R., Bell, J. G., MacGlaughlin, P., McGhee, F., & Dick, J. R. (2001). Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: Effects of dietary vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry and Molecular Biology*, 130(2), 257–270.

- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11(2), 107-184.
- Tocher, D. R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J. R., & Teale, A. J. (2006). Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*, 41(11), 1003-1016.
- Torstensen, B. E., Lie, O., & Frøyland, L. (2000). Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*, 35(6), 653-664.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., & Lie, O. (2004). Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquaculture Nutrition* 10, 175-192.
- Torstensen, B. E., Bell, J. G., Rosenlund, G., Henderson, R. J., Graff, I. E., Tocher, D. R. Sargent, J. R. (2005). Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10166-10178.
- Torstensen, B. E., Espe, M., Stubhaug, I., & Lie, O. (2011). Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The British Journal of Nutrition*, 106(5), 633-647.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W.-K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10-57.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034.
- Van Nieuwenhoven, F.A., VanderVusse, G.J. & Glatz, J.F.C. (1996). Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Lipids* 31, 223-227.
- Villalobos, S. (2012). Respuesta productiva en familias de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ante la inclusión de proteína y aceite vegetal en la dieta. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile, 79p.
- Von Baer, E. (2004). Lupino dulce: Un ingrediente para la alimentación de truchas y salmones. pp.11-21. In: *Fundación para la Innovación Agraria (FIA Ed)*. Lupino

dulce: Leguminosa en la producción de alimento para salmónidos. Valparaíso, Chile. 41p.

- Xue, X., Hixson, S. M., Hori, T. S., Booman, M., Parrish, C. C., Anderson, D. M., & Rise, M. L. (2015). Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver transcriptome response to diets containing *Camelina sativa* products. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 14, 1–15.
- Wakil, S.J., & Abu-Elheiga. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research vol.50 Supplement S138-S143*.
- Webster, C.D. and Chhorn, E.L. (2002). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. *CABI Publishing, Wallingford, Oxon., UK*. 448p.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85.
- Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. a., Bell, J. G., & Teale, A. J. (2004). Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 236, 467–483.
- Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Bell J.G., Teale A.J. (2005) Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a  $\Delta 6$  desaturase of Atlantic salmon. *Lipids* 40:13-24
- Zhou, S.Y., Ackman, R.G. & Morrison, C. (1995). Storage of lipids in the myosepta of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry* 14(2), 171-178.