



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL  
CRECIMIENTO MUSCULAR DEL PARGO FLAMENCO**

*Lutjanus guttatus*

---

Por:

**Mauricio Eduardo Escalante Rojas**

TESIS APROBADA POR LA

Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mauricio Eduardo Escalante Rojas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



---

Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Directora de Tesis



---

Dr. Leonardo Ibarra Castro  
Miembro de Comité de Tesis



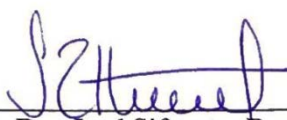
---

Dr. Juan Manuel Martínez Brown  
Miembro de Comité de Tesis



---

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera  
Miembro de Comité de Tesis



---

Dra. Itzel Sifuentes Romero  
Miembro de Comité de Tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento muscular del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Mauricio Eduardo Escalante Rojas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado otorgada.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por abrirme las puertas una vez más y permitirme realizar este trabajo, así como por los apoyos de movilidad otorgados.

También agradezco a CONACYT por los apoyos financieros otorgados para los proyectos 179098 y 258545, que permitieron la realización de este trabajo.

Agradezco enormemente a mi directora de Tesis, la Dra. Silvia Alejandra García Gasca, no solo por la oportunidad, las facilidades y apoyo académico otorgado para la realización de esta tesis, sino también por su amabilidad y atención. Realmente ha sido un privilegio contar con su guía y trabajar bajo su dirección.

Gracias a los miembros de mi comité de Tesis, a la Dra. Itzel Sifuentes Romero, al Dr. Raúl Llera Herrera, al Dr. Juan Manuel Martínez Brown y al Dr. Leonardo Ibarra Castro. Les agradezco por formar parte de mi comité, por su disponibilidad y su tiempo, así como por su apoyo técnico y académico, por las facilidades otorgadas, por sus recomendaciones y sugerencias.

Agradezco a la M.C. Rubí Hernández Cornejo por su apoyo y capacitación técnica en el Laboratorio de Biología Molecular.

Agradezco a la Dra. Crisantema Hernández por permitirme desarrollar parte de los análisis en el Laboratorio de Nutrición. Gracias también a la M.C. Erika Yazmín Sánchez por su invaluable apoyo técnico durante la ejecución de los análisis antes mencionados.

Gracias a la Dra. María Cristina Chávez Sánchez y a la M.C. Selene Abad Rosales por su apoyo en la realización de los análisis histológicos.

Agradezco a mis compañeros y amigos, Julia, Rodolfo, Citlalic, Ana Luisa, Eunice, Erick y Andrés, no solo por la ayuda que me brindaron cuando la necesité, sino principalmente por los buenos momentos y por su amistad, que sin duda alguna son muy valiosos.

A mis padres, Eduardo e Isabel, por su apoyo y su amor incondicionales. Gracias.

A mí hija, Samantha.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
2.1 Estudios Transcriptómicos en Peces .....	19
2.2 Estudios sobre Fuentes de Proteína en Peces y Efectos en Crecimiento .....	22
2.3 Restricción de Alimento y Crecimiento Compensatorio en Peces.....	25
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1 Generales .....	33
4.2 Particulares .....	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
5.1 Secuenciación y Ensamblaje <i>de novo</i> Del Transcriptoma de <i>L. guttatus</i> .....	34
5.1.1 Toma de Muestras y Aislamiento de ARN .....	34
5.1.2 Construcción de Librerías y Secuenciación .....	35
5.1.3 Análisis Bioinformático .....	35
5.2 Efecto de la Fuente de Proteína en la Dieta de <i>L. guttatus</i> .....	36
5.2.1 Diseño Experimental, Mantenimiento de los Peces y Alimentación .....	36
5.2.2 Composición Proximal de las Dietas.....	38
5.2.3 Evaluación de Crecimiento y Eficiencia Alimenticia .....	39
5.2.4 Aislamiento de ARN y Síntesis de ADNc.....	40
5.2.5 Análisis de Expresión Génica por qPCR.....	40
5.2.6 Análisis Estadístico .....	44
5.3 Experimento de Restricción Alimenticia y Realimentación en <i>L. guttatus</i> .....	44
5.3.1 Diseño Experimental .....	44
5.3.2 Composición Proximal de los Peces .....	45
5.3.3 Expresión Génica .....	46
5.3.4 Análisis Histológico .....	48
5.3.5 Análisis Estadístico .....	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	50
6.1 Ensamblaje <i>de novo</i> y Anotación del Transcriptoma de <i>L. guttatus</i> .....	50
6.2 Efecto de la Fuente de Proteína en la Expresión de Genes Involucrados en Crecimiento/Atrofia en <i>Lutjanus guttatus</i> .....	55
6.2.1 Resultados .....	55

## CONTENIDO (continuación)

6.2.2	Discusión .....	61
6.3	Efecto de la Restricción Alimenticia y Realimentación en <i>L. guttatus</i> .....	66
6.3.1	Crecimiento y Eficiencia Alimenticia .....	66
6.3.2	Composición Proximal de los Peces .....	71
6.3.3	Histología en Hígado.....	72
6.3.4	Expresión Génica en Hígado .....	74
6.3.5	Expresión Génica en Músculo Esquelético .....	77
6.3.7	Discusión .....	84
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Distribución de la longitud de los transcritos en el transcriptoma de referencia de <i>L. guttatus</i> ..... 51
2	Resultados del análisis de ortólogos conservados dentro del transcriptoma de <i>L. guttatus</i> , en secuencia de aminoácidos y nucleótidos con la plataforma BUSCO..... 52
3	(A) Distribución de valores E de los hits de BLASTp con un valor E umbral 1.0E-5. (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTp contra la base de datos Uniprot/Swissprot ..... 54
4	Top 40 Rutas biológicas KEGG mejor representadas en los péptidos hipotéticos identificados del transcriptoma de <i>L. guttatus</i> ..... 55
5	Expresión relativa de <i>igf1</i> , <i>igf2</i> y <i>ghr</i> en hígado, y <i>pacap</i> en cerebro de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG) ..... 57
6	Expresión relativa de <i>mtor</i> , <i>igf1</i> , <i>igf2</i> , <i>myod1</i> , <i>myod2</i> y <i>myogenin</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG) ..... 59
7	Expresión relativa de <i>murf1</i> , <i>foxo3a</i> , <i>foxo3b</i> , <i>mstn1</i> y <i>mstn2</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG) ..... 60
8	Cambios en el peso de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación ..... 66
9	Ganancia en peso semanal en juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación..... 67
10	Tasa de crecimiento específico semanal en juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación ..... 68
11	Ingesta de alimento semanal en juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación..... 69
12	Factor de conversión alimenticia semanal en juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación ..... 70
13	Cambios histológicos en el hígado de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana de ayuno y a una posterior realimentación..... 73



14	Cambios histológicos en el hígado de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a dos semanas de ayuno, a las 48 horas post-realimentación y a una semana post-realimentación .....	74
15	Expresión relativa de <i>ghr</i> , <i>igf1</i> , <i>igf2</i> y <i>lep</i> en hígado de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	76
16	Expresión relativa de <i>lal</i> , <i>ulk1</i> y <i>atg7</i> en hígado de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	78
17	Expresión relativa de <i>igf1</i> y <i>igf2</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	79
18	Expresión relativa de <i>myod1</i> , <i>myod2</i> y <i>myogenin</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	80
19	Expresión relativa de <i>atg7</i> y <i>ulk1</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	81
20	Expresión relativa de <i>mafbox</i> , <i>murfl</i> , <i>mstn1</i> y <i>foxo3b</i> en músculo de juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación .....	83

## LISTA DE CUADROS

Tabla	Página
1	Formulación y composición de las dietas utilizadas en el experimento de reemplazo de harina de pescado en <i>L.guttatus</i> ..... 37
2	Primers utilizados para los análisis de expresión génica por qPCR en el experimento de reemplazo de harina de pescado por fuentes alternativas de proteína en <i>L. guttatus</i> ..... 41
3	Primers utilizados para los análisis de expresión génica por qPCR en el experimento de ayuno/realimentación en <i>L. guttatus</i> ..... 47
4	Resumen de estadísticas de la secuenciación y ensamblaje <i>de novo</i> del transcriptoma de <i>L. guttatus</i> ..... 50
5	Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de los juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con las dietas experimentales por 60 días ..... 56
6	Cambios en índices Viscerosomático (VSI), Hepatosomático (HSI) y Grasa Meséntérica (MSI) en juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a ayuno-realimentación ..... 71
7	Composición proximal de los juveniles de <i>L. guttatus</i> sometidos a ayuno y realimentación ..... 72

## RESUMEN

Se investigó el efecto de la fuente de proteína y la restricción total de alimento en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Primeramente, se generó un transcriptoma de referencia a partir de once tejidos (cerebro, corazón, gónada, hígado, intestino, músculo, piel blanca, piel oscura y grasa visceral) utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2000. El ensamblaje del transcriptoma fue realizado con Trinity, mientras que la anotación se realizó con Trinotate; se ensamblaron 267,601 contigs con una longitud promedio de 845 pb; mientras que se identificaron 85,677 proteínas hipotéticas. Se extrajeron secuencias de interés del transcriptoma para la generación de oligos para cuantificación de expresión génica por qPCR. En cerebro, se examinó la expresión de *pacap*; en hígado, *igf1*, *igf2*, *ghr*, *lal*, *atg7* y *ulk1*; y en músculo, *mtor*, *igf1*, *igf2*, *myod1*, *myod2*, *myogenin*, *atg7*, *ulk1*, *foxo3a*, *foxo3b*, *murfl*, *mafxb*, *mstn1* y *mstn2*. Se realizó un ensayo de alimentación, utilizando tres dietas, una formulada a base de harina de pescado (FM), una formulada a base de harina de carne porcina y subproductos avícolas (PPM), y una dieta vegetal (VEG), con gluten de maíz y concentrado de proteína de soya. La dieta vegetal ocasionó un crecimiento reducido, así como una reducción en la expresión de genes del eje somatotrópico y genes miogénicos; sin embargo, no se encontró un aumento en la expresión de mecanismos de atrofia. Los resultados indican que la proteína vegetal carece de nutrientes necesarios para *L. guttatus*. En un segundo experimento, se sometió a juveniles de *L. guttatus* a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de ayuno total, con el propósito de inducir una respuesta de crecimiento compensatorio. Después del ayuno, los peces mostraron una reducción en la masa corporal, así como una intensa movilización de reservas lipídicas. En cuanto a la expresión génica, una semana de ayuno ocasionó un aumento en la expresión de genes involucrados en procesos proteolíticos en tejido muscular, más no en hígado. Por otro lado, dos semanas de ayuno generaron cambios inesperados en la expresión génica pues no hubo un aumento en la expresión de genes involucrados en proteólisis muscular. Durante la realimentación, se registró un aumento en la ingesta de alimento y tasas de crecimiento en la primera semana post-realimentación. El perfil de expresión génica no se caracterizó por una sobreexpresión en genes involucrados en crecimiento en el grupo 1WF, sin embargo, el grupo 2WF si presentó una sobreexpresión en algunos de estos genes.

**Palabras clave:** miogénesis, atrofia, autofagia, proteosoma, crecimiento compensatorio.

## ABSTRACT

The effect of protein source and total feed restriction on growth and gene expression was investigated on rose spotted snapper *Lutjanus guttatus*. First, a reference transcriptome was generated from eleven tissues (brain, heart, gonad, liver, gut, muscle, white skin, dark skin and visceral fat) with Illumina HiSeq 2000 platform. Trinity was used for the assembly, while annotation was done with Trinotate; 267,601 contigs were assembled with an average length of 845 bp; 86,677 putative proteins were identified. Sequences of interest were retrieved from the transcriptome in order to generate primers for gene expression analysis through qPCR. In brain, *pacap* was analyzed; in liver *igf1*, *igf2*, *ghr*, *lal*, *atg7* and *ulk1*; and in muscle, *mtor*, *igf1*, *igf2*, *myod1*, *myod2*, *myogenin*, *atg7*, *ulk1*, *foxo3a*, *foxo3b*, *murf1*, *mafbx*, *mstn1* and *mstn2*. A first feeding trial was run using three diets, one fish-meal based (FM), another with porcine meat meal and poultry by-products meal (PPM), and a vegetable protein diet formulated with soybean protein concentrate and corn gluten (VEG). VEG diet caused a reduced growth performance, as well as a reduction on expression of somatotropic and myogenic genes; however, an up-regulation of atrophy related genes could not be detected. The results indicated that VEG diet could not meet the nutrient requirements for *L. guttatus*. In a second feeding trial, *L. guttatus* juveniles were subjected to one week (1WF) and two weeks (2WF) of total feed restriction, with the purpose of inducing a compensatory growth response. After fasting, fish showed a reduced body mass and intense lipid reserve mobilization. Regarding gene expression, one week of fasting caused an up-regulation of proteolysis-related genes in muscle, but not in liver. On the other hand, two weeks of fasting caused unexpected changes on gene expression since protein degradation genes were not up-regulated. During re-feeding, an increased feed intake and growth rates were observed. The gene expression profile was not characterized by an up-regulation of growth-related genes in group 1WF; however, 2WF group did show an increased expression of some of these genes.

**Keywords:** myogenesis, atrophy, autophagy, proteosome, compensatory growth.

## 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento es un importante proceso fisiológico caracterizado por el aumento de dimensiones corporales. En ese sentido, el músculo esquelético ha recibido particular atención ya que conforma gran parte de la masa corporal. El crecimiento muscular, o más propiamente dicho, miogénesis, consiste en la generación de masa muscular a través de procesos de hipertrofia e hiperplasia. La hiperplasia involucra el reclutamiento de nuevas fibras musculares, mientras que la hipertrofia es el aumento de tamaño de las fibras ya existentes (Johnston, 2006). Los peces han sido un interesante modelo en el estudio del crecimiento, ya que poseen una notoria plasticidad muscular, además de tener la capacidad de crecer de forma indefinida, claro está que con sus excepciones, puesto que también existen especies de peces con crecimiento definido (Johnston, *et al.*, 2011). Si bien los primeros eventos miogénicos toman lugar en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, en el presente trabajo solo se discutirán aspectos sobre la regulación de la masa muscular en etapas juveniles.

El sistema de la hormona de crecimiento – factor de crecimiento tipo insulina (GH-IGF) es considerado el principal mecanismo responsable de la regulación del crecimiento en vertebrados. El sistema GH-IGF está controlado por el eje hipotálamo – pituitaria; las señales y estímulos son integrados en el hipotálamo y este a su vez, a través de hormonas inhibitoras o liberadoras, regula la liberación de GH de la pituitaria (Norris, 2006). En la glándula pituitaria, las células encargadas de la producción de GH son las células somatotropas, ubicadas en el *pars distalis* de la adenohipófisis, estas células han sido identificadas en los diferentes grupos de vertebrados (Norris, 2006). Algunos neuropéptidos que regulan la secreción de GH son la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), somatostatina, somatolactina, polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP), entre otros (Canosa *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2006). En varias especies de peces, la evidencia sugiere que PACAP tiene una mayor capacidad de estimular la producción de GH y quizás es más importante para este proceso que GHRH, al contrario de lo que sucede en mamíferos (Wong *et al.*, 2006). La influencia del eje somatotrópico en el crecimiento de los mamíferos y los peces ha sido documentada más extensivamente en comparación a los demás grupos de vertebrados. A través de distintas aproximaciones, desde la ablación de la hipófisis hasta el silenciamiento génico y la transgénesis, la importancia del sistema GH/IGF sobre el

crecimiento ha sido demostrado en numerosas especies de mamíferos y peces (Canosa *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2015).

Si bien existen diferencias, el mecanismo general así como las rutas que participan en los distintos aspectos del sistema GH/IGF se mantienen entre mamíferos y peces. Cuando las condiciones son adecuadas, es decir, cuando existe una suficiencia de nutrientes y energía, la GH tiene la función de estimular el crecimiento, esta hormona ejerce sus efectos a través de sus receptores (GHR). En peces, existen dos receptores de GH, GHR1 y GHR2, mismos que tienen una afinidad diferencial a GH, siendo GHR1 el homólogo al GHR de los mamíferos, que opera a través de la ruta de señalización JAK2/STAT5, mientras que GHR2 opera preferencialmente a través de las rutas ERK y PI3K/Akt (Kittilson *et al.*, 2011). Lo anterior implica que una vez que se une a su ligando, GHR se dimeriza y a través la ruta de señalización JAK2/STAT5, induce la transcripción de varios genes, principalmente de *igf1* e *igf2*, genes que codifican a los factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I e IGF-II, respectivamente), moléculas con una estructura similar a la insulina. Los receptores GHR se encuentran distribuidos en diferentes órganos y tejidos, pero se considera al hígado al principal órgano blanco de la GH, ya que en el hígado existe una densidad mayor de receptores para esta hormona, y la principal función de GH en este órgano es la inducción de la liberación de IGFs, de tal forma que también se le considera al hígado a la principal fuente endocrina de IGFs (Canosa *et al.*, 2007).

Los factores de crecimiento tipo insulina (IGFs) son péptidos relacionados con la insulina, capaces de estimular el crecimiento en el tejido muscular promoviendo la proliferación celular, diferenciación e hipertrofia, y la inhibición de la atrofia muscular (Fuentes *et al.*, 2013; Reindl y Sheridan, 2012). Los IGFs son capaces de inducir el crecimiento a través de la activación de distintas rutas de señalización, tales como PI3K/AKT. La ruta PI3K/AKT controla la síntesis de proteína a través de la activación mTOR, que a su vez regula la activación de P70S6K y 4EBP1, proteínas que controlan la iniciación de la traducción y elongación, y que en última instancia dan como resultado crecimiento por hipertrofia e hiperplasia muscular. La actividad de mTOR está directamente regulada por los IGFs, así como por aminoácidos libres (p. ej., leucina y arginina, aunque todos los aminoácidos son necesarios para una localización intracelular adecuada), de tal forma que la actividad de mTOR ha sido considerada como indicador del estatus nutricional y energético (Sengupta *et al.*, 2010; Schiaffino y Mammucari, 2011; Fuentes *et al.*, 2013). IGF-I es la hormona que se

ha considerado como principal efector de la GH. Por otro lado, IGF-II parece tener mayor relevancia en el desarrollo fetal o embrionario. En mamíferos, esta hormona se expresa en la placenta, y se considera un factor importante en la regulación del crecimiento y desarrollo embrionario en humanos (Constância *et al.*, 2002). En el caso de los peces, se ha registrado que IGF-II tiene una expresión significativamente más alta en etapas embrionarias, misma que va disminuyendo de forma gradual hacia etapas de desarrollo más avanzada (Gabillard *et al.*, 2005).

Además de la regulación neuroendocrina del crecimiento muscular por el eje GH/IGF, el crecimiento del músculo esquelético es también modulado de manera local por otros mecanismos. Los factores reguladores miogénicos (MRF) son un grupo de factores de transcripción que controlan la proliferación y diferenciación terminal de los mioblastos, y están conformados por MyoD, Myf5, Miogenina y Mrf4 (Buckingham y Rigby, 2014). La Miostatina, un miembro de la familia de factores de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ), tiene la capacidad de inhibir el crecimiento muscular al unirse al receptor de activina tipo-2 (ActRIIB), ocasionando la fosforilación de Smad2/3 para ejercer sus efectos en la transcripción de genes (Dayton y White, 2008).

El crecimiento resulta de un balance positivo entre procesos anabólicos y catabólicos, en este sentido, la degradación proteínica juega un papel crucial como proceso catabólico. La degradación proteínica ocurre a través de diversas rutas, una de las más importantes es la ubiquitinación - proteosoma. La ubiquitinación se lleva a cabo por 3 tipos de enzima: enzimas E1 o activadoras de la ubiquitina, enzimas E2 o conjugadoras de ubiquitina, y por último, enzimas E3 o también conocidas como ligasas de ubiquitina, que son encargadas del reconocimiento del sustrato y que presentan especificidad por ciertos sustratos. Numerosas enzimas E3 han sido identificadas, sin embargo, dos de ellas son reguladas positivamente en varios modelos de pérdida muscular, a saber, MuRF1 (Muscle Ring Finger protein 1) y MAFbx (Muscle Atrophy F-box), también conocida como Atrogin-1 (Bonaldo y Sandri, 2013). La transcripción de estas enzimas es regulada por una serie de factores de transcripción que pertenecen a la familia FoxO, que al mismo tiempo son controlados por la ruta PI3k/AKT. Normalmente, AKT bloquea la actividad de FoxO manteniéndolo en un estado fosforilado. Sin embargo, cuando AKT presenta una actividad reducida, FoxO se transloca al núcleo celular y regula positivamente la transcripción de MuRF-1 y MaFbx (Bonaldo y Sandri, 2013). El conocimiento de los mecanismos mencionados previamente en

modelos de peces es todavía escaso y está enfocado principalmente en patrones de expresión bajo condiciones de ayuno/alimentación (Bower *et al.*, 2010; Fuentes *et al.*, 2012; Tacchi *et al.*, 2012; Heidari *et al.*, 2015; Mareco *et al.*, 2015).

Otra razón por la que el crecimiento ha sido ampliamente estudiado en peces, es por la importancia que tienen para la acuicultura. Se han utilizado distintos enfoques para estudiar el crecimiento en peces, principalmente con la finalidad de maximizar las tasas de crecimiento y de optimizar recursos, ya que se espera que la acuicultura siga creciendo a nivel mundial para satisfacer la demanda de pescado, y consecuentemente, la necesidad de proteína de alta calidad para la manufactura de alimentos acuícolas. Históricamente, la harina de pescado ha sido la fuente de proteína más utilizada (FAO, 2016). Por su alto contenido de proteína cruda, perfil de aminoácidos y perfil de ácidos grasos, se considera una excelente fuente proteínica, pero su disponibilidad es una gran desventaja, ya que su precio está sujeto a grandes variaciones estacionales, principalmente atribuidas a eventos climatológicos y a la sobreexplotación de poblaciones de pequeños peces pelágicos que son utilizados para la elaboración de este insumo (Olsen y Hasan, 2012; Shepherd y Jackson, 2013). Esto ha llevado a la búsqueda de ingredientes alternativos que tengan una mayor disponibilidad y una mejor sostenibilidad a largo plazo, tales como las harinas vegetales y las harinas de subproductos de animales terrestres (Naylor *et al.*, 2009). Sin embargo, los cambios que pudieran realizarse en la dieta de los peces en engorda, podrían activar diferentes respuestas fisiológicas que finalmente afectan el crecimiento.

Otro enfoque que se ha empleado para estudiar y buscar estrategias para maximizar el crecimiento, es a través de la inducción del crecimiento compensatorio. El crecimiento compensatorio ha sido descrito como un período de crecimiento acelerado una vez que ciertas condiciones que retrasan el crecimiento han sido superadas o aliviadas. Este proceso ha sido observado en una gran cantidad de taxones, desde plantas hasta mamíferos y se reconoce como una respuesta adaptativa a las variaciones estacionales ambientales que afectan el estatus bioenergético de los organismos (Wilson y Osbourn, 1960; Ali *et al.*, 2003; Geiger *et al.*, 2012; Reichert *et al.*, 2014).

La compensación en el crecimiento puede presentarse después de una variedad de condiciones que retrasan o paralizan dicho proceso. Estas pueden ir desde temperaturas inadecuadas, hipoxia, fluctuaciones en la salinidad, estrés por sobre-población, restricción de



alimento parcial o total, siendo este último el factor más estudiado. La restricción de alimento, ya sea parcial o total, genera una serie de cambios en el sistema neuroendocrino, que una vez que el alimento está disponible en cantidades suficientes, los organismos aumentan su ingesta significativamente (hiperfagia) y empiezan a crecer a tasas aceleradas. La respuesta de hiperfagia también dependerá de la duración del periodo de restricción. Algunos estudios han demostrado que los individuos que experimentan una etapa de crecimiento compensatorio pueden acelerar la tasa de crecimiento al grado de alcanzar a aquellos que se han alimentado de forma constante (Hayward *et al.*, 1997; Chatakondi, 2001; Ali *et al.*, 2003). El hecho de que los organismos puedan exhibir este comportamiento, indica que existe una optimización de los recursos en función de su disponibilidad, pues además de las tasas de crecimiento más rápidas, también se presenta un aumento en la eficiencia de la conversión de alimento (Won y Borski, 2013). Es por lo anterior que inducir el crecimiento compensatorio de manera intencional en el cultivo ha sido propuesto como estrategia para mejorar tasas de crecimiento y también para ahorrar alimento en al menos algunas etapas del proceso de producción.

Dependiendo del grado de compensación, el crecimiento compensatorio puede clasificarse en compensación completa, parcial, no compensación y sobrecompensación. La compensación completa ocurre cuando los animales sometidos a una restricción alimentaria alcanzan el mismo tamaño, a la misma edad, que aquellos animales que se alimentaron continuamente. En la compensación parcial los organismos con restricción alimentaria, a pesar de que mostraron tasas de crecimiento más altas durante la fase compensatoria, no lograron alcanzar a aquellos que no sufrieron restricción. La no compensación ocurre cuando el crecimiento se queda estancado, probablemente a causa de una restricción muy severa. Y por último la sobrecompensación, que es cuando los organismos privados de alimento, a la misma edad, superan en tamaño a los organismos alimentados continuamente (Ali *et al.*, 2003).

Durante el ayuno, los organismos experimentan una serie de cambios en la regulación endocrina. Existe una teoría llamada “lipo-estática” (en inglés Lipostat) (Jobling y Johansen, 1999). Esta teoría señala que en condiciones en las que no existe restricción de alimento, la utilización de las reservas lipídicas se mantiene estática; sin embargo, ciertos estímulos o condiciones como el ayuno prolongado activan ciertos mecanismos que movilizan las reservas lipídicas para utilizarse como sustrato energético. Una vez que el ayuno termina, la acumulación de respuestas humorales induce al organismo a tener una respuesta de hiperfagia

para recuperar las reservas utilizadas. En otras palabras, este modelo nos dice que la cantidad de reservas lipídicas son las que modulan en gran medida la ingesta de alimento.

La GH tiene diferentes efectos dependiendo del estado metabólico. En el caso del ayuno prolongado, su papel es el de la movilización de lípidos. Primeramente, se ha observado que conforme el tiempo de ayuno transcurre, la concentración de GH en plasma aumenta. Dicho aumento es mediado por una reducción en los niveles de nutrientes, por la acción de distintas hormonas orexigénicas como la ghrelina y el neuropéptido Y, y por la falta de retroalimentación negativa en el hipotálamo y la pituitaria por parte de IGF-I (Won y Borski, 2013). Adicionalmente, en condiciones de inanición, existe una resistencia hepática a la GH, misma que es regulada por la somatostatina y el cortisol; ambos reducen la transcripción y producción de GHR, y en el caso de la somatostatina, es capaz de internalizar los receptores GHR por mecanismos que aún no han sido bien esclarecidos, inhibiendo de este modo la interacción entre GH y GHR (Sheridan y Hagemester, 2010). Lo anterior da como resultado que tanto la transcripción como la producción de IGF-I se vean reducidas dramáticamente, y por ende, el crecimiento somático se ve estancado.

El pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) es un importante recurso pesquero con gran potencial para la acuicultura comercial en varios países latinoamericanos. La investigación en esta especie ha llevado a la elaboración de protocolos para su reproducción y crianza bajo condiciones de granja (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2012; Ibarra-Castro *et al.*, 2012), así también se ha podido generar conocimiento sobre sus requerimientos nutricionales utilizando ingredientes de menor costo y con mayor sustentabilidad (García-Ortega, 2009; Hernández *et al.*, 2016); sin embargo, la información genómica y transcriptómica para esta especie y todas las pertenecientes a la familia Lutjanidae es muy escasa, siendo esto una limitación para la investigación de este grupo de peces. Por lo tanto, se consideró esta una oportunidad para mejorar la capacidad de estudiar esta especie en un contexto fisiológico al generar un transcriptoma de referencia.

El propósito del presente trabajo fue generar un transcriptoma de referencia para *L. guttatus*, con la finalidad de proporcionar una herramienta para investigaciones posteriores en esta y en otras especies cercanas, así como de analizar mecanismos involucrados en la regulación del crecimiento a través de dos aproximaciones, el uso de fuentes de proteína alternativas y la inducción de crecimiento compensatorio a través de la restricción total de alimento.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios Transcriptómicos en Peces

La transcriptómica se refiere al estudio del conjunto de transcritos de una célula, tejido u organismo completo bajo condiciones específicas o en alguna etapa de desarrollo. Dicho conjunto de transcritos es conocido como transcriptoma, y puede incluir ARN mensajero, ARN de transferencia, ARN ribosomal y otros tipos de ARN. La principal diferencia entre genoma y transcriptoma, es que el primero es relativamente estable, mientras que el segundo varía constantemente en función tanto de las condiciones fisiológicas como de las condiciones ambientales (Qian *et al.*, 2014).

Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que se han desarrollado en los últimos años han sido ampliamente utilizadas en estudios genómicos y transcriptómicos, puesto que su principal ventaja es que no se necesita información previa. Esto ha facilitado en gran manera el estudio de la biología molecular, sobre todo en organismos no-modelo. La secuenciación del transcriptoma, o también conocida como RNA-seq, involucra no solamente la secuenciación del ARN, sino que también incluye el procesamiento de las lecturas generadas así como el ensamblaje, mapeo, anotación, análisis de expresión diferencial, entre otros procedimientos, para los cuales también se han tenido que desarrollar las herramientas informáticas necesarias.

Se han generado transcriptomas de referencia para distintas especies de peces; por ejemplo, en el caso de la trucha arcoíris se han publicado distintos transcriptomas de referencia con una complejidad progresiva gracias a los avances en tecnologías de secuenciación que han ido surgiendo con el paso de los años, así como al desarrollo de herramientas para el análisis bioinformático. Por ejemplo, Sánchez *et al.* (2011) generaron un transcriptoma de referencia para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por pirosecuenciación utilizando una mezcla de ARN de branquias, cerebro, hígado, bazo, riñón y músculo a través de la plataforma GS FLX Titanium; se generaron 3, 160,306 lecturas de alta calidad mismas que fueron ensambladas en 110,031 *contigs*. Salem *et al.* (2015) publicaron un transcriptoma de referencia de 13 órganos (cerebro, músculo blanco, músculo rojo, grasa, branquias, riñón cefálico, riñón, intestino,

bazo, estómago, hígado y testes) de trucha arcoíris (*O. mykiss*) utilizando la plataforma Illumina Genome Analyzer Iix, generando 1167 millones de lecturas pareadas, que al ser ensambladas resultaron en 474,524 *contigs* con una longitud mayor a 500 pares de bases. Caldach-Giner *et al.* (2013) presentaron un transcriptoma de músculo esquelético, intestino, riñón cefálico y sangre de dorada (*Sparus aurata*), utilizando la plataforma Titanium GS FLX 454 de Roche; obtuvieron casi 3 millones de lecturas, a partir de las cuales se ensamblaron 125,263 *contigs* y 21,384 lograron ser anotadas.

En lo que respecta a estudios transcriptómicos enfocados particularmente a aspectos relacionados con crecimiento en peces existen varias publicaciones. Para dorada (*Sparus aurata*), Garcia de la Serrana *et al.* (2012) generaron un transcriptoma de músculo esquelético de contracción rápida, a partir de muestras de ARN de peces sometidos a distintos esquemas de alimentación y temperatura (saciedad, ayuno por 3 días, transferencia a baja temperatura [11 °C] y transferencia a alta temperatura [33 °C]) obteniendo 43,461 *contigs* en total, con longitud de más de 100 pares de bases, de las cuales 10,465 fueron anotadas exitosamente y con los que se pudieron representar 344 rutas biológicas en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés).

Palstra *et al.* (2013) publicaron un estudio sobre expresión diferencial en tejido muscular de trucha arcoíris, en el que se examinaron los cambios inducidos por la actividad de nado prolongado (1176 km) tanto en músculo oscuro como en músculo blanco. El nado constante provocó un aumento en la actividad transcripcional del tejido muscular, induciendo la expresión de genes involucrados en crecimiento muscular y procesos de desarrollo.

En un estudio realizado por He *et al.* (2015) sobre el crecimiento compensatorio de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), se compararon los efectos inducidos por las condiciones de inanición y realimentación en tejido muscular y hepático. Los autores encontraron 4061 genes expresados diferencialmente en músculo y 1988 en hígado bajo condiciones de inanición con relación a los controles. Gran parte de los genes que se sobre-expresaron fueron aquellos involucrados en procesos de degradación, como ubiquitinación de proteínas, mientras que los genes sub-expresados estaban involucrados en metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos. Después de la realimentación, 349 genes se expresaron diferencialmente en músculo y 247 en hígado. En este caso los genes sobre-expresados

fueron aquellos relacionados a la síntesis de proteínas de tipo muscular y metabolismo de ácidos grasos, mientras que los procesos de degradación fueron regulados de forma negativa.

Mareco *et al.* (2015) generaron un transcriptoma de músculo de contracción rápida y de músculo de contracción lenta en el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) con la finalidad de incrementar la información sobre esta especie, comparar los fenotipos de músculo lento y rápido a nivel transcriptómico e investigar el efecto del ayuno y realimentación sobre los procesos de des-ubiquitinación mediados por proteasas específicas de ubiquitina (USP). Se generaron 504,065 *contigs*, a partir de los cuales se identificaron cerca de 15,000 genes. A partir de dicho transcriptoma pudieron ser identificadas 45 proteasas USP, mismas que fueron analizadas a través de qPCR en condiciones de ayuno y realimentación.

García de la Serrana *et al.* (2015) compararon el transcriptoma del músculo rápido entre especímenes silvestres de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y los de una línea transgénica para GH, de la misma especie. Ambos grupos, previamente alimentados con la misma ración, se sometieron a 24 horas de ayuno. Se obtuvieron más de 700 millones de lecturas pareadas, que a su vez se ensamblaron en un transcriptoma de 323,155 *contigs*, a partir de los cuales se identificaron 19,093 genes. Los peces transgénicos mostraron una mayor expresión de genes asociados a la síntesis de proteína.

Rescan *et al.* (2017) investigaron el fenómeno de crecimiento compensatorio en trucha arcoíris, sometiendo a los organismos a restricción de alimento y a una subsecuente realimentación. Con ayuda de secuenciación masiva, encontraron que la respuesta de crecimiento compensatorio en el tejido muscular se caracterizaba por presentar un perfil de expresión de tipo hipertrófico y no hiperplásico, concluyendo los autores que el crecimiento compensatorio resultaba por hipertrofia.

En lo que respecta a especies de la familia Lutjanidae, Zhang *et al.* (2015) generaron dos transcriptomas para el pargo carmesí (*Lutjanus erythropterus*), uno para piel oscura y otro para piel clara. El propósito de dicho estudio fue comparar la expresión genes en los dos tipos de piel y generar información sobre los mecanismos que regulan la pigmentación y los patrones de coloración en estos organismos.

## 2.2 Estudios sobre Fuentes de Proteína en Peces y Efectos en Crecimiento

El uso de fuentes alternativas de proteína en la manufactura de alimentos acuícolas ha sido investigado en una gran cantidad de especies marinas y de agua dulce. Generalmente, los altos niveles de proteína de origen vegetal en dieta afectan de forma negativa el crecimiento de los peces por la carencia de aminoácidos esenciales y por la presencia de factores nutricionales (Francis *et al.*, 2001). Puesto que las fuentes de proteína vegetal se caracterizan por carencia de aminoácidos esenciales, en algunos estudios se ha probado la suplementación con aminoácidos esenciales, como metionina o lisina, con el propósito de compensar la falta de dichos nutrientes en la dieta. En algunas investigaciones se han probado otras fuentes de proteína como complementación a las proteínas vegetales; por ejemplo, el uso de hidrolizados o inclusive, el uso de proteínas poco convencionales como la harina de insectos o gusanos.

La trucha arcoíris ha sido uno de los peces más estudiados dentro del contexto del reemplazo de la harina de pescado. Se han probado una gran diversidad de ingredientes alternativos así como el efecto de estos a distintos niveles de inclusión en el alimento. Por ejemplo, Wacyk *et al.* (2012) examinaron la sustitución de la harina de pescado por una mezcla vegetal (aislado de proteína de soya y gluten de maíz) en distintas proporciones. Estos autores observaron una reducción significativa en el crecimiento y un aumento de aminoácidos libres en plasma; mientras que la expresión génica en hígado se vio afectada. La expresión de *alt1* (alanina amino transferasa) y *gls02* (glutamina sintetasa) se redujo, mientras que *redd1* se sobre-expresó; *redd1* se ve sobre-expresado en condiciones de estrés, por lo que los autores indican que las proteínas de origen vegetal pudieran ser considerados como un factor estresante, en este caso por la deficiencia de aminoácidos. Como se mencionó previamente, la metionina es un aminoácido esencial, además, las proteínas de origen vegetal son deficientes en este aminoácido, por lo que la deficiencia y la suplementación con metionina han sido investigadas en estudios de esta naturaleza. Una deficiencia de este aminoácido en la dieta de trucha arcoíris provoca menor ganancia en peso y una reducción en la expresión de factores de iniciación de transcripción (p. ej., *s6* y *eIF2a*); mientras que por otro lado, provoca un aumento en la expresión de genes involucrados en procesos proteolíticos, como la autofagia y la ubiquitinación (p. ej., *atg4b*, *atg121*, *Uvrag*, *SQSTM1*, *MuRF2*, *MuRF3*, *Fbx32*, *ZNF21*, *Trim32*) (Belghit *et al.*, 2014). En un trabajo posterior, para esta misma especie de salmónido,

se encontró que la deficiencia de metionina también está asociada a un aumento en la expresión de genes involucrados en otros mecanismos de metabolismo de aminoácidos como es el caso de los genes *atf4*, *asns*, *snat2*, *cat1*, que son activados a través de la ruta de Control general no-reprimible /factor de iniciación eucariótico 2-alfa (GCN2/eIF2a). Por otro lado, el exceso de metionina se relacionó con un aumento en la expresión de genes involucrados en procesos de síntesis de lípidos (*fas*), oxidación de lípidos (*hoad*), gluconeogénesis (*g6pasa*, *pepck*) y catabolismo de aminoácidos (*gdh1* y *gdh2*) (Skiba-cassy *et al.*, 2016).

Por su importancia comercial, el salmón del Atlántico también ha sido ampliamente estudiado en cuanto a los efectos del reemplazo de la harina de pescado. Tacchi *et al.* (2012) probaron el reemplazo de la harina de pescado por una mezcla de proteínas de origen vegetal (gluten de maíz, harina de girasol, harina de colza, gluten de trigo, concentrado de proteína de soya) suplementada con los aminoácidos lisina y metionina; con ayuda de microarreglos, observaron el efecto en la expresión de genes en intestino, hígado y músculo. En el caso del intestino, se observó un aumento en la expresión de genes relacionados a la enteritis, metabolismo de proteína y energía, actividad mitocondrial, mientras que también se registró una disminución en los procesos de proliferación y apoptosis. En cuanto al hígado, la respuesta inmune se vio afectada de manera negativa, mientras que la proliferación celular y apoptosis se vieron reguladas de manera positiva. En lo que respecta a los procesos de respuesta inmune, el metabolismo de proteína, la proliferación celular y la apoptosis del tejido muscular, todos fueron afectados de forma negativa. También se ha investigado el efecto que podría ocasionar una deficiencia de metionina en la dieta de esta especie. Espe *et al.*, (2016) encontraron que esto puede ocasionar una menor ganancia de masa asociada a una reducción en la tasa de acreción de proteína; asimismo, observaron una disminución en los niveles de ARNm de *igf1* y de *mlc2*, mientras que diferentes catepsinas tuvieron un aumento en su expresión; sin embargo, los marcadores de proteólisis, *mafbx* y *murfl*, no presentaron cambio alguno en su expresión.

En lobina europea (*Dicentrarchus labrax*), se investigó el efecto de reemplazar tanto la fuente de proteína como la fuente de lípidos, en el crecimiento y la expresión génica en hígado, a través de microarreglos. Se reemplazó a la harina de pescado por una mezcla de proteínas vegetales (gluten de maíz, harina de soya, gluten de trigo y harina de chícharo) y el aceite de pescado por aceite de linaza y lecitina de soya. El crecimiento fue afectado de forma negativa en los peces alimentados con la dieta vegetal, mientras que en el perfil de expresión hepática,

los procesos relacionados con la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y de colesterol se vieron aumentados de forma significativa (Geay *et al.*, 2011).

El uso de proteína de soya afecta negativamente el crecimiento y la expresión de *igf1* en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*); sin embargo, la suplementación con hidrolizados de pescado de bajo peso molecular mejoró el desempeño en el crecimiento y en la expresión de *igf1* (Zheng *et al.*, 2014).

Wang *et al.* (2016) examinaron el efecto que podría ocasionar una dieta deficiente en metionina en la cobia (*Rachycentron canadum*), encontrando menores tasas de crecimiento posiblemente causado por una disminución en la expresión de *igf1*, mientras que por otro lado, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en la respuesta de aminoácidos modulada por *gcn2*, *atf4*, *c/ebp* y *asns*.

En el turbot (*Scophthalmus maximus*) se examinó el efecto de la sustitución de la harina de pescado por harina vegetal en los niveles de reemplazo del 30 y 40%, además del efecto de la suplementación con harina de gusano en un 3% a cada una de dichas dietas. Los autores encontraron que la sustitución del 40% afectó el crecimiento de forma negativa; sin embargo, al suplementarla con harina de gusanos, se pudo mejorar el crecimiento a través de una mejora en la digestibilidad, un incremento en la actividad de tripsina y señalización mTOR (Q. Wang *et al.*, 2016). En la misma especie, también se observó el efecto de la sustitución en un 40% de harina de pescado por una mezcla de proteínas de origen vegetal (harina de trigo, proteína de soya, gluten de maíz), además de una disminución en crecimiento, se observó una concentración menor de aminoácidos esenciales en el músculo de los peces tratados. La expresión génica también fue analizada, específicamente de genes involucrados en el transporte de aminoácidos en intestino, los cuales sufrieron un aumento en su expresión, mientras que en músculo, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en transporte de aminoácidos, catabolismo y anabolismo de aminoácidos, así como genes de la respuesta de aminoácidos (AAR), ruta que es activada durante la restricción de aminoácidos (Xu *et al.*, 2017).

En el pargo flamenco también se ha investigado el efecto de fuentes alternativas de proteína sobre el crecimiento. Silva-Carrillo *et al.* (2012) examinaron el efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de soya. Los autores reportaron que en niveles de sustitución



por encima del 20%, el crecimiento se ve afectado de manera negativa; sin embargo, los efectos a nivel molecular no han sido examinados.

### 2.3 Restricción de Alimento y Crecimiento Compensatorio en Peces

Como se explicó anteriormente, el crecimiento compensatorio es una etapa de crecimiento acelerado que ocurre después de que ciertas condiciones que detienen el crecimiento son aliviadas. Wilson y Osbourn (1960) presentaron un extensivo trabajo sobre crecimiento compensatorio en mamíferos y aves, donde logran identificar variables importantes en este fenómeno como son la naturaleza de la restricción, el grado de severidad de desnutrición, la duración de la restricción, la etapa de desarrollo en la que ocurre dicha restricción, la rapidez con la que alcanzan la madurez sexual los animales y la forma en la que se da la realimentación.

En peces, una gran parte de las primeras investigaciones sobre crecimiento compensatorio fueron realizadas en salmónidos. Uno de los primeros trabajos sobre crecimiento compensatorio en peces fue realizado por Dobson y Holmes (1984) en trucha arcoíris (*O. mykiss*), donde observaron que estos peces eran capaces de hacer un uso más eficiente del alimento y crecer a tasas mayores después de ser sometidos a ayuno. En la trucha del Ártico (*Salvelinus alpinus*), Miglavs y Jobling (1989) no observaron una respuesta de crecimiento compensatorio en truchas sometidas a 8 semanas de ayuno y 8 semanas de realimentación; sin embargo, pudieron observar que los peces presentaban una recuperación notoria en sus reservas, principalmente en el hígado. En un estudio posterior para esta misma especie, Jobling *et al.* (1993) reportaron una respuesta de crecimiento compensatorio al probar distintos regímenes de ayuno-realimentación más cortos que en el estudio previo (1:1, 1.5:1.5 y 3:3, semanas de ayuno y semanas de realimentación respectivamente). En esta ocasión, con peces de mayor talla, encontraron que los peces inmaduros (machos y hembras) mostraron tasas de crecimiento más altas que los peces maduros (machos). Mortensen y Damsgård (1993) examinaron el efecto de la temperatura y la duración del fotoperiodo en el salmón del Atlántico y en la trucha del Ártico, encontrando que los peces exhibían una respuesta de mayor crecimiento al ser transferidos de un régimen de baja temperatura (2 °C) y duración corta de fotoperiodo (6 horas de luz), a un régimen de temperatura más cálida (11 °C) e

iluminación continua. Skilbrei (1990) reportó para el salmón del Atlántico, que aquellos machos que maduran tempranamente, caracterizados por tener un menor tamaño y una resistencia más baja a la esmoltificación en comparación con aquellos peces que alcanzan mayor tamaño y maduran en el océano, son capaces de presentar altas tasas de crecimiento cuando el alimento es abundante, mostrando una compensación en el crecimiento. Johansen *et al.* (2001) observaron una relación entre la severidad de la restricción alimenticia, la duración de la respuesta hiperfágica, la recuperación de las reservas lipídicas y la ganancia en peso en el salmón del Atlántico, concluyendo que la respuesta de crecimiento compensatorio está modulada en parte por las reservas, dando evidencia esto de una regulación lipostática.

Se ha logrado inducir el crecimiento compensatorio con bastante variabilidad en los grados de compensación en distintas especies. Por ejemplo, en híbridos de pez sol (*Lepomis cyanellus* X *Lepomis macrochirus*) se logró inducir crecimiento sobre-compensatorio, llegando a doblar el tamaño final de los peces en comparación del grupo control, utilizando un esquema de dos días de restricción completa y posteriormente alimentación *ad libitum* mientras se presentara una respuesta de hiperfagia con respecto a la ingesta del grupo control, una vez que dicha respuesta se detenía, se volvía a dejar de alimentar por 2 días, y así sucesivamente; la restricción por 14 días también logró buenos resultados, resultando en un crecimiento 1.4 veces mayor al control (Hayward *et al.*, 1997). En bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) se utilizó un esquema parecido, con ciclos de 0, 1, 2 y 3 días de restricción, y una posterior realimentación mientras los peces estuvieran mostrando una respuesta de alimentación hiperfágica; una vez que la hiperfagia desaparecía, nuevamente se sometía a los peces al mismo tratamiento al que habían sido sometidos; en este caso los peces que eran privados de alimento por 3 días tuvieron un mayor crecimiento que todos los demás grupos (Chatakondi, 2001). En el barramundi (*Lates calcarifer*) se logró inducir crecimiento compensatorio con una sola fase de restricción alimenticia por una semana (Tian y Qin, 2004). En algunos estudios han reportado la falta de crecimiento compensatorio; por ejemplo, en la dorada (*Sparus aurata*) no se logró inducir ninguna modificación en la ingesta de alimento ni en la tasa de crecimiento tras 1 o 2 semanas de inanición (Peres *et al.*, 2011). Por otro lado, algunos autores señalan que es necesario considerar tanto longitud como peso ganado al momento de analizar el crecimiento compensatorio. Bavčević, *et al.* (2010) observaron que el crecimiento compensatorio en la dorada (*S. aurata*) es capaz de restaurar el peso más no la longitud, y concluyeron que por cada etapa de restricción o inanición, existe una pérdida permanente en el potencial de crecimiento durante esa etapa, puesto que la

longitud limita el peso máximo que los peces son capaces de alcanzar en determinado periodo.

Como se mencionó previamente, los cambios que ocurren en la regulación endocrina durante la restricción de alimento y la posterior realimentación propician la respuesta de crecimiento compensatorio. Won y Borski (2013) presentan una detallada reseña sobre los cambios a nivel endocrino que ocurren durante la inanición y durante el crecimiento compensatorio. Como se explicó en la sección anterior, la restricción de alimento provoca un aumento en la concentración de hormonas orexigénicas y una disminución en las hormonas anorexigénicas, acompañado de un aumento en la concentración de GH en plasma. En la realimentación, la acumulación de hormonas orexigénicas ocasiona una respuesta de hiperfagia que junto con las elevadas cantidades de GH en plasma, ocasionan una respuesta de crecimiento acelerado caracterizada por una sobreproducción de IGF-I.

Sin embargo, algunas discrepancias han sido documentadas en varias especies. Picha *et al.* (2006) en la lubina rayada híbrida (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*), observaron un aumento de 82% en la transcripción de *igf1* en hígado, mientras que los niveles en plasma de IGF-I disminuyeron durante la restricción de alimento. Por el contrario, durante la realimentación se observó el efecto contrario, la transcripción de *igf1* disminuyó en un 62% mientras que los niveles en plasma aumentaron un 86%. En un estudio posterior para la misma especie, el mismo grupo de investigación, a través de una aproximación un tanto distinta (normalizando la expresión génica en función del ARN total en hígado) en lubina híbrida rayada, observaron una disminución de forma endocrina y paracrina de IGF-I, a nivel de expresión génica y en los niveles en plasma después de 3 semanas de inanición. Asimismo, registraron una reducción en los receptores hepáticos *ghr1* y *ghr2*. Por el contrario, durante la respuesta de crecimiento compensatorio observaron un incremento significativo en estos componentes del eje somatotrópico durante la realimentación (Picha *et al.*, 2008).

Srijila *et al.* (2014) investigaron el efecto de la restricción parcial de alimento (5, 25, 50 y 75% de la saciedad) y realimentación en el rohú (*Labeo rohita*), con una duración de 6 semanas en cada fase. Durante el ayuno, los peces no mostraron diferencias en los niveles de expresión de GH en la glándula pituitaria. Durante la etapa de realimentación, la compensación en el crecimiento solo fue observada en los peces sometidos a una restricción

moderada (50 y 75% de saciedad). Los peces de los grupos 25 y 50% mostraron una expresión más elevada de GH en esta segunda etapa.

Al ser un componente mayoritario, el tejido muscular ha sido un importante objeto de estudio dentro del marco del crecimiento compensatorio. De forma general, lo que se espera es una regulación negativa de aquellos procesos involucrados en la hiperplasia e hipertrofia muscular durante la restricción alimenticia. Por el contrario, los procesos proteolíticos son regulados de manera positiva. Durante la realimentación subsecuente, los procesos de crecimiento son reanudados mientras que la actividad de los procesos de degradación se ve disminuida.

Posiblemente la especie más estudiada en cuanto al crecimiento compensatorio y la dinámica de la expresión génica en este fenómeno es la trucha arcoíris. Uno de los primeros trabajos donde se aborda la regulación del crecimiento muscular a nivel molecular fue el de Chauvigné *et al.* (2003), donde midieron los cambios de expresión en *igf1*, *igf2*, receptores de IGF, factores de crecimiento de fibroblastos *fgf2* y *fgf6*, así como la expresión de *mstn*. Johansen y Overturf (2006) examinaron cambios en la expresión génica de factores miogénicos y miostatina, analizando mediante qPCR la expresión de *myod2*, *myf5*, *myogenin*, *myosin*, *mef2c*, *mef2c*, *mstn1* y *mstn2*. Rescan *et al.* (2007) estudiaron la dinámica en la expresión génica en trucha arcoíris sometida a 30 días de ayuno y 36 días de realimentación a través de microarreglos. En el análisis lograron identificar cuatro grupos de expresión. Un primer grupo de 1020 genes con alta expresión, involucrados en su mayoría en procesos de catabolismo, correspondiente al periodo de ayuno. Un segundo grupo con una expresión transitoria de los 4 a los 11 días después de realimentar a los peces, caracterizado por genes relacionados a la transcripción, biogénesis de ribosomas, traducción, actividad de chaperones, producción de ATP y división celular. Un tercer grupo con 480 genes sobreexpresados de los 7 a los 36 días post-realimentación, conformado por genes codificantes de proteínas sarcoméricas y de dinámica del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático. Un cuarto grupo de 200 genes sobreexpresados a los 36 días post-realimentación, involucrados en el metabolismo de carbohidratos y síntesis de lípidos. Seiliez *et al.* (2010) en un estudio *in vitro*, encontraron que la restricción de nutrientes ocasionaba una sobreexpresión en genes involucrados en autofagia (*lc3b*, *gabap11*, *atg121*, *atg4b*), exponiendo a miocitos de trucha a agotamiento de nutrientes. El mismo fue encontrado *in vivo*, con truchas sometidas a 14 días de ayuno. Rescan *et al.* (2017) investigaron el fenómeno de crecimiento compensatorio,

sometiendo a los organismos a restricción de alimento y a una subsecuente realimentación utilizando un enfoque transcriptómico con ayuda de secuenciación masiva. Encontraron que la respuesta de crecimiento compensatorio en el tejido muscular se caracterizaba por presentar un perfil de expresión de tipo hipertrófico y no hiperplásico, concluyendo los autores que el crecimiento compensatorio resultaba por hipertrofia.

En el lenguado fino (*Paralichthys adspersus*), la restricción de alimento por tres semanas ocasionó un aumento en la expresión de las ligasas de ubiquitina E3 *murfl* y *mafbx*, además de un incremento en la ubiquitinación de proteínas, condiciones que pudieron ser revertidas desde la primer hora post-realimentación (Fuentes *et al.*, 2012). Valenzuela *et al.* (2015) examinaron los cambios en la transcripción de 28 genes involucrados en distintos procesos fisiológicos como estrés, atrofia, crecimiento y sistema inmune en músculo esquelético de esta misma especie de lenguado, durante inanición y realimentación. De manera general, el ayuno provocó una disminución en los marcadores de sistema inmune, mientras que la respuesta a estrés y atrofia se vio incrementada. En la realimentación, los genes de estrés y atrofia disminuyeron, mientras que los genes relacionados a crecimiento y sistema inmune fueron regulados de forma positiva.

Nebo *et al.* (2013) analizaron las variaciones en la expresión en *myod*, *myogenin* y *mstn* en el músculo esquelético de tilapia *O. niloticus*, utilizando diferentes esquemas de ayuno y realimentación. Durante el ayuno, los autores observaron signos de atrofia muscular acompañada de una disminución en la expresión de *myod* y *myogenin* sin importar el tiempo de ayuno, mientras que *mstn* se veía sobreexpresada. Al final del periodo de realimentación, los organismos tratados mostraron una compensación en el crecimiento, además que los niveles de expresión de los genes estudiados se estabilizaron con los de los organismos control.

En *Megalobrama amblycephala*, Zhu *et al.* (2014) estudiaron el patrón de expresión de *myogenin* en músculo blanco durante el crecimiento compensatorio. Durante la etapa de restricción, la cual tuvo una duración de 21 días, la expresión de *myogenin* disminuyó significativamente; sin embargo, la realimentación por una semana provocó un gran incremento en la expresión del mismo.

En la dorada (*S. aurata*) se examinó, a través de qPCR, el sistema de ubiquitinación-proteosoma y el sistema de las catepsinas, otro importante mecanismo de degradación proteínica en el tejido muscular. El ayuno por 15 y 30 días ocasionó una elevación en los niveles de expresión de las catepsinas *ctsb*, *ctsl*, *ctsa* y *ctsd*, así como un aumento en la expresión de genes del sistema U-P *n3*, *ub*, *murfl* y *mafba*. La realimentación ocasionó una reducción significativa en todos los genes analizados. Los autores señalaron que tanto el sistema U-P como la ruta de las catepsinas, trabajan de forma coordinada durante la inanición, y que dicho aumento en la proteólisis puede tener implicaciones en la calidad *post-mortem* de la carne (Salmerón *et al.*, 2015).

Para salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) transgénico para GH se generó un transcriptoma de músculo rápido. Dicho transcriptoma fue comparado contra el de peces de tipo silvestre. Ambos grupos, previamente alimentados con la misma ración, se les sometió a 24 horas de ayuno. Los peces transgénicos mostraron una mayor expresión de genes asociados a la síntesis de proteína (García de la Serrana *et al.*, 2015).

El pacú (*Piaractus mesopotamicus*) es una especie de importancia acuícola, caracterizada por su rápido crecimiento. Mareco *et al.* (2015) investigaron el efecto del ayuno y realimentación sobre los procesos de des-ubiquitinación mediados por proteasas específicas de ubiquitina (USP) en músculo de contracción lenta y en músculo de contracción rápida. A partir de un transcriptoma que generaron para tejido muscular, pudieron identificar 45 proteasas USP, de las cuales 18 fueron seleccionadas para un posterior análisis de expresión génica por qPCR en condiciones de ayuno-realimentación, junto con algunos componentes de la ruta PI3K/Akt y algunas ligasas E3 de ubiquitina, incluyendo *murfl* y *mafba*. De forma general, durante el ayuno y las 6 horas posteriores al ayuno, tanto la expresión de los procesos de ubiquitinación como des-ubiquitinación se vieron aumentadas, mismas que disminuyeron de forma gradual. En un trabajo posterior, se examinó la expresión de algunos componentes involucrados en el complejo mTORC1 (*igfl*, *mtor*, *pi3k*, *mlst8* y *raptor*) y genes de atrofia (*fbx25*, *bcl2*, *atg12*, *murfla*, *murfb* y *mafba*) en tejido muscular durante restricción de alimento por 10 días, registrando un aumento en la expresión tanto en los genes anabólicos como en los genes catabólicos. Durante la realimentación a corto y largo plazo se observó una disminución generalizada de todos los genes. Los autores sugieren que los resultados observados pueden ser causados por mecanismos de preservación de proteínas musculares durante condiciones de estrés nutricional (De Paula *et al.*, 2017). Gabriel-Kuniyoshi *et al.* (2019) examinaron el

proteoma de músculo de contracción rápida durante inanición prolongada (30 días) en esta misma especie, así como durante la realimentación a los 30 y 60 días. Al final del ayuno, además de observar un evidente catabolismo muscular a nivel histológico, se observó un efecto negativo en metabolismo de proteínas, biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis y estructura del citoesqueleto, mientras que las proteínas nucleares y reguladoras aumentaron su actividad. Después de los primeros 30 días de realimentación, se observó un crecimiento acelerado y un aumento en la biosíntesis de aminoácidos. A los 90 días, los peces alcanzaron un crecimiento compensatorio total; sin embargo, la biosíntesis de aminoácidos empezó a mostrar una ligera disminución en este punto.

### 3. HIPOTESIS

Considerando lo expuesto en las secciones anteriores, se formularon tres hipótesis de investigación.

- 1) La alimentación con proteína de origen vegetal ocasiona una reducción en la tasa de crecimiento del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Dicha reducción en la tasa de crecimiento es regulada, por una parte, por la disminución en la tasa de síntesis de proteínas musculares, y por otra, por una mayor tasa de degradación de proteínas del tejido muscular, mecanismos que son modulados por las vías de MAFbx y MuRF1, respectivamente.
- 2) La restricción de alimento a juveniles de *Lutjanus guttatus* durante una y dos semanas, provocará una respuesta de hiperfagia cuando los peces tengan disponibilidad de alimento nuevamente, dicha respuesta dará lugar a un estado de crecimiento compensatorio, mismo que será más intenso en peces sometidos a dos semanas de ayuno.
- 3) El perfil de expresión génica durante la inanición estará caracterizado por un aumento en la expresión de genes involucrados en los procesos proteolíticos de autofagia y ubiquitinación-proteosoma (*atg7*, *ulk1*, *foxo3b*, *mafbx*, *murfl*), y una reducción en la expresión de genes involucrados en el eje somatotrópico y factores reguladores miogénicos. Durante la realimentación, la expresión génica mostrará un perfil directamente opuesto a la etapa previa.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Generales

Estudiar los diversos mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento muscular del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, evaluando el crecimiento compensatorio y el efecto de diversas fuentes proteínicas en la dieta.

### 4.2 Particulares

1. Realizar el ensamblaje *de novo* y la anotación funcional del transcriptoma de diferentes órganos y tejidos (bazo, branquias, cerebro, corazón, grasa visceral, hígado, intestino, músculo, piel blanca, piel oscura, testículo) de *L. guttatus*.
2. Evaluar el efecto de la fuente de proteína en dieta sobre la expresión de distintos genes involucrados tanto en crecimiento como en atrofia muscular del pargo flamenco *L. guttatus*.
3. Conocer el efecto de la restricción total de alimento durante una y dos semanas, sobre la condición energética en juveniles de pargo *L. guttatus* durante la etapa de preengorda, así como determinar si dicha restricción es capaz de inducir crecimiento compensatorio.
4. Evaluar la expresión de genes involucrados en los mecanismos de crecimiento, atrofia y metabolismo, durante la restricción alimenticia y durante la respuesta posterior a dicha restricción en juveniles de pargo flamenco.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y los métodos se detallan a continuación, en tres secciones principales de acuerdo a los objetivos planteados. De forma breve, la primera parte corresponde a la secuenciación y ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *Lutjanus guttatus*. En la segunda sección se presentan los materiales y métodos correspondientes al segundo objetivo, que consistió en realizar un experimento de alimentación con tres diferentes fuentes de proteína en el pargo flamenco y el efecto de las mismas sobre el crecimiento y la expresión de genes involucrados en crecimiento y atrofia. En la tercera sección se detalla la metodología seguida para cubrir los dos últimos objetivos, para ello se llevó a cabo un experimento de ayuno-realimentación con juveniles de pargo flamenco utilizando dos periodos distintos de ayuno, y sus efectos en el crecimiento, composición proximal, histología hepática y expresión de genes implicados en procesos de degradación y crecimiento.

### 5.1 Secuenciación y Ensamblaje *de novo* Del Transcriptoma de *L. guttatus*

#### 5.1.1 Toma de Muestras y Aislamiento de ARN

Once tejidos diferentes fueron tomados de un ejemplar de pargo flamenco de 516 gramos. El pez fue mantenido en condiciones de cultivo y alimentado con una dieta a base de harina de pescado, en la planta piloto de peces marinos del CIAD unidad Mazatlán. El pez fue sacrificado con una sobredosis de metanosulfonato de triclaína (Sigma-Aldrich, San Luis, MO.) Los tejidos muestreados fueron bazo, branquias, cerebro, corazón, testículo, hígado, intestino, músculo, piel oscura, piel blanca y grasa visceral. Las muestras fueron mantenidas en ARNlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a -20°C hasta su procesamiento. El ARN total de cada tejido se extrajo con el kit Quick-RNA Microprep (Zymo Research, Irvine, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN se evaluó a través de micro-electroforesis con el equipo Nano 6000 BioAnalyzer de Agilent Technologies (Santa Clara, CA) y la concentración se midió por espectrofotometría con UV Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

### 5.1.2 Construcción de Librerías y Secuenciación

Las genotecas para secuenciación fueron construidas a partir de 1 µg ARN total. Se purificó el ARN mensajero utilizando cuentas magnéticas con oligo-dT, y posteriormente se fragmentó utilizando cationes divalentes, dichos fragmentos fueron empleados para la síntesis de ADNc con ADN Polimerasa I, seguido de reparación de extremos, ligación de adaptadores, purificación y finalmente, un enriquecimiento por amplificación con PCR. La secuenciación se realizó en la plataforma HiSeq 2000 de Illumina, utilizando química de 2x100 con extremos pareados.

### 5.1.3 Análisis Bioinformático

Después de que se obtuvieron las lecturas crudas, se procesaron con Trimmomatic v0.32 (Bolger *et al.*, 2014) para eliminar adaptadores, barcodes y lecturas de baja calidad. Se escanearon las lecturas en una amplitud de ventana de 10 bases, y las bases con un puntaje Phred promedio menor a 18, al inicio o al final de la ventana, fueron recortadas. También se descartaron las lecturas con una longitud final menor a 36 pares de bases. Posteriormente, dado que no se contaba con un transcriptoma o genoma de referencia, se llevó a cabo un ensamblaje *de novo* de un transcriptoma, utilizando las lecturas provenientes de todos los órganos, para este proceso se utilizó el software Trinity v2.1.1 (Grabherr *et al.*, 2011) con normalización digital de las lecturas y k-meros de 25.

Una vez ensamblado, se identificaron secuencias de proteínas conceptuales TransDecoder v.2.01 (Haas *et al.*, 2014) utilizando las bases de datos de Swissprot y pFAM. Además, para evaluar la contribución de lecturas de cada muestra en el ensamblaje *de novo*, se mapearon las lecturas procesadas de cada tejido con los transcritos ensamblados con Bowtie2 v2.2.6 (Langmead y Salzberg, 2012). Para obtener perfiles de expresión de los diferentes tejidos, se realizó estimación de abundancia de transcritos con Kallisto v0.42.3 (Bray *et al.*, 2016). Además, como una medida adicional de que tan completo estaba el transcriptoma, se utilizó BUSCO v2.0 (Simão *et al.*, 2015), el cual provee una evaluación cuantitativa del transcriptoma, basada en las expectativas evolutivas en cuanto al contenido de genes

ortólogos de una sola copia, contenidos dentro de la base de datos de Actinopterigios en OrthoDB v9 (Kriventseva *et al.*, 2015).

La anotación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Trinotate v3.0.1 (Haas *et al.*, 2014). La longitud mínima de *contig* considerada para la anotación fue de 200 pares de bases. Primero, los transcritos y proteínas hipotéticos se sometieron a una búsqueda de homologías, con BLASTX y BLASTp, respectivamente, empleando la base de datos Uniprot, ya que Trinotate recupera varias anotaciones KEGG, GO y EggNog de ella misma. Se utilizó HMMER v3.0 (Finn *et al.*, 2015) para identificar los dominios proteínicos dentro de los péptidos predichos, utilizando la base de datos de Pfam (Finn *et al.*, 2016). También se corrió SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) para identificar sitios de escisión de péptidos señal encontrados en los péptidos hipotéticos. Para predecir hélices transmembranales en las proteínas se corrió tmHMM v2.0 (Krogh *et al.*, 2001), RNAmmer v1.2 (Lagesen *et al.*, 2007) fue empleado para identificar RNA ribosomales.

## 5.2 Efecto de la Fuente de Proteína en la Dieta de *L. guttatus*

El propósito de esta sección es describir los métodos empleados para evaluar el efecto de la fuente de proteína en la expresión de genes involucrados en distintos procesos de crecimiento y atrofia en *L. guttatus*. Las muestras para dichos análisis provienen de un estudio previo realizado por Peña-Marín (2016), en donde se explican con mayor detalle los métodos así como los resultados obtenidos en crecimiento, procesos enzimáticos digestivos y en la química sanguínea. Sin embargo, para facilitar al lector la información, en las secciones posteriores se presenta la parte de los materiales y métodos alusiva a los organismos experimentales, formulación de las dietas y la evaluación del crecimiento.

### 5.2.1 Diseño Experimental, Mantenimiento de los Peces y Alimentación

Los peces empleados para el ensayo se produjeron en la planta piloto de peces del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, siguiendo los protocolos para la reproducción y

crianza de larvas. Después de la etapa de crianza, los peces fueron llevados a granjas comerciales para ser engordados en jaulas flotantes de 2x2 m. Se tomó una población aleatoria de peces con un peso promedio individual de  $61.2 \pm 8.8$  gramos y fueron trasladados a las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo para el experimento. Se distribuyeron aleatoriamente 108 peces en 9 tanques de fibra de vidrio (12 individuos por tanque), con una capacidad de 300 L. El sistema fue suministrado con agua de mar bombeada desde la costa a través de dos filtros de arena paralelos, misma que fue almacenada en cisternas de polietileno de alta densidad de 25 m<sup>3</sup>. Cada tanque fue abastecido con un flujo constante de agua salada de 8 L/min. Se les proveyó de aireación constante utilizando piedras difusoras. A lo largo del experimento, la temperatura promedio fue de  $29 \pm 1.5$  °C y el oxígeno disuelto promedio fue de  $6.4 \pm 0.5$  mg/L (saturación de 82.5%).

Tres dietas fueron formuladas para tener un contenido de proteína cruda del 45% y 10% de lípidos, de acuerdo a los requerimientos nutricionales del pargo flamenco de acuerdo a Abdo de la Parra *et al.* (2010) (Tabla 1). Para la dieta de referencia la principal fuente de proteína fue harina de pescado. En las dietas experimentales, la harina de pescado (FM) se reemplazó por una mezcla de harina de carne porcina y harina de subproductos de aves de corral en proporción 1:1 (PPM), y otra con una mezcla de concentrado de soya y harina de gluten de maíz en una proporción de 1:1 (VEG). Cada dieta fue asignada de manera aleatoria a tres tanques cada una. Los peces fueron alimentados manualmente *ad libitum* tres veces al día (9:00, 13:00 y 18:00) por 60 días.

Tabla 1. Formulación y composición de las dietas utilizadas en el experimento de reemplazo de harina de pescado en *L. guttatus*

Ingredientes (g Kg <sup>-1</sup> )	FM	PPM	VEG
Harina de pescado <sup>a</sup>	480.3	0.0	0.0
Harina de subproductos de aves <sup>b</sup>	0.0	266.7	0.0
Harina de carne de puerco <sup>b</sup>	0.0	287.8	0.0
Concentrado de harina de soya <sup>b</sup>	0.0	0.0	268.7
Harina de gluten de maíz <sup>b</sup>	0.0	0.0	236.5
Harina de krill <sup>b</sup>	75.9	75.9	75.9
Harina de calamar <sup>b</sup>	60.0	60.0	60.0
Harina de gluten de trigo <sup>c</sup>	20.0	20.0	20.0
Aceite de pescado <sup>c</sup>	50.6	17.9	70.8
Almidón de maíz <sup>c</sup>	254.9	213.4	207.8
Alginato <sup>c</sup>	30.0	30.0	30.0

Premezcla de vitaminas <sup>e</sup>	6.0	6.0	6.0
Premezcla de minerales <sup>e</sup>	2.3	2.3	2.3
Carotenoides	1.0	1.0	1.0
Lecitina de soya <sup>c</sup>	15.0	15.0	15.0
Vitamina C <sup>f</sup>	1.0	1.0	1.0
Cloruro de colina <sup>d</sup>	2.0	2.0	2.0
Antioxidantes <sup>c</sup>	1.0	1.0	1.0
CaP dibásico <sup>d</sup>	0.0	0.0	2.0
Metionina <sup>d</sup>	0.0	5.2	4.6

#### Composición (% Materia seca)<sup>g</sup>

Proteína cruda	46.25±0.88	45.21±0.33	46.87±0.59
Lípidos crudos	10.25±0.15	10.81±0.27	10.86±0.11
Ceniza	11.43±0.06	12.25±0.24	5.11±0.09
Extracto libre de nitrógeno <sup>h</sup>	32.06±0.84	31.73±0.35	37.15±0.49
Energía bruta (kJ g <sup>-1</sup> )	19.86±0.0	19.53±0.36	21.39±0.13

<sup>a</sup> Harina de pescado grado “Premium” de Selecta de Guaymas, S.A. de C.V., Guaymas, Sonora, México.

<sup>b</sup> Proteínas marinas y agropecuarias, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>c</sup> Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V., Ciudad de México, México.

<sup>d</sup> Sigma-Aldrich Chemical, S.A. de C.V., Toluca, Estado de México, México.

<sup>e</sup> Trouw Nutrition México S.A. de C.V. (cortesía). Composición premezcla de vitaminas g, mg o Unidades internacionales por kg de dieta: Vitamina A, 10,000,000 IU; Vitamina D3, 2,000,000 IU; Vitamina E, 100,000 IU; Vitamina K3, 4.0 g; Tiamina B1, 8.0 g; Riboflavina B2, 8.7 g; Piridoxina B6, 7.3 g; Vitamina B12, 20.0 mg; Niacina, 50.0 g; Ácido pantoténico, 22.2 g; Inositol, 0.15 mg; Ácido nicotínico, 0.16 mg; Ácido fólico, 4.0 g; Biotina, 500 mg; Vitamina C, 10.0 g; Colina 0.3 mg, Excipiente q.s. 2 g; Composición premezcla de minerales: Manganeso, 10 g; Magnesio, 4.5 g; Zinc, 1.6 g; Hierro, 0.2 g; Cobre, 0.2 g; Yodo, 0.5 g; Selenio, 40 mg; Cobalto 60 mg. Excipiente q.s. 1.5 g.

<sup>f</sup> DSM Nutritional Products Mexico S.A. de C.V., El Salto, Jalisco, México.

<sup>g</sup> Media±DE, número de determinaciones = 3.

<sup>h</sup> Extracto libre de nitrógeno (incluyendo fibra) = 100 - (% proteína + % lípidos + % cenizas).

## 5.2.2 Composición Proximal de las Dietas

La composición proximal de las dietas (humedad, proteína, lípidos y cenizas) fue determinada utilizando los métodos estándar de acuerdo a la AOAC (2000). La cantidad de proteína cruda se analizó con el método micro-Kjeldahl con un equipo Labconco System (Labconco, Kansas City, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de lípidos se determinó con el método soxhlet utilizando con el equipo automático micro Foss Soxtec Avanti 2050 (Foss Soxtec, Hoganäs, Suecia) utilizando éter de petróleo como solvente. El contenido de ceniza se determinó por calcinación de las muestras en una mufla a

550°C. La cantidad de energía bruta de las dietas se midió por combustión en una bomba calorimétrica Parr 1241 (Fisher Scientific International, Inc. Pittsburgh, PA) utilizando ácido benzoico como estándar.

### 5.2.3 Evaluación de Crecimiento y Eficiencia Alimenticia

El crecimiento y la eficiencia alimenticia fueron evaluados a través de la ganancia en peso, tasa de crecimiento específico (TCE), ingesta de alimento (IA), factor de conversión alimenticia (FCA), tasa de eficiencia proteínica (TEP), índice hepatosomático, índice viscerosomático, índice de grasa mesentérica, factor de condición, supervivencia, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ganancia en peso} = \text{Pesopromediofinal} - \text{Pesopromedioinicial} \quad (1)$$

$$TCE = \frac{(\ln \text{Pesofinal} - \ln \text{Pesoinicial})}{\text{Número de días}} * 100 \quad (2)$$

$$IA = \frac{\text{Consumo total de alimento (g)}}{\text{Número de peces}} \quad (3)$$

$$FCA = \frac{\text{Ingesta (g)}}{\text{Ganancia en peso (g)}} \quad (4)$$

$$TEP = \frac{\text{Pesofinal} - \text{Pesoinicial (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \quad (5)$$

$$\text{Índice hepatosomático} = \frac{\text{Pesodelhígado (g)}}{\text{Pesocorporal (g)}} * 100 \quad (6)$$

$$\text{Índice viscerosomático} = \frac{\text{Pesodelas vísceras (g)}}{\text{Pesocorporal (g)}} * 100 \quad (7)$$

$$\text{Índice de Grasa Mesentérica} = \frac{\text{Pesodela grasa mesentérica (g)}}{\text{Pesocorporal (g)}} * 100 \quad (8)$$

$$\text{Factordecondición} = \frac{\text{Pesocorporal}(g)}{\text{Longitudcoporal}(g)^3} * 100 \quad (9)$$

$$\text{Supervivencia} = \frac{\text{Númerofinaldeorganismos}}{\text{Númeroinicialdeorganismos}} * 100 \quad (10)$$

#### 5.2.4 Aislamiento de ARN y Síntesis de ADNc

Al final del estudio, nueve peces por tratamiento fueron eutanasiados y diseccionados para tomar muestras de músculo esquelético blanco, hígado y cerebro. Las muestras de tejidos fueron almacenadas en RNA-later a -20 °C hasta su procesamiento. Antes de proceder con la extracción de ARN, se retiró el RNA-later y después las muestras fueron homogeneizadas con Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante para aislar el ARN total. Posteriormente, el ARN total fue tratado con DNAsa RQ1 libre de RNAsa (Promega, Madison, Wisconsin) para degradar el ADN genómico. Posteriormente, se sintetizó ADNc a partir del ARN total, utilizando transcriptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de hexámeros aleatorios a 45 °C por una hora. Por último, el ADNc fue diluido en una proporción 1:10 y almacenado a -20 °C hasta los análisis de qPCR.

#### 5.2.5 Análisis de Expresión Génica por qPCR

Se examinó la expresión de 14 genes de los diferentes tejidos por medio de qPCR. En hígado, se midió la expresión de *ghr*, *igf1* e *igf2*; en el caso del tejido muscular, se analizó la expresión de *mtor*, *igf1*, *igf2*, *myod1*, *myod2*, *myogenin*, *murfl*, *mafxb*, *mstn1*, *mstn2*, *foxo3a* y *foxo3b*; por último, la expresión de *pacap* fue analizada en el cerebro. Además, dado que la expresión génica sería normalizada en función de la expresión de genes de referencia, se seleccionaron 5 genes candidatos. *b2mg*, *ef1a*, *gapdh*, *prps1* y *rbp56*. Las secuencias para el diseño de los oligos fueron obtenidas del transcriptoma ensamblado *de novo* en este mismo trabajo. Para el diseño de los mismos se utilizó el software PRIMER3 (Untergasser *et al.*, 2012). En la Tabla 2 se presentan las secuencias, eficiencia de amplificación, temperatura de disociación y tamaño de amplicon de los *primers* utilizados en este experimento.



Tabla 2. *Primers* utilizados para los análisis de expresión génica por qPCR en el experimento de reemplazo de harina de pescado por fuentes alternativas de proteína en *L. guttatus*.

<b>Gen</b>		<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Eficiencia (%)</b>	<b>Tamaño de amplicon (pb)</b>
<i>efla</i>	Delantera	AAGCAGCTCATTGTCTGGAGT	58.4	92.0	186
	Reversa	CTTGTCCTGGTCTCCAGCA	60.5		
<i>foxo3a</i>	Delantera	GGAAGACAACGGAGCCAACG	62.5	93.5	205
	Reversa	GTGGTCGCTGAAGTGCGAGA	62.5		
<i>foxo3b</i>	Delantera	GAACTCCATCCGGCACAACC	62.5	97.2	194
	Reversa	TCTTTTGGCAGCACGTCCA	58.4		
<i>gapdh</i>	Delantera	CGAACTCAACGGCAAGCTGA	60.5	98.5	160
	Reversa	ACCCAGCACTCCCTTCATGG	62.5		
<i>ghr</i>	Delantera	GGGAGTGCTTCTTTGACGAG	60.5	95.2	155
	Reversa	CAGGGTCCAGTTTAGGGACA	60.5		
<i>igf1</i>	Delantera	AGCGCTCTTTCCTTTCAGTGGCA	64.7	90.0	150
	Reversa	ACACACAAACTGCAGCGTGTCG	64		
<i>igf2</i>	Delantera	TGGTCGACACGCTGCAGTTTGT	64	92.9	152
	Reversa	AGGTGCACAGTACATCTCCAGGC	66.4		
<i>mafba</i>	Delantera	AGAGCTGCGCAATGTCAACAGT	62.1	92.0	175
	Reversa	TAACCCAACCTCTGACCCGGTGA	64		
<i>mstn1</i>	Delantera	TCCGCTCCCTGAAGATCGAC	62.5	61.7	154
	Reversa	GTCACGGCCAAGTCGTTTCC	62.5		
<i>mstn2</i>	Delantera	GGAGAGGAAGGACTGCAACCGTT	66.4	101.0	167
	Reversa	GCGATGATCCAGTCCCAACCGAA	66.4		

<i>mtor</i>	Delantera	ACAACCACAGCCCGCCACAA	62.5	101.7	152
	Reversa	TCTTCAAGGCCCTCGTGCCACA	65.9		
<i>murfl</i>	Delantera	GCAGGACCAAGGCTCTTCACCAT	66.4	90.2	171
	Reversa	TCATTCCACAGCAAAGCCGCA	61.3		
<i>myod1</i>	Delantera	CCTGAAGCATCCTGTCACACCGT	66.4	92.5	153
	Reversa	TGTGATGCAGTCGGGAGCTCAT	64		
<i>myod2</i>	Delantera	GACGCCTTCGAGACCCTGAA	62.5	88.1	190
	Reversa	CGGAGTCCCCGCTGTAGTGT	64.6		
<i>myogenin</i>	Delantera	AACATGCGTGCTCTGACCTCCA	64	96.3	154
	Reversa	TGTCAGCCTGCTTTGCCAATTGT	62.9		
<i>pacap</i>	Delantera	CGGTGAAGAAATACCTGGCGGCA	66.4	94.6	150
	Reversa	TCATCTGGGGCTGCACACACTT	64		
<i>prps1</i>	Delantera	TGCCTGCTTTGAAGCTGTGG	60.5	97.9	167
	Reversa	ACAAGGGGACATGGCTGAACA	61.3		
<i>rbp56</i>	Delantera	ACGGCTCAAGGGATGAACCA	60.5	96.9	162
	Reversa	TGATCATTGGCTGGCCAGTTT	59.4		
<i><math>\beta</math>2mg</i>	Delantera	TTGCCATGTGAGTGGCTTCC	60.5	94.5	157
	Reversa	TTGTCCACTCGTGGGTGTGAA	61.3		

Las reacciones de qPCR fueron realizadas por triplicado en un termociclador de 96 pocillos (CFX-96 Real time PCR detection system, BioRad, Hercules, CA). El volumen de reacción fue de 10  $\mu$ l, para esto, se utilizó una mezcla de PCR con  $MgCl_2$  2.5 mM, 0.25 U de polimerasa GoTaq, dNTPs 0.2 mM, reactivo EvaGreen 1x (Biotium) y cada par de oligos en una concentración 0.4  $\mu$ M. El protocolo de PCR empleado fue de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 30 segundos, siendo al final de este paso donde se tomó la medición de fluorescencia; además, al

final del protocolo se realizó un paso de disociación de 60 a 94 °C, para obtener y examinar la curva de disociación de cada amplicon y examinar la especificidad de amplificación de cada una de estas. Se hizo un análisis de estabilidad para los genes de referencia utilizando el algoritmo geNorm a través del software qbase+ v3.1. Para obtener la eficiencia de amplificación de cada par de *primers*, se realizó una serie de 5 diluciones seriadas de productos de amplificación por PCR de cada gen probado, el factor de dilución fue de 10. Primeramente, se obtuvo el valor de la pendiente de la función log-lineal del factor de dilución contra los valores C<sub>q</sub> registrados, después, se utilizó la ecuación (11) para calcular la eficiencia.

$$Eficiencia = 10^{\left(\frac{1}{pendiente}\right)} \quad (11)$$

Los valores resultantes de eficiencia fueron empleados en la corrección de la cuantificación relativa. Para cada gen, las cantidades relativas fueron calculadas con la ecuación (12).

$$RQ = (1 + E)^{(Cq_{min} - Cq)} \quad (12)$$

Donde RQ es igual a la cantidad relativa, C<sub>qmin</sub> es igual al valor C<sub>q</sub> mínimo dentro del grupo analizado y C<sub>q</sub> corresponde al valor de C<sub>q</sub> de cada muestra. E es igual a la eficiencia de amplificación calculada con la ecuación (11).

Los valores relativos de expresión de cada muestra individual fueron estimados con la ecuación (13).

$$\mathfrak{R} = \frac{RQt}{RQnf} \quad (13)$$

Donde RE es igual a la expresión relativa individual, RQt corresponde a la cantidad relativa del gen de interés y RQnf corresponde al factor de normalización (media geométrica del Cq de los genes de referencia).

### **5.2.6 Análisis Estadístico**

Las diferencias estadísticas en los niveles de expresión de los genes de interés fueron identificadas con ANOVA de una vía utilizando la prueba de Tukey para las comparaciones *post hoc*. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homoscedasticidad, se realizó la prueba de rangos de Kruskal-Wallis, con la prueba de Dunn para las comparaciones *post hoc*. Las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete estadístico SigmaPlot v12.

## 5.3 Experimento de Restricción Alimenticia y Realimentación en *L. guttatus*

### **5.3.1 Diseño Experimental**

Se realizó un experimento de restricción alimenticia durante 6 semanas con juveniles de *Lutjanus guttatus*. En este experimento, los peces fueron sometidos a dos periodos de restricción alimenticia total, una semana y dos semanas (los grupos fueron 1WF y 2WF respectivamente). Cada tratamiento tuvo su propio grupo control, en el cual los organismos control fueron alimentados durante todo el experimento. Cada tratamiento se probó por cuadruplicado junto con sus respectivos controles. Los peces utilizados en este experimento fueron proporcionados por la planta piloto de peces marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Mazatlán, y fueron producidos siguiendo protocolos regulares para reproducción y crianza larvaria (Ibarra-Castro, datos sin publicar). Después de los protocolos de crianza, los peces juveniles fueron colocados en tanques de 5 m<sup>3</sup> hasta que alcanzaron 30 g, y posteriormente, se transfirieron a los tanques experimentales. El sistema experimental consistió en 16 tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 300 L,

suministrados con un flujo abierto promedio de  $7 \text{ L min}^{-1}$  de agua salada, misma que fue previamente filtrada a través de filtros de arena y almacenada en tanques de polietileno de alta densidad de  $25 \text{ m}^3$ ; a los tanques se les proporcionó aireación constante a través de piedras difusoras. La temperatura promedio durante el experimento fue de  $30.1 \text{ }^\circ\text{C}$  y la saturación de oxígeno fue  $3.81 \text{ mg/L}$ .

Se colocaron 25 peces en cada tanque experimental. El peso inicial fue de  $31.6 \text{ g}$ . Los peces del grupo 1WF fueron sometidos a ayuno total durante la primer semana del experimento, mientras que los peces del grupo 2WF estuvieron en ayuno durante las dos primeras semanas del ensayo, después de cada periodo de ayuno los peces fueron alimentados 3 veces al día a saciedad aparente con un alimento comercial para peces carnívoros marinos (Marine MX, Skretting, Tooele, Utah), mismo que contenía un 46% de proteína y un 12% de lípidos.

Los peces fueron pesados individualmente cada semana, para hacerlo, fueron capturados con una red y posteriormente anestesiados con aceite de clavo para facilitar la manipulación. El crecimiento y la eficiencia alimenticia se evaluaron a través de la ganancia en peso (Ec. 1), Tasa de Crecimiento específico (Ec. 2), Ingesta de alimento (Ec. 3), Factor de Conversión Alimenticia (Ec. 4), Índice hepatosomático (Ec. 6), Índice viscerosomático (Ec. 7) e Índice de grasa mesentérica (Ec. 8).

### **5.3.2 Composición Proximal de los Peces**

Al inicio del experimento, cinco peces provenientes de la misma población de peces utilizada para el experimento, fueron tomados para analizar su composición proximal. También, al finalizar cada periodo de ayuno, cuatro peces por tratamiento fueron muestreados para evaluar los posibles cambios en la composición proximal. También, después de una semana de reiniciar la alimentación, se volvieron a tomar cuatro peces por tratamiento para realizar los mismos análisis. Los análisis realizados fueron humedad, proteína total, lípidos y cenizas, se determinaron empleando los métodos estándar descritos por la AOAC (2000). Brevemente, los peces fueron completamente homogenizados para realizar la determinación del contenido de humedad, secando las muestras por 12 horas a  $105^\circ \text{ C}$ . La cantidad de proteína cruda se obtuvo con el método micro-Kjeldahl utilizando un aparato RapidStill I de

Labconco System (Labconco, Kansas, MO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El contenido de lípidos se determinó con el método Soxhlet con ayuda del sistema automático Foss Soxtec Avanti 2050 (Foss Soxtec, Hoganá, Suecia) y empleando éter de petróleo como solvente. El contenido de cenizas se determinó por calcinación de las muestras en una mufla a 550 °C por 6 horas (Fisher Scientific International, Pittsburgh, Pennsylvania).

### 5.3.3 Expresión Génica

Para la cuantificación de la expresión génica en tejido muscular blanco epaxial y tejido hepático, se tomaron muestras al final de cada periodo de ayuno; además para la evaluación de los cambios a corto plazo, se tomaron muestras del grupo 1WF a las 24 horas post-realimentación, y en el caso del grupo 2WF a las 48 horas post-realimentación; además, ambos tratamientos fueron muestreados después de 1 semana post-realimentación para nuevamente evaluar los cambios en la expresión génica. Las muestras para los análisis de expresión génica fueron almacenadas en RNAlater a -20° C hasta el procesamiento. Antes del aislamiento del ARN, se eliminó el RNAlater. Posteriormente se extrajo el ARN total utilizando el método de Trizol-Cloroformo, y después, se trató el ARN extraído con DNAsa mediante el kit Turbo DNA-free, para eliminar el ADN bicatenario que pudiera estar presente en las muestras. Por último, el ARN total extraído fue utilizado para sintetizar ADNc utilizando Transcriptasa Reversa MMLV en presencia de hexámeros aleatorios.

Para diseñar los *primers*, los transcritos de los genes de interés fueron recuperados del transcriptoma de referencia de *L. guttatus*, los *primers* se diseñaron utilizando el software PRIMER 3 (Untergasser *et al.*, 2012), en la Tabla 3 se presentan los *primers* y sus secuencias. Se cuantificó la expresión de *ghr*, *igf1*, *igf2*, *lep*, *lal*, *atg7* y *ulk1* en hígado, mientras que, en músculo blanco, se midió la expresión de *myod1*, *myod2*, *myogenin*, *mstn1*, *mafbx*, *murfl*, *atg7* y *ulk1*. Las reacciones de PCR fueron realizadas por duplicado en termociclador de 96 pocillos (CFX-96 Real time PCR detection system, BioRad, Hercules, CA), en un volumen de reacción de 5 µl, con un sistema comercial de detección fluorescente de New England BioLabs (Luna Universal qPCR Master Mix). Para cada gen analizado, se obtuvieron las eficiencias de amplificación mediante el cálculo de la pendiente de cinco diluciones seriales con productos de PCR diluidos. Los valores fueron calculados a partir de

la pendiente de la función log-lineal del factor de dilución contra el valor Cq registrado, utilizando la ecuación (11). Posteriormente se calculó la cantidad relativa (RQ) de cada gen de interés por muestra utilizando la ecuación (12), sustituyendo en este caso el término Cqmin por Cqprom, quedando como en la ecuación (14).

$$RQ = (1 + E)^{(Cq_{prom} - Cq)} \quad (14)$$

Donde Cqprom es igual al promedio de Cq de todos los organismos analizados (Control y Tratados). E es igual a la eficiencia de amplificación, misma que fue calculada con la ecuación (11). La expresión relativa se estimó con la ecuación (13), los genes de referencia utilizados fueron *gapdh* y *prps1*.

**Tabla 3. Primers utilizados para los análisis de expresión génica por qPCR en el experimento de ayuno/realimentación en *L. guttatus*.**

Primer	Secuencia	Tamaño de amplicon (bp)	Tm (°C)
<i>atg7-f</i>	CGGCTTTGACACGTTTGTCG	177	69.1
<i>atg7-r</i>	CCGGGGATGTTGGAGAACAG		69.1
<i>foxo3b-f</i>	GAACTCCATCCGGCACAACC	194	62.5
<i>foxo3b-r</i>	TCTTTTGGCAGCACGTCCA		58.4
<i>gapdh-f</i>	CGAACTCAACGGCAAGCTGA	160	60.5
<i>gapdh-r</i>	ACCCAGCACTCCCTTCATGG		60.5
<i>ghr-f</i>	GGGAGTGCTTCTTTGACGAG	155	60.5
<i>ghr-r</i>	CAGGGTCCAGTTTAGGGACA		60.5
<i>igf1-f</i>	AGCGCTCTTTCCTTTCAGTGGCA	150	64.7
<i>igf1-r</i>	ACACACAAACTGCAGCGTGTCG		64
<i>igf2-f</i>	TGGTCGACACGCTGCAGTTTGT	152	64
<i>igf2-r</i>	AGGTGCACAGTACATCTCCAGGC		66.4
<i>lal-f</i>	CCGTTTCATGGAGGGAAGCTG	164	69.3
<i>lal-r</i>	GGCCATGTCTTTGGGGTCTG		69.2
<i>mafbx-f</i>	AGAGCTGCGCAATGTCAACAGT	175	62.1
<i>mafbx-r</i>	TAACCCAACTCTGACCCGGTGA		64
<i>mstn1-f</i>	TCCGCTCCCTGAAGATCGAC	154	62.5
<i>mstn1-r</i>	GTCACGGCCAAGTCGTTTCC		62.5
<i>murf1-f</i>	GCAGGACCAAGGCTCTTCACCAT	171	66.4
<i>murf1-r</i>	TCATTCCACAGCAAAGCCGCA		61.3
<i>mtor-f</i>	ACAACCACAGCCCGCCACAA	152	62.5

<i>mtor-r</i>	TCTTCAAGGCCCTCGTGCCACA		65.9
<i>myod1-f</i>	CCTGAAGCATCCTGTCACACCGT	153	66.4
<i>myod1-r</i>	TGTGATGCAGTCGGGAGCTCAT		64
<i>myod2-f</i>	GACGCCTTCGAGACCCTGAA	190	62.5
<i>myod2-r</i>	CGGAGTCCCCGCTGTAGTGT		64.6
<i>myogenin-f</i>	AACATGCGTGCTCTGACCTCCA	154	64
<i>myogenin-r</i>	TGTCAGCCTGCTTTGCCAATTGT		62.9
<i>prps1-f</i>	TGCCTGCTTTGAAGCTGTGG	167	60.5
<i>prps1-r</i>	ACAAGGGGACATGGCTGAACA		61.3
<i>sqstm1-f</i>	TTCACGGTGGACCAGGAGGT	160	69.5
<i>sqstm1-r</i>	AGGCCAGACCCAACATCAGC		69
<i>ulk1-f</i>	TACTGCAACGGGGGTGACCT	180	69.1
<i>ulk1-r</i>	CTTGCGTCCTGGTGGGTAGG		69.2

### 5.3.4 Análisis Histológico

Se realizó un análisis histológico convencional en hígado con 12 organismos por cada punto de muestreo, al igual que en el análisis de qPCR. Las muestras de hígado fueron fijadas inmediatamente después de la disección en formalina al 4%, después se deshidrataron y fueron embebidas en parafina. Se hicieron cortes de 5 µm con ayuda de un micrótopo Leica Jung Histocut 820 y dichos cortes fueron teñidos con eosina y hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich). Los cortes histológicos fueron observados con un microscopio Olympus CX41 y se tomaron microfotografías con una cámara acoplada al microscopio.

### 5.3.5 Análisis Estadístico

Los resultados en los parámetros de crecimiento y de eficiencia alimenticia fueron analizados a través de un ANOVA de dos vías, utilizando el tratamiento y el tiempo como factores, este análisis fue seguido de una prueba de Tukey HSD para comparaciones *post hoc*. Los índices hepatosomático, viscerosomático y de grasa mesentérica, fueron analizados con una prueba t de Student para muestras pareadas, comparando cada grupo experimental con su respectivo control para cada variable. La composición proximal se analizó de la misma manera que los índices somáticos, comparando a los organismos tratados contra los organismos control para cada variable con una prueba t de Student. La expresión génica se analizó con un ANOVA de



dos vías para cada gen cuantificado, utilizando el tratamiento y el punto de muestreo como factores, las comparaciones post-hoc fueron hechas con una prueba de Tukey. Los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del paquete estadístico STATISTICA versión 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Ensamblaje *de novo* y Anotación del Transcriptoma de *L. guttatus*

Se obtuvieron un total de 222, 856,278 lecturas de la secuenciación de los once tejidos. Después de procesarlas, se obtuvieron 211, 242,810 lecturas pareadas de alta calidad, y estas fueron las que se utilizaron para generar el transcriptoma de referencia para el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Tabla 4). El 93.11% de las lecturas crudas pudieron ser mapeadas contra el transcriptoma ensamblado con la ayuda de Bowtie2. El tracto digestivo fue el tejido con la mayor contribución al ensamblaje con la mayor cantidad de lecturas, mientras que el cerebro fue el que proporcionó la menor cantidad. El ensamblaje *de novo*, mismo que fue realizado con el software Trinity, resultó en 267,601 transcritos, que corresponden a 214,151 genes. En la Figura 1 se presenta un histograma de la distribución de las longitudes de los *contigs*, la longitud mínima fue de 201 pb mientras que la mayor fue de 19,666 pb, con una longitud promedio de 845 pb y un N50 de 1658 pb. La N50 indica que al menos la mitad de las bases ensambladas, están contenidas en *contigs* con una longitud de 1658 pb.

**Tabla 4. Resumen de estadísticas de la secuenciación y ensamblaje *de novo* del transcriptoma del pargo flamenco *L. guttatus***

<b>Pre-procesamiento de lecturas</b>	
Lecturas crudas	222,856,278
Lecturas recortadas	217,066,923
Lecturas ensambladas	207,493,630
<b>Ensamblaje <i>de novo</i> con Trinity</b>	
Total de bases ensambladas	226,084,468
Número de transcritos	267,601
Número de “genes”	214,150
Contenido GC (%)	44.97
N50 (pb)	1658
N90 (pb)	303

Longitud promedio de transcrito (pb)	845
Longitud máxima de transcrito (pb)	19,666
Longitud mínima de transcrito (pb)	201

La abundancia de transcritos fue estimada con Kallisto v0.42.3 a través de Trinity, la abundancia de cada transcrito fue reportada como fragmentos por kilobase por millón de lecturas (FPKM). Al relacionar la abundancia con la longitud de los transcritos, fue posible concluir que una gran proporción del transcriptoma ensamblado (238,559 *contigs*), se conformó por transcritos con una abundancia menor a 3 FPKM (datos no mostrados). Por otro lado, alrededor del 90% de la transcripción total estuvo constituida por apenas 29,042 transcritos (aquellos con una abundancia mayor o igual a 3 FPKM), además, la N50 de este set de transcritos (E90N50) fue de 2,375 pb, en otras palabras, al menos la mitad de las bases que conformaron el 90% de la transcripción total, están contenidas en *contigs* con una longitud de 2,375 pb.

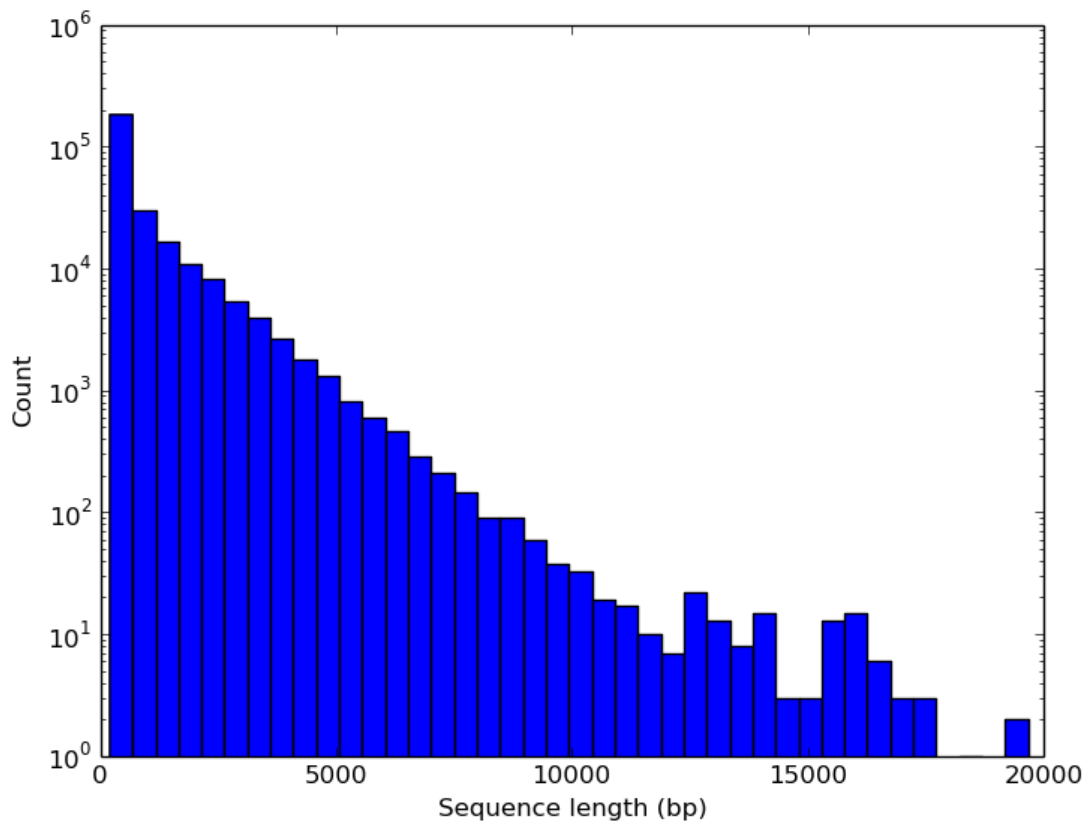


Figura 1 Distribución de la longitud de los transcritos en el transcriptoma de referencia de *L. guttatus*

Para evaluar qué tan completo fue el ensamble del transcriptoma, se utilizó BUSCO v2 para buscar la presencia de genes ortólogos conservados en la base de datos de Actinopterigios de OrthoDB, en esta base de datos se tienen 4,584 ortólogos de una sola copia, los cuales están bien anotados y curados. Se obtuvo un 90% de hits contra dicha base de datos al realizar esta búsqueda con BUSCO, sean hits individuales o duplicados (2689 y 1436 respectivamente), 5.5% de los hits fueron fragmentados y solo faltó un 4.5% de genes que no tuvieron ningún hit (Figura 2). Tales resultados indican que el ensamblaje del transcriptoma estaba prácticamente completo.

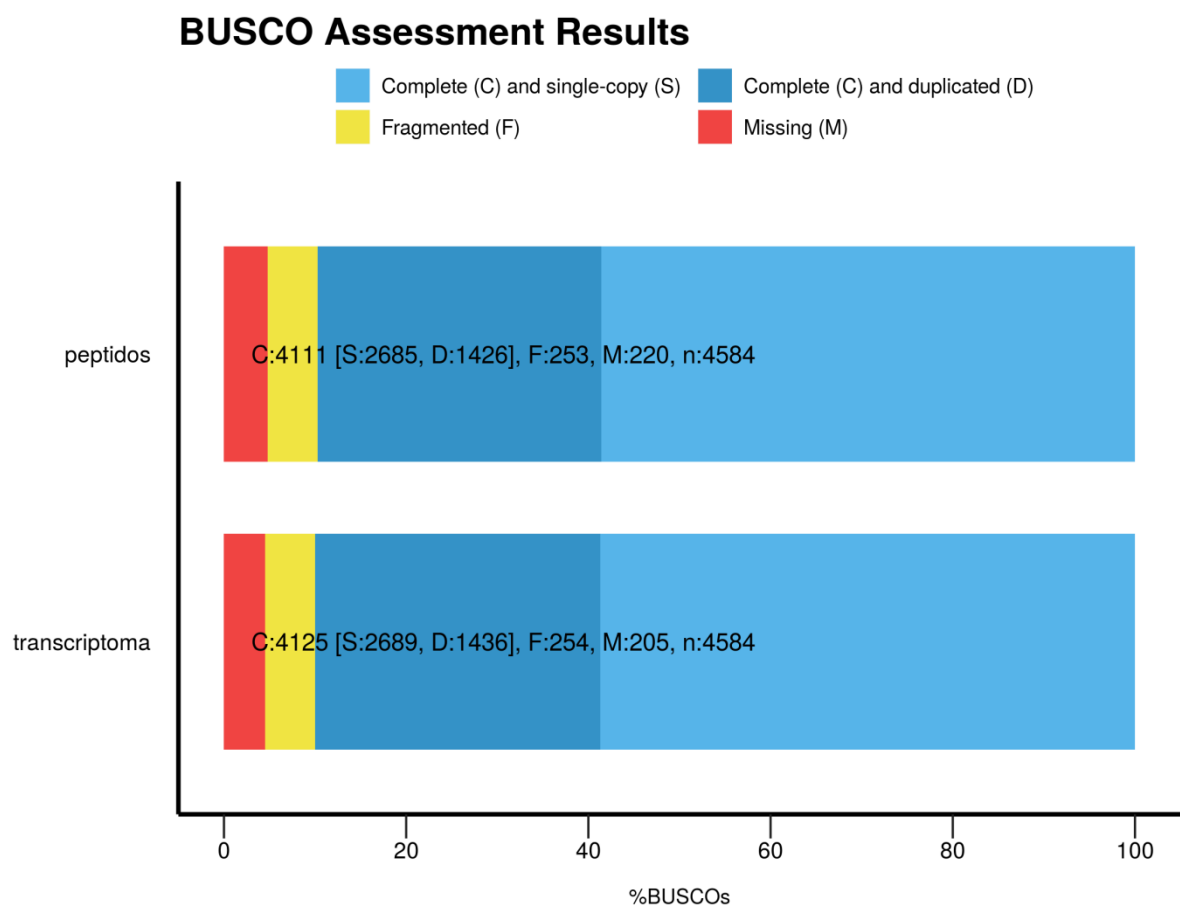


Figura 2. Resultados del análisis de ortólogos conservados dentro del transcriptoma de *L. guttatus*, en secuencia de aminoácidos y nucleótidos con la plataforma BUSCO.

El siguiente paso fue hacer una búsqueda de marcos de lectura abiertos (ORF, *Open Reading Frames*) que podrían estar dentro de las secuencias de transcritos. Dicha tarea se realizó con TransDecoder, una utilidad dentro del software de Trinity. Se obtuvieron 85,677 péptidos

hipotéticos. El ORF más largo tuvo 6,229 aminoácidos, y la longitud promedio fue de 346 aminoácidos.

El proceso de anotación se llevó a cabo con Trinotate. Se inició con una búsqueda del transcriptoma contra la base de datos Uniprot/Swissprot, utilizando el algoritmo BLASTx, con un valor umbral E de  $10^{-5}$ . Se registraron un total de 113,907 hits, los que correspondían a 65,981 transcritos del transcriptoma de *L. guttatus* que se ensambló, y que a su vez, dichos hits correspondían a 23,367 proteínas de SwissProt. Los péptidos hipotéticos también fueron sometidos a una búsqueda de homologías contra la misma base de datos y con los mismos parámetros que el transcriptoma en secuencia de nucleótidos, pero utilizando el algoritmo BLASTp, en este caso se obtuvieron 88,413 hits que correspondían a 56,515 ORFs (66% del total) y a 21,066 proteínas de SwissProt. El 34% de las coincidencias de BLASTp registraron un valor E de  $1e^{-100}$  o menor, y 35% de ellas tenían al menos 60% de identidad.

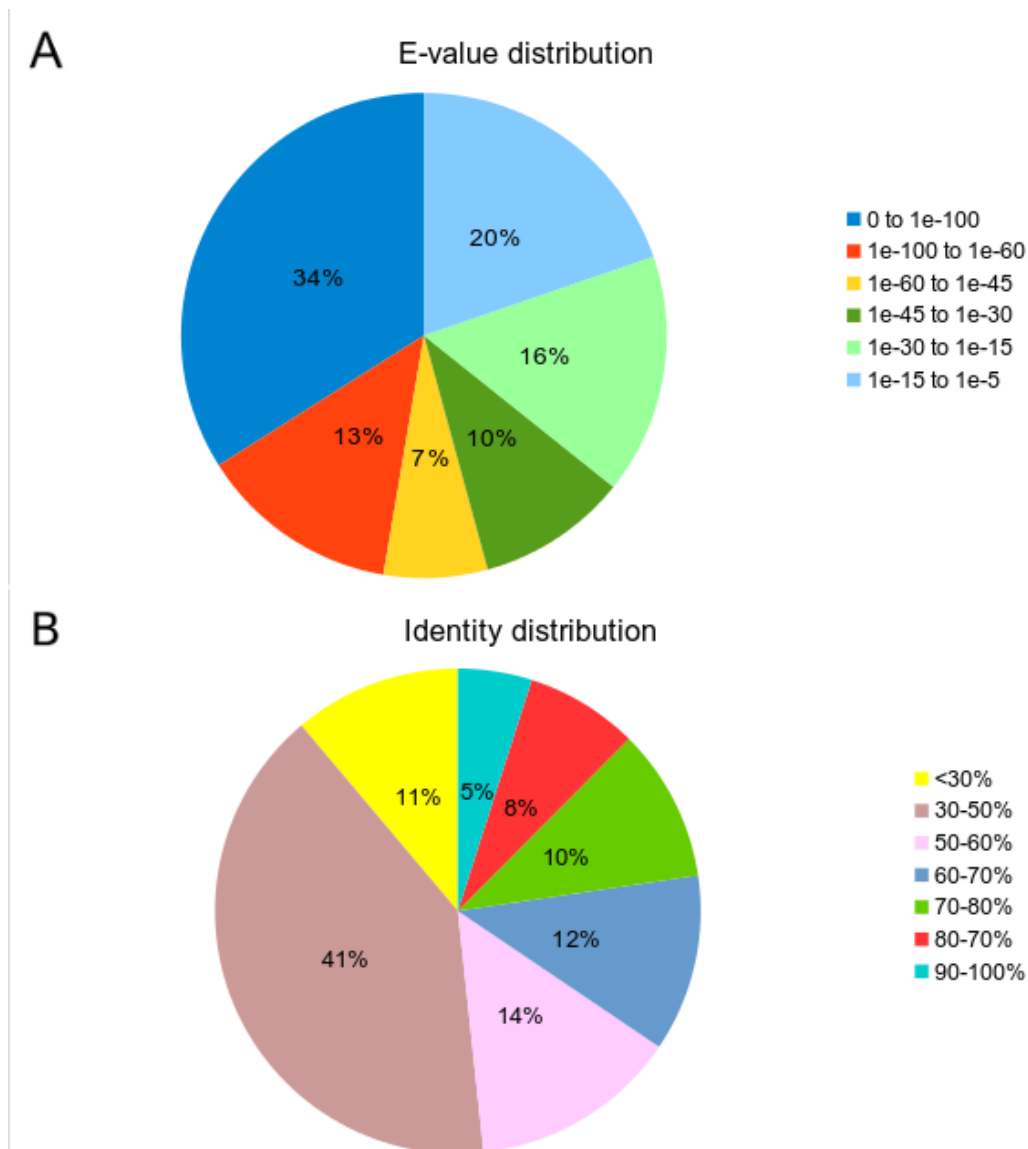


Figura 3. (A) Distribución de valores E de los hits de BLASTp con un valor E umbral  $1.0E^{-5}$ . (B) Distribución de los porcentajes de identidad de los hits de BLASTp contra la base de datos Uniprot/Swissprot.

Además, para tener un mayor conocimiento de las funciones representadas en el transcriptoma, los péptidos fueron mapeados contra la base de datos KEGG para identificar rutas biológicas, en la Figura 4 se presentan las 40 rutas mejor representadas en el ensamblaje *de novo*. También se realizó predicción de dominios de la base Pfam, se buscaron sitios de señalización de ruptura, dominio transmembranales y ARN ribosomal.

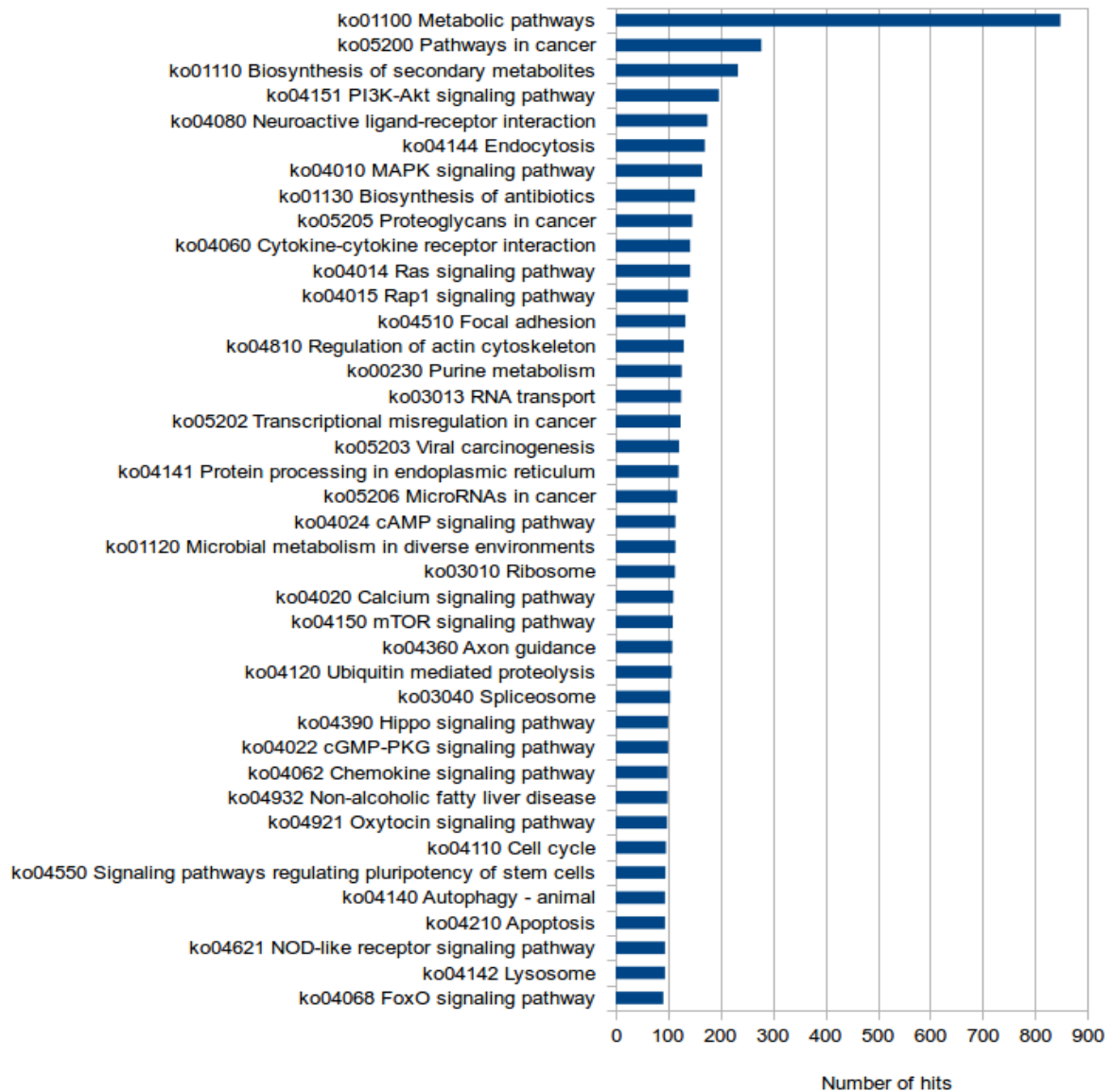


Figura 4. Top 40 Rutas biológicas KEGG mejor representadas en los péptidos hipotéticos identificados del transcriptoma de *L. guttatus*

## 6.2 Efecto de la Fuente de Proteína en la Expresión de Genes Involucrados en Crecimiento/Atrofia en *Lutjanus guttatus*

### 6.2.1 Resultados

En esta sección se presentan y discuten los resultados correspondientes al experimento de sustitución de harina de pescado por fuentes alternativas de proteína en la alimentación del

pargo flamenco. En la Tabla 5 se presentan los parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia, donde es posible observar que los peces alimentados con la dieta VEG mostraron un pobre desempeño en crecimiento al igual que en ingesta y factor de conversión del alimento al compararlos contra los resultados obtenidos con los otros dos tratamientos, siendo los peces alimentados con la dieta PPM los que presentaron mejor crecimiento y eficiencia alimenticia.

**Tabla 5. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de los juveniles de *L. guttatus* alimentados con las dietas experimentales por 60 días**

	FM	PPM	VEG
Peso inicial (g)	61.32±0.24	61.21±0.24	61.14±0.04
Peso final (g)	120.71±3.09 <sup>b</sup>	132.67±3.79 <sup>a</sup>	98.50±2.18 <sup>c</sup>
Ganancia de peso (%)	96.87±5.82 <sup>b</sup>	116.75±6.94 <sup>a</sup>	61.10±3.47 <sup>c</sup>
TCE (% d <sup>-1</sup> )	1.13±0.05 <sup>b</sup>	1.29±0.05 <sup>a</sup>	0.79±0.04 <sup>c</sup>
FCA	1.46±0.16 <sup>b</sup>	1.35±0.10 <sup>b</sup>	1.89±0.06 <sup>a</sup>
FEP	1.54±0.17 <sup>a</sup>	1.65±0.12 <sup>a</sup>	1.18±0.03 <sup>b</sup>
Ingesta total (g)	86.29±4.49 <sup>a</sup>	96.31±4.1 <sup>a</sup>	70.40±3.51 <sup>b</sup>
FC	1.89±0.09 <sup>a</sup>	1.78±0.08 <sup>b</sup>	1.63±0.08 <sup>c</sup>
Supervivencia (%)	87.27±6.30	97.22±4.81	97.22±4.81
IHS	2.67±0.30 <sup>a</sup>	2.25±0.41 <sup>a</sup>	1.37±0.20 <sup>b</sup>
IVS	3.73±0.50 <sup>b</sup>	4.45±0.39 <sup>a</sup>	3.21±0.36 <sup>b</sup>
IGM	6.38±1.40	5.94±1.15	6.95±1.42

En el hígado, los factores endocrinos *igf1*, *igf2* y *ghr* mostraron niveles de expresión significativamente diferentes entre tratamientos (Figura 5). En general, los peces alimentados con la dieta FM y PPM mostraron un nivel más alto de expresión que los peces alimentados con la dieta VEG, consistente con los valores de HSI Tabla 5. En lo que respecta a la expresión cerebral de *pacap*, esta fue significativamente menor en los peces alimentados con las dietas PPM y VEG comparados contra aquéllos alimentados con la dieta FM (Figura 5).



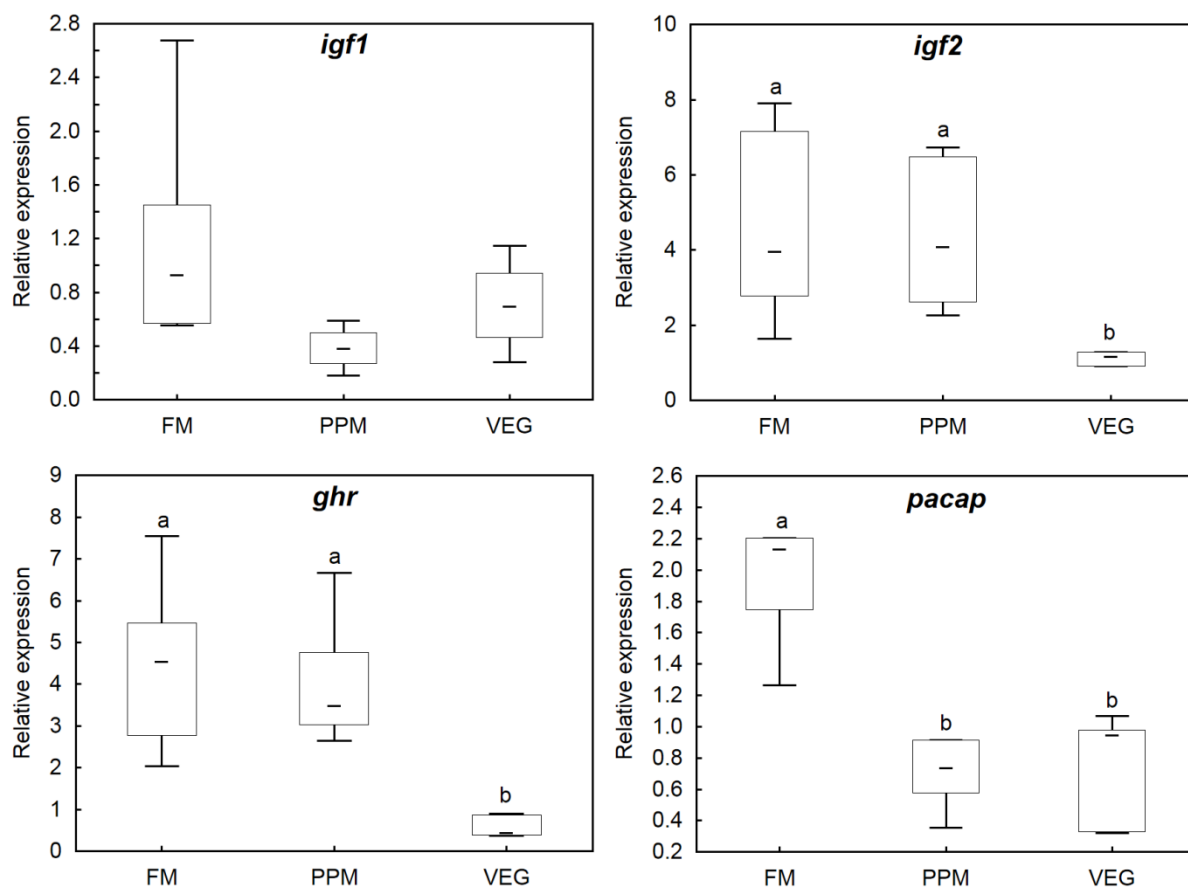


Figura 5. Expresión relativa de *igf1*, *igf2* y *ghr* en hígado, y *pacap* en cerebro de juveniles de *L. guttatus* alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG). El punto medio representa la mediana, los valores de las cajas representan los percentiles y las líneas representan los límites para valores extremos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada gen analizado ( $p < 0.05$ ).

En el músculo, se observó un patrón de expresión similar en los marcadores de crecimiento (Figura 6); la expresión de *mtor* fue significativamente mayor en los peces alimentados con la dieta FM, mientras que los grupos alimentados con PPM y VEG mostraron una menor expresión sin tener diferencias significativas entre ellos. En cuanto a los factores reguladores miogénicos, *myod1* y *myod2*, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los distintos grupos, aunque la expresión parece ser un poco menor en los grupos PPM y VEG con respecto al grupo FM. La expresión de *myogenin* fue menor en el grupo VEG comparado contra el grupo control FM, mientras que los peces alimentados con la dieta PPM no presentaron diferencias estadísticas con ninguno de los otros dos grupos.

Para los genes de atrofia (Figura 7), *mafba* mostró niveles muy bajos de expresión en todas las muestras cuantificadas, y por lo tanto, dichos datos no fueron considerados para análisis posteriores. La expresión de *murfl*, *foxo3a*, *foxo3b* y *mstn2*, no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre tratamientos, solo *mstn1* mostró un nivel de expresión estadísticamente significativo entre los peces alimentados con las dietas FM y los peces del grupo VEG, siendo menor en este último, mientras que el grupo PPM no tuvo diferencias con ninguno de los otros dos. Este resultado fue inesperado ya que el producto de este gen funciona como regulador negativo del crecimiento en los peces, por lo se esperaba que los niveles de expresión en el grupo VEG fuesen mayores.

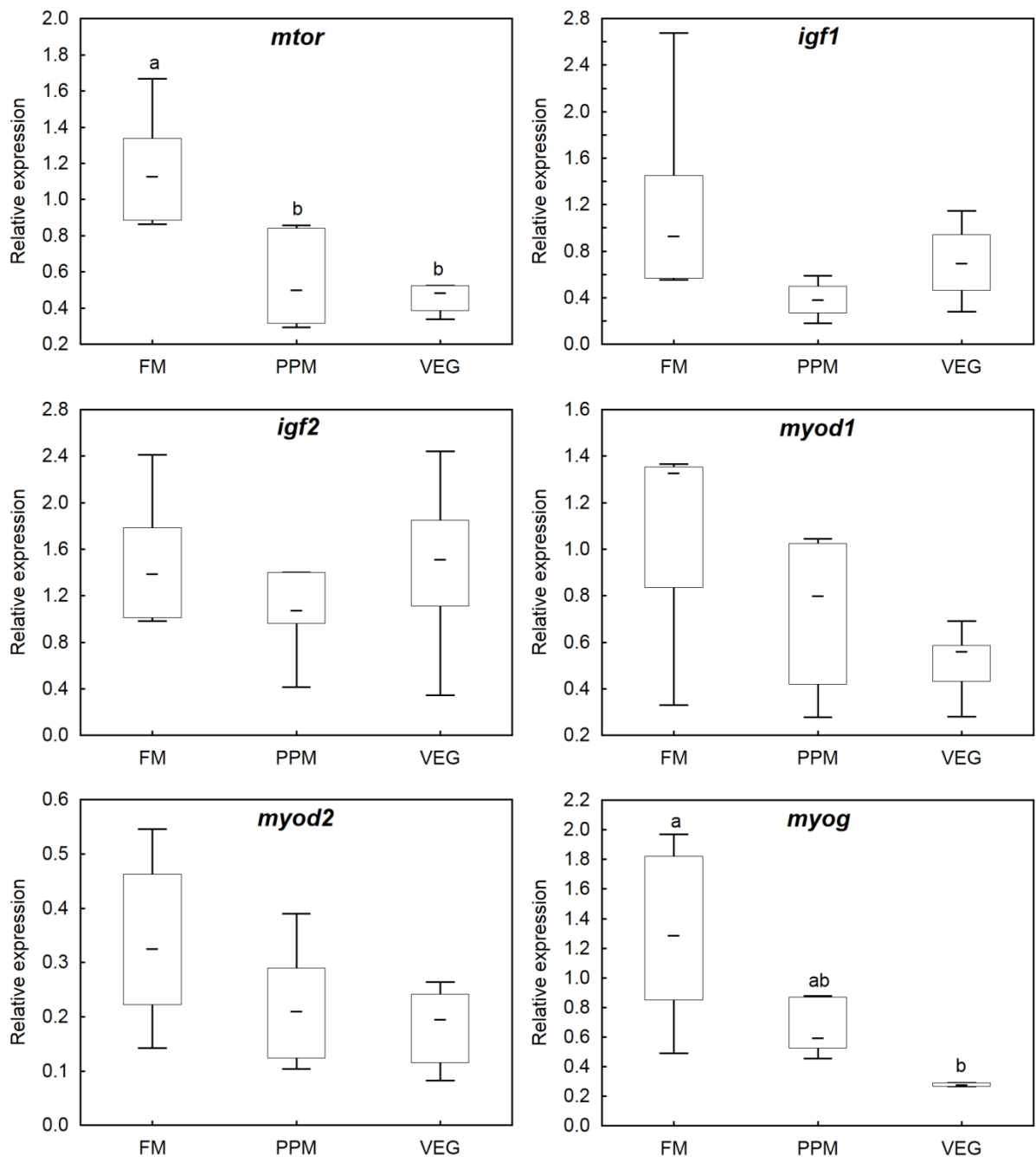


Figura 6. Expresión relativa de los genes de crecimiento *mtor*, *igf1*, *igf2*, *myod1*, *myod2* y *myogenin* en músculo de juveniles de *L. guttatus* alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG). El punto medio representa la mediana, los valores de las cajas representan los percentiles y las líneas representan los límites para valores extremos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada gen analizado ( $p < 0.05$ ).

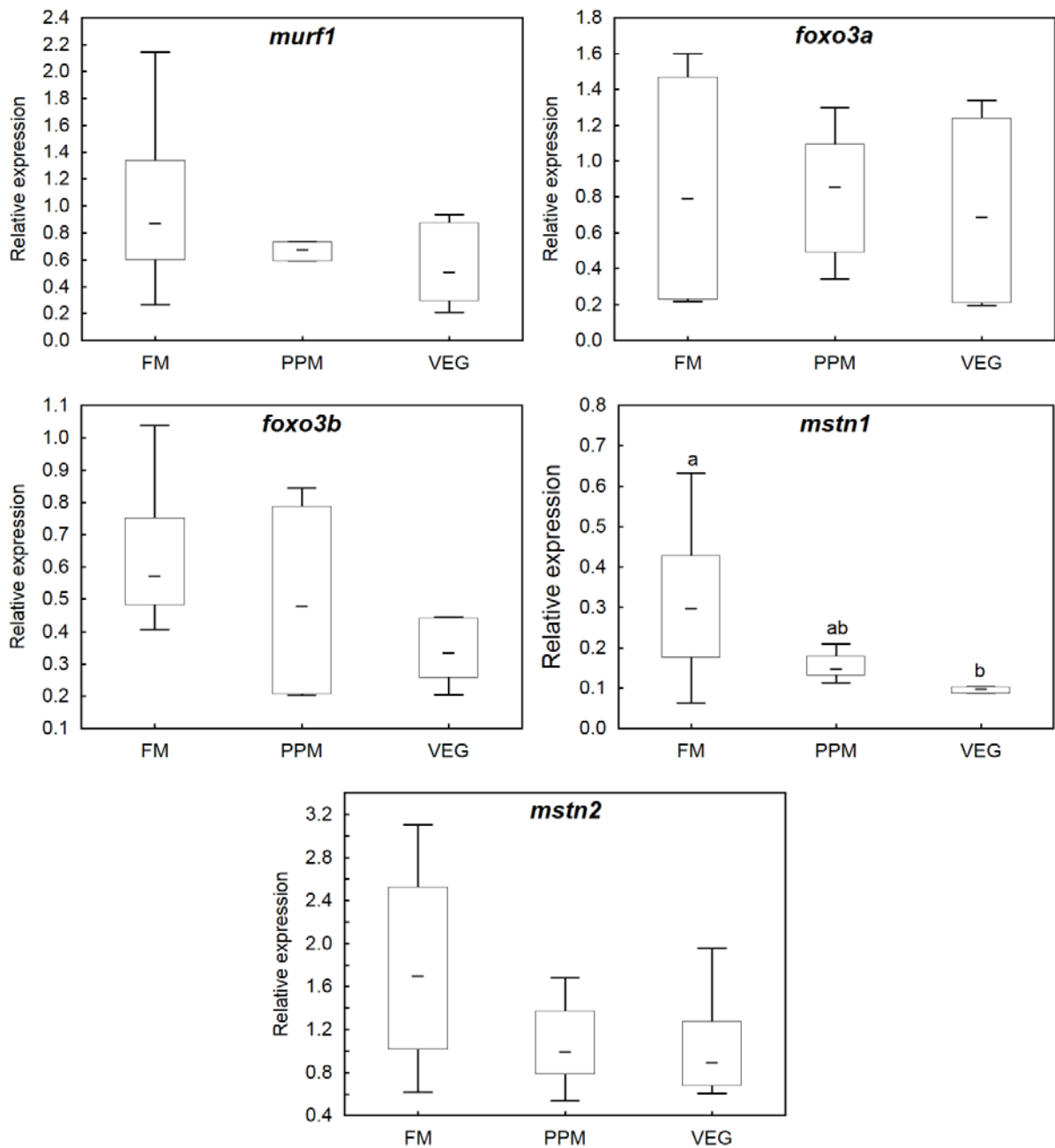


Figura 7. Expresión relativa de marcadores de atrofia *murf1*, *foxo3a*, *foxo3b*, *mstn1* y *mstn2* en músculo de juveniles de *L. guttatus* alimentados con dieta a base de harina de pescado (FM); dieta a base de harina de aves y carne de puerco (PPM); dieta a base de harina vegetal (VEG). El punto medio representa la mediana, los valores de las cajas representan los percentiles y las líneas representan los límites para valores extremos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada gen analizado ( $p < 0.05$ ).

## 6.2.2 Discusión

El reemplazo de la harina de pescado con ingredientes alternativos (tales como la harina de soya y la harina de sub-productos avícolas) se ha analizado previamente en la especie en cuestión (Hernández *et al.*, 2014; Silva Carrillo *et al.*, 2012); sin embargo, los efectos en la expresión génica no habían sido analizados. El presente estudio muestra que la sustitución completa por una mezcla vegetal en la dieta de *L. guttatus* tiene un impacto negativo en el crecimiento y en la expresión de genes relacionados a crecimiento. Un patrón similar se observó en la expresión de *ghr*, *igf1* e *igf2* en el hígado, consistente con los resultados en la ganancia en peso, tasa de crecimiento específico, ingesta de alimento y factor de conversión alimenticia (Tabla 5), donde los peces alimentados con la dieta VEG mostraron un desempeño significativamente menor en estos parámetros. Resultados similares han sido obtenidos en la dorada *Sparus aurata*, donde la sustitución completa de la harina de pescado por una mezcla de proteínas vegetales causó un menor crecimiento así como una menor expresión de *igf1* y *ghr* (Gómez-Requeni *et al.*, 2004). También, en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), una menor ingesta acompañada de un menor crecimiento fue detectada en los peces alimentados con altos niveles de proteína vegetal por 3 meses, además, una tendencia a una menor expresión de *igf1* fue observada en músculo rápido, más no en hígado (Hevrøy *et al.*, 2008). En el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*, los peces alimentados con dietas con un alto contenido de proteína de origen vegetal, presentaron un menor crecimiento y menor expresión de *igf1* en hígado, aunque la adición de hidrolizado de proteína de pescado en niveles moderados, mejoró la respuesta de crecimiento (Zheng *et al.*, 2014).

En este estudio, ya que los peces que se alimentaron con la dieta VEG tuvieron una menor ingesta y por lo tanto una menor disponibilidad de aminoácidos, el crecimiento se vio comprometido, y esto podría explicar los resultados observados en la expresión de los genes que pertenecen al eje somatotrópico, dado el hecho de que el estatus nutricional juega un papel muy importante en la actividad de dicho sistema. Sin embargo, los peces alimentados con la dieta PPM, también mostraron una menor expresión de *mtor*, resultado que se considera como inesperado puesto que el crecimiento en este grupo de peces no se vio afectado de forma negativa. Ha sido bien documentado que la acreción de proteína, y por lo tanto, el crecimiento, está regulada por la ruta PI3K/Akt/mTOR y dentro de este contexto, mTOR es un componente clave (Schiaffino y Mammucari, 2011). mTOR regula la síntesis de

proteína y de lípidos, y diferentes estímulos tales como los factores de crecimiento, niveles de oxígeno, el estatus energético de la célula, la disponibilidad de aminoácidos así como su tipo, la inflamación, estrés celular, pueden activar la señalización de mTOR (Sengupta *et al.*, 2010). El hecho de que la expresión de *mtor* haya sido significativamente mayor en músculo de los peces alimentados con la dieta FM, pero que la expresión de ambos factores, *igf1* e *igf2*, no fue significativamente diferente en los tres grupos (aunque *igf1* fue mayor en el grupo FM), sugiere que el nivel de expresión de *mtor* pudo haber sido inducido por el contenido de aminoácidos y ácidos grasos en la dieta FM. También es plausible que la expresión más baja en el grupo PPM haya sido debido a la composición de aminoácidos y lípidos de la dieta, puesto que algunos aminoácidos (tales como la leucina) y ácidos grasos poliinsaturados (presentes en el aceite de pescado), son capaces de estimular la expresión y actividad de mTOR en peces (Smith *et al.*, 2011; Garcia de la Serrana *et al.*, 2016), en cuanto este último punto, la dieta PPM contenía la menor cantidad de aceite de pescado (Tabla 2).

En cuanto a la expresión de *pacap*, el resultado fue el esperado en el grupo FM, por las funciones promotoras de crecimiento de PACAP al funcionar como estimulador de la liberación de GH en peces (Lugo *et al.*, 2008), sin embargo, los bajos niveles de expresión de *pacap* observados en el grupo PPM fueron inconsistentes, ya que se esperaba que estos peces mostraran altos niveles puesto que presentaron un mejor crecimiento que el grupo FM (Tabla 5). PACAP y sus receptores se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central y órganos periféricos. Hasta el momento, 3 receptores para PACAP se han identificado en humanos (PAC1, VPAC1 y VPAC2), y la cantidad de receptores aumenta por splicing alternativo (Vaudry *et al.*, 2009). Por lo tanto, la diversidad de receptores de PACAP provee de una variedad de respuestas biológicas que quizás puedan explicar los resultados obtenidos. En el presente estudio, se encontraron 11 transcritos (completos e incompletos) codificantes para PACAP, mismos que necesitan un análisis más completo. Se necesita investigación más detallada sobre los niveles de expresión tejido-específicos de los receptores de PACAP, así como de sus rutas de señalización, para entender la complejidad de la biología de PACAP bajo distintos regímenes de alimentación y diferentes fuentes proteicas.

MyoD y myogenina pertenecen a una familia de factores de transcripción básicos hélice-rizo-hélice (bHLH), junto con Mrf4 y Myf5, y son factores clave en la activación y progresión de las células satélite en miocitos (Berkes y Tapscott, 2005). Investigaciones previas han demostrado que los factores reguladores miogénicos pueden verse afectados por el estatus

nutricional, más específicamente por la restricción de alimento (Bower y Johnston, 2010; Campos *et al.*, 2010; Mareco *et al.*, 2015), situación que será discutida en la siguiente sección, por otro lado, la información sobre los efectos de las fuentes proteínicas en dichos factores es aún escasa.

En este estudio, la expresión de *myod1* y *myod2*, aunque no fue significativa la diferencia, su expresión fue más baja en el grupo de peces alimentado con la dieta VEG. En cuanto a la expresión de *myogenina*, fue significativamente más baja en el grupo VEG comparado contra el grupo FM, consistente con el peso más bajo de los peces del grupo VEG. Inclusive, aunque las diferencias en la expresión de dichos genes no fue significativa, parece ser que hubo una inducción de miogénesis en el grupo FM. *myod* se expresa antes que *myogenin* durante la progresión del crecimiento muscular, y lo hace en las células que están proliferando, mientras que *myogenin* opera durante la diferenciación terminal del músculo (Rossi y Messina, 2014). De tal forma que estos resultados sugieren que la proliferación y diferenciación celular en las células musculares fueron activadas en los peces alimentados con la dieta FM.

Descubrimientos previos a este respecto se han registrado para diversas especies de peces, pero no han mostrado un patrón consistente, por ejemplo en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, una dieta rica en harina de soya provoca una menor expresión de *myod* en músculo blanco, aunque la expresión de *myogenina* no se ve afectada, en contraste, la expresión global de genes no se vio afectada en el músculo (Alami-Durante *et al.*, 2010). En otro estudio, con pez cebra, solo los machos presentaron una expresión menor de *myogenina*, junto con una menor expresión de *mrf4* y de *igf2a*; sin embargo, los niveles de *igf1a*, *mtor*, *pld1a*, *myod*, *myogenina* y *mstn1b* no se vieron alterados por la dieta (Ulloa *et al.*, 2013). Existe una evidencia creciente que los factores de crecimiento IGF pueden modular la expresión y la actividad de Myod y de myogenina (Zanou y Gailly, 2013); no obstante, los mecanismos de señalización por los que dichos procesos son regulados en peces, siguen siendo objeto de estudio. Tomando esto en cuenta, podríamos esperar que una menor expresión de los genes del eje somatotrópico pudiera estar relacionada con una menor expresión en los genes que codifican a los factores reguladores miogénicos, resultando así en un menor crecimiento.

Aunque a una tasa menor, los peces alimentados con la dieta VEG crecieron, lo que significa que la acreción de proteína sobrepasó la tasa de degradación de proteínas. Cualquier reducción en la acreción de proteína en el tejido muscular puede ser causada por una

disminución en la tasa de síntesis de proteínas y/o un aumento en la degradación de proteínas, pero es importante notar que una disminución en la síntesis de proteínas no necesariamente indica una activación de los mecanismos que producen atrofia muscular (Sandri, 2013). En este estudio, aunque se expresaron a cierto nivel (excepto por *mafbx*), no hubo un efecto aparente de la fuente de proteína en dieta sobre la expresión de genes involucrados en la degradación de proteínas por el sistema de ubiquitinación, específicamente *foxo3a*, *foxo3b*, *murfl* y *mafbx*. La deficiencia de nutrientes ocasionada por la dieta VEG no fue suficiente para activar este tipo de degradación. Como se ha reportado en otros estudios, estas rutas podrían ser activadas solamente durante condiciones de catabolismo severo, tales como la inanición completa o por la inducción con glucocorticoides (Bodine y Baehr, 2014; Bonaldo y Sandri, 2013). Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos de Espe *et al.* (2016); estos autores encontraron que la expresión de los genes *murfl* y *mafbx* no se vio afectada por cambios en los niveles de metionina en la dieta del salmón del Atlántico, sin embargo, si se observó una menor ganancia de proteína y un nivel de expresión de *igfl* menor. También, en cerdos alimentados con niveles restringidos de proteína, no se observaron efectos en la expresión de *murfl* y *mafbx*, aunque dichos cerdos sí mostraron una menor ganancia de peso en comparación con los organismos control al final de experimento (Li *et al.*, 2016).

En cuanto a la expresión de *mstn1*, se observó que los peces alimentados con la dieta vegetal presentaron una expresión más baja, contrario a lo que se esperaba, una posible explicación a esto, puede ser que en dicho grupo, los peces tenían suficiente proteína MSTN1 activa para realizar su función, y por lo tanto se encontraron niveles menores gracias a una retroalimentación negativa, sin embargo, para poder probar este escenario potencial, se necesitaría información de las proteínas. Es importante mencionar que las muestras fueron tomadas solo al final del ensayo, y por lo tanto, las posibles fluctuaciones en *mstn1* no pudieron ser registradas. Es importante mencionar esto ya que para esta misma especie, se ha encontrado que existen fluctuaciones diarias en la expresión de este gen (Torres-Velarde *et al.*, 2015).

Si bien es cierto que el sistema ubiquitinación – proteosoma es una de las principales rutas de degradación de proteínas, existen otras rutas que pudieran controlar la deficiencia de nutrientes observada en el grupo de peces alimentado con la dieta VEG, tal es el caso de la ruta general de control de aminoácidos (GAAC). Esta ruta puede acoplarse a la autofagia y es capaz de mantener los niveles de aminoácidos bajo inanición, la condición de inanición es



detectada por la célula a través de la desactivación de la ruta mTOR, que a su vez activa un programa genético que regula la biosíntesis de aminoácidos y transporte, junto con la activación de genes relacionados con la autofagia, tales como *atf4* (Factor de activación de transcripción-4). Estudios recientes en diversas especies de peces han demostrado que la deficiencia en dieta de metionina o el reemplazo de la harina de pescado con proteínas vegetales puede inducir la expresión de *atf4*, junto con otros genes bajo el control de ATF4 (Skiba-cassy *et al* 2016; Wang *et al* 2016; Xu *et al* 2017). Distintos genes relacionados a la autofagia se detectaron en el transcriptoma de *L. guttatus*; por lo tanto, los mecanismos por los que la autofagia regula la degradación de proteínas bajo distintos regímenes alimenticios con fuentes alternativas de proteína merecen un análisis más detallado.

Las proteínas de origen vegetal pueden tener distintas limitaciones nutricionales ya que carecen de aminoácidos esenciales como metionina y lisina (Conceição *et al.*, 2012). A pesar de que las dietas experimentales fueron suplementadas con la suficiente metionina para alcanzar los mismos niveles de la dieta FM, la ingesta de alimento y el crecimiento en la dieta VEG no fueron mejorados. Una posible explicación podría ser una mala palatabilidad de dicha dieta y/o la presencia de factores antinutricionales, así como la baja de absorción de metionina por tránsito rápido del alimento a lo largo del intestino. En función del procesamiento, el concentrado de proteína de soya es conocido por tener una cierta cantidad de factores antinutricionales, tales como inhibidores de proteasas, lectinas y antígenos, entre otros, que podrían ocasionar problemas intestinales y una reducción en la absorción de nutrientes, que en última instancia, afectan el crecimiento (Francis *et al.*, 2001; Hardy, 2010). El gluten de maíz no contiene factores antinutricionales pero se caracteriza por la presencia de oligosacáridos (Hardy 2010), que son de muy poco valor nutricional para animales carnívoros, tal como lo es el pargo flamenco, y de alguna manera podrían impactar la digestibilidad del alimento. Sin embargo, sería importante todavía analizar si la disminución en el crecimiento causada por las proteínas de origen vegetal fue por la presencia de factores antinutricionales o cambios en el perfil de aminoácidos.

### 6.3 Efecto de la Restricción Alimenticia y Realimentación en *L. guttatus*

#### 6.3.1 Crecimiento y Eficiencia Alimenticia

Los cambios en la masa corporal de los peces están presentados en la Figura 8. Todos los peces tuvieron un peso similar (31.6 g) al inicio del experimento. Una vez que los periodos de restricción alimenticia concluyeron, los peces tratados de ambos grupos en ayuno mostraron una pérdida de masa corporal con respecto a su condición inicial. La pérdida de peso en los peces sometidos a dos semanas de ayuno (2WF) fue mayor que la de los peces sometidos a una semana de ayuno (1WF). Sin embargo, los peces de ambos tratamientos lograron reanudar el crecimiento al volver a ser alimentados, pero ninguno de los dos grupos fue capaz de alcanzar el mismo tamaño que los organismos control al final de las 4 semanas de realimentación.

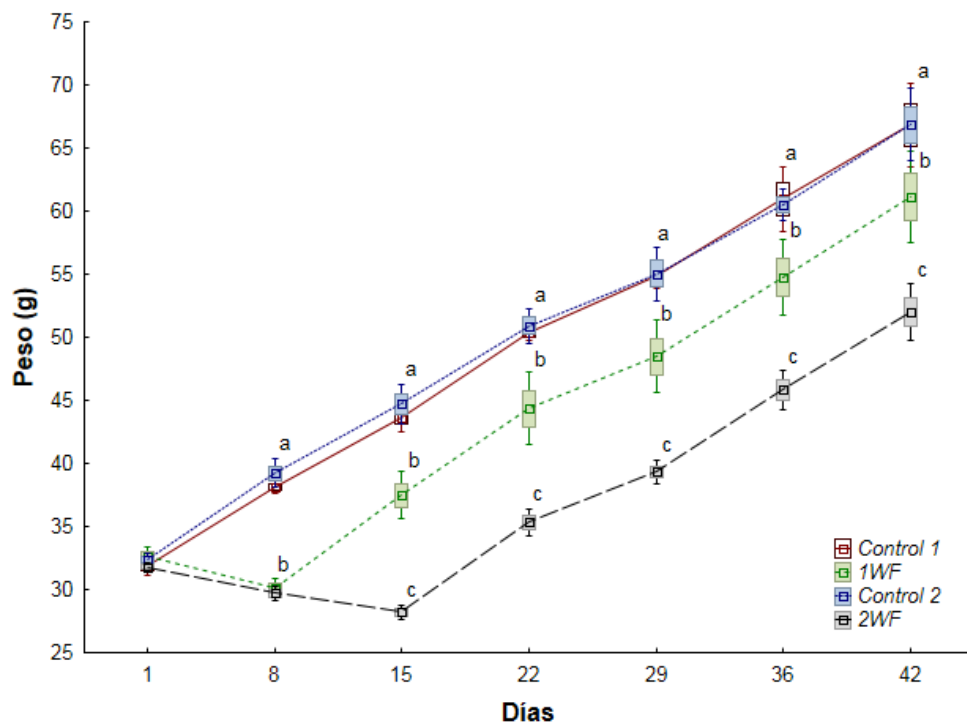


Figura 8. Cambios en el peso de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. El punto medio representa la media, los valores de las cajas representan el error estándar y las líneas representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de manera semanal ( $p < 0.05$ ).

La ganancia en peso se evaluó de forma semanal, y el único punto donde se lograron detectar diferencias significativas fue en la primera semana post-realimentación, donde los peces 1WF mostraron una mayor ganancia en peso. No se detectaron más diferencias durante el resto del experimento (Figura 9).

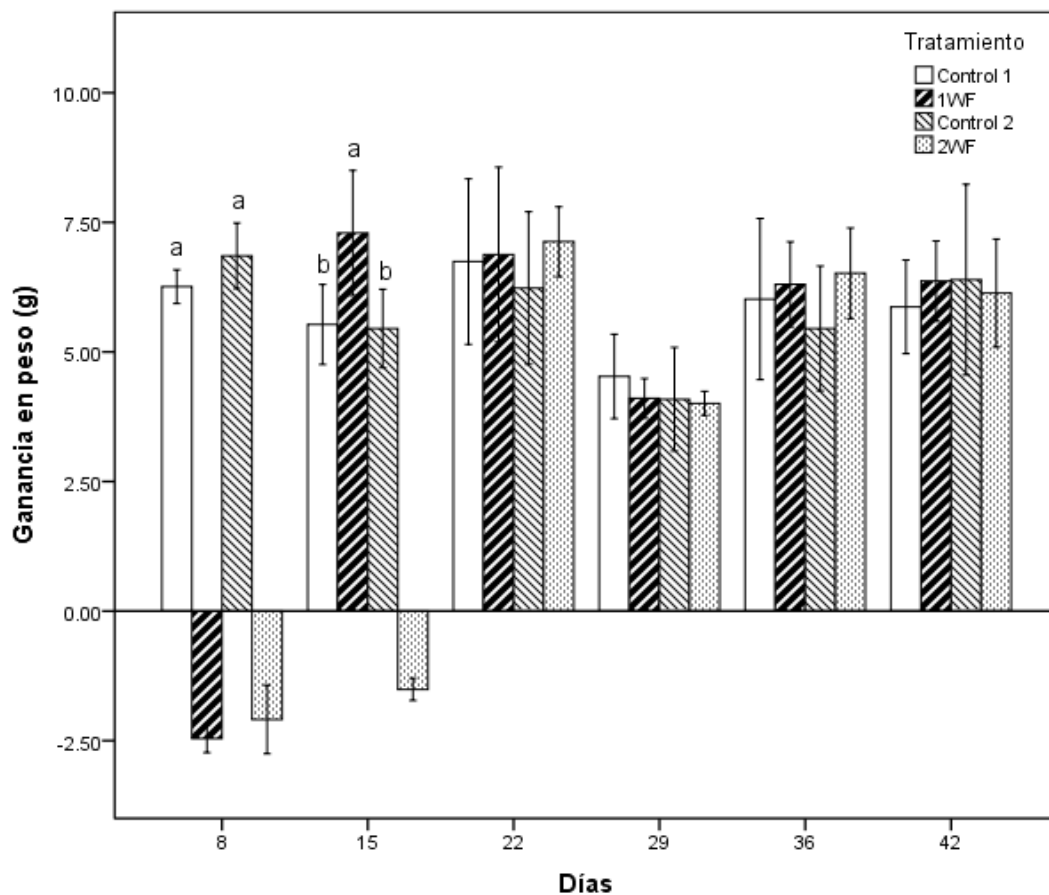


Figura 9. Ganancia en peso semanal en juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de manera semanal ( $p < 0.05$ ).

La tasa de crecimiento específico (SGE por sus siglas en inglés) fue analizada de la misma manera que la ganancia en peso. El grupo 1WF mostró una TCE mayor durante la primera semana de realimentación, después de ese punto, regresó al mismo nivel que los organismos control y continuó sin cambios por el resto del experimento. En el caso del grupo 2WF, se observó el mismo resultado que con el grupo 1WF, la TCE fue significativamente más alta que los demás grupos durante la primera semana de realimentación. En la tercera semana

post-realimentación, el grupo 2WF presentó una TCE mayor que su grupo control; sin embargo, no fue significativamente diferente de los otros grupos (Figura 10).

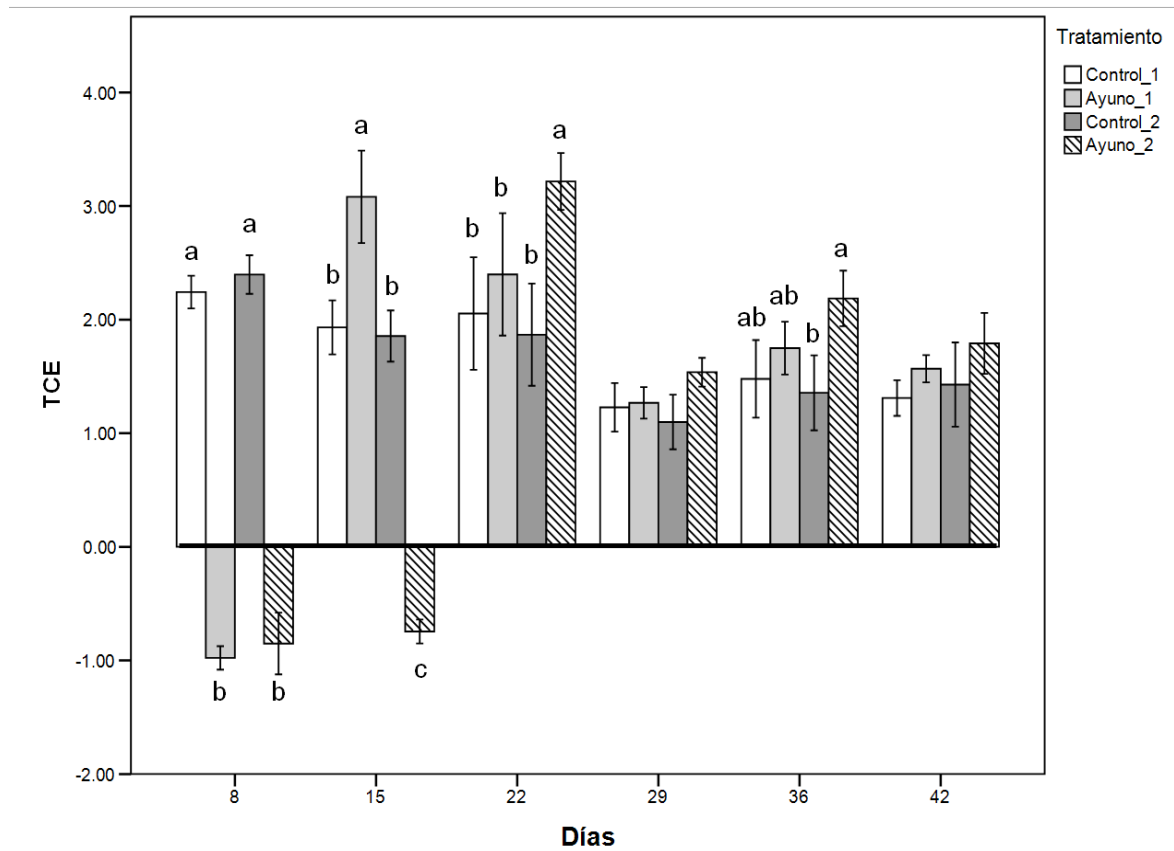


Figura 10. Tasa de crecimiento específico (TCE) semanal en juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de manera semanal ( $p < 0.05$ ).

La ingesta de alimento fue significativamente más alta en los peces sometidos a ayuno cuando se les proporcionó alimento nuevamente. La ingesta de alimento tuvo una ligera disminución en las semanas posteriores; sin embargo, la ingesta de los peces del grupo 2WF se siguió manteniendo más alta en relación a los organismos control.

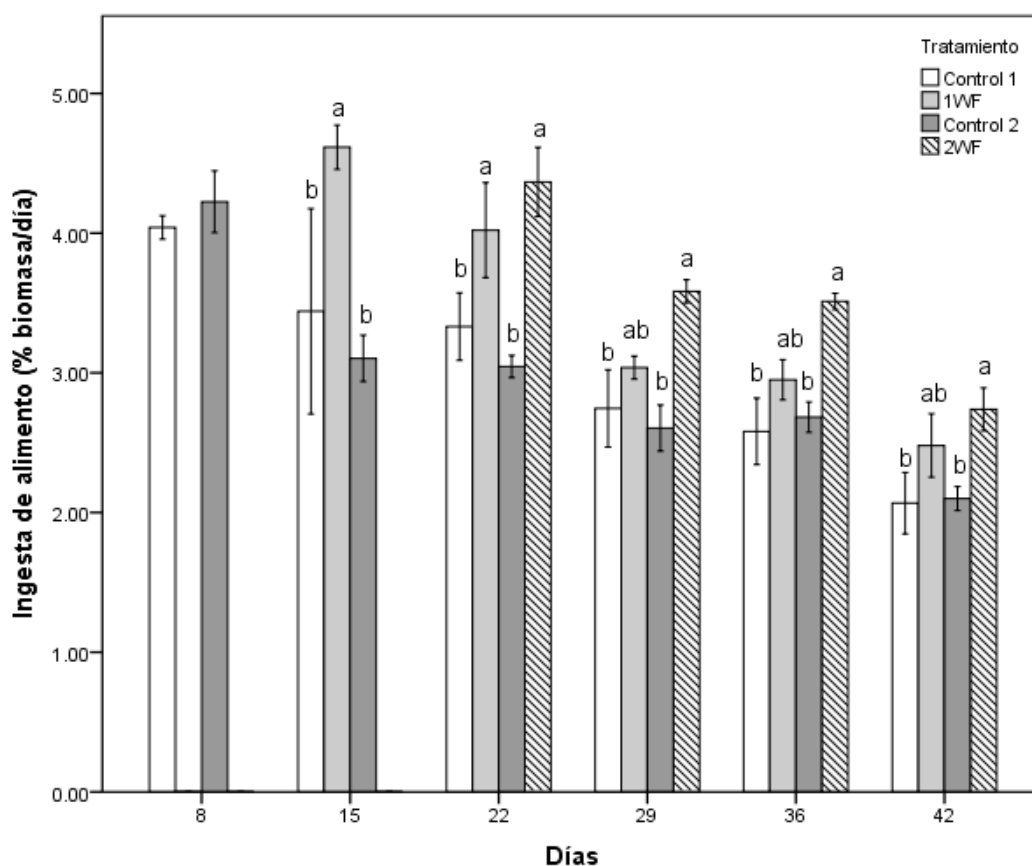


Figura 11. Ingesta de alimento semanal en juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de manera semanal ( $p < 0.05$ ).

El Factor de conversión alimenticia no mostró diferencias significativas a lo largo del ensayo al ser analizado mediante un ANOVA de dos vías; sin embargo, al comparar solamente el FCA del grupo 1WF contra su control utilizando una prueba t de Student, el FCA del grupo 1WF fue significativamente menor que el de su respectivo control durante la primera semana post-realimentación (datos no mostrados). Además, en ambos grupos de peces sometidos a ayuno fue posible observar una tendencia a un menor FCA durante la primera semana de realimentación. En las semanas posteriores, este parámetro presentó valores muy cercanos entre los diferentes grupos (Figura 12).

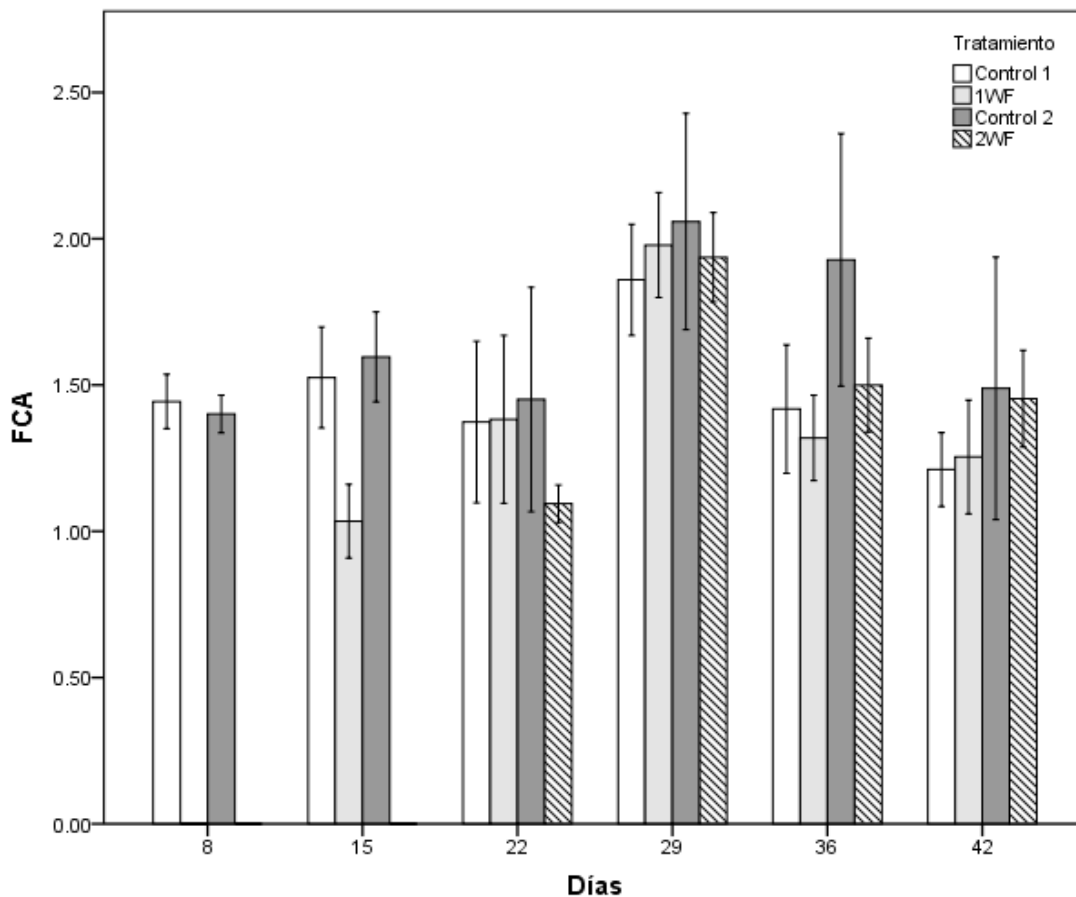


Figura 12. Factor de conversión alimenticia semanal en juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de manera semanal ( $p < 0.05$ ).

Los efectos de la restricción de alimento sobre los índices somáticos analizados (hepatosomático, viscerosomático y de grasa mesentérica) fueron evidentes (Tabla 6). Al final del ayuno, los peces de ambos tratamientos mostraron una gran reducción en sus reservas, siendo más severa en el grupo 2WF, ya que estos presentaron una mayor pérdida de grasa visceral que los peces del grupo 1WF. Sin embargo, los peces mostraron una gran capacidad de recuperación, principalmente en el hígado, ya que el índice hepatosomático de los peces tratados alcanzó e inclusive sobrepasó el de los peces control después de una semana de realimentación.

**Tabla 6. Cambios en índices Viscerosomático (VSI), Hepatosomático (HSI) y Grasa Meséntérica (MSI) en juveniles de *L. guttatus* sometidos a ayuno-realimentación.**

	1WF fish			2 semana de ayuno		
	Final del ayuno			Final del ayuno		
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
VSI	8.02 ± 0.88	4.84 ± 0.38	<0.001	8.71 ± 0.28	4.49 ± 0.14	<0.001
HSI	2.04 ± 0.44	0.60 ± 0.07	<0.001	2.10 ± 0.08	0.70 ± 0.09	<0.001
MSI	3.82 ± 0.53	1.91 ± 0.32	0.03	3.88 ± 0.19	1.32 ± 0.36	<0.001
	24 h post-realimentación			48 h post-realimentación		
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
VSI	8.34 ± 0.79	5.82 ± 0.47	0.03	9.02 ± 0.34	5.98 ± 0.42	<0.001
HSI	2.09 ± 0.31	1.06 ± 0.17	0.001	2.08 ± 0.07	1.63 ± 0.17	0.003
MSI	3.86 ± 0.51	2.13 ± 0.18	<0.001	4.39 ± 0.40	1.64 ± 0.32	<0.001
	1 semana post-realimentación			1 semana post-realimentación		
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
VSI	8.08 ± 1.41	6.87 ± 0.44	0.152	9.12 ± 0.51	7.37 ± 0.44	0.002
HSI	1.92 ± 0.39	1.86 ± 0.20	0.8	2.07 ± 0.23	2.50 ± 0.19	0.027
MSI	3.80 ± 0.90	2.56 ± 0.19	0.036	4.84 ± 0.41	2.30 ± 0.40	<0.001

### 6.3.2 Composición Proximal de los Peces

La composición proximal de los peces bajo ayuno-realimentación mostró cambios importantes durante el experimento (Tabla 7). Al finalizar el ayuno, los organismos que fueron privados de alimento, mostraron un nivel de humedad mayor en comparación con los controles, este resultado fue observado en los dos tratamientos. A una semana post-realimentación, el contenido de humedad empezó a disminuir a medida que la proporción de los otros componentes se incrementó. La pérdida de grasa fue notoria en ambos tratamientos, aunque fue más pronunciada en el grupo 2WF; sin embargo, una semana después de ser realimentados, los peces mostraron una recuperación considerable de lípidos, aunque no llegó al mismo nivel que los peces control. Por otro lado, la cantidad de proteína se mantuvo relativamente constante en el grupo 1WF al ser comparada contra el grupo control, mientras que en el caso del grupo 2WF el contenido de proteína cruda fue inclusive mayor en los peces tratados al compararlos con sus controles; sin embargo, a una semana post-realimentación, los niveles de proteína cruda se estabilizaron.

**Tabla 7. Composición proximal de los juveniles de *L. guttatus* sometidos a ayuno y realimentación.**

Componente	1 semana de ayuno					
	Final del ayuno			1 semana post-realimentación		
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
Humedad	71.5 ± 1.1	75.18 ± 0.7	0.0	70.0 ± 0.7	71.8 ± 0.4	0.029
Proteína	49.7 ± 0.7	50.14 ± 2.9	0.9	46.9 ± 2.9	48.3 ± 0.6	0.486
Lípidos	22.1 ± 1.0	18.07 ± 3.0	0.0	25.1 ± 2.6	21.0 ± 1.4	0.035
Ceniza	15.7 ± 0.7	19.03 ± 0.6	<0.001	15.7 ± 2.1	17.6 ± 0.6	<0.001

Componente	2 semanas de ayuno					
	Final del ayuno			1 semana post-realimentación		
	Control	Tratados	<i>p</i>	Control	Tratados	<i>p</i>
Humedad	69.5 ± 1.1	75.88 ± 2.0	0.0	71.0 ± 1.4	72.9 ± 0.8	0.049
Proteína	45.6 ± 1.0	51.74 ± 2.4	0.0	48.7 ± 0.9	48.4 ± 0.7	0.575
Lípidos	25.7 ± 1.1	14.01 ± 2.2	<0.001	24.1 ± 2.3	19.2 ± 1.1	0.008
Ceniza	15.2 ± 0.4	20.36 ± 1.0	<0.001	15.1 ± 1.9	16.7 ± 0.6	0.057

### 6.3.3 Histología en Hígado

El análisis histológico reveló cambios importantes en la cantidad de reservas hepáticas. De forma general, los peces control mostraron un alto nivel de lípidos durante todo el ensayo. Por otro lado, los peces sometidos a ayuno tuvieron una reducción sustancial en sus reservas hepáticas; sin embargo, también mostraron una gran capacidad de recuperar las reservas al ser alimentados nuevamente. A una semana post-realimentación, las reservas en hígado en ambos grupos experimentales se encontraron prácticamente al mismo nivel de los organismos control (Figuras 13 y 14).



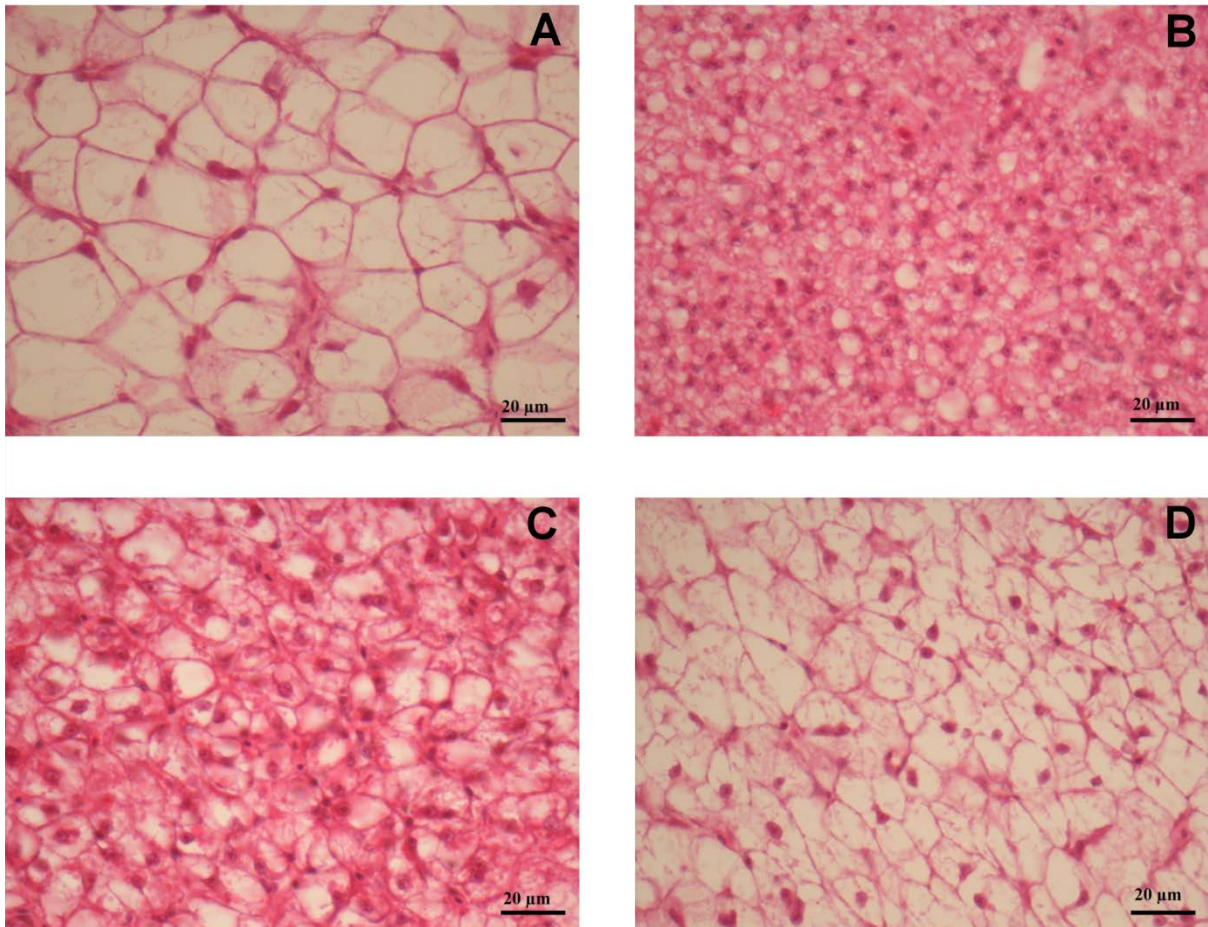


Figura 13. Cambios histológicos en el hígado de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana de ayuno y a una posterior realimentación. A) Controles. B) Después de una semana de ayuno. C) A 24 horas post-realimentación. D) A una semana post-realimentación.

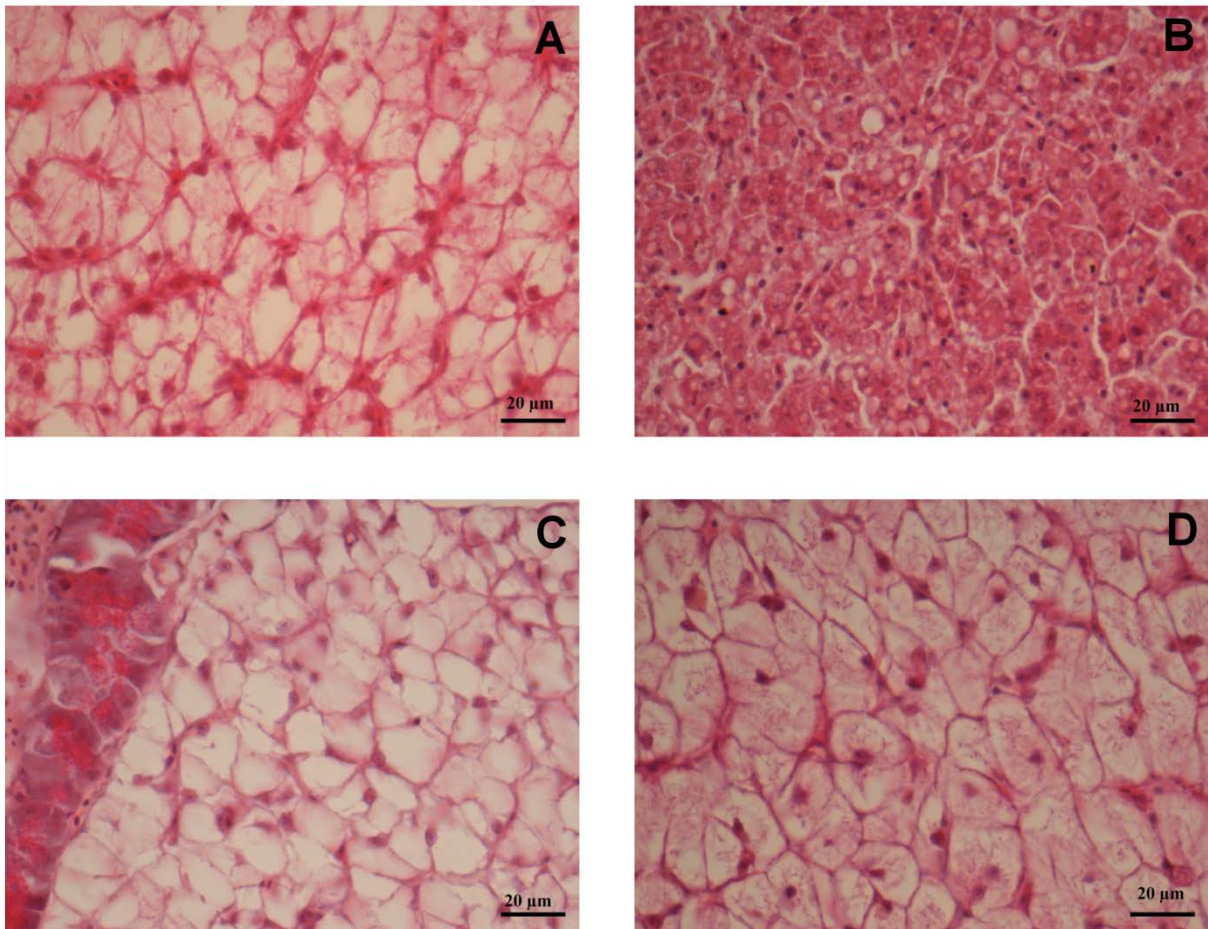


Figura 14. Cambios histológicos en el hígado de juveniles de *L. guttatus* sometidos a dos semanas de ayuno y a una posterior realimentación. A) Controles. B) Después de dos semanas de ayuno. C) A 48 horas post-realimentación. D) A una semana post-realimentación.

### 6.3.4 Expresión Génica en Hígado

El ayuno ocasionó cambios en la expresión de algunos de los genes analizados en este estudio. En general, el perfil de expresión génica fue similar en ambos grupos experimentales sin importar la duración de la restricción de alimento.

Factor de Crecimiento Tipo Insulina-I (*igf1*): La expresión hepática de *igf1* no presentó cambios significativos a lo largo del experimento, no obstante, los grupos 1WF y 2WF mostraron una menor expresión después de la realimentación (Figura 15).

Factor de Crecimiento Tipo Insulina-II (*igf2*): En cuanto a *igf2*, los peces del grupo 1WF mostraron una expresión significativamente mayor al final del ayuno, pero esta regresó al nivel de los controles después de la realimentación, por otro lado, el grupo 2WF no mostró cambios significativos en la expresión de *igf2* a través de los diferentes muestreos (Figura 15).

Receptor de Hormona de Crecimiento (*ghr*): Los peces sometidos a ayuno presentaron niveles menores en la expresión de este gen con respecto a los controles. A las 24 horas y a las 48 horas post-realimentación, para el grupo 1WF y para el grupo 2WF respectivamente, no hubo diferencias significativas en el nivel de expresión de *ghr* entre peces tratados y control, sin embargo, el grupo 1WF presentó un nivel de expresión más bajo. Después de una semana de realimentación, la expresión de *ghr* se mantuvo mayor en los grupos control con respecto a los organismos tratados aunque tal diferencia no fue significativa (Figura 15).

Leptina (*lep*): En lo que respecta a la expresión de *lep* en hígado, no se detectaron diferencias significativas entre organismos tratados y control, sin embargo, se observó una variabilidad muy alta dentro de los grupos experimentales (Figura 15).

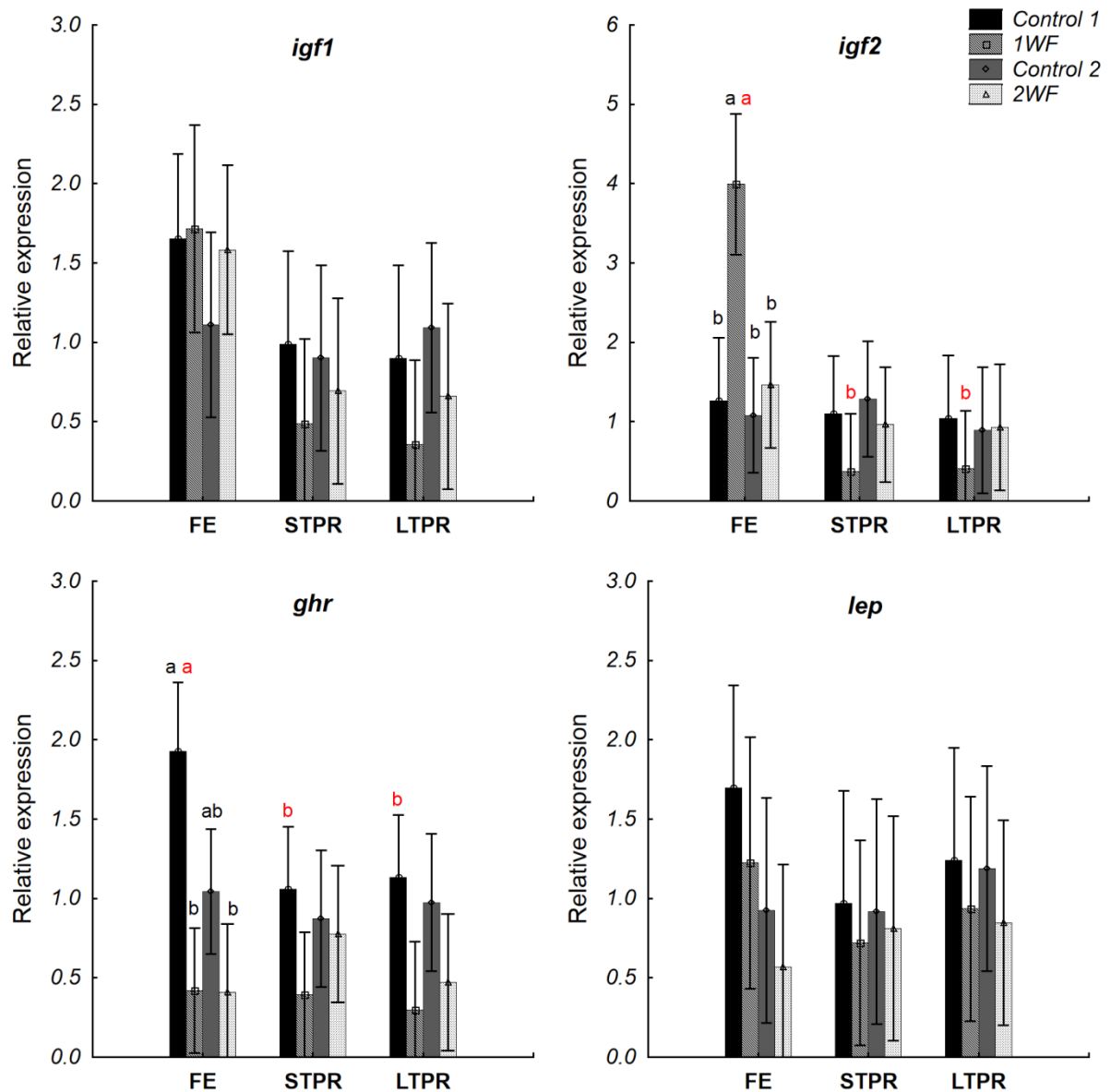


Figura 15. Expresión relativa de *ghr*, *igf1*, *igf2* y *lep* en hígado de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).

Lipasa lisosomal ácida (*lal*): Al final del ayuno, los peces tratados tanto del grupo 1WF como del grupo 2WF, mostraron un aumento significativo en la expresión de *lal*; los niveles de ARNm de *lal* a corto plazo después de la realimentación en los peces tratados presentaron una disminución significativa, dichos niveles no fueron significativamente diferentes de los

organismos control. Después de una semana de realimentación el nivel de expresión de *lal* no presentó más cambios (Figura 16).

Marcadores de autofagia (autophagy-related gene 7 (*atg7*) y Unc51-like autophagy activating kinase (*ULK1*)): Los marcadores de autofagia *atg7* y *ULK1* mostraron resultados inesperados, puesto que no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre peces tratados y peces control tanto en el grupo 1WF como en el 2WF. La única diferencia que se registró fue para *ULK1* al final del ayuno en los peces controles correspondientes al grupo 1WF, probablemente debido a una alta variación entre individuos (Figura 16).

### 6.3.5 Expresión Génica en Músculo Esquelético

Factor de Crecimiento Tipo Insulina I y II (*IGF1* and *IGF2*): Aunque la expresión de *IGF1* en tejido muscular no presentó diferencias significativas, los niveles de ARNm de este gen mostraron una tendencia a ser más altos al final del ayuno en ambos tratamientos. En el grupo 1WF, la expresión de *IGF1* disminuyó después de la realimentación, mostrando diferencias significativas con respecto al control. En cuanto al grupo 2WF, *IGF1* presentó un patrón de expresión similar al del grupo 1WF en los dos primeros muestreos; sin embargo, a una semana post-realimentación, *IGF1* se sobre-expresó significativamente. La expresión de *IGF2* mostró un perfil de expresión similar al de *IGF1*, aunque en este caso no se pudieron detectar diferencias significativas entre grupos (Figura 17).



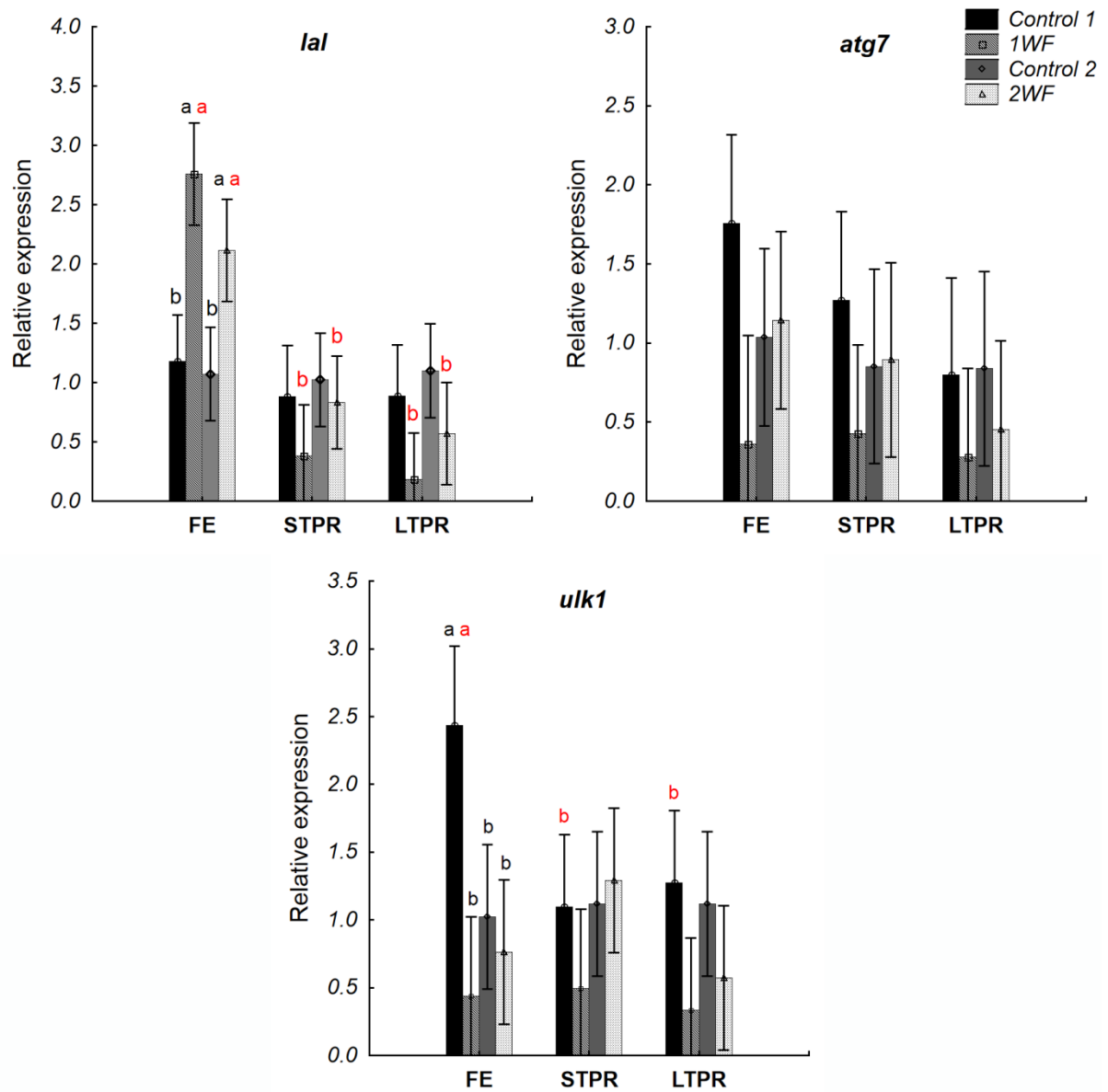


Figura 16. Expresión relativa de *lal*, *ulk1* y *atg7* en hígado de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).

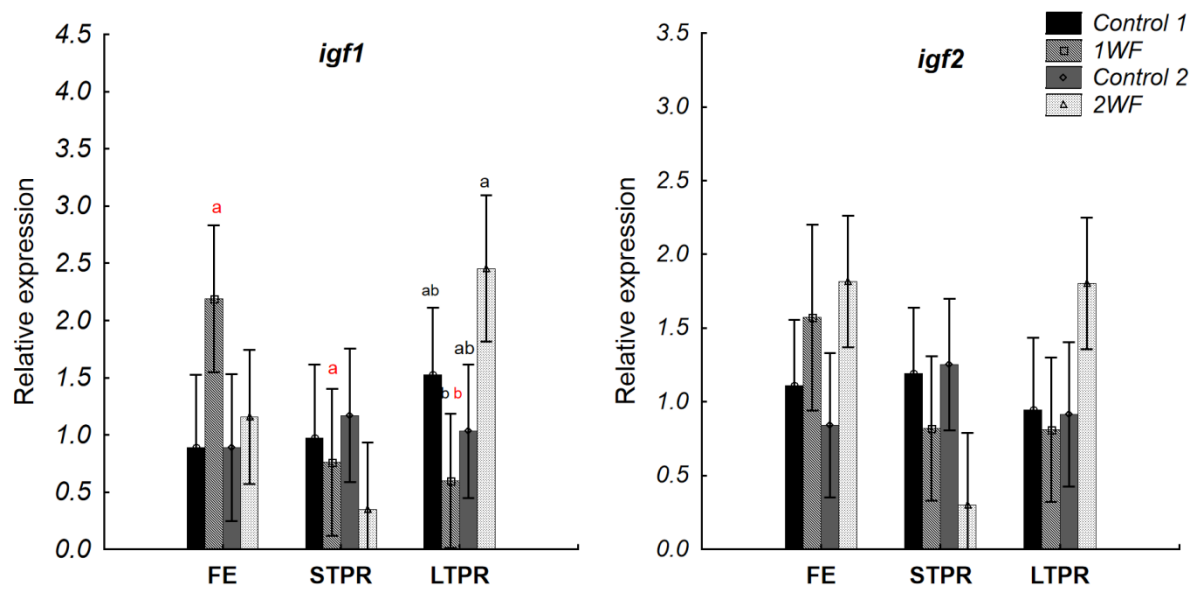


Figura 17. Expresión relativa de *igf1* y *igf2* en músculo de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).

Factores reguladores miogénicos (*myod1*, *myod2* y *myogenin*): Una semana de ayuno no tuvo un efecto claro en la expresión de *myod1* en *L. guttatus*. A corto plazo, después de la realimentación, la expresión de *myod1* en el grupo 1WF presentó un decremento sin ser significativo, mientras que a una semana post-realimentación, los niveles de expresión de *myod1* fueron mayores para el grupo 1WF, pero sin ser estadísticamente diferente del control. Para el grupo 2WF, la expresión de *myod1* al final del ayuno y a las 48 horas post-realimentación no fue significativamente diferente al grupo control, pero a una semana post-realimentación, se registró una sobreexpresión significativa de *myod1*. En lo que concierne a *myod2*, no se registraron diferencias en los primeros dos muestreos en ninguno de los dos tratamientos; sin embargo, en el tercer muestreo, los peces sometidos previamente a ayuno mostraron una expresión de *myod2* mayor, siendo significativa para el grupo 2WF con respecto a los controles. La expresión de *myogenin* fue similar entre los peces del grupo 1WF al terminar el ayuno y su respectivo control, pero a las 24 horas después de la realimentación, este grupo mostró niveles más bajo de *myogenin* con respecto al control, y se mantuvieron así inclusive una semana después. Por otro lado, los peces del grupo 2WF presentaron una

expresión significativamente menor al finalizar las dos semanas de ayuno, misma que aumentó gradualmente después de la realimentación (Figura 18).

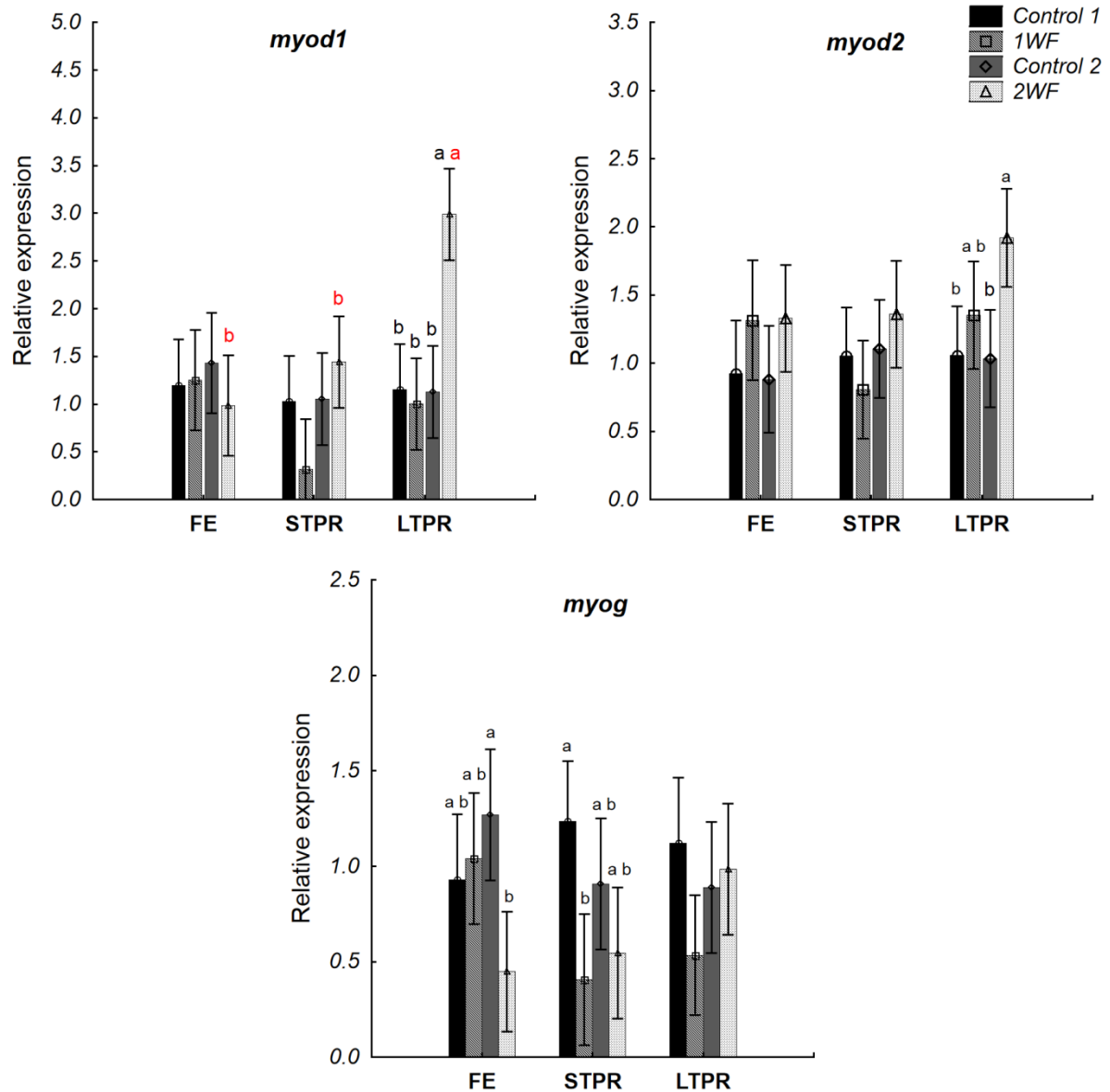


Figura 18. Expresión relativa de *myod1*, *myod2* y *myogenin* en músculo de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).



Genes de autofagia (*atg7* y *ulk1*): No hubo cambios significativos en la expresión de *atg7* en tejido muscular en ambos grupos a través de los diferentes puntos de muestreo, aunque la expresión de *atg7* fue potencialmente más alta en el grupo 1WF al final de la restricción alimenticia así como después de la realimentación, adicionalmente, una alta variabilidad dentro de los tratamientos pudo ser observada. Los niveles de expresión de *ulk1* en los peces 1WF no presentaron cambios significativos a lo largo del tiempo con respecto a los peces control, a diferencia de los peces del tratamiento 2WF, que sí presentaron una sobreexpresión significativa de *ulk1*, pero solo una semana después de la realimentación (Figura 19).

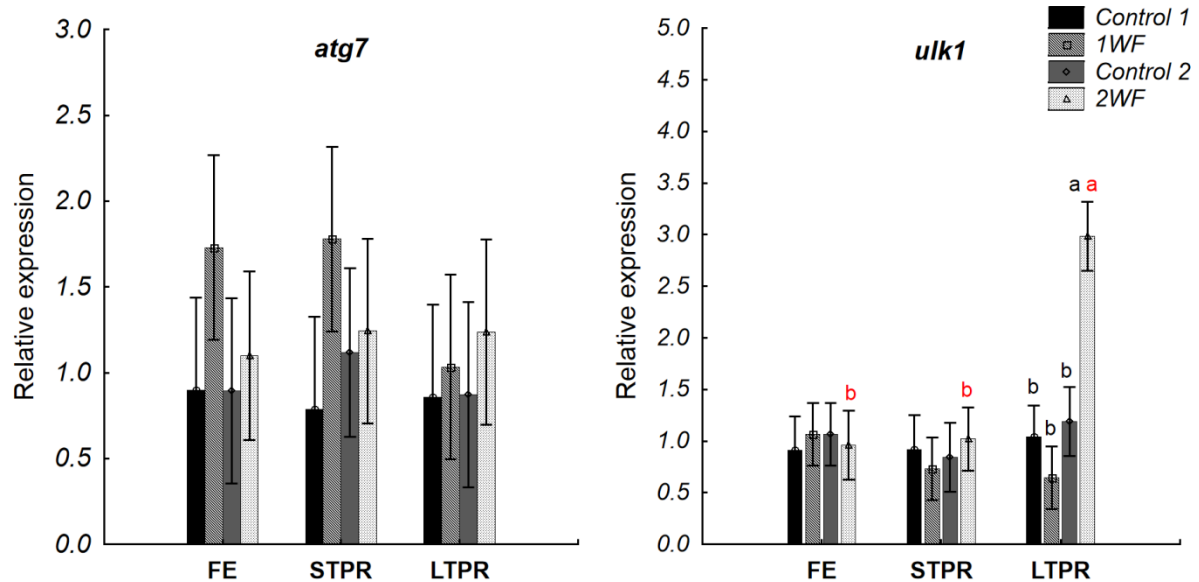


Figura 19. Expresión relativa de *atg7* y *ulk1* en músculo de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimenticia total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).

Miostatina (*mstn1*): Después de una semana de ayuno (1WF), los peces presentaron una regulación positiva de *mstn1*, la cual disminuyó significativamente a las 24 horas post-realimentación. Después de una semana de realimentación, los peces tratados mostraron un incremento en la expresión de *mstn1*, mismo que no fue significativa con respecto al punto

anterior. A diferencia del grupo 1WF, los peces del grupo 2WF no tuvieron un incremento en la expresión de *mstn1* después de dos semanas de ayuno. Además, ese nivel de expresión fue mantenido sin cambios durante los siguientes puntos de muestreo (Figura 20).

Forkhead box O3 (*foxo3b*): En lo que respecta a los niveles de ARNm de *foxo3b*, los peces tratados no presentaron diferencias estadísticamente significativas al final de la restricción de alimento contra los peces control en ninguno de los dos tratamientos; sin embargo, el grupo 1WF mostró niveles potencialmente mayores. Después de la realimentación, los peces del grupo 2WF mostraron una elevada sobreexpresión de *foxo3b* en relación a los demás grupos, y una semana después de la realimentación, dichos niveles de expresión disminuyeron significativamente (Figura 20).

Muscle Atrophy F-box (*mafbx*): La expresión de *mafbx* aumentó significativamente al final del ayuno en el grupo 1WF, 24 horas después de reiniciar la alimentación, la expresión de *mafbx* disminuyó significativamente y se mantuvo en este nivel una semana después. Por otro lado, la expresión de *mafbx* en el grupo 2WF no presentó cambios al final del ayuno ni tampoco a las 48 horas post-realimentación, pero sí se registró un aumento significativo en la expresión de este gen una semana después (Figura 20).

Muscle RING finger-1(*murfl*): En cuanto a *murfl*, los niveles de ARNm de este gen mostraron incrementaron al final del ayuno sin ser significativo en ambos tratamientos; al reiniciar la alimentación, no se pudieron detectar diferencias significativas en el corto plazo, sin embargo, una semana después de la realimentación, el grupo 2WF mostró un nivel de expresión mayor de *murfl* en comparación con el grupo 1WF, ninguno de los dos grupos tuvo diferencias significativas al ser comparados contra los peces control (Figura 20).

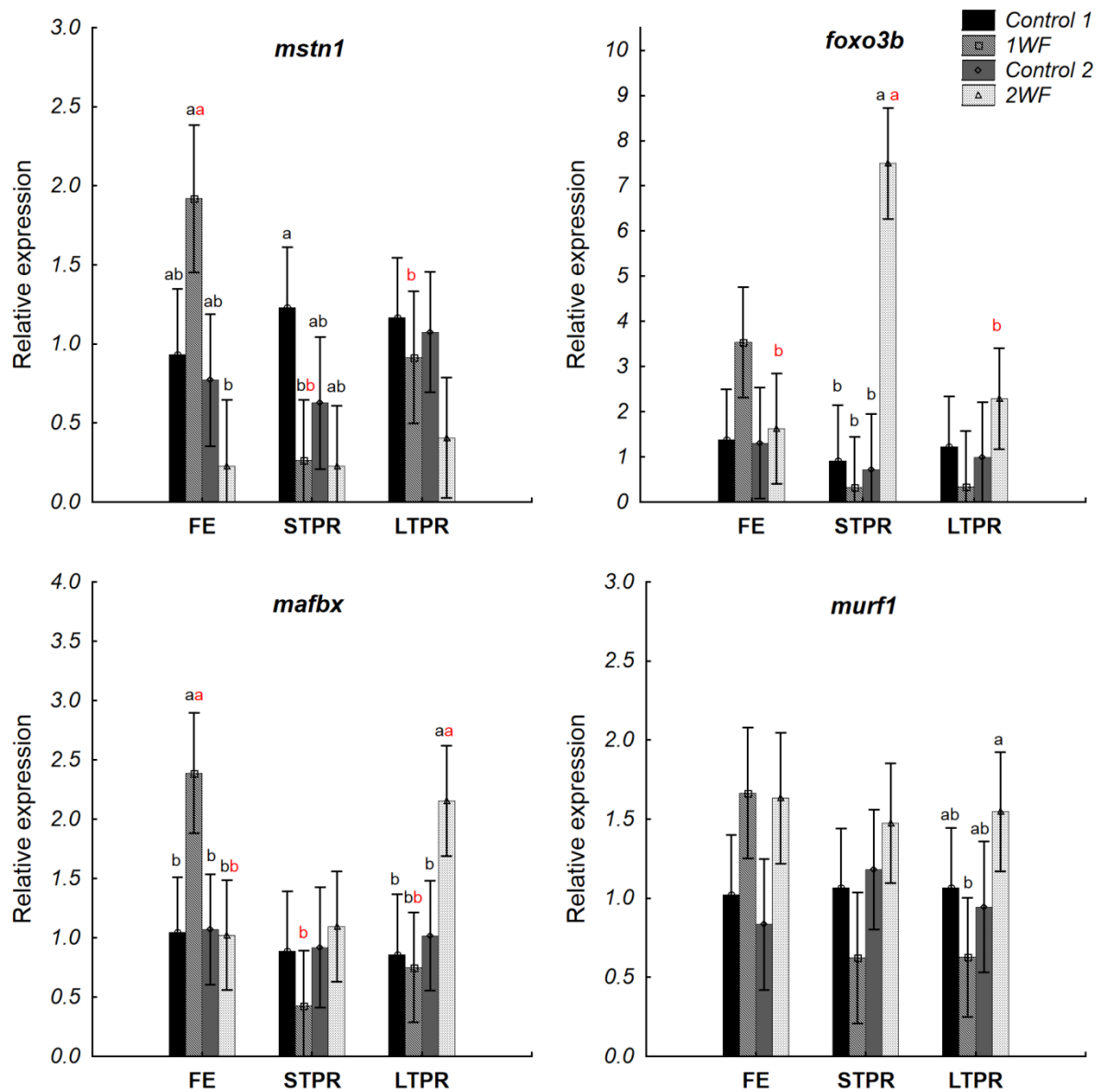


Figura 20. Expresión relativa de *mafbx*, *murf1*, *mstn1* y *foxo3b* en músculo de juveniles de *L. guttatus* sometidos a una semana (1WF) y dos semanas (2WF) de restricción alimentaria total, con una subsecuente realimentación. Las barras representan la media y las líneas representan los intervalos de confianza del 95%. Letras negras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada punto de muestreo; letras rojas indican diferencias significativas para el mismo grupo a lo largo del tiempo (FE: fin del ayuno, STPR: Realimentación corto plazo, LTPR: Realimentación largo plazo) ( $p < 0.05$ ).

### 6.3.7 Discusión

Los resultados obtenidos sugieren que la restricción completa de alimento puede inducir una respuesta de crecimiento compensatorio en juveniles de *L. guttatus*. Es importante señalar que la respuesta obtenida en este experimento fue parcial. Sin importar si la duración del ayuno fue de una semana o dos semanas, fue suficiente para producir una respuesta hiperfágica en los peces cuando estos tuvieron acceso al alimento nuevamente, puesto que se observó un incremento en la ingesta de alimento por algunos días después de que la restricción de alimento concluyera. Dicha hiperfagia, permitió a los peces aumentar la tasa de crecimiento; sin embargo, tal aumento solo pudo ser sostenido por un periodo limitado. Durante este periodo, la eficiencia alimenticia fue mejor en los peces tratados que en los organismos utilizados como control. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios realizados en otras especies de peces. Por ejemplo, en el cíclido *Cichlasoma dimerus*, se observó una respuesta de crecimiento compensatorio después de tres semanas de realimentación, además, durante la primera semana de realimentación se observó una mejora en la eficiencia alimenticia acompañada de niveles más altos de GH en plasma así como de ARNm (Delgadin *et al.*, 2018). En el cíclido delfín *Cyrtocara moori*, una respuesta de crecimiento compensatorio parcial pudo ser obtenida después de una y dos semanas de restricción total de alimento, sin embargo, el FCA no fue mejorado significativamente (Yılmaz *et al.*, 2018). Montserrat *et al.* (2007) reportaron para dorada *Sparus aurata* una respuesta de crecimiento compensatorio parcial después de un mes de realimentación en peces que fueron sometidos a ayuno por una o tres semanas. En el halibut del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* se ha podido inducir crecimiento compensatorio parcial después de distintos regímenes de ayuno-realimentación (Heide *et al.*, 2006). De igual manera, el incremento en la ingesta de alimento ocasionado por la hiperfagia, fue la principal razón por la que se observó un incremento en la tasa de crecimiento específico en los juveniles de *L. guttatus*. También, es posible que los peces del grupo 1WF hubieran alcanzado el mismo tamaño de los organismos control si el tiempo de realimentación hubiera sido más largo, a diferencia del grupo 2WF, que probablemente se hubieran quedado rezagados en cuestión de tamaño. No obstante, es importante considerar que dicho aumento en las tasas de crecimiento solo se mantuvo alrededor de una semana o menos después de la realimentación, y este lapso fue la única oportunidad que tuvieron los peces para compensar el crecimiento, y por lo tanto, sería muy poco probable que los peces en ayuno alcanzaran el tamaño de los organismos

control sin un estímulo adicional. Para propósitos de acuicultura, se pudo comprobar que la inanición puede inducir crecimiento compensatorio en *L. guttatus*, a partir de esto, los productores podrían tomar ventaja para generar estrategias con el objetivo de reducir costos, sin embargo, podría ser necesario probar diferentes esquemas de ayuno-realimentación que pudieran dar un mejor rendimiento.

De los cambios inducidos por la restricción de alimento en los índices somáticos, composición proximal e histología, es posible decir que los peces sometidos a ayuno utilizaron las reservas lipídicas como una importante fuente de energía para soportar la inanición, cabe recalcar que los peces utilizados en este experimento presentaban una cantidad considerable de grasa visceral antes de iniciar el ensayo, y también que los peces utilizados como control mantuvieron esta alta adiposidad durante el experimento. La movilización de lípidos sometidos a restricción de alimento ha sido reportada previamente, por ejemplo, el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) responde a la inanición movilizando las reservas lipídicas primero, después las reservas de glucógeno en músculo y en hígado, y por último las proteínas musculares, indicando esto que las proteínas musculares se utilizan como último recurso energético (Guderley *et al.*, 2003). En mamíferos, se ha documentado que ratas obesas presentan una mayor resistencia contra la inanición en comparación con ratas magras; ratas obesas presentan una menor excreción de nitrógeno y pueden prolongar la fase de preservación de proteína nueve veces más tiempo que ratas magras (Cherel *et al.*, 1992). En este estudio, la pérdida promedio de peso después del ayuno fue relativamente pequeña, además de que, considerando la composición proximal, podemos inferir que la pérdida de peso fue en su mayor parte grasa y una porción menor fue tejido muscular. Estos resultados indican una preferencia por los lípidos como fuente energética, así como también pueden ser indicativos de mecanismos de preservación de proteína.

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica refuerzan lo anterior, puesto que la expresión de *lal* en hígado se elevó significativamente después de una y dos semanas de ayuno, lo que confirma que los lípidos se utilizaron como fuente de energía, además, después de que iniciara la realimentación, la expresión de *lal* disminuyó sustancialmente en los peces tratados, lo que fue indicativo de que el catabolismo de lípidos estaba siendo reducido. LAL es una lipasa conocida por su capacidad para degradar gotas de grasa dentro de las células, en un proceso llamado lipofagia, una forma selectiva de macroautofagia (Settembre y Ballabio, 2014). La información acerca de la regulación transcripcional de esta lipasa es escasa en

teleósteos; sin embargo, este estudio provee información sobre este proceso. Distintos mecanismos están involucrados en la degradación de lípidos, y a pesar de que la expresión de *lal* fue la única medida de la actividad lipolítica en este estudio, es muy probable que otros procesos lipolíticos estuvieran activos, ya que la lipofagia se conecta directamente con el metabolismo de lípidos.

Ahora bien, la teoría lipostática menciona que las reservas de lípidos impactan el apetito de tal forma que el apetito se mantiene hasta que las reservas se recuperan hasta cierto nivel (Jobling y Johansen, 1999). En mamíferos, se le ha atribuido a la leptina la función de regulación del apetito y por ende, la regulación de las reservas lipídicas (Friedman y Halaas, 1998; Denver *et al.*, 2011), sin embargo, en peces esto no ha sido tan evidente, puesto que diversos trabajos señalan que la leptina juega un papel importante en la modulación de los hábitos alimenticios así como del metabolismo de lípidos en ciertas especies, mientras que en otras especies no hay evidencia clara de ello. Por ejemplo, en la carpa común *Cyprinus carpio*, la expresión de leptina no se ve afectada por periodos de ayuno cortos o largos, sin embargo, sí se ve alterada por la ingesta de alimento al corto plazo, aunque no es posible observar efectos a largo plazo (Huisling *et al.*, 2006). En el pez dorado *Carassius auratus*, Tinoco *et al.* (2012) reportaron que los niveles de expresión de *leptina* no se ven afectados por el ayuno (1 semana) ni por la sobrealimentación, aunque, sí se presentó una sobreexpresión horas después de la ingesta de alimento. Los dos estudios mencionados previamente sugieren que en estas especies, la leptina podría estar involucrada en la regulación post-prandial de la saciedad. Sin embargo, en este estudio no se pudo encontrar un efecto claro del ayuno ni la realimentación sobre la expresión hepática de *leptina* en juveniles de *L. guttatus*.

Los peces han pasado por tres eventos de duplicación genómica, y en algunos grupos de peces han sido hasta cuatro. Dichos procesos han tenido como resultado un repertorio más amplio en el genoma de los peces, incrementando el número de parálogos. Mientras que muchos parálogos han sido perdidos a través del tiempo, gran parte de ellos han sido retenidos, teniendo o compartiendo con sus copias, la misma función que el gen original, mientras que en otros casos han adquirido nuevas funciones (Volf, 2005; Glasauer y Neuhauss, 2014). Esto es un punto importante a considerar en el caso de la leptina puesto que se han identificado parálogos en algunas especies de peces. Por ejemplo, *lep-a1*, un parálogo de *lep* en la trucha arcoíris, está involucrado en la regulación de la anorexia pero no por la

restricción de alimento, sino por los bajos niveles de oxígeno (MacDonald *et al.*, 2014). Michel *et al.* (2016) encontraron que la leptina está involucrada en la homeostasis de la glucosa en el pez cebra, así como también lo hace en mamíferos, sin embargo, parece no estar involucrada en la regulación de las reservas lipídicas ni del apetito, y estos autores sugieren que es más probable que la función adipostática haya sido adquirida en el linaje que dio lugar a los vertebrados. Tomando en cuenta lo anterior, es posible que la regulación de la expresión de *leptina* en hígado de *L. guttatus* sea regulada por un factor distinto del ayuno y por lo tanto, esto también podría implicar que esté involucrada en otro proceso biológico diferente. Es importante considerar que los niveles de expresión no siempre se relacionan directamente con la cantidad de proteína funcional presente.

El crecimiento en los vertebrados está regulado en gran medida por el eje GH/IGF, siendo el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) un componente clave en este sistema, dado que es el encargado de mediar las acciones de GH a través de la activación de la ruta JAK/STAT (Brooks *et al.*, 2008). El efecto de la inanición sobre el crecimiento en los juveniles de *L. guttatus* sujetos a ayuno se reflejó sobre la expresión hepática de *ghr*. En diversas especies se ha observado la subexpresión de *ghr* durante el ayuno, por ejemplo, en el robalo rayado híbrido (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Picha *et al.*, 2008), en el lenguado *Paralichthys adspersus* (Fuentes *et al.*, 2012) y el pez mandarín *Siniperca chuatsi* (Lu *et al.*, 2016), por mencionar algunos. Como se menciona en el trabajo de Won y Borski (2013) la baja expresión de *ghr* y por tanto, la tasa más baja de traducción de este gen, es al menos uno de los mecanismos por los que existe resistencia a GH durante la inanición, misma que se relaciona con una disminución en la producción de los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II, proteínas que son codificadas por *igf1* e *igf2* respectivamente, y que son conocidas por su capacidad de estimular el crecimiento a través de distintos mecanismos, siendo la ruta PI3K/Akt/mTOR una de las más ampliamente estudiadas. Dentro de este contexto, IGF-I ha sido más estudiada que IGF-II (Fuentes *et al.*, 2013).

Se asume generalmente que los niveles en plasma de IGF así como su expresión son regulados de forma negativa en condiciones de inanición, y posteriormente son restaurados durante la realimentación, tal como lo indican estudios previos en distintas especies de peces como la trucha arcoíris (Chauvigné *et al.*, 2003), lubina rayada híbrida (Picha *et al.*, 2008) y el lenguado fino (Fuentes *et al.*, 2012), entre otros. En este estudio no fue posible observar el patrón de expresión esperado para *igf1* y para *igf2* (disminución durante la restricción,

seguida de un aumento considerable durante la realimentación); en el caso de la expresión hepática de *igf1*, no hubo un efecto claro del ayuno ni de la realimentación; en cuanto a la expresión hepática de *igf2* se observó un aumento al final del ayuno en el grupo 1WF, y una subsecuente disminución en la realimentación. En músculo, la expresión de ambos genes mostró un patrón de expresión distinto, puesto que hubo un aumento en el ayuno y una disminución en la realimentación; los peces del grupo 2WF mostraron niveles más altos de expresión en ambos genes, sugiriendo esto una reanudación en los procesos de crecimiento.

Diferencias entre los niveles de expresión y los niveles en plasma de IGFs en relación a la inanición han sido reportadas en estudios previos. Por ejemplo, en la lubina rayada híbrida, se observó un incremento en la expresión después de someter los peces a cuatro semanas de ayuno, además, los niveles de expresión después de la realimentación disminuyeron significativamente (Picha *et al.*, 2006). En el bagre de canal, 30 días de ayuno indujeron una disminución en la expresión muscular y hepática de *igf1*, no obstante, los niveles de expresión de *igf2* no fueron afectados; durante la realimentación, la expresión de *igf1* en músculo y en hígado fue restaurada, la expresión de *igf2* solo aumentó en hígado (Peterson y Waldbieser, 2009). En el rohu (*Labeo rohita*), la restricción parcial de alimento por 30 días ocasionó un aumento en la expresión de *igf1* en músculo y en hígado, la cual aumentó aún más 15 días después de la realimentación, aunque a los 30 días después de la realimentación comenzó a disminuir (Ahmad Dar *et al.*, 2018). En el cíclido delfín azul (*Cyrtocara moori*), los niveles de expresión de *igf1* y de *igf2* no mostraron cambios en la realimentación después de haber sido sometidos a ayuno, excepto por la expresión de *igf2* en músculo que aumentó después de tres semanas (Delgadin *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de estos genes sugieren que *igf1* e *igf2* están regulados diferencialmente en *L. guttatus*, y también que la síntesis y liberación de IGFs responden de diferente manera en hígado y en músculo a la restricción alimenticia.

Los factores reguladores miogénicos (MRF) son una familia de proteínas con estructura hélice-bucle-hélice básica, están constituidas por MyoD, Myf5, myogenin y Mrf4, juegan un papel fundamental en el desarrollo del tejido muscular tanto prenatal como postnatal al regular la actividad de genes específico de este tejido (Bentzinger *et al.*, 2012). En este estudio se cuantificó la expresión de los parálogos *myod1* y *myod2*, mismos que mostraron un patrón de expresión similar entre ellos, si bien, no se detectaron cambios significativos en la expresión de estos dos genes al final del ayuno, *myod2* aumentó en los peces tratados. En



trucha arcoíris, la restricción de alimento por una, dos y hasta cuatro semanas, no provocó cambios en la expresión de *myod1* y *myod2*, sin embargo, cuatro semanas de ayuno si ocasionaron un incremento en los niveles de *myogenin*, lo que fue asociado con el mantenimiento del tejido muscular. Hallazgos similares fueron obtenidos por Johansen y Overturf (2006) para la misma especie. En la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), cinco días de ayuno fueron suficientes para ocasionar una reducción en la expresión de *myod* y de *myogenin* (Nebo *et al.*, 2013).

La expresión de *myogenin* presentó variaciones interesantes, solo los peces del grupo 2WF mostraron una disminución a causa del ayuno. Después de la realimentación, los niveles de *myod1* y *myod2* disminuyeron en el grupo 1WF al compararlos contra los organismos control, más no en el grupo 2WF, los cuales presentaron los valores más altos entre todos los grupos, aunque sin ser significativos. Una semana después de la realimentación, el grupo 2WF mostró un incremento en la expresión de ambos parálogos de *myod*, lo que podría indicar que los procesos de crecimiento en este grupo experimental estaban siendo reanudados, sin embargo, puesto que el incremento en la Tasa de Crecimiento Específico solo fue observado durante la primera semana posterior a la realimentación, es posible que la moderada respuesta de crecimiento compensatorio haya sido causada por hipertrofia y no por hiperplasia, esto también concuerda con el hecho de la expresión de ambos parálogos de *myod* aumentaron su expresión hasta una semana después de la realimentación. Rescan *et al.*, (2017) no encontraron un incremento en la expresión de genes controlados por los Factores Reguladores Miogénicos durante la respuesta de crecimiento compensatorio, sugiriendo que dicho aumento en la tasa de crecimiento fue causado por procesos de hipertrofia y no por hiperplasia. Además, cuando se realimentó a los juveniles de *L. guttatus*, estos tuvieron una menor expresión de *myogenin*, esta observación y el hecho de que la miogenina está involucrada en la diferenciación terminal de los mioblastos, apoyan la hipótesis de que el crecimiento compensatorio observado fue causado por hipertrofia, adicionalmente, la expresión de *myogenin* no presentó diferencias entre ninguno de los grupos, lo que probablemente indicaba que los procesos de hiperplasia estaban en progreso. Nuestros resultados en cuanto a la expresión de *myogenin* contrastan con investigaciones previas; en la trucha arcoíris, el ayuno por 30 días ocasionó una profunda disminución en los niveles de *myogenin*, mismos que no pudieron ser restaurados después de 15 días de realimentación (Johansen y Overturf, 2006). En *Megalobrama amblycephala*, se registró una disminución en la expresión de *myogenin* durante el ayuno, misma que fue restaurada durante la

realimentación (Zhu *et al.*, 2014). En la tilapia del Nilo se observó una disminución en la expresión de *myogenin* después de 5 días de ayuno, seguida de un aumento considerable en sus niveles una vez que los peces empezaron a ser realimentados (Nebo *et al.*, 2013).

El tejido muscular representa una gran porción de la masa corporal en los peces, es un tejido importante ya que funciona como blanco neuroendocrino y una reserva de nutrientes durante condiciones adversas, tales como la escasez de alimento, por tanto, durante una inanición prolongada, los organismos hacen uso del tejido muscular como una fuente importante de aminoácidos para llevar a cabo funciones biológicas básicas. Para lograr esto, distintos mecanismos proteolíticos son activados, entre ellos el sistema autofagia-lisosoma y la ruta de ubiquitinación-proteosoma, dos de los mecanismos de degradación más ampliamente estudiados. La información sobre autofagia en teleósteos es bastante escasa, siendo la restricción de alimento el activador de autofagia más estudiado. Por ejemplo, en trucha arcoíris se estudió la expresión de los genes *lc3b*, *atg12*, *gabap11* y *atg4b* durante la inanición, los autores encontraron un aumento significativo en todos ellos en el tejido muscular después de 14 días de ayuno, además, investigaron el efecto de la restricción de nutrientes *in vitro*, privando de nutrientes a miocitos de trucha en cultivo, en este caso pudieron observar un aumento gradual en la expresión de todos los genes anteriormente mencionados en el transcurso de 24 horas (Seiliez *et al.*, 2010).

En un experimento con salmón coho transgénico para Hormona de Crecimiento (*Oncorhynchus kisutch*), se observó que estos no presentaban un aumento en la expresión de genes involucrados en procesos autofágicos después de 24 horas de inanición, a diferencia de los peces de tipo silvestre (García de la Serrana *et al.*, 2015). En otro estudio con trucha arcoíris, se observó un aumento en la expresión de genes de autofagia como *sqstm1* después de 30 días de ayuno (Rescan *et al.*, 2017). En este trabajo se midió la expresión de *atg7* y de *ULK1* como marcadores de autofagia. ULK1 participa en la iniciación de la autofagia junto con otras proteínas (FIP2000, ATG13, ATG101) para formar el complejo ULK1, el cual se involucra directamente en la formación del fagóforo, estructura precursora del autofagosoma (Zachari y Ganley, 2017). Por otro lado, ATG7 es una enzima con actividad tipo enzima E1, activa a ATG12 para su conjugación con ATG5, un paso necesario para la elongación y cierre de las membranas de aislamiento (Nakatogawa *et al.*, 2009). De acuerdo a la literatura, la autofagia incrementa su actividad tanto a nivel transcripcional como traduccional durante la

inanición, y distintos factores modulan la transcripción de *ULK1* y de *ATG7* durante tal condición, incrementando su expresión (Füllgrabe *et al.*, 2016).

Aunque no fue significativo, la expresión hepática de *ATG7* y *ULK1* en el grupo 1WF fue menor que los organismos control, en el caso del grupo 2WF, no se pudo observar ninguna diferencia. Además, el efecto del ayuno sobre la expresión de *ATG7* en músculo no fue claro, aunque en el grupo 1WF fue potencialmente más alta al final del ayuno y al inicio de la realimentación, a diferencia del grupo 2WF que mantuvieron los mismos niveles a lo largo de los tres muestreos. Aparentemente la expresión de *ULK1* no fue afectada por el ayuno y por la realimentación en el corto plazo en ambos tratamientos, sin embargo, a una semana post-realimentación el grupo 2WF presentó un aumento significativo en la expresión de *ULK1*, mismo que podría asociarse a un aumento en el flujo autofágico necesario para la remoción y renovación de proteínas que fueron dañadas durante la inanición. De estos resultados, es posible decir que el tejido muscular y el hígado responden de forma diferencial a la restricción de nutrientes. A pesar de que no hubo un efecto claro del ayuno sobre la expresión de *ATG7* y de *ULK1*, esto no significa que la autofagia no estaba activa.

Existe evidencia de que, durante inanición prolongada, la autofagia es suprimida para prevenir una degradación excesiva y evitar la muerte celular. La degradación de ULK1 a través de la ruta de Ubiquitinación-Proteosoma ha sido demostrada con diferentes ligasas de ubiquitina E3, tales como NEDD4L (Nazio *et al.*, 2016) y como Cul3-KLHL20 (Liu *et al.*, 2016), sin embargo, tales hallazgos han sido obtenidos en modelos *in vitro* utilizando distintas líneas celulares, por lo que las comparaciones con modelos *in vivo* debe hacerse con cierta cautela, además, la duración de la inanición en los estudios *in vivo* es generalmente mucho mayor que aquella de los estudios *in vitro*.

Por otra parte, la expresión de los genes *foxo3b*, *murfl*, *mafbx* y *mstn1* tuvo un patrón de expresión mucho más consistente que los otros genes, incrementándose durante el ayuno en el grupo 1WF, mientras que solo *murfl* presentó una expresión elevada en el grupo 2WF. El patrón de expresión observado en el grupo 1WF fue consistente con la función de FoxO3 como regulador de la actividad de MuRF1 y MAFbx, induciendo su transcripción de forma directa (Hoppeler, 2016). Además, los niveles de expresión de estos genes disminuyeron a las 24 horas post-realimentación y se mantuvieron en estos niveles una semana después, lo que podría relacionarse con la estabilización de los procesos proteolíticos. Los resultados

obtenidos en el grupo 1WF concuerdan con otros estudios donde se observa un aumento en la expresión de *murfl* y *mafbox* durante estados catabólicos. Por ejemplo, en la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*), la expresión de *mafbox* incrementó después de 100 días de restricción alimenticia (Cassidy *et al.*, 2018). En el lenguado fino, tres semanas de ayuno indujeron un aumento en los niveles de ARNm de *foxo3*, *mafbox* y *murfl* mismos que disminuyeron rápidamente en la realimentación (Valenzuela *et al.*, 2015). En la trucha arcoíris, 30 días de ayuno incrementaron la expresión tanto de *mafbox* como de *murfl*, y disminuyeron gradualmente conforme transcurría la realimentación. Además, estudios previos en *L. guttatus* han demostrado una correlación entre la expresión de *foxo3b* y *mstn1*, sin embargo, el mecanismo aún no ha sido esclarecido (Torres-Velarde *et al.*, 2018).

Por otro lado, los niveles de expresión para *mafbox*, *foxo3b* y *mstn1* para el grupo 2WF se mantuvieron al mismo nivel que su control o inclusive más bajo (para *mstn1*), estos patrones de expresión pudieran ser consecuencia de la duración del periodo de inanición, ya que los peces del grupo 2WF al estar en un estado catabólico más severo y en un intento por retener la mayor cantidad de masa muscular posible, los rutas proteolíticas empezaron a ser suprimidas como parte de un mecanismo de preservación de proteína dentro de su organismo. A diferencia del grupo 1WF, que mostraron una disminución en los genes relacionados a degradación proteica al ser realimentados, los peces del grupo 2WF tuvieron un incremento en la expresión de *mafbox*, *ulk1* y *foxo3b* después de la realimentación, que en este caso se pudiera asociar a la activación de procesos de remodelación en el tejido muscular puesto que durante la inanición más prolongada a la que estuvieron sometidos, las proteínas dañadas no podían ser reparadas eficientemente y solo al tener un suministro adecuado de aminoácidos, las células pudieron reiniciar apropiadamente los procesos de renovación. Se ha demostrado que a las 24 horas posteriores a la recarga muscular en ratas con atrofia inducida por inmovilización, la expresión de *mafbox* y *murfl* se incrementó de manera significativa, tiempo en el que los mecanismos de reparación pudieran estar activos para renovar las fibras musculares dañadas (Slimani *et al.*, 2012). Otro mecanismo a través del cual *mafbox* y *murfl* han demostrado ser regulados, es través de la Ghrelina, esta proteína ha demostrado la capacidad de inhibir la proteólisis muscular a través de la inhibición de MAFBx y MuRF1, se ha demostrado que los efectos anticatabólicos de la ghrelina en los miotúbulos son llevados a cabo de la ruta PI3K/mTORC2 y p38, en una ruta independiente de IGF-I (Akamizu y Kangawa, 2010; Balasubramaniam *et al.*, 2009; Porporato *et al.*, 2013). Es posible que los peces del grupo 2WF tuvieran una acumulación elevada en plasma, a niveles más altos que

los del grupo 1WF, y por lo tanto una disminución en los niveles de *mafbx* y *murfl* ocurrió, sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada.

## 7. CONCLUSIONES

Se secuenció y ensambló un transcriptoma *de novo* de 11 tejidos de pargo flamenco, obteniendo una gran cantidad de transcritos y proteínas, mismas que fueron identificadas y anotadas. Este transcriptoma es el primero reportado para especies Lutjánidas. Se considera este transcriptoma como una valiosa herramienta para el estudio de esta misma especie y otras especies cercanas.

Por otro lado, se observó un efecto de la fuente de proteína en dieta sobre el crecimiento y la expresión de genes del eje somatotrópico en hígado y factores reguladores miogénicos en hígado de pargo flamenco. La sustitución total de proteína animal por proteína vegetal afectó negativamente el crecimiento, también ocasionó una reducción en la expresión de genes involucrados en crecimiento en hígado y músculo, sin embargo, el uso de proteína vegetal no provocó un aumento en la expresión de genes involucrados en el sistema proteolítico Ubiquitinación-Proteosoma.

La restricción de alimento total por una y por dos semanas ocasionó una reducción en la masa corporal, así como una intensa movilización de reservas de lípidos en pargo flamenco, siendo más severa después de dos semanas de ayuno. Se observó una respuesta de hiperfagia durante la primera semana post-realimentación, así como un incremento en la tasa de crecimiento específico y la eficiencia alimenticia. La expresión génica mostró una respuesta diferencial entre los dos tiempos de ayuno. Mientras que una semana de ayuno ocasionó un perfil de expresión más acorde a lo encontrado en otras especies de teleósteos, el ayuno por dos semanas ocasionó una serie de cambios inesperados en la expresión génica, mismos que necesitan más análisis para poder ser elucidados.

## 8. RECOMENDACIONES

En lo que respecta al estudio de la fuente proteínica en la alimentación de *L. guttatus*, se recomienda analizar otros mecanismos que pudieran estar participando en el metabolismo y transporte de aminoácidos no solamente en tejido muscular y hepático, sino también a nivel intestinal. Así también se recomienda explorar los mecanismos que regulan la alimentación a otros niveles, como a nivel cerebral, que pudieran estar interviniendo en la respuesta y la adaptación a fuentes de proteína alternativas, especialmente ante proteínas de origen vegetal.

En cuanto al uso de la restricción alimenticia total como estrategia para maximizar la tasa de crecimiento en la crianza de pargo flamenco, se recomienda probar esquemas de ayuno y realimentación con distintas duraciones a las empleadas en este estudio, así como el efecto que pudieran tener estas variaciones en peces de distintas tallas, sobre todo en animales de mayor tamaño. También, se recomienda analizar la restricción alimenticia parcial. Y por último, considerando que existe una diversidad y complejidad de los procesos que regulan el anabolismo y el catabolismo, es recomendable utilizar herramientas que permitan tener un panorama más amplio sobre dichos procesos, a nivel de expresión génica, como por ejemplo con uso de las tecnologías de secuenciación masiva, y a nivel de proteína, a través de inmuno-ensayos u otras técnicas que permitan conocer los cambios que ocurren a dicho nivel.

## 9. REFERENCIAS

- Abdo de la Parra, I., Rodríguez-Ibarra, L. E., Hernández, C., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I., & García-ortega, A. (2010). Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45, 433–439.
- Ahmad Dar, S., Srivastava, P. P., Varghese, T., Irfan Rasool, S., Anand, G., Gupta, S., ... Krishna, G. (2018). Regulation of compensatory growth by molecular mechanism in *Labeo rohita* juveniles under different feeding regimes. *General and Comparative Endocrinology*, 261, 89–96.
- Akamizu, T., & Kangawa, K. (2010). Ghrelin for cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 1(2), 169–176.
- 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(1–4), 50–58.
- Ali, M., Nicieza, A., & Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4(2), 147–190.
- Alvarez-Lajonchère, L., Abdo de la Parra, M. I., Rodríguez Ibarra, L. E., Velasco Blanco, G., Puello-Cruz, A. C., González Rodríguez, B., ... Ibarra Castro, L. (2012). The Scale-up of Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, Larval Rearing at Mazatlan, Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(3), 411–422.
- Balasubramaniam, A., Joshi, R., Su, C., Friend, L. A., Sheriff, S., Kagan, R. J., & James, J. H. (2009). Ghrelin inhibits skeletal muscle protein breakdown in rats with thermal injury through normalizing elevated expression of E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(4), R893–R901.
- Bavčević, L., Klanjšček, T., Karamarko, V., Aničić, I., & Legović, T. (2010). Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. *Aquaculture*, 301(1–4), 57–63.
- Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., & Seiliez, I. (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 112(2014), 493–503.
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. a. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2).
- Berkes, C. A., & Tapscott, S. J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Vol. 16, pp. 585–595.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.006>
- Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). *Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx / atrogen-1*. 95616.



- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *btu170*.
- Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, *6*(1), 25–39.
- Bower, N. I., Garcia, D., & Johnston, I. A. (2010). Characterisation and differential regulation of MAFbx / Atrogin-1 a and b transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon ( *Salmo salar* ). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(2), 265–271.
- Bower, N. I., & Johnston, I. a. (2010). *Discovery and characterization of nutritionally regulated genes associated with muscle growth in Atlantic salmon*. (79), 114–130.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 525–527.
- Brooks, A. J., Wooh, J. W., Tunny, K. a, & Waters, M. J. (2008). Growth hormone receptor; mechanism of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(10), 1984–1989.
- Buckingham, M., & Rigby, P. W. J. (2014). Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Developmental Cell*, Vol. 28, pp. 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>
- Calduch-Giner, J. A., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2013). Deep sequencing for de novo construction of a marine fish (*Sparus aurata*) transcriptome database with a large coverage of protein-coding transcripts. *BMC Genomics*, *14*(1), 178.
- 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*(2), 200–209.
- Canosa, L. F., Chang, J. P., & Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *151*(1), 1–26.
- Cassidy, A. A., Blier, P. U., Le François, N. R., Dionne, P., Morin, P., & Lamarre, S. G. (2018). Effects of fasting and refeeding on protein and glucose metabolism in Arctic charr. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, *226*, 66–74.
- Chatakondi, G. (2001). Application of Compensatory Growth to Enhance Production in Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal Of The World Aquaculture Society*, *32*(3), 278–285.
- Chauvigné, F., Gabillard, J. C., Weil, C., & Rescan, P. Y. (2003). Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology*, *132*(2), 209–215.
- Cherel, Y., Robin, J. P., Heitz, A., Calgari, C., & le Maho, Y. (1992). Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *Journal of Comparative Physiology B*, *162*(4), 305–313.
- Conceição, L. E. C., Aragão, C., Dias, J., Costas, B., Terova, G., Martins, C., & Tort, L. (2012). Dietary nitrogen and fish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, *38*(1), 119–141.

- Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., ... Reik, W. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*, *417*(6892), 945–948.
- Dai, X., Zhang, W., Zhuo, Z., He, J., & Yin, Z. (2015). Neuroendocrine regulation of somatic growth in fishes. *Science China Life Sciences*, *58*(2), 137–147.
- Dayton, W. R., & White, M. E. (2008). Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *Journal of Animal Science*, *86*(14 Suppl).
- De Paula, T. G., Zanella, B. T. T., De Almeida Fantinatti, B. E., De Moraes, L. N., Da Silva Duran, B. O., De Oliveira, C. B., ... Dal-Pai-Silva, M. (2017). Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *PLoS ONE*.
- Delgado, T. H., Simó, I., Pérez Sirkin, D. I., Di Yorio, M. P., Arranz, S. E., & Vissio, P. G. (2018). *Cichlasoma dimerus* responds to refeeding with a partial compensatory growth associated with an increment of the feed conversion efficiency and a rapid recovery of GH/IGFs axis. *Aquaculture Nutrition*, *24*(4), 1234–1243.
- Denver, R. J., Bonett, R. M., & Boorse, G. C. (2011). Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, *94*(1), 21–38.
- Dobson, S. H., & Holmes, R. M. (1984). Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, *25*(6), 649–656.
- Espe, M., Veiseth-Kent, E., Zerrahn, J. E., Rønnestad, I., & Aksnes, A. (2016). Juvenile Atlantic salmon decrease white trunk muscle IGF-1 expression and reduce muscle and plasma free sulphur amino acids when methionine availability is low while liver sulphur metabolites mostly is unaffected by treatment. *Aquaculture Nutrition*, *22*(4), 801–812.
- FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)*.
- Finn, R. D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B. L., Wheeler, T. J., Schreiber, F., ... Eddy, S. R. (2015). HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W30–W38.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., ... Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D279–D285.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. In *Aquaculture* (Vol. 199).
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, *395*(6704), 763–770.
- Fuentes, E. N., Ruiz, P., Valdes, J. A., & Molina, A. (2012). Catabolic Signaling Pathways, Atrogenes, and Ubiquitinated Proteins Are Regulated by the Nutritional Status in the Muscle of the Fine Flounder. *PLoS ONE*, *7*(9).
- Fuentes, E. N., Valdés, J. A., Molina, A., & Björnsson, B. T. (2013). Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*, *192*, 136–148.
- Füllgrabe, J., Ghislat, G., Cho, D.-H., & Rubinsztein, D. C. (2016). Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(16), 3059–3066.

- Gabillard, J., Weil, C., & Rescan, P. (2005). *Does the GH / IGF system mediate the effect of water temperature on fish growth ? A review*. 29(1), 107–117.
- Gabriel Kuniyoshi, M. L., Nunes Da Silva-Gomes, R., Cavalcante Souza Vieira, J., Casemiro Hessel, M., Assunção Mareco, E., Dos Santos, V. B., ... Dal-Pai-Silva, M. (2019). Proteomic analysis of the fast-twitch muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after prolonged fasting and compensatory growth. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 30(April), 321–332.
- García-Ortega, A. (2009). Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 69–80.
- Garcia de la Serrana, D., Estévez, A., Andree, K., & Johnston, I. a. (2012). Fast skeletal muscle transcriptome of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC Genomics*, 13(1), 181.
- Garcia de la serrana, D., Mareco, E. A., LA Vieira, V., Power, D. M., & Johnston, I. A. (2016). Comparison of the transcriptional responses of skeletal muscle and bone to a flooding dose of leucine in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 50–57.
- Geay, F., Ferrarresso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., ... Mazurais, D. (2011). Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12(1), 522.
- Geiger, S., Le Vaillant, M., Lebard, T., Reichert, S., Stier, A., Le Maho, Y., & Criscuolo, F. (2012). Catching-up but telomere loss: Half-opening the black box of growth and ageing trade-off in wild king penguin chicks. *Molecular Ecology*, 21(6), 1500–1510.
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., ... Pérez-Sánchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232(1–4), 493–510.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., & Dutil, J. D. (2003). Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 135(2), 347–356.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., ... Pochet, N. (2014). reference generation and analysis with Trinity. In *Nat Protocols* (Vol. 8).
- 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.

- Hayward, R. S., Noltie, D. B., & Wang, N. (1997). Use of Compensatory Growth to Double Hybrid Sunfish Growth Rates. *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(6), 961–976.
- Heidari, Z., Bickerdike, R., Tinsley, J., Zou, J., Wang, T. Y., Chen, T. Y., & Martin, S. A. M. (2015). Regulatory factors controlling muscle mass: Competition between innate immune function and anabolic signals in regulation of atrogin-1 in Atlantic salmon. *Molecular Immunology*, 67(2), 341–349.
- Heide, A., Foss, A., Stefansson, S. O., Mayer, I., Norberg, B., Roth, B., ... Imsland, A. K. (2006). Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: Effects of short term starvation periods and subsequent feeding. *Aquaculture*, 261(1), 109–117.
- Hernández, C. H., Hernández, C., Martínez-Cordero, F. J., Castañeda-Lomas, N., Rodríguez-Domínguez, G., Tacon, A. G. J., & Aragón-Noriega, E. A. (2016). Effect of Density at Harvest on the Growth Performance and Profitability of Hatchery-reared Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, Cultured in Floating Net Cages. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 51–60.
- Hevrøy, E. M., El-Mowafi, A., Taylor, R., Norberg, B., & Espe, M. (2008). Effects of a high plant protein diet on the somatotropic system and cholecystokinin in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 151(4), 621–627.
- Hoppeler, H. (2016). Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 219(2), 205–213.
- Huising, M. O., Geven, E. J. W., Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Stolte, E. H., Spanings, F. a T., ... Flik, G. (2006). Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, 147(12), 5786–5797.
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., García-Aguilar, N., Abdo-de la Parra, M. I., & Rodríguez-Ibarra, L. E. (2012). Generation cycle closure of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, in captivity. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2), 333–337.
- Jobling, M., & Johansen, S. J. S. (1999). The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Research*, 30(7), 473–478.
- Jobling, M., Jørgensen, E. H., & Siikavuopio, S. I. (1993). The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, Vol. 43, pp. 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00576.x>
- Johansen, S. J. S., Ekli, M., Stangnes, B., & Jobling, M. (2001). Weight gain and lipid deposition in Atlantic salmon, *Salmo salar*, during compensatory growth: evidence for lipostatic regulation? *Aquaculture Research*, 32(12), 963–974.
- Johnston, I. a. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 209(Pt 12), 2249–2264.
- Johnston, I. a, Bower, N. I., & Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 214(Pt 10), 1617–1628.

- Kittilson, J. D., Jones, E., & Sheridan, M. a. (2011). ERK, Akt, and STAT5 are differentially activated by the two growth hormone receptor subtypes of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Endocrinology*, 2(SEP), 1–7.
- Kriventseva, E. V, Tegenfeldt, F., Petty, T. J., Waterhouse, R. M., Simão, F. A., Pozdnyakov, I. A., ... Zdobnov, E. M. (2015). OrthoDB v8: update of the hierarchical catalog of orthologs and the underlying free software. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D250-6.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. . (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Staerfeldt, H.-H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100–3108.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.
- Li, Y., Li, F., Wu, L., Wei, H., Liu, Y., Li, T., ... Yin, Y. (2016). Effects of dietary protein restriction on muscle fiber characteristics and mTORC1 pathway in the skeletal muscle of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 47.
- Liu, C. C., Lin, Y. C., Chen, Y. H., Chen, C. M., Pang, L. Y., Chen, H. A., ... Chen, R. H. (2016). Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination. *Molecular Cell*, 61(1), 84–97.
- Lu, X., Gu, Y., Hou, X., Wang, H., Wang, P., Xu, P., ... Li, G. (2016). Molecular characterization, tissue distribution, and expression regulation from fasting and re-feeding of two growth hormone receptors in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Fisheries Science*, 82(1), 155–169.
- Lugo, J. M., Rodriguez, A., Helguera, Y., Morales, R., Gonzalez, O., Acosta, J., ... Estrada, M. P. (2008). Recombinant novel pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide from African catfish (*Clarias gariepinus*) authenticates its biological function as a growth-promoting factor in low vertebrates. *Journal of Endocrinology*, 197(3), 583–597.
- MacDonald, L. E., Alderman, S. L., Kramer, S., Woo, P. T. K., & Bernier, N. J. (2014). Hypoxemia-induced leptin secretion: A mechanism for the control of food intake in diseased fish. *Journal of Endocrinology*, 221(3), 441–455.
- Mareco, E. a, Garcia de la Serrana, D., Johnston, I. a, & Dal-Pai-Silva, M. (2015). Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC Genomics*, 16(1), 1–13.
- Michel, M., Page-McCaw, P. S., Chen, W., & Cone, R. D. (2016). Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 3084–3089.
- Miglav, I., & Jobling, M. (1989). The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 35(1), 1–11.
- Montserrat, N., Gómez-Requeni, P., Bellini, G., Capilla, E., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I., & Gutiérrez, J. (2007). Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*).

- Aquaculture*, 267(1–4), 188–198.
- Mortensen, A., & Damsgård, B. (1993). Compensatory growth and weight segregation following light and temperature manipulation of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 114(3–4), 261–272.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 458–467.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., ... Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15103–15110.
- Nazio, F., Carinci, M., Valacca, C., Bielli, P., Strappazzon, F., Antonioli, M., ... Cecconi, F. (2016). Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *Journal of Cell Biology*, 215(6), 841–856.
- Nebo, C., Portella, M. C., Carani, F. R., de Almeida, F. L. A., Padovani, C. R., Carvalho, R. F., & Dal-Pai-Silva, M. (2013). Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 164(4), 268–274.
- Norris, D. O. (2006). Vertebrate endocrinology. In *Nature* (Vol. 303).
- Olsen, R. L., & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science and Technology*, 27(2), 120–128.
- Palstra, A. P., Beltran, S., Burgerhout, E., Brittijn, S. a, Magnoni, L. J., Henkel, C. V, ... Planas, J. V. (2013). Deep RNA sequencing of the skeletal muscle transcriptome in swimming fish. *PloS One*, 8(1), e53171.
- Peres, H., Santos, S., & Oliva-Teles, A. (2011). Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. *Aquaculture*, 318(3–4), 384–388.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786.
- Peterson, B. C., & Waldbieser, G. C. (2009). Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 37(2), 74–83.
- Picha, M. E., Silverstein, J. T., & Borski, R. J. (2006). Discordant regulation of hepatic IGF-I mRNA and circulating IGF-I during compensatory growth in a teleost, the hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *General and Comparative Endocrinology*, 147(2), 196–205.
- Picha, M. E., Turano, M. J., Tipsmark, C. K., & Borski, R. J. (2008). Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*). *Journal of Endocrinology*, 199(1), 81–94.
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., & Zhong, G. (2014). RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *OmicS : A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 98–110.
- Reichert, S., Criscuolo, F., Zahn, S., Arrive, M., Bize, P., & Massemin, S. (2014). Immediate

- and delayed effects of growth conditions on ageing parameters in nestling zebra finches. *Journal of Experimental Biology*, 218(3), 491–499.
- Reindl, K. M., & Sheridan, M. A. (2012). Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 163(3–4), 231–245.
- Rescan, P.-Y., Le Cam, A., Rallière, C., & Montfort, J. (2017). Global gene expression in muscle from fasted/refed trout reveals up-regulation of genes promoting myofibre hypertrophy but not myofibre production. *BMC Genomics*, 18(1), 447.
- Rescan, P.-Y., Montfort, J., Rallière, C., Le Cam, A., Esquerré, D., & Hugot, K. (2007). Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule. *BMC Genomics*, 8, 438.
- Rossi, G., & Messina, G. (2014). Comparative myogenesis in teleosts and mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(16), 3081–3099.
- Salem, M., Paneru, B., Al-Tobasei, R., Abdouni, F., Thorgaard, G. H., Rexroad, C. E., & Yao, J. (2015). Transcriptome assembly, gene annotation and tissue gene expression atlas of the rainbow trout. *PLoS ONE*, 10(3), 1–27.
- Salmerón, C., Navarro, I., Johnston, I. A., Gutiérrez, J., & Capilla, E. (2015). Characterisation and expression analysis of cathepsins and ubiquitin-proteasome genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) skeletal muscle. *BMC Research Notes*, 8(1), 149.
- Sánchez, C. C., Weber, G. M., Gao, G., Cleveland, B. M., Yao, J., & Rexroad, C. E. (2011). Generation of a reference transcriptome for evaluating rainbow trout responses to various stressors. *BMC Genomics*, 12(1), 626.
- Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(10), 2121–2129.
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1(1), 4.
- Seiliez, I., Gutierrez, J., Salmerón, C., Skiba-Cassy, S., Chauvin, C., Dias, K., ... Panserat, S. (2010). An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 157(3), 258–266.
- Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell*, 40(2), 310–322.
- Settembre, C., & Ballabio, A. (2014). Lysosome: Regulator of lipid degradation pathways. *Trends in Cell Biology*, 24(12), 743–750.
- Shepherd, C. J., & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: Inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*, 83(4), 1046–1066.
- Sheridan, M. a., & Hagemeister, A. L. (2010). Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), 360–365.
- Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, R. W., González-Rodríguez, B., & Castillo-Vargasmachuca, S. (2012). The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture*, 364–365, 180–185.

- Sim??o, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, *31*(19), 3210–3212.
- Skiba-cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., & Seiliez, I. (2016). Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose , lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ). *Aquaculture*, *454*, 56–65.
- Skilbrei, O. T. (1990). Compensatory sea growth of male Atlantic salmon, *Salmo salar* L., which previously mature as parr. *Journal of Fish Biology*, *37*(1 990), 425–435.
- Slimani, L., Micol, D., Amat, J., Delcros, G., Meunier, B., Taillandier, D., ... Combaret, L. (2012). The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *303*(11), E1335–E1347.
- Smith, G. I., Atherton, P., Reeds, D. N., Mohammed, B. S., Rankin, D., Rennie, M. J., & Mittendorfer, B. (2011). Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia–hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women. *Clinical Science*, *121*(6), 267–278.
- Srijila, C. K., Rani, A. M. B., Babu, P. G., & Tiwari, V. K. (2014). Ration restriction, compensatory growth and pituitary growth hormone gene expression in *Labeo rohita*. *Aquaculture International*, *22*(5), 1703–1710.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2012). Muscle-Specific RING Finger (MuRF) cDNAs in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Their Role as Regulators of Muscle Protein Degradation. *Marine Biotechnology*, *14*(1), 35–45.
- Tacchi, L., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. a, Venegas, C., Takle, H., & Martin, S. a M. (2012). Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, *13*(1), 363.
- Tian, X., & Qin, J. G. (2004). Effects of previous ration restriction on compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, *235*(1–4), 273–283.
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., Isorna, E., Delgado, M. J., & De Pedro, N. (2012). Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. *Peptides*, *34*(2), 329–335.
- Torres-Velarde, J., Llera-Herrera, R., García-Gasca, T., & García-Gasca, A. (2018). Mechanisms of stress-related muscle atrophy in fish: An ex vivo approach. *Mechanisms of Development*, *154*(January), 162–169.
- Ulloa, P. E., Peña, A. a, Lizama, C. D., Araneda, C., Iturra, P., Neira, R., & Medrano, J. F. (2013). Growth response and expression of muscle growth-related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein-based diets. *Zebrafish*, *10*(1), 99–109.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). *Primer3—new capabilities and interfaces*.
- Valenzuela, C. A., Escobar, D., Perez, L., Zuloaga, R., Estrada, J. M., Mercado, L., ... Molina, A. (2015). Transcriptional dynamics of immune, growth and stress related genes in skeletal muscle of the fine flounder (*Paralichthys adpersus*) during different



- nutritional statuses. *Developmental and Comparative Immunology*, 53(1), 145–157.
- Volff, J.-N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94(3), 280–294.
- Wacyk, J., Powell, M., Rodnick, K., Overturf, K., Hill, R. A., & Hardy, R. (2012). Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture*, 356–357, 223–234.
- Wang, Z., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Liu, Y., & Ai, Q. (2016). Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 454, 148–156.
- Wilson, P. N., & Osbourn, D. F. (1960). Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 35(September), 324–363.
- Won, E. T., & Borski, R. J. (2013). Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 4(July), 74.
- Wong, A. O. L., Zhou, H., Jiang, Y., & Ko, W. K. W. (2006). Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 144(3), 284–305.
- Xu, D., He, G., Mai, K., Wang, Q., Li, M., Zhou, H., ... Song, F. (2017). Effect of fish meal replacement by plant protein blend on amino acid concentration, transportation and metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1169–1178.
- Yılmaz, E., Arık, R. O., Arı, B., Yılmaz, A., & Gök, A. (2018). The investigation of the effects of different feeding strategies on the growth of dolphin cichlid (*Cyrtocara moori* Boulenger, 1902) fish. *Aquaculture Research*, 49(9), 3004–3010.
- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays In Biochemistry*, 61(6), 585–596.
- Zanou, N., & Gailly, P. (2013). *Skeletal muscle hypertrophy and regeneration : interplay between the myogenic regulatory factors ( MRFs ) and insulin-like growth factors ( IGFs ) pathways*. 4117–4130.
- Zhang, Y. P., Wang, Z. D., Guo, Y. S., Liu, L., Yu, J., Zhang, S., ... Liu, C. W. (2015). Morphological characters and transcriptome profiles associated with black skin and red skin in crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26991–27004.
- Zheng, K., Xu, T., Qian, C., Liang, M., & Wang, X. (2014). Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. *Aquaculture Nutrition*, 20(4), 372–380.
- Zhu, K., Chen, L., Zhao, J., Wang, H., Wang, W., Li, Z., & Wang, H. (2014). Molecular characterization and expression patterns of myogenin in compensatory growth of *Megalobrama amblycephala*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 170(1), 10–17.