
Determinación de la expresión de genes relacionados con el crecimiento en el Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

Trabajo de Fin de Máster

Cristina Llamas Navarro



Índice

Resumen 3

Introducción 4

Distribución y perspectivas de futuro

Mecanismos de crecimiento en el músculo de teleósteos

Genes implicados en el crecimiento del músculo en teleósteos

Implicaciones de la dieta en el crecimiento muscular de peces teleósteos

Objetivos

Material y métodos 7

Tratamiento de las muestras y diseño del experimento

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Primers

PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Resultados 11

Elección de “ Housekeeping genes”

Estadística

Discusión 18

Gen MyHC

Gen MyLc2

Gen Myod1

Gen Myod2

Conclusiones 21

Bibliografía 22

Resumen

Solea senegalensis Kaup, 1858 ha comenzado a tener importancia económica como especie de cultivo debido a su demanda dentro del mercado, de manera que se han realizado varios estudios acerca de la alimentación de este teleósteo marino y de cómo afecta esa alimentación al crecimiento de los individuos. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de genes de crecimiento (Myod1, Myod2, MyHC y MyLC2) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en función de las diferentes dietas administradas, de modo que podamos comprobar cuál es la más apropiada para obtener el mayor crecimiento en el menor tiempo posible. Para analizar la variación en la expresión de genes de los individuos sometidos a diferentes dietas, se ha realizado la extracción de RNA y se ha utilizado la RT-qPCR, lo que ha permitido comparar la expresión genética de distintos genes mediante métodos estadísticos permitiendo conocer que dieta es más adecuada para el crecimiento más óptimo de los individuos de esta especie.

Introducción

Solea senegalensis Kaup, 1858 es un teleósteo marino incluido en el orden Pleuronectiformes y familia Soleidae. Se trata de un pez plano, de cuerpo ovalado y asimétrico que vive en fondos arenosos o fangosos en aguas costeras hasta los 100 m de profundidad.

Distribución y perspectivas de futuro

Este lenguado, que habita principalmente en la costa Atlántica Oriental, desde el Golfo de Guinea hasta el de Vizcaya, así como en aguas del Mediterráneo Occidental y Norte de África, se ha convertido en una de las alternativas a los cultivos tradicionales en España. Es quizá una de las especies con mayores perspectivas de futuro, tanto por su gran aceptación entre los consumidores como por su precio y la elevada demanda en nuestros mercados (Conceição et al., 2007). España, pionera en el cultivo de esta especie, es, con 194 toneladas producidas en 2013, el segundo país europeo con mayor producción de lenguado senegalés después de Francia. La empresa *Solt Sea Farm* lleva desarrollando el cultivo de esta especie en Galicia en los últimos años y está trabajando en instalaciones en otros países europeos (Francia e Islandia). En Portugal también se lleva a cabo el cultivo de esta especie, con vistas a aumentar la producción (Rodríguez and Peleteiro, 2014)

Mecanismos de crecimiento en el músculo de teleósteos

El lenguado senegalés, al igual que otros teleósteos marinos, tiene mecanismos de crecimiento muscular diferentes a los de mamíferos y aves. El aumento del músculo en estos peces ocurre por Hipertrofia (incremento en el tamaño de las fibras musculares existentes) y por Hiperplasia (reclutamiento de nuevas fibras musculares). Además, estos procesos no solo tienen lugar durante la incubación y proceso larvario, si no que se alargan durante mucho tiempo después. En muchos teleósteos, como es el caso del lenguado senegalés, la masa axial del músculo esquelético representa más del 60% de la masa corporal total, de esta masa, más del 90% es músculo blanco (fibras musculares de contracción rápida), que se localizan en la parte más profunda. En la zona que limita con la piel, se localiza el músculo rojo (fibras de contracción lenta) y entre medias de estas dos capas, podemos encontrar una capa intermedia (rosa) que separa ambos tipos de fibras (Alami-Durante et al., 2010)

Genes implicados en el crecimiento del músculo en teleósteos

El crecimiento muscular en peces teleósteos está regulado por genes del eje somatotrópico/IGF (factor de crecimiento dependiente de insulina) además de por diferentes familias de factores de crecimiento. El control de crecimiento del músculo es mediado por varios genes llamados factores

reguladores miogénicos (MRFs), también por miembros de la familia del factor de crecimiento del fibroblasto (FGFs) y por el factor β transformante del crecimiento (TFG- β). Además, los tejidos del músculo estriado tienen miosina como principal componente estructural. La miosina está formada por dos cadenas, la cadena pesada (MyHc) y la cadena ligera (MyHL), de las cuales existen múltiples isoformas (Campos et al., 2010).

Además de la miosina, hay otros importantes reguladores del crecimiento muscular, así como la miostatina (*mstn*), que es un regulador negativo de la formación de la masa muscular esquelética, que también interviene en la formación de células inmunes y su antagonista, la folistatina (*fst*), una proteína de unión-activación implicada en el crecimiento y desarrollo muscular (Campos et al., 2010, Campos et al., 2013)

Estos factores de crecimiento del mioblasto, están muchas veces regulados por las condiciones del medio o por las temperaturas sufridas durante el desarrollo temprano (Campos et al., 2013). También se cree que pueden verse incluidos por la dieta de los individuos.

Implicaciones de la dieta en el crecimiento muscular de peces teleósteos

El crecimiento en los peces teleósteos, consiste principalmente en la deposición de proteínas, por lo que es importante tener en cuenta la dieta en relación con el crecimiento del músculo. *Solea senegalensis* Kaup, 1858 es una especie carnívora que se alimenta de pequeños invertebrados bentónicos, larvas de poliquetos y moluscos bivalvos y también de pequeños crustáceos (Rodríguez and Peleteiro, 2014). Cuando está en libertad, por lo tanto, debemos considerar que en peces carnívoros marinos, son usados los lípidos, en lugar de los carbohidratos, como principal fuente de energía no proteica, permitiendo de este modo el ahorro de proteínas (Campos et al., 2010). Se estima que el lenguado necesita un 60% de proteína en base al nivel de materia seca de la dieta (Rema et al., 2008). Actualmente, estas dietas se basan en harinas de pescado de alta calidad como principal fuente de proteínas. No obstante, la utilización de estas dietas a gran escala no es sostenible debido a sus altos costes de producción y su reducida disponibilidad (FAO, 2006). Por ello, varios estudios realizados recientemente han sustituido las proteína procedente de la harina de pescado por otras de origen vegetal, consiguiéndose buenos resultados a nivel de crecimiento, alimentación y utilización proteica una vez que los aminoácidos de la dieta están en equilibrio (Silva et al., 2010).

Otra de las tendencias en nutrición en acuicultura es el aumento del contenido en lípidos como fuente de energía no proteica para aumentar el crecimiento y sustituir las proteínas (Alami-Durante et al., 2010). Pero tras varios estudios en peces planos, se observó que los efectos positivos

en el ahorro de proteínas son limitados y controvertidos, en el caso del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) no han sido encontrados efectos beneficiosos de esta sustitución (Rema et al., 2008) pero en el caso del rodaballo (*Psetta máxima*, *Scophthalmus maximus*) los efectos de la sustitución fueron negativos para el crecimiento (Regost et al., 2001).

Aunque no se conocen exactamente los efectos de la sustitución de las proteínas de la dieta por lípidos, sí se sabe que estos pueden alterar la expresión de genes del eje somatotrópico y el sistema inmune (Campos et al., 2010, Montero et al., 2010). En el caso de las proteínas, si se ha estimado la cantidad máxima de proteínas en la dieta que necesita el lenguado senegalés (600g/kg/dieta) (Regost et al., 2001). Además, se han realizado estudios en distintas especies de peces teleósteos en los que se sustituían las proteínas de la harina de pescado por proteínas vegetales y una de las especies que menos vio afectado su crecimiento y utilización de nutrientes debido a esta sustitución era el lenguado senegalés, que además todavía preservaba un alto valor nutricional para el consumo humano (Valente et al., 2016)

En general, en acuicultura intensiva, se tiende a aumentar el contenido en lípidos de la dieta, y de reducir el contenido en proteínas, de forma que se aumente el crecimiento de los individuos (Campos et al., 2010). Uno de los objetivos de esta acuicultura intensiva, consiste en reducir el nivel de aceites de pescado en las dietas de los peces y sustituirlas por aceites de origen vegetal. Los sustitutos potenciales deben reunir tanto las altas necesidades de proteínas en peces como los requerimientos indispensables de aminoácidos (Alami-Durante et al., 2010).

Objetivos

Conocer los efectos de la dieta en el crecimiento del Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) mediante la expresión de genes de crecimiento en el músculo utilizando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Analizar, mediante la comparación de la expresión genética de los genes estudiados, la dieta más acertada para un mejor desarrollo y crecimiento de los individuos.

Material y métodos

Tratamiento de las muestras y diseño del experimento

Se partió de tres grupos experimentales, el grupo control, con un pienso normal (SPAROS) y los dos grupos experimentales, siendo uno de ellos un 50% formado por lípidos y el otro un 100% lípidos. Los tanques control, con un pienso normal son los tanques P1, P5 y P9. Los tanques a los que se alimentó con un pienso al 50% de lípidos, se corresponden con los tanques P2, P6 y P8. Por último, los tanques alimentados con un pienso compuesto al 100% de lípidos fueron los tanques P3, P4 y P7.

Las condiciones de temperatura, salinidad, profundidad, etc. se mantuvieron iguales en todos los tanques de estudio.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción del RNA de las muestras de músculo se llevó a cabo mediante Thermo Scientific GeneJET RNA Purification #K0731, #K0732. Se extrajeron 30 mg de tejido por cada individuo y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml libre de RNasas.

El Kit funciona lisando y homogeneizando las muestras con el tampón de lisis, que contiene guanidina tiocianato, una sal caotrópica que se encarga de proteger el RNA de los ataques de las RNasas endógenas. Lo que se obtiene después de la lisis, se mezcla con etanol y se carga en la columna de purificación del Kit. La sal caotrópica y el etanol causan que el RNA se una a la membrana de sílica de la columna, mientras que el producto lisado se filtra a través de la membrana, por lo tanto, las impurezas son eliminadas efectivamente desde la membrana mediante el lavado de la columna con los tampones de lavado 1 y 2. El RNA puro se eluye bajo una fuerza iónica baja con agua libre de RNasas. Al final obtenemos 100 µl de RNA disuelto en agua libre de RNasas.

Para la extracción de RNA de las muestras de riñón, se usó el método TRIzol, basado en el aislamiento del RNA mediante fenol (compuesto volátil tóxico) hidroxiquinoleína (inhibidor de RNasas), tiocianato de guanidina, tiocianato de aminio y glicerol. Durante el procedimiento se realiza una etapa de homogeneización de la muestra con TRIzol, lo que proporciona estabilidad a la muestra y rompe células y componentes celulares. La homogeneización del tejido tiene que hacerse en frío para evitar la degradación del RNA, pero una vez añadido el TRIzol, su degradación se ve seriamente reducida. La adición posterior de cloroformo separa la solución en fase acuosa y orgánica, donde la primera de estas contiene el RNA, esta fase acuosa es posteriormente tratada con Isopropanol frío para recuperar por precipitación el RNA.

Las muestras de RNA fueron cuantificadas con el espectrofotómetro NanoDrop Lite, que nos indica la pureza y la cantidad del RNA de las muestras extraídas.

Para pasar de RNA a cDNA, utilizamos el *AffinityScript One-Step RT-PCR Kit* de Agilent, compuesto de Herculasa, Oligo(dT) y hexámeros (*Upstream y Downstream primers*) además de un bloqueante de las RNasas. La Herculasa II es una polimerasa, los Oligo(dT) son una secuencia corta de nucleótidos de desoxi-timina que se unen a la cola de poli(A) proporcionando un extremo 3-OH libre que puede ser extendido por la transcriptasa inversa, para formar la cadena complementaria de DNA y los hexámeros son el material que usará la Herculasa para construir la hélice complementaria. Debemos usar por muestra 25 μl de herculasa, 1 μl de *upstream primer* y la misma cantidad de *downstream primer*, 0,5 μl de bloqueante de RNasas y por último la muestra y el agua libre de RNasas hasta completar 50 μl . Si bien es cierto que el Kit indica que es recomendable usar concentraciones menores a 5 μl de muestra, en este caso, la concentración de RNA final era demasiado baja, por lo que cantidades de 5 μl no eran suficientes para que se produjese con éxito el paso a cDNA. Por ello se midieron las concentraciones de RNA por muestra mediante NanoDrop Lite y con esos datos se estimó la cantidad necesaria para la síntesis de RNA a cDNA de la siguiente manera, de 10 a 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ se utilizó una concentración de 20 μl de muestra y 0,5 μl de agua libre de RNasas. Para muestras con una concentración de 100 a 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$, se emplearon 15 μl de muestra y 10,5 μl de agua libre de RNasas y por último, para muestras con una concentración de RNA superior a 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ se usaron los 5 μl recomendados por el kit y 15,5 μl de agua libre de RNasas.

Para que la enzima actúe, se emplea el termociclador, de modo que sea posible someter la muestra a los cambios de temperatura necesarios para que se lleve a cabo el proceso. Se diseñó el programa según las recomendaciones del *AffinityScript One-Step RT-PCR Kit* de Agilent: 1 ciclo de 5 minutos a 45°C, 1 ciclo de 1 minuto a 92°C, 40 ciclos en los que la temperatura variaría de 20 segundos a 92°C, 20 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C y por último un ciclo de 3 minutos a 72°C.

Una vez realizado este proceso, se midió la concentración obtenida de cDNA, mediante un gel de agarosa al 1% y de nuevo usando el espectrofotómetro NanoDrop Lite para conocer el éxito del proceso.

Primers

Para la clonación de los genes de interés, se diseñaron primers específicos para qPCR. Los primers de referencia utilizados han sido obtenidos teniendo en cuenta los análisis realizados por

(Infante et al., 2008). En el caso de los primers de los genes que se van a analizar, son los descritos por (Campos et al., 2010, Campos et al., 2013).

Los genes de referencia endógena (*Housekeeping genes* o HGKs) actúan como controles endógenos que permiten la corrección de variaciones experimentales causadas por errores de pipeteo, componentes inhibidores, transcripción inversa (RT), eficiencia o calidad del material de partida, etc. Tradicionalmente, los genes más expresados, como por ejemplo el Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el de la β -actina (ACTB) o 18ARN ribosómico, son los utilizados tradicionalmente debido a su papel en el metabolismo, citoesqueleto y estructura del ribosoma, respectivamente. Se asume que estos genes se expresan a un nivel constante en diferentes tejidos y células, sin embargo hay una creciente evidencia de que la expresión puede variar durante el desarrollo o en respuesta de tratamientos externos y algunos de ellos, (GADPH y otras enzimas glucolíticas) poseen genes parálogos funcionales que muestran patrones específicos de expresión en tejidos (músculo, hígado y/o cerebro) (Infante et al., 2008).

Como alternativa según (Infante et al., 2008), se han sustituido estos genes tradicionales de referencia endógena, por otros elegidos específicamente para el lenguado senegalés. Los genes seleccionados fueron el de la ubiquitina (ubq) involucrado en la degradación de proteínas, el factor de elongación I alfa (eef1a1) involucrado en la síntesis de proteínas y la proteína ribosomal 4S componente de la subunidad pequeña del ribosoma de 40S (rpS4) (Infante et al., 2008).

| Gene | Fwd sequence (5'→3') | Rev sequence (3'→5') | Accession n° (GenBank) | Size (bp) | E (%) |
|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|--------------|----------|
| myod1 | CTCCTCCTCCCCGTCATC | TTGGTGGTCTTCCGCTTG | FJ009109 | 144 | 89 |
| myod 2 | ACAGCCACCAGCCCAAAC | GTGAAATCCATCATGCCATC | FJ009108 | 194 | 94 |
| myHC | GAAAAATCTGACAGAGGAAATGG | CCTTGGTGAGAGTGTGACTTTG | FJ515911 | 143 | 91 |
| mylc2 | GTACAAGGAGGCGTTCACAATC | CCAGCACGTCCCTAAGGTC | FJ515912 | 77 | 92 |
| eef1a1 | ATTGGCGGCATTGGAACA | CATCTCCACAGACTTGACCTC | AB326302 | 117 | 91 |
| rpS4 | CTGCTGGATTCATGGATGTG | GGCAGTGATGCGGTGGAC | AB291557 | 101 | 90 |
| ubq | TCTGCGTGGTGGTCTCATC | TGACCACACTTCTTCTTGCG | AB291588 | 135 | 92 |

Tabla 1. Primers usados en la qPCR. Para cada gen, hay un número de acceso para GenBank, un tamaño de amplicón (bp) y una eficiencia de amplificación. La temperatura de alineamiento de todos los pares de primers es de 60°C. Los genes marcados con color azul, corresponden a genes de referencia endógena.

PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Utilizando una placa de 48 pocillos, se dispuso en cada uno de ellos 20 μ l totales de un Mix compuesto por: 2 μ l de muestra de cDNA diluida, 10 μ l del Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,4 μ l del Reverse primer y 0,4 μ l de Forward primer. Para finalizar, se rellenó hasta 20 μ l con Agua DEPC. Posteriormente, se cubrió el plato de reacción con MicroAmp Fast Optical Adhesive Film (Applied biosystem) y se introdujo en el termociclador Applied biosystem StepOne Real-Time PCR System. Las muestras son desnaturalizadas a 95°C durante 10 minutos y se someten a 40 ciclos de amplificación de acuerdo con el protocolo del Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies): 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineamiento a 60°C y por último 1 minuto y 30 segundos de extensión a 72°C.

Fueron analizadas 9 placas de 48 pocillos para llevar a cabo el análisis de la expresión. Tanto los controles negativos como las muestras de referencia, riñón, se hicieron por triplicado. En el caso de las muestras de músculo, cada una de las réplicas correspondía a un individuo del mismo tanque.

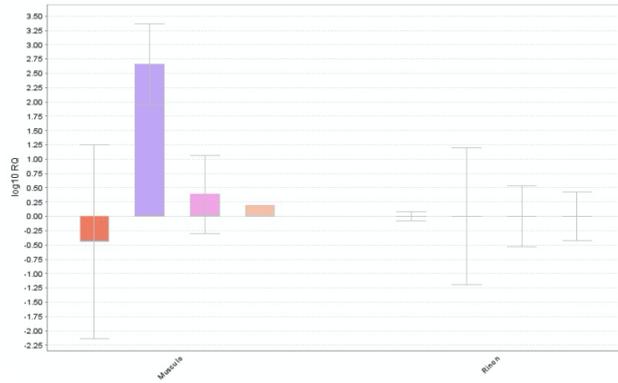
Resultados

Elección de “ Housekeeping genes”

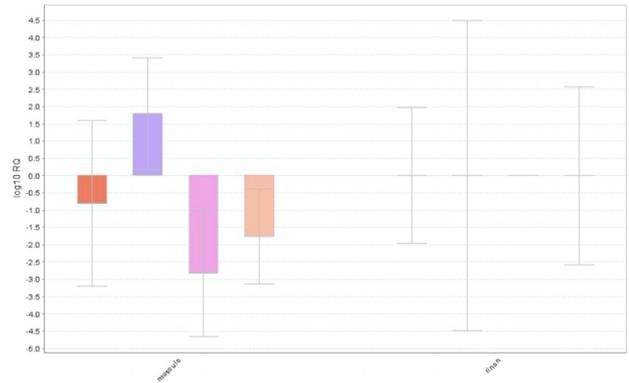
Se analizó una placa control para comprobar qué gen de referencia endógena o “Housekeeping gene” era más idóneo para ser utilizado como control en las subsiguientes placas. Se eligió entre tres posibles genes de referencia usando como punto de partida la investigación de Infante et. al, 2008. La elección final fue la Ubq debido que la expresión de este gen tenía lugar en todos los tejidos analizados y además, la gráfica obtenida después de la prueba muestra que la expresión se produce al mismo tiempo en todos los tejidos y los controles negativos quedaban claramente separados de las muestras amplificadas. En el caso de Rps4, la expresión en los individuos era muy uniforme, pero, el control negativo, aunque más tarde, también dio un patrón de fluorescencia semejante al de las muestras, de modo que si se usa este gen como referencia puede llevar a error. Por último, el gen Eef1a1, del mismo modo que se esperaba, se expresa en todos los individuos, aunque hay variaciones muy grandes en el rango de expresión de modo que aunque el control negativo sea tan bueno como el de la ubiquitina, la dispersión de cada una de las muestras le impedirá funcionar tan bien como la Ubq.

Estadística

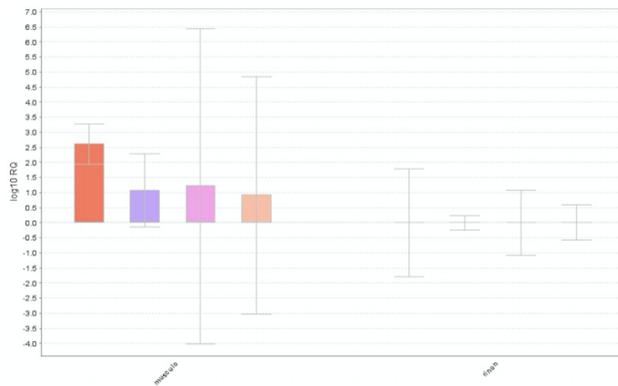
Los resultados de la expresión de genes de cada uno de los tanques se muestran en la tabla 2. Se puede observar que el termociclador Applied biosystem StepOne Real-Time PCR System devuelve una comparativa de la expresión de los genes usando como cero los datos obtenidos de la expresión de genes en el riñón, por eso en algunos casos, aparece un resultado negativo, lo que indica que ese gen se ha expresado también en el riñón. De manera, que para analizar únicamente los genes expresados en músculo, llevamos a cabo los subsiguientes análisis estadísticos, para determinar la expresión de cada gen en los diferentes tanques. Dichos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa informático Minitab Express.



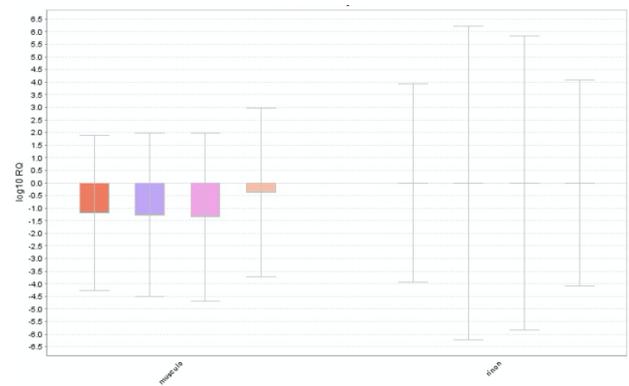
Gráfica 1. Resultados expresión Tanque P1. Pienso control sin sustitución de lípidos.



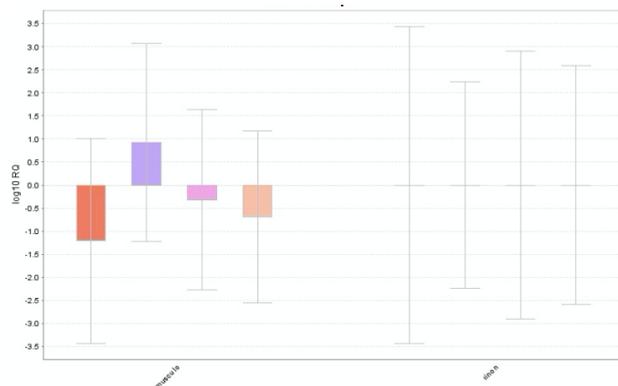
Gráfica 2. Resultados expresión Tanque P2. Pienso con un sustitución de lípidos del 50%



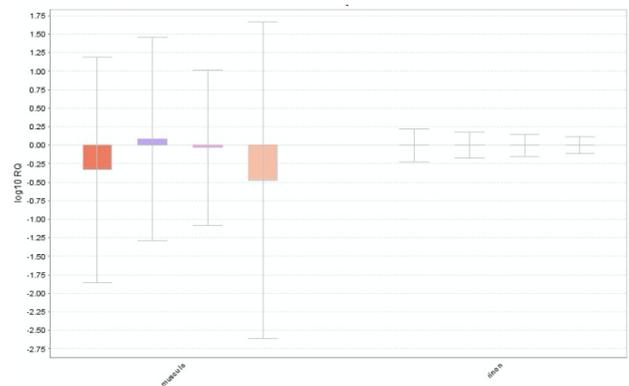
Gráfica 3. Resultados expresión Tanque P3. Pienso con un sustitución de lípidos del 100%



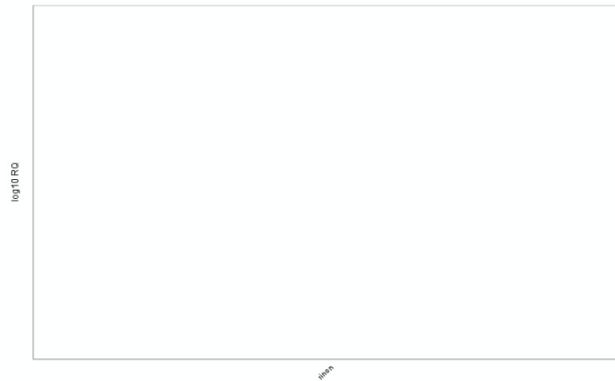
Gráfica 4. Resultados expresión Tanque P4. Pienso con un sustitución de lípidos del 100%



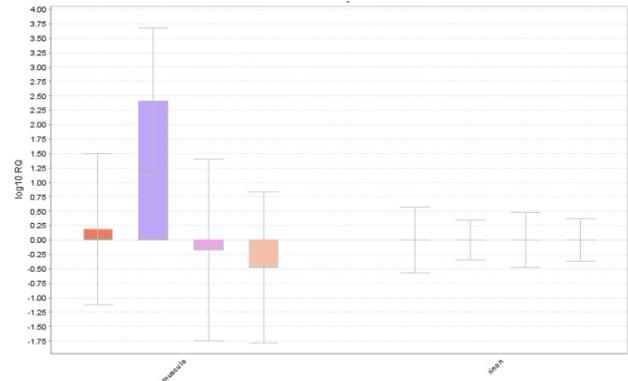
Gráfica 5. Resultados expresión Tanque P5. Pienso control sin sustitución de lípidos.



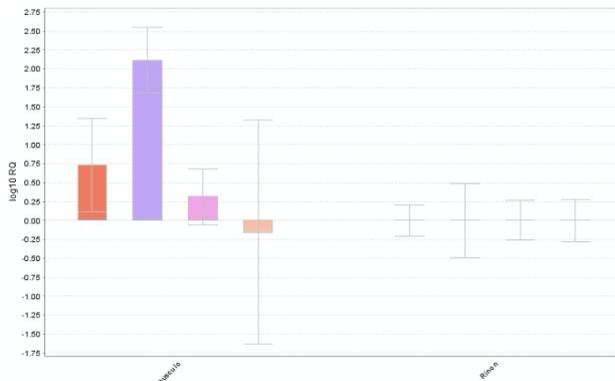
Gráfica 6. Resultados expresión Tanque P6. Pienso con un sustitución de lípidos del 50%



Gráfica 7. Resultados expresión tanque P7. Se observa una falta total de expresión genética en este caso. Esto puede deberse a varios motivos. En este caso la sustitución de lípidos en el pienso era del 100%



Gráfica 8. Resultados expresión Tanque P8. Pienso con un sustitución de lípidos del 50%



Gráfica 9. Resultados expresión Tanque P9. Pienso control sin sustitución de lípidos.

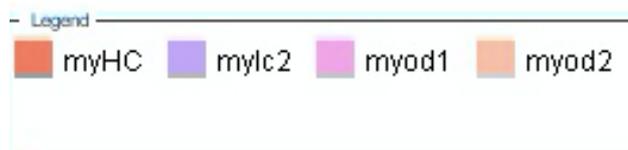


Tabla 2: Agrupación de las gráficas de expresión de los genes MyHC, MyLc2, Myod1 y Myod2 en el músculo. Las imágenes se obtuvieron después de analizar la expresión genética mediante RT-qPCR de cada uno de los tanques.

En las gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se muestran primero los resultados del músculo y a continuación los de riñón, los cuales son tomados como valor 0. se observa la diferente expresión de cada gen en el músculo usando como control interno la ubiquitina y la expresión de estos mismos genes en el riñón.

El criterio de valoración cuantitativa de la RT-qPCR es el valor de Ct (“Ciclo Umbral”). De este modo, la Ct se define como el ciclo de PCR en el que la señal fluorescente del colorante cruza un umbral arbitrariamente colocado. El valor numérico de la Ct es inversamente proporcional a la cantidad de amplicón en la reacción (es decir, cuanto menor es la Ct, mayor es la cantidad de amplicón) (Livak and Schmittgen, 2001).

Según (Livak and Schmittgen, 2001) se recomienda que no se usen los datos en bruto del valor de Ct para cada gen para llevar a cabo los análisis estadísticos de los datos, por lo tanto, se sugiere llevar a cabo cualquiera de las siguientes transformaciones: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $2^{-\Delta Ct}$ o 2^{-Ct} . Se usa la transformación de $2^{-\Delta Ct}$ obtenida mediante la siguiente expresión:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{control interno}}) \quad (1)$$

Esta transformación se realiza introduciendo la ecuación (1) en el programa informático Excel, con todos los datos proporcionados por la RT-qPCR.

Esta ecuación (1) permite normalizar los datos de la expresión de un gen, teniendo en cuenta un control interno, en este caso, el control interno sería la Ubq y se realiza la transformación para cada uno de los genes de estudio.

Se comprueba que los valores en la expresión no siguen una distribución normal (p-valor < 0.05). De modo que se lleva a cabo un test de Levene para comprobar la igualdad de las varianzas, en este caso, también se rechaza la hipótesis de igualdad de las varianzas (p-valor = 0.5156) ya que el p-valor es mayor de 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula, que indica que las varianzas son iguales.

Se procede entonces a realizar un análisis ANOVA que incluya la comparación HSD de Tukey para comparar la expresión de los diferentes genes. El análisis ANOVA nos devuelve también un p-valor > 0.05 (0.5179) de manera que se acepta de nuevo la hipótesis nula y se rechaza la alternativa.

Puesto que existe igualdad de varianzas, como ya se ha comprobado, se analizan los resultados obtenidos de la comparación de la expresión dos a dos generada por el test HSD de Tukey.

| Genes | P-Valor | Significancia |
|-------------|---------|---|
| Myod1-Myod2 | 0.5665 | No existen diferencias significativas en la expresión |
| MyHC-Myod1 | 0.5819 | No existen diferencias significativas en la expresión |
| MyLc2-Myod1 | 0.7441 | No existen diferencias significativas en la expresión |
| MyHC-Myod2 | 0.9999 | No existen diferencias significativas en la expresión |
| MyLc2-Myod2 | 0.9986 | No existen diferencias significativas en la expresión |
| MyLc2-MyHC | 0.9937 | No existen diferencias significativas en la expresión |

Tabla 3. Test HSD de Tukey. Se procede a la comparación de la expresión de cada uno de los genes en general. Se observa que comparando la expresión en general, no existen diferencias significativas atendiendo al p-valor > 0.05

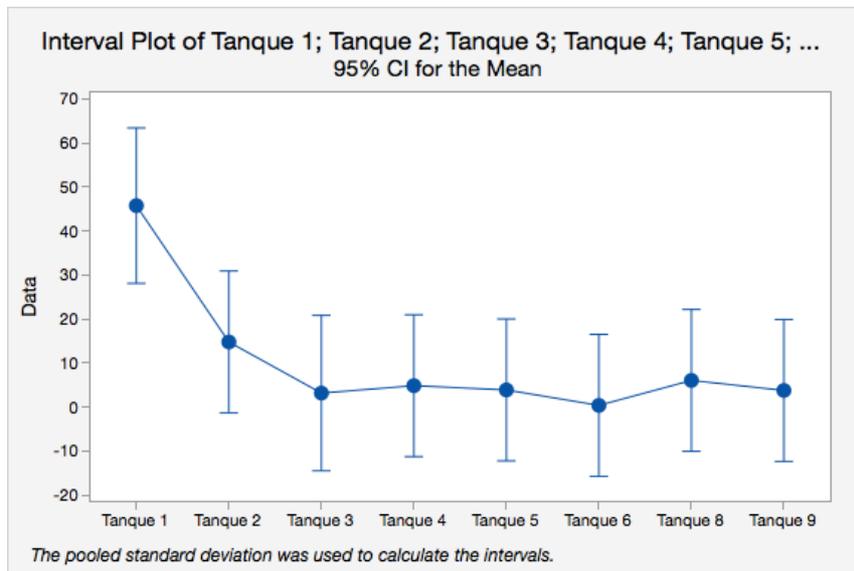
Los datos de la tabla 3 nos muestran que no existen diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes, aunque si bien es cierto, que en ciertos casos se puede ver un p-valor más bajo para ciertas comparaciones como en el caso de Myod1-Myod2, MyHC-Myod1 y MyLc2-Myod1.

Se ha realizado un análisis de comparación de la expresión de todos los genes, pero lo que realmente es de importancia es conocer las diferencias de expresión genética de cada tanque. Por lo que de nuevo, y utilizando la misma transformación anteriormente explicada, se procede a analizar la expresión en cada tanque.

Primero se comprobó la normalidad de los datos. Analizando la expresión genética por tanque en la que tampoco se obtuvo una distribución normal de los datos, ya que de nuevo, el p-valor fue menor de 0.05 en todos los casos. Por lo que se procedió a realizar un test de igualdad de varianzas, en este caso, del mismo modo que en el caso anterior, se usó el test de Levene. Se rechazó la hipótesis nula, puesto que el p-valor fue menor de 0.05 (p-valor= 0,0089) por lo que se aceptó la hipótesis alternativa que enuncia que al menos una de las varianzas es distinta.

También, del mismo modo que en el caso anterior, se realiza un análisis ANOVA acompañado de un Test HSD de Tukey para comparar la expresión en los tanques de forma individual. Al realizar el test ANOVA, se vuelve a obtener un p-valor < 0.05 de modo que se sigue rechazando la hipótesis de igualdad de varianzas para todos los Tanques.

Se obtienen los p-valores del test HSD de Tukey, donde se muestra que en la mayoría de los casos las diferencias entre tanques no son significativas, pero existen algunos casos en los que esta norma no se cumple, ya que en la comparativa por parejas, se observa que todas las comparaciones con el Tanque 1 dan diferencias significativas.



Gráfica 10. ANOVA de la expresión genética en cada tanque. Se puede observar como en el tanque 1 y en el tanque 2 la expresión genética es mayor que en los demás, en los cuales, se mantiene prácticamente constante. Se ha de tener en cuenta, que la expresión, en este caso, se está analizando con todos los genes a la vez.

Por último, y llevando a cabo los mismos procesos que en los dos casos anteriores, se compara la expresión individual de un gen en cada tanque.

Teniendo en cuenta solo la expresión de un gen en cada tanque, los datos si se ajustan a una distribución normal, siendo el p-valor >0.05 .

Se realiza directamente el análisis ANOVA puesto que los datos si se ajustan a una distribución normal.

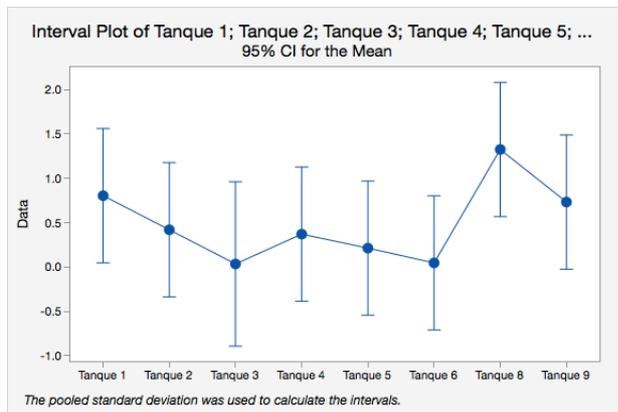
| Gen | P.Valor (ANOVA) | Significancia |
|-------|-----------------|---|
| Myod1 | 0.2565 | Se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas. |
| Myod2 | 0.8517 | Se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas. |
| MyHC | 0.7696 | Se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas. |
| MyLc2 | <0.001 | No se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianzas |

Tabla 4. ANOVA para los datos de la expresión de cada gen en todos los tanques. Se observan los p-valores, mayores de 0.05 en todos los casos menos en el caso del MyLc2.

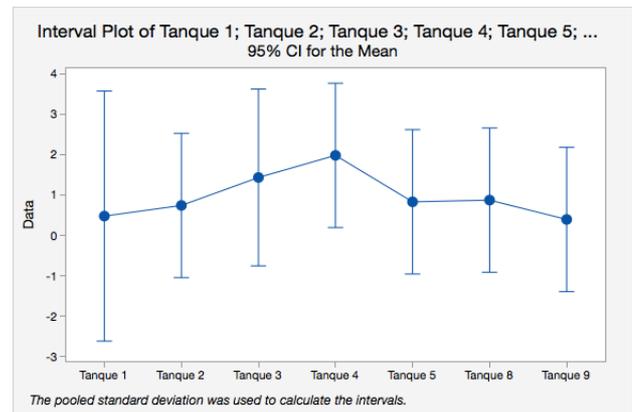
Para los genes Myod1, Myod2 y MyHC no existen diferencias significativas en la expresión en cada uno de los tanques, aunque si bien es cierto, muchos de los p-valores en su comparación

están más cercanos al valor de $\alpha=0.05$, de modo que aunque se considere que aun así las diferencias no son significativas, si se podría hablar de pequeñas diferencias de expresión.

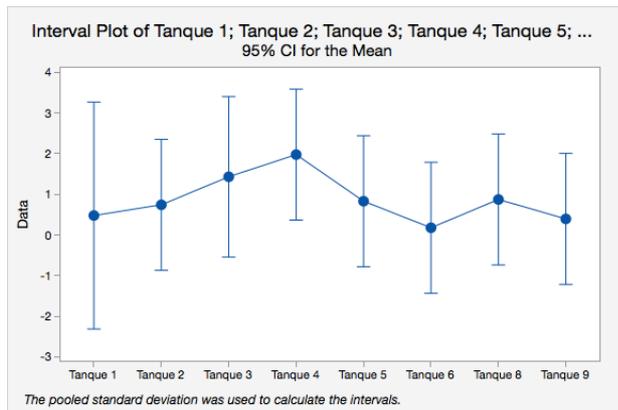
En el caso de MyLc2, si se observan diferencias significativas, en relación con la expresión del Tanque 1, obteniendo en todos los casos p-valores <0.001 .



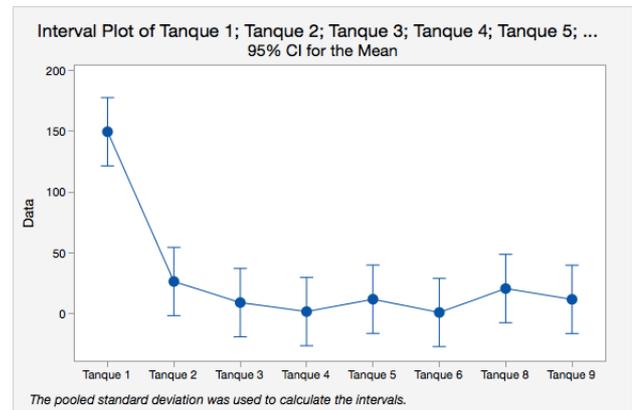
Grafica 11. ANOVA para el gen Myod1



Grafica 12. ANOVA para el gen Myod2



Grafica 13 ANOVA para el gen MyHC



Grafica 14. ANOVA para el gen MyLc2

Tabla 5. Agrupación de las gráficas correspondientes a los ANOVA realizados para cada tanque.

Discusión

Si bien es cierto que los análisis estadísticos revelan la falta de diferencias significativas en la comparación de la expresión de cada uno de los genes, se procede a realizar una evaluación de los resultados de los distintos tanques sin tener en cuenta la dieta en un principio. De modo que se presta mayor atención a los resultados mostrados en las gráficas 10, 11, 12 y 13. Estas gráficas representan las diferencias de la expresión entre los tanques. Observándolas se aprecia que en Myod1, la expresión relativa en el tanque P8 y en el tanque P9 aumentan notablemente con respecto a los otros. Myod2 mantiene una expresión relativamente constante, excepto por el tanque P4, en el que hay un pequeño aumento, aunque no demasiado significativo. Tanto Myod1 como Myod2 son genes que están involucrados en la miogénesis del músculo, mientras que MyHc y MyLc2 están implicados en el crecimiento muscular.

También, si se observan detenidamente los valores de Myod2 y MyHC en las gráficas 10, 11, 12 y 13, se puede comprobar la existencia de un patrón muy similar, es decir, la expresión que cada uno de ellos ha tenido en los individuos de los diferentes tanques es muy similar, aumentando en el Tanque P4, y algo menos notablemente en el Tanque P6. Por último, en análisis de las gráficas correspondientes al gen MyLc2 indica una gran expresión de este gen en los individuos del Tanque P1, mientras que después, la expresión es mucho menos notable, aumentando levemente en el Tanque P8 y en el P6, y manteniendo incluso por debajo que en los otros genes.

En principio, no se aprecia ningún patrón específico que permita sacar conclusiones previas a simple vista.

Después de este análisis preliminar de la comparativa en la expresión de genes en los individuos de cada Tanque, se analiza de nuevo su significado, teniendo en cuenta la composición de cada una de las dietas aplicadas a cada Tanque. Como se ha indicado con anterioridad, los individuos de los tanques P1, P5 y P9 fueron alimentados con un pienso control, al que no se le realizó ninguna clase de transformación, a los tanques P2, P6 y P8 se les administro una dieta con un pienso con una sustitución del lípidos del 50% y por último a los tanques P3, P4 y P7 se les administro una dieta a base de un pienso compuesto por lípidos completamente.

Gen MyHC

Tanques con dieta a base de pienso control: se observa que la expresión para este gen es diferente en todos los tanques, en P1 y P5, los resultados son negativos y se demuestra de esta forma

que este gen se ha expresado también en el riñón, que actúa como tejido de referencia. Se observa también que aunque en sentido contrario, la cantidad de este gen en P1 y P9 es similar.

Para los tanques con una sustitución de la dieta del 50% (P2, P6 y P8) se comprueba que los resultados de expresión de este gen tampoco son iguales en todos los casos. Para P2 y P6, la expresión es casi idéntica y también negativa, pero para P8 se observa, que aunque es muy pequeña, también hay una expresión positiva.

Por último en el caso de los tanques con una sustitución de la dieta del 100% (P3, P4 y P7) lo que más llama la atención es el tanque P7 en el que no se ha producido expresión en el músculo de ningún gen. En el caso de los tanques P3 y P4, se observa que no hay ningún tipo de similitud. En el caso de P3, la expresión es positiva respecto al riñón, pero que en el caso de P4, la expresión es toda ella negativa respecto al riñón.

Por último, se realiza una comparación de los resultados posteriormente para saber si la dieta influye negativa o positivamente en la expresión de este gen, se puede llegar a la conclusión de que los resultados no son concluyentes, puesto las repeticiones en distintos tanques no nos dan valores significativos, y del mismo modo que ocurría con la observación a primera vista, no parece haber un patrón entre los distintos patrones de expresión en los tanques.

Gen MyLc2

En los tanques P1, P5 y P9, con una dieta control, observamos que la expresión de este gen siempre es positiva y además, comprobamos que en el caso de P1 y P9 es visiblemente notable el aumento de la expresión de este gen con respecto a los demás. En el caso de P5, aunque la expresión también es positiva, es menos notable, aunque en comparación, también llamativa.

En el caso de P2, P6 y P8, con un 50% de sustitución de lípidos, se observa lo mismo, en los dos casos, la expresión de este gen es positiva, pero no igual. En el caso de P2 la expresión es mucho mayor que en el P6 y en el caso del tanque P8, la expresión de este gen es muy elevada, mucho mayor que en los otros dos casos.

En el caso de los tanques P3, P4 y P7 con una sustitución del 100% de lípidos, se observa que aunque en valores contrarios, la expresión de este gen en P3 y P4 es casi idéntica, aunque aparece en valores negativos en el caso de P4 debido a la expresión positiva en el riñón en el caso de P4.

En relación a este gen con la dieta, se puede decir que del mismo modo que en el caso anterior, los resultados no son concluyentes, no pudiendo decir con seguridad que la concentración de lípidos en la dieta modifica la expresión de los genes de crecimiento. Si bien es cierto, que cuanto

mayor ha sido la expresión de este gen es cuando se han analizado los tanques control y el de la sustitución de lípidos del 50%, lo que se puede entender como que el aumento de lípidos en la dieta tiene un efecto negativo en la expresión de este gen en el músculo.

Gen Myod1

En el caso de Myod1, para la dieta control, se puede ver como de nuevo, los tanques P1 y P9 son muy similares en cuanto la expresión de este gen, del mismo modo que lo eran con MyLc2, teniendo además un valor positivo de expresión. Es en el tanque P5, en el que la expresión es negativa, aunque también, como ya ha ocurrido en otros casos, los valores, aunque negativos, son muy similares.

Para los tanques P2, P6 y P8 los resultados para este gen son completamente diferentes en todos los casos. De forma que en P2 existe una gran cantidad de expresión, aunque si bien es cierto que aparece negativamente en la gráfica 2 lo que significa que también hubo una alta expresión de este gen en el riñón. En el caso de P6, la expresión es positiva, pero muy leve, del mismo modo que en P8, pero en este caso, negativa.

En el caso de los tanques P3 y P4, la expresión es la misma, pero en el caso de P4 es negativa y en P3 positiva.

Como han demostrado los análisis estadísticos previamente, no hay diferencias significativas en la expresión de este gen, ya que no parece depender de la dieta la expresión o falta de esta en estos genes.

Gen Myod2

Este es el último de los genes analizados, P1, P5 y P9 muestran en todos los casos, una expresión muy reducida para este gen, como se observa en las gráficas 1, 5 y 9, además solo en uno de los casos la expresión es positiva.

Para la sustitución por lípidos del 50% en el pienso, es decir, los tanques P2, P6 y P8 la expresión es negativa en todos los casos, en P6 y P8 es muy similar, casi idéntica, pero en el caso de P2, aunque negativa (porque también se ha expresado en el riñón) esta es más elevada.

Por último, para P3 y P4 destaca que la expresión en P4 es menor además de tener valores negativos en ella.

Del mismo modo que para el resto de los genes, no se pueden encontrar diferencias significativas entre las diferentes dietas.

En realidad, estudios previos como el mencionado en (Alami-Durante et al., 2010) ya han señalado que la sustitución de lípidos en la dieta del lenguado senegalés no ha mostrado efectos negativos ni positivos en el crecimiento de este.

Conclusiones

Después de analizar los resultados de las distintas gráficas y los test estadísticos minuciosamente, se puede concluir que en el caso del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) la sustitución de los componentes del pienso por lípidos no tiene efectos significativos en el crecimiento o al menos, los resultados no han sido concluyentes. De esta manera, se puede decir que los resultados obtenidos han sido satisfactorios, debido a la posibilidad que se plantea de sustituir las proteínas obtenidas de la harina del pescado por componentes más económicos, sin afectar al crecimiento y a las cualidades organolépticas del lenguado y permitiendo una explotación mas beneficiosa y optima.

Bibliografía

- ALAMI-DURANTE, H., MÉDALE, F., CLUZEAUD, M. & KAUSHIK, S. J. 2010. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture*, 303, 50-58.
- CAMPOS, C., FERNANDES, J. M. O., CONCEIÇÃO, L. E. C., ENGROLA, S., SOUSA, V. & VALENTE, L. M. P. 2013. Thermal conditions during larval pelagic phase influence subsequent somatic growth of Senegalese sole by modulating gene expression and muscle growth dynamics. *Aquaculture*.
- CAMPOS, C., VALENTE, L. M. P., BORGES, P., BIZUAYEHU, T. & FERNANDES, J. M. O. 2010. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *The Journal of Experimental Biology*, 213, 200-209.
- CONCEIÇÃO, L. E. C., RIBEIRO, L., ENGROLA, S., ARAGÃO, C., MORAIS, S., LACUISSE, M., SOARES, F. & DINIS, M. T. 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 268, 64-81.
- FAO. 2006. *Estado mundial de la agricultura y la alimentación* [Online]. Roma: ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.
- INFANTE, C., MATSUOKA, M. P., ASENSIO, E., CAÑAVATE, J. P., REITH, M. & MANCHADO, M. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9:28.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻AAC Method. *METHODS*, 25, 402-408.
- MONTERO, D., MATHLOUTHI, L., TORT, L., ALFONSO, J. M., TORRECILLAS, S., FERNÁNDEZ-VAQUERO, A., NEGRIN, D. & IZQUIERDO, M. S. 2010. Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in glithead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 1073-1081.
- REGOST, C., ARZEL, J., CARDINAL, H., ROBIN, J., CAROCHE, M. & KAUSHIK, S. J. 2001. Dietary lipid levels, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 193, 291-309.
- REMA, P., CONCEIÇÃO, L. E. C., EVERS, F., CASTRO-CUNHA, M., DINIS, M. T. & DIAS, J. 2008. Optimal dietary proteins levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition*, 14, 263-269.
- RODRÍGUEZ, J. L. & PELETEIRO, J. F. 2014. Cuadernos de acuicultura. Cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), Madrid, Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- SILVA, J. M. G., ESPE, M., CONCEIÇÃO, L. E. C., DIAS, J., COSTAS, B. & VALENTE, L. M. P. 2010. Feed intake and growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) fed diets with partial replacement of fish meal with plant proteins. *Aquaculture Research*, 41, e20-e30.
- VALENTE, L. M. P., CABRAL, E. M., SOUSA, V., CUNHA, L. M. & FERNANDES, J. M. O. 2016. Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture*, 453, 77-85.