



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**  
**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales**  
**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

**Nutrigenómica de larvas de pescado blanco de Pátzcuaro**  
**(*Chirostoma estor*) alimentadas con alimento vivo y**  
**microdietas**

Tesis que presenta:

**MVZ. Mitzi Ernestina Juárez Gutiérrez**

Como requisito para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

**Biológicas**

Área temática:

**Producción y Salud Animal**

Asesor:

**Dr. Carlos Antonio Martínez Palacios**

Co-asesora:

**Dra. Pamela Navarrete Ramírez**

Morelia, Michoacán. Febrero, 2020

## ÍNDICE

	Página
Glosario.....	5
Índice de figuras.....	6
Índice de gráficas.....	7
Índice de tablas.....	7
<b>1. Resumen.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Marco teórico - Antecedentes.....</b>	<b>11</b>
4.1. Pescado blanco ( <i>Chirostoma estor</i> ).....	11
4.2. Cultivo de pescado blanco.....	12
4.3. Alimentación.....	13
4.4. Alimento vivo.....	13
4.5. Microdietas.....	15
4.6. Ácido alfa-lipoico.....	17
4.6.1. Uso del ácido alfa-lipoico en organismos acuáticos.....	20
4.7. Nutrigenómica en peces.....	23
<b>5. Justificación.....</b>	<b>28</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
6.1. Objetivo general.....	29
6.2. Objetivos específicos.....	29
<b>7. Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>8. Materiales y Métodos.....</b>	<b>30</b>
8.1. Obtención de organismos y diseño experimental.....	30
8.2. Muestras.....	31
8.2.1. Obtención de muestras para histología.....	31
8.2.2. Obtención de muestras para extracción de RNA y secuenciación.....	32
8.3. Extracción de RNA.....	32

8.4. Construcción de librerías RNA-seq.....	33
8.5. Secuenciación de RNA ( <i>RNA-seq</i> ).....	33
8.6. Análisis bioinformático.....	33
8.6.1. Control de calidad de las secuencias.....	34
8.6.2. Limpieza de secuencias.....	34
8.6.3. Ensamble del transcriptoma <i>de novo</i> .....	35
8.6.4. Traducción de transcritos.....	36
8.6.5. Anotación funcional del transcriptoma.....	37
8.6.6. Evaluación general del ensamble.....	37
8.6.7. Estimación de abundancia de transcritos.....	38
8.6.8. Análisis de correlación de muestras.....	39
8.6.9. Análisis de expresión diferencial.....	39
8.6.10. Anotación de genes con expresión diferencial.....	39
<b>9. Resultados.....</b>	<b>41</b>
9.1. Desempeño larvario y evaluación histológica.....	41
9.2. Extracción de RNA .....	43
9.3. Secuenciación de RNA ( <i>RNA-seq</i> ).....	43
9.4. Control de calidad de las secuencias .....	43
9.5. Ensamble del transcriptoma <i>de novo</i> .....	44
9.6. Traducción de transcritos .....	46
9.7. Anotación funcional del transcriptoma.....	47
9.8. Evaluación general del ensamble.....	47
9.9. Efecto del ALA en las larvas.....	49
9.9.1. Análisis de correlación de muestras (ALA0 vs ALA20).....	49
9.9.2. Análisis de expresión diferencial (ALA0 vs ALA20).....	52
9.9.3. Anotación de genes con expresión diferencial (ALA0 vs ALA20).....	54
9.9.4. Anotación de genes con expresión diferencial (ALA0 vs ALA160).....	55
9.10. Efecto del alimento vivo vs microdietas en las larvas.....	58

<b>9.10.1.</b> Anotación de genes con expresión diferencial (microdieta vs alimento vivo).....	58
<b>10. Discusión</b> .....	63
<b>10.1.</b> Evaluación general del ensamble.....	63
<b>10.2.</b> Efecto del ácido alfa-lipoico en microdietas para larvas.....	65
<b>10.3.</b> Efecto del alimento vivo vs microdietas sobre las larvas.....	71
<b>11. Conclusiones</b> .....	82
<b>12. Recomendaciones</b> .....	84
<b>13. Bibliografía</b> .....	86
<b>14. Anexos</b> .....	106
<b>14.1.</b> Anotación de genes con expresión diferencial en larvas alimentadas con rotífero.....	106
<b>14.2.</b> Síntesis del ácido alfa-lipoico.....	111

## G L O S A R I O

**ALA:** Ácido alfa-lipoico  
**FCR:** Tasa de conversión alimenticia  
**PER:** Tasa de eficiencia proteica  
**d<sub>pf</sub>:** Días post-fertilización  
**d<sub>pe</sub>:** Días post-eclosión  
**PS:** Proteína soluble  
**PF:** Proteína fibrosa  
**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno  
**DHLA:** Ácido dihidrolipoico  
**OH:** Radical hidroxilo  
**WGR:** Tasa de peso ganado  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**GPX:** Glutación peroxidasa  
**GSH:** Glutación  
**GST:** Glutación-S-transferasa  
**GCL:** Glutamato-cisteína ligasa  
**RNA-seq:** Secuenciación de RNA  
**OS:** Sistema Operativo  
**ORFs:** Marcos de lectura abiertos  
**GO:** Gene Ontology  
**PCA:** Análisis de componentes principales  
**FI:** Consumo de alimento  
**ARE:** Elementos de respuesta antioxidante  
**Nrf2:** Nuclear factor erythroid 2- related factor 2  
**Keap1:** Kelch-like ECH-associated protein 1  
**IGF-1:** Insulin-Like Growth Factor 1  
**GR:** Growth Hormone  
**MFRs:** Factores de regulación miogénica  
**bHLH:** Dominio basic-helix-loop-helix

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Estructura del ácido alfa-lipoico
- Fig. 2.** Muestras para la extracción de RNA.
- Fig. 3.** *Pipeline* del análisis bioinformático
- Fig. 4.** Esquemmatización del proceso de ensamblaje
- Fig. 5.** Corte transversal de larva de *C. estor* alimentada con microdieta
- Fig. 6.** Resumen del análisis de control de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación
- Fig. 7.** Gráfico de dispersión de los *missing genes*.
- Fig. 8.** Matriz de correlación de muestras (ALA-0 vs ALA-20) y sus respectivas réplicas.
- Fig. 9.** Análisis de componentes principales representando por 2 componentes
- Fig. 10.** *Plot MA* (ALA-0 vs ALA-20)
- Fig. 11.** *Plot Volcano* (ALA-0 vs ALA-20)
- Fig. 12.** *Heat map* (ALA-0 vs ALA-20)
- Fig. 13.** Matriz de correlación de muestras y sus respectivas réplicas de larvas alimentadas con microdieta vs larvas alimentadas con alimento vivo
- Fig. 14.** Análisis de componentes principales de las muestras de las larvas alimentadas con microdieta y de las larvas alimentadas con alimento vivo
- Fig. 15.** *Plot MA* (Rotífero vs microdieta)
- Fig. 16.** *Plot Volcano* (Rotífero vs microdieta)
- Fig. 17.** *Heat map* (Rotífero vs microdieta)
- Fig. 18.** Enantiómeros R y S del ácido alfa-lipoico
- Fig. 19.** Biosíntesis mitocondrial e incorporación del ácido alfa-lipoico exógeno en organismos.

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Crecimiento de larvas de *C. estor* bajo diferentes tratamientos de alimentación

**Gráfica 2.** Supervivencia de larvas de *C. estor* bajo diferentes tratamientos de alimentación

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Métricas del ensamblaje del transcriptoma *de novo* de larvas de *Chirostoma estor*

**Tabla 2.** Estadísticas basadas en los contigs de todos los transcritos de ambos ensambles

**Tabla 3.** ORFs o regiones codificantes de cada transcrito obtenidos a partir del proceso de ensamblaje.

**Tabla 4.** Cuantificación de proteínas del ensamble del transcriptoma *de novo*

**Tabla 5.** Métricas de la evaluación del ensamble de transcriptoma *de novo*

**Tabla 6.** Anotación de genes con expresión diferencial para el tratamiento de

**Tabla 7.** Anotación de genes con expresión diferencial para el tratamiento ALA160

## 1. RESUMEN

El objetivo de éste trabajo fue evaluar el efecto del alimento vivo y microdietas (con y sin ALA) en el crecimiento y la expresión de genes de larvas de *Chirostoma estor*. Al terminar el experimento se realizó una evaluación histológica y *RNA-seq* de las larvas. Con herramientas bioinformáticas se ensambló el transcriptoma *de novo* de las larvas y se realizaron análisis de correlación de muestras y expresión diferencial. Las larvas alimentadas con rotífero lograron significativamente mejor crecimiento y supervivencia ( $p \leq 0.05$ ) que el resto de los tratamientos. La incorporación de 20 mg kg<sup>-1</sup> de ALA en la microdieta de las larvas logró mayor supervivencia y mejores parámetros alimenticios en comparación con larvas alimentadas sin ALA. Larvas alimentadas con rotífero sobre-expresaron, principalmente, un conjunto de genes relacionados al crecimiento y desarrollo muscular, óseo y cartilaginoso, correlacionado con el crecimiento muscular observado vía histología. El ALA en las concentraciones evaluadas, no tuvo efecto en el transcriptoma de las larvas, específicamente en el proceso de estrés oxidativo. Los resultados pueden emplearse como herramienta de mejora de la microdieta que se brinda actualmente a larvas de *C. estor*. Se sugieren más estudios para dilucidar el mecanismo por medio del cual el rotífero regula y eleva la expresión de genes involucrados en el crecimiento de larvas.

**Palabras clave:** alimento vivo, microdietas, ácido alfa-lipoico, expresión de genes

## 2. ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of live food and microdiets (with and without ALA) on the growth and expression of larvae genes of *Chirostoma estor*. At the end of the experiment, a histological evaluation and RNA-seq of the larvae were performed. *De novo* transcriptome of the larvae was assembled with bioinformatics tools and correlation analysis of samples and differential expression were performed. Rotifer-fed larvae achieved significantly better growth and survival ( $p \leq 0.05$ ) than the rest of the treatments. The incorporation of 20 mg kg<sup>-1</sup> of ALA in the larvae microdiet achieved greater survival and better feeding parameters compared to larvae fed without ALA. Larvae fed with rotifer overexpressed, mainly, a set of genes related to growth and development of muscle, bone and cartilage, correlated with muscle growth observed by histology. ALA in the concentrations evaluated, did not had effect on the transcriptome of the larvae, specifically in the oxidative stress process. The results can be used as a tool to improve the microdiet currently provided to *C. estor* larvae. Further studies are suggested to elucidate the mechanism which the rotifer regulates and elevates the expression of genes involved in larval growth.

**Keywords:** live food, microdiets, alpha-lipoic acid, gene expression

### **3. INTRODUCCIÓN**

El pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) tiene gran valor comercial y alta demanda en el mercado, siendo hasta hace unos años, la base de la pesquería del Lago de Pátzcuaro. Sin embargo, diversos factores tales como la presión de pesca, la introducción de especies exóticas, el deterioro y la contaminación de los cuerpos de agua en donde habita, lo han llevado a ser una especie en peligro (Martínez-Palacios *et al.* 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2004; Rojas-Carrillo, 2013).

Diversas investigaciones se han realizado para establecer los requerimientos básicos para el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro, principalmente la alimentación y nutrición en etapas tempranas tales como larvas y juveniles, ya que son los estadios en los que se presentan las tasas más altas de mortalidad, debido principalmente a una alimentación inicial inadecuada (Jones y Houde, 1986; Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Rojas-Carrillo, 2013).

En general, la larvicultura de peces se ha basado principalmente en alimento vivo (organismos zooplanctónicos tales como rotíferos, copépodos y nauplios de artemia) debido al buen desempeño que promueven en las larvas, sin embargo, estos constituyen cultivos anexos que requieren personal calificado para su manejo, lo que incrementa de manera importante los costos de producción (Kolkovski *et al.*, 1993; Martínez-Palacios *et al.*, 2006).

Actualmente los trabajos de investigación se han enfocado en el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para aumentar la supervivencia y el crecimiento de las larvas de peces en cultivo, con base en los requerimientos nutricionales y morfológicos específicos de cada especie (Civera-Cerecedo *et al.*, 2004), lo anterior con la finalidad de reducir el período de alimentación con alimento vivo para reemplazarlo por una dieta o microdieta artificial específica y con ello reducir los costos de producción (Martínez-Palacios *et al.*, 2008). En ese sentido,

recientemente se probó una microdieta para larvas de *C. estor* con la que se consiguió reducir el uso del alimento vivo, disminuyendo así el tiempo de destete de las larvas, sin embargo, no ha logrado ser tan eficiente como el alimento vivo en términos de desempeño larvario (Martínez-Ángeles, 2016).

Por tal motivo, para obtener un mejor desempeño de las larvas, se han incorporado diversos aditivos a las microdietas. Uno de los aditivos más utilizados en la industria alimenticia son los antioxidantes. El ácido alfa-lipoico (ALA) es un antioxidante que ha cobrado un gran interés debido a los buenos resultados observados.

En un trabajo previo se evaluó el efecto del ALA en la supervivencia, crecimiento y algunos parámetros nutricionales en larvas de *C. estor*, suministrando una microdieta adicionada con diferentes concentraciones (0, 20, 40, 80, 160 mg kg<sup>-1</sup>) de ALA, además de contar con un control en donde las larvas fueron alimentadas únicamente con rotífero. Los resultados obtenidos mostraron que las larvas alimentadas con rotífero lograron de forma significativa mejor desempeño (crecimiento y supervivencia) ( $p \leq 0.05$ ) que el resto de los tratamientos. Las larvas alimentadas con la microdieta adicionada con 20 mg kg<sup>-1</sup> de ALA tuvieron mayor supervivencia, mejor conversión alimenticia (FCR) y tasa de eficiencia proteica (PER) en comparación con larvas alimentadas sin ALA (Monroy de la Peña, 2018). Sin embargo, las implicaciones a nivel de expresión génica de la adición de ALA y la alimentación con rotífero, no han sido evaluadas hasta éste momento. En este contexto, la nutrigenómica es una disciplina que evalúa dichas implicaciones asociadas o derivadas de una intervención dietaria a nivel genómico (Ulloa *et al.*, 2011).

Por lo tanto, el presente trabajo pretende estudiar, el efecto nutrigenómico de la adición de ALA en la microdieta y el efecto de la alimentación con alimento vivo de las larvas de *C. estor*, en términos de cambios en el transcriptoma.

## 4. MARCO TEÓRICO – ANTECEDENTES

### 4.1 **Pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*)**

El pescado blanco del Lago de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) es una especie de agua dulce perteneciente a la familia Atherinopsidae (Dyer y Chernoff, 1996). Ésta familia está conformada por un grupo de especies cosmopolitas que en su mayoría habitan en aguas marinas o salobres, sin embargo, algunas especies pueden encontrarse en agua dulce. Los atherinópsidos en México pertenecen al género *Chirostoma*, el cual se conforma por 18 especies y 6 subespecies dulceacuícolas. Este género está dividido en dos grupos, el grupo Jordani (los peces grandes), que incluye a los peces blancos, y el grupo Arge (los peces pequeños) al que pertenecen los llamados comúnmente charales (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Ríos-Durán *et al.*, 2014).

Todos los miembros del género *Chirostoma* son endémicos del altiplano mexicano; son especies totalmente de agua dulce, pero con grandes similitudes con algunos atherinópsidos marinos ya que poseen ancestros comunes (Barbour, 1973).

*Chirostoma estor* es endémico de la región del lago de Pátzcuaro (Michoacán, México); constituyó por mucho tiempo la base de la pesquería del lago, siendo el recurso de subsistencia de los ribereños Purépechas, conservando una gran importancia económica, social, cultural y ecológica. Sin embargo, debido a diversos factores tales como la presión de pesca, la introducción de especies exóticas, el deterioro y la contaminación de los cuerpos de agua en que habita, han dado como resultado una reducción de su población, provocando que se encuentre en peligro (Lyons *et al.*, 1998; Martínez-Palacios *et al.* 2002).

El pescado blanco es un organismo eurihalino, zooplanctófago filtrador, con una pequeña boca superior protractil, dientes faríngeos y numerosas espinas en los arcos branquiales, las cuales conforman un sistema complejo de filtración; en la

mandíbula inferior tiene cuatro hileras de dientes cónicos, simples, inconspicuos, los cuales son pequeños y frágiles. Estas estructuras son indicativas de un depredador pelágico que se alimenta de presas pequeñas. Aunque es un pez zooplanctófago, cuando los peces alcanzan tallas adultas, ocasionalmente pueden incluir peces en su dieta y crustáceos pequeños (Ross *et al.* 2006; Martínez-Palacios *et al.* 2008; Martínez-Palacios *et al.*, 2019).

El pescado blanco posee un tracto digestivo corto, carece de estómago o apéndice pilórico identificable (Martínez-Palacios *et al.* 2008), estas características son un indicativo de un consumidor continuo accediendo a presas abundantes y altamente digeribles (Ross *et al.* 2006). Es ovíparo y presenta una reproducción asincrónica. Los huevos del pescado blanco son esféricos, transparentes, con un diámetro de 0.9 a 1.2 mm y poseen entre 6 y 8 hilos adherentes. Cuando los huevos son fertilizados eclosionan entre el séptimo u octavo día post-fertilización (dpf) a una temperatura aproximada de 25°C y el saco vitelino desaparece hacia el tercer día post-eclosión (dpe). Las larvas recién eclosionadas miden aproximadamente 4 o 5 mm de longitud, son transparentes, presentan una línea de cromatóforos negros a lo largo del cuerpo, así como una fuerte pigmentación ocular y desarrollo extraordinario de los ojos que se hace patente en su habilidad de captura de presas en el momento de la eclosión (Campos-Mendoza, 2000; Martínez-Palacios *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2006 y 2007)

#### **4.2 Cultivo de pescado blanco**

Por más de 15 años se han realizado diversas investigaciones biotecnológicas con la finalidad de avanzar y establecer el cultivo del pescado blanco.

Varias de éstas investigaciones han sido dirigidas a establecer los requerimientos básicos de *C. estor*, así como a optimizar estrategias de alimentación y nutrición en etapas tempranas (larvas y juveniles) ya que es en estadios tempranos en los que se presentan las tasas más altas de mortalidad, que

son el resultado de una alimentación inicial inadecuada (Jones y Houde, 1986; Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Ross *et al.* 2006; Rojas-Carrillo, 2013). Por lo anterior, se está llevando a cabo el desarrollo y aplicación de nuevas biotecnologías para aumentar la supervivencia y el crecimiento de las larvas de pescado blanco con base en sus requerimientos nutricionales y morfológicos específicos. Uno de los principales objetivos de estos estudios es reducir el período de alimentación con alimento vivo para reemplazarlo con una dieta o microdieta artificial (Martínez-Palacios *et al.*, 2008), en donde ocasionalmente se incorporan diversos aditivos con la finalidad de incrementar el desempeño de las larvas y con ello reducir los costos de cultivo (Wenk, 2000)

#### **4.3 Alimentación**

Como ya se mencionó, la alimentación en la etapa larval es sumamente crítica en el cultivo de cualquier especie de peces, debido a la gran mortalidad ocasionada principalmente por el periodo de transición entre la reabsorción del saco vitelino y la primera alimentación exógena de las larvas (Jones y Houde 1986; Watanabe y Kiron, 1994; Martínez-Palacios *et al.* 2008) o bien, por un sistema digestivo inmaduro que no permite la asimilación del alimento artificial (Hoffer y Nassir-Uddin, 1985).

El sistema digestivo de las larvas de peces está adaptado para la digestión de organismos zoopláctónicos (alimento vivo), y su capacidad para procesar alimentos artificiales ha sido muy discutida (Segner *et al.* 1989). Además, existen algunos factores cruciales que determinan el tamaño y el tipo de alimento que se les debe proporcionar a las larvas, como: cambios morfológicos, el tamaño de la boca y la diferenciación del tracto digestivo (Blaxter, 1988).

#### **4.4 Alimento vivo**

En general, la larvicultura se ha basado en la alimentación con alimento vivo, haciendo uso de organismos zoopláctónicos como son: el rotífero, los nauplios de

artemia y copépodos; pero dado que estos constituyen cultivos anexos, incrementan los costos de producción durante esta fase (Martínez-Palacios *et al.*, 2004).

El alimento vivo es altamente eficiente para inducir crecimiento y supervivencia en las larvas (Cahu y Zambonino 1997). Sin embargo, este presenta la gran desventaja de poseer una calidad nutricional incierta (Conceição *et al.*, 2010). De acuerdo a diversos estudios, el contenido de proteína del rotífero varía en intervalos de 28-63%, lípidos de 9-28% y carbohidratos de 10.5-27% (peso seco) (Lubzens y Zmora, 2003), sin embargo, estos datos deben manejarse con cautela, ya que pueden variar en gran medida entre experimentos y dentro del mismo experimento debido a las condiciones y protocolos de cultivo de los organismos vivos (Conceição *et al.*, 2010).

Existen diversos trabajos en donde evalúan principalmente el crecimiento y supervivencia, entre otras variables, de las larvas alimentadas con alimento vivo vs larvas alimentadas con microdieta. En general se ha observado que las larvas alimentadas con rotífero, logran un mejor desempeño, como en el caso de trabajo realizado por Blair *et al.*, (2003) que emplearon larvas del anón (*Melanogrammus aeglefinus*) o el que realizado por Alam *et al.*, (2015) en larvas de platijas del sur (*Paralichthys lethostigma*) observando que la supervivencia y el peso promedio de las larvas era significativamente mayor en las larvas alimentadas con rotífero, a diferencia de las alimentadas con microdieta.

La eficiencia de la utilización del alimento vivo se ve influenciada por factores internos y externos, principalmente la búsqueda, identificación y proceso de ingestión, están influenciados por factores físicos y químicos, incluyendo color, forma, tamaño, contraste, movimiento y estímulo olfatorio a nivel molecular (Kolkovski, 2013). El alimento vivo secreta sustancias atrayentes que actúan estimulando la respuesta de alimentación y que son identificados específicamente por la larva (Kolkovski *et al.*, 1997)

El sistema de alimentación establecido para larvas *C. estor*, tras varios estudios previos (Campos-Mendoza 2000; Martínez-Palacios *et al.* 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2003), es con rotífero (*Brachionus plicatilis*) cultivado en salinidad de 30ppm (30 gr L<sup>-1</sup>) alimentado con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Campos-Mendoza 2000; Martínez-Palacios *et al.* 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Los estudios realizados en años anteriores en larvas de *C. estor* sugerían que el destete no podía ser logrado antes de los dos o tres meses de edad (Martínez-Palacios *et al.* 2004); sin embargo, recientemente se probó una microdieta con la cual se obtuvieron resultados favorables disminuyendo el tiempo de destete al 10° dpe (Martínez-Ángeles, 2016).

#### 4.5 Microdietas

Como ya se mencionó, es indispensable disminuir el uso de alimento vivo en el cultivo de larvas de peces, por lo que las investigaciones sobre nutrición y alimentación se han enfocado en el diseño y desarrollo de alimentos formulados, con un tamaño de partícula en el orden de micras, conocidas como microdietas (Pedroza- Islas, 2004; Hamre *et al.*, 2013). El tamaño de partícula de las microdietas usadas como primer alimento en larvas de peces oscila entre 50 y 600 µm, dependiendo de la especie, edad y el tamaño de la boca (Cahu y Zambonino-Infante, 1997; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

Las microdietas deben cumplir con varias características físico-químicas para mantener su estructura y contenido nutricional, por ejemplo, palatabilidad, digestibilidad, requerimientos energéticos y nutricionales de los organismos, además deben presentar un tamaño de partícula adecuado, una buena estabilidad en el agua, así como una baja lixiviación de nutrientes (Pedroza-Islas *et al.*, 2004; Hamre *et al.*, 2013).

Un gran reto en la larvicultura de peces es la generación de alimentos artificiales que permitan un adecuado crecimiento y alta supervivencia en etapas

tempranas. Sin embargo, es difícil la inclusión, suministro y asimilación de este tipo de dietas artificiales, debido a que la alimentación de las larvas está limitada por la abertura de la boca y a que poseen un sistema digestivo inmaduro, además de que pueden influir características particulares del alimento tales como la textura, sabor, color, tamaño de partícula, etc., que pueden ser factores que alteren la aceptación de las microdietas (Hoffer y Nasir Uddin, 1985; Önal y Langdon 2000; Yúfera *et al.* 2000; Martínez-Palacios *et al.* 2002; Langdon, 2003; Pedroza-Islas *et al.* 2004; Martínez-Palacios *et al.*, 2004; Yanes-Roca *et al.*, 2017).

Un intestino inmaduro puede, entre otras características, dificultar la digestión del alimento artificial sub óptimo, lo que se refleja en una menor supervivencia y crecimiento en comparación con larvas alimentadas solo con alimento vivo (Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Yúfera y Darías, 2007). Por ello, la inclusión de dietas artificiales como primera alimentación se ha logrado exitosamente solo en pocas especies (Jones *et al.*, 1993); los casos donde no se obtuvo buen desempeño, se atribuyó a un sistema digestivo inmaduro, rápido tránsito intestinal, baja capacidad enzimática, o a la poca capacidad de las larvas para reconocer el alimento, localizarlo e ingerirlo (Kolkovski, 2001; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

A pesar de los avances en nutrición de larvas de peces, la primera alimentación sigue basándose en presas vivas, ya que independientemente de su valor nutritivo, son fácilmente detectadas, capturadas y altamente digeribles, además, tienen la capacidad de nadar en la columna de agua y así estar constantemente disponibles para las larvas, a diferencia de los alimentos formulados o microdietas que tienden a agregarse en la superficie o hundirse después de poco tiempo de haberse suministrado. Las larvas están naturalmente adaptadas a atacar a las presas en movimiento; esta respuesta es estimulada por el constante movimiento del alimento vivo (Conceição *et al.*, 2010).

En el caso de *C. estor*, se ha logrado reducir el tiempo de alimentación con presas vivas mediante la inclusión de distintas microdietas con su implementación

al décimo dpe con una co-alimentación previa de 3 días, disminuyendo así el tiempo de destete de las larvas (Martínez-Ángeles, 2016). Dichas microdietas fueron elaboradas con una mezcla a base de proteínas solubles (PS) y proteínas fibrosas (PF) en diferentes proporciones, para cubrir los requerimientos energéticos y nutricionales de los organismos. La microdieta compuesta por una proporción de 25% de proteínas fibrosas y 75% de proteínas solubles, presentó los mejores resultados en cuanto a la supervivencia (69.33%), además no presentó efectos negativos en el crecimiento.

En otro trabajo, dicha microdieta fue adicionada con ácido alfa-lipoico (ALA) a diferentes concentraciones, con la finalidad de mejorar el crecimiento y supervivencia de las larvas de pescado blanco, obteniendo que la microdieta adicionada con 20 mg kg<sup>-1</sup> de ALA, influye de manera positiva sobre la supervivencia y algunos parámetros nutricionales, sin presentar un efecto negativo en el crecimiento en términos de peso seco (Monroy de la Peña, 2018).

#### 4.6 **Ácido alfa-lipoico**

La incorporación de aditivos en las dietas para animales es muy común, estos ingredientes son adicionados a los alimentos a fin de mejorar alguna característica como la palatabilidad, la vida de anaquel, la ingesta, digestión, absorción o metabolismo de los ingredientes, para optimizar la asimilación de estos e incrementar el crecimiento, aunque de forma estricta su adición no sea esencial en el alimento debido a que no se trata de un ingrediente indispensable en la nutrición. Dentro de los aditivos utilizados se encuentran los saborizantes, colorantes, emulsificantes, conservadores, vitaminas, aglutinantes, oligoelementos, mezclas de enzimas, probióticos, antioxidantes, entre otros (Wenk, 2000; Shimada, 2007).

La importancia de los antioxidantes radica en que son uno de los principales sistemas de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS; por sus siglas en ingles) y previenen la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular, además de que estimulan indirectamente los mecanismos

fisiológicos del proceso de crecimiento (González-Pérez *et al.*, 2008; Longaray-García *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2000).

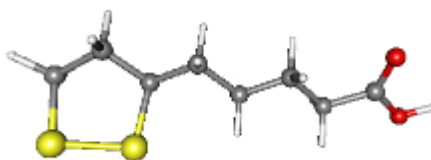
Los organismos acuáticos y terrestres están sujetos a factores (bióticos y abióticos) que pueden afectar su producción, crecimiento y salud, como resultado de la generación de estrés oxidativo (Montserrat *et al.*, 2007). El estrés oxidativo es una condición bioquímica que ocurre cuando la concentración de agentes oxidantes es mayor que la concentración de antioxidantes, reflejando un desbalance en el organismo, lo que puede provocar daños a nivel molecular (Jones, 2006; Kütter *et al.*, 2012). Diferentes parámetros para la valoración de estrés oxidativo incluyen la medición de actividad de enzimas antioxidantes (Panserat y Kaushik, 2010), la concentración de ROS, la oxidación de proteínas (Montserrat *et al.*, 2008) o la peroxidación lipídica en determinados órganos (Xu *et al.*, 2017).

Las ROS se forman durante el metabolismo aeróbico por varios procesos bioquímicos, incluyendo la fosforilación oxidativa (Kütter *et al.*, 2012). El nivel de ROS en animales es importante ya que juegan roles vitales interviniendo en diversos procesos como la transcripción de genes, la señalización celular, la regulación de actividad enzimática y el sistema inmune (Butler *et al.*, 2009); también influyen indirectamente en el crecimiento y atacan bacterias, sin embargo, por su fuerte propiedad química reactiva, altas concentraciones de ROS son dañinas para las células, conduciendo a un daño irreversible de proteínas, lípidos de membrana y al DNA, resultando finalmente en muerte celular, además de que se ha propuesto que esta condición es la etiología de varias patologías, al mismo tiempo de que incrementan la mortalidad y malformaciones en organismos acuáticos durante su desarrollo (McCord, 2000; Hadi *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Cole *et al.* 2009)

Para proteger a las células y órganos del estrés oxidativo causado por ROS, existen una variedad de moléculas antioxidantes endógenas y exógenas que las neutralizan y/o interceptan. Éste grupo incluye a enzimas antioxidantes que

promueven la degradación de ROS (glutación peroxidasa, superóxido dismutasa, entre otras); y antioxidantes no enzimáticos derivados de la dieta, tales como el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), carotenoides, polifenoles y otros compuestos como el ácido alfa-lipoico (ALA) (Block, 1991; Wang y Luo, 2007; Jiang *et al.*, 2009).

El ALA fue identificado por primera vez por Lester Reed en 1951 y ha ganado gran atención debido a sus múltiples funciones biológicas, principalmente a su función antioxidante (Reed *et al.*, 1951). También es conocido como ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico o ácido tióctico (Shay *et al.*, 2009). Es un compuesto disulfurado derivado del ácido octanoico que se sintetiza en la mitocondria (**Fig. 1**) (Sigler *et al.*, 2015). Las principales fuentes de ALA son el hígado, riñón y corazón (Shamsizadeh *et al.*, 2017).



**Fig. 1.** Estructura del ácido alfa-lipoico  
([https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thioctic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thioctic_acid))

Debido a la capacidad del ALA para disminuir la presencia de ROS, se establece un balance entre los agentes oxidantes y la capacidad antioxidante del organismo (Park *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2008; Gomes y Negrato, 2014; Kütter *et al.*, 2012; Kütter *et al.*, 2014)

Una de sus propiedades antioxidantes más estudiadas es la interacción con el radical hidroxilo (OH), una ROS responsable de la inducción de la peroxidación de lípidos. El ALA interviene en varias funciones bioquímicas, por ejemplo, su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (DHHLA), puede actuar como reductor o regenerador de las formas oxidadas de otros agentes antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol, glutatión, tioredoxina, coenzima Q10, ubiquinona, vitamina C (Packer *et al.*, 2001).

El ALA también actúa como agente quelante, regula la expresión de genes, protege a los organismos de oxidación de su DNA (Packer *et al.*, 1995; Gomes y Negrato, 2014); participa en otros procesos fisiológicos que no están directamente relacionados con actividad antioxidante, incluyendo la inducción de vías de señalización celular de la glucogénesis, en el metabolismo lipídico y actúa como adyuvante para funciones neurocognitivas (Shay *et al.*, 2009). Es utilizado en el tratamiento de una variedad de enfermedades como la ascitis (Díaz-Cruz *et al.*, 2003), patologías neurodegenerativas (Bergamini *et al.*, 2004), polineuropatía diabética (Simbula *et al.*, 2007) y contaminación por metales pesados (Baht y Flora, 2009).

#### **4.6.1 Uso del ácido alfa-lipoico en organismos acuáticos**

Los atributos del ALA como aditivo alimenticio y regulador del estrés oxidativo, han generado gran interés dentro del ámbito de la investigación. Existen diversos estudios en donde se ha hecho uso del ALA en diversos modelos experimentales y con distintas concentraciones, por lo que los resultados han sido variables. Es importante considerar que un exceso en la adición de ALA puede tener un impacto negativo, tanto en el crecimiento como en la capacidad antioxidante de algunos organismos, por ello es importante determinar la dosis apropiada para especies de importancia económica (Sigler *et al.*, 2015; Xu, 2017).

Específicamente en organismos acuáticos la adición de ALA ha mostrado efectos favorables en diversas funciones biológicas como: crecimiento, supervivencia, respuestas inmunes, resistencia a daños por contaminantes, etc. Además, disminuye los niveles de estrés oxidativo de los peces (Kütter *et al.*, 2014). Los estudios del efecto del ALA en organismos acuáticos se han limitado a algunas especies como la carpa (*Cyprinus carpio*), el pacú (*Piaractus mesopotamicus*), la coridora (*Corydora paleatus*), el pámpano plateado (*Trachinotus marginatus*), el pez cebra (*Danio rerio*), y algunas especies de invertebrados como el abulón (*Haliotis discus hannai* Ino) y el camarón (*Litopenaeus vannamei*) (Kütter *et al.*, 2014).

En ese sentido, en juveniles de abulón (*H. discus hannai* Iino) se observó que una dosis de 800 mg de ALA kg<sup>-1</sup> aumenta la tasa de peso ganado (WGR) y con dosis de 1600 y 3200 mg kg<sup>-1</sup> se observa un decremento de la WGR. Por otra parte, las dosis de 200, 400 y 800 mg de ALA kg<sup>-1</sup> aumentan la capacidad total antioxidante. De acuerdo a este trabajo, la dosis óptima de ALA para juveniles de abulón es de 709 mg kg<sup>-1</sup>. Evaluaron también la actividad de algunas enzimas antioxidantes y reportaron un incremento significativo en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en la dieta suplementada con 200, 400 y 800 mg kg<sup>-1</sup> de ALA, de la cual se especula que el mecanismo del ALA para estimular la actividad de dicha enzima en el hepatopáncreas del abulón, ocurre directamente incrementando la expresión del gen de la SOD. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) incrementó significativamente en el tratamiento con 800 mg kg<sup>-1</sup>, pero interesantemente, en las dietas con niveles más altos de ALA (1600 y 3200 mg kg<sup>-1</sup>), la actividad de GPX decreció de forma significativa. Finalmente, el contenido de la glutatión (GSH) en el hepatopáncreas del abulón, incrementó significativamente con el ALA de la dieta (Zhang *et al.*, 2010).

En juveniles del cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*) se evaluó el efecto del porcentaje de lípidos (7% y 13%) en el crecimiento, composición corporal y estado antioxidante con dietas adicionadas con 0, 700 y 1400 mg de ALA kg<sup>-1</sup>. Se demostró que la adición de ALA en las dietas promueve el aumento de peso y la tasa de crecimiento específico de los cangrejos, independientemente del porcentaje de lípidos en la dieta. Además, se demostró que el ALA disminuye el daño oxidativo del hepatopáncreas y no afecta la supervivencia de los cangrejos. Respecto a la medición de la expresión de genes relacionados con la descomposición de lípidos en el hepatopáncreas, concluyen que el ALA puede inducir un metabolismo más activo para la digestión y utilización de los triacilglicéridos en el hepatopáncreas de los cangrejos. Los parámetros antioxidantes en el hepatopáncreas señalan que el porcentaje de lípidos y la concentración de ALA, influye significativamente sobre la actividad de la SOD y GPX, siendo mayor en el tratamiento con 7% de lípidos y 1400 mg kg<sup>-1</sup> de ALA, contrariamente a la dieta con 13% de lípidos, en donde la

actividad de GPX disminuyó con el incremento de concentración de ALA y no hubo diferencia significativa en la actividad de SOD (Xu, 2017).

Un estudio realizado en pez cebra (*D. rerio*) demostró que la exposición a 6, 9 y 12  $\mu\text{M}$  de ALA en el agua durante la embriogénesis, disminuye el tiempo de eclosión significativamente y aumenta el porcentaje de eclosión de las larvas. En las larvas recién eclosionadas se observó un incremento significativo en longitud estándar con todas las dosis de ALA, la longitud máxima alcanzada fue con la dosis de 9  $\mu\text{M}$ . Este incremento en el tamaño de las larvas persistió hasta 15 días después de la eclosión. La actividad de SOD en las larvas recién eclosionadas que fueron tratadas con ALA fue significativamente mayor en comparación con el control, lo que sugirió que efectivamente el ALA presentó una actividad antioxidante relevante (Francis *et al.*, 2012).

Juveniles de pámpano plateado (*T. marginatus*) fueron tratados con diferentes dosis de ALA en la dieta (316, 524, 890 y 1367  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Las dosis de 316 y 524  $\text{mg kg}^{-1}$  disminuyeron la peroxidación lipídica del tejido muscular sin afectar el crecimiento. Sin embargo, dosis altas de ALA (890 y 1367  $\text{mg kg}^{-1}$ ) promueven un efecto anoréxico y, por lo tanto, una reducción de las tasas de crecimiento y eficiencia proteica. La suplementación de la dieta con ALA induce la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST) en el cerebro de los peces cuando fueron alimentados con 890  $\text{mg kg}^{-1}$ ; la GST es una de las principales enzimas involucradas en la actividad antioxidante. En el hígado se observó una reducción en la actividad de GST en peces alimentados con 316 y 524  $\text{mg kg}^{-1}$  en comparación con el grupo control (0  $\text{mg kg}^{-1}$  ALA). Contrario a esto, en el músculo no se observaron cambios en la actividad de GST como resultado del tratamiento con ALA (Kütter *et al.*, 2012).

Por otra parte, en un estudio realizado con adultos de coridoras (*C. paleatus*), al añadir 70  $\text{mg kg}^{-1}$  de ALA en una dieta comercial, se demostró que el ALA no aumenta la actividad de la glutamato-cisteína ligasa (GCL), la cual es importante

para generar protección antioxidante, ni los niveles de GSH en músculo; contrariamente a lo que ocurre en cerebro e hígado, donde los peces del grupo donde se adicionó el ALA, presentan un aumento en la actividad de la GCL así como una mayor actividad de la GST en el cerebro, lo que sugiere una reducción del estrés oxidativo en este tejido (Montserrat *et al.*, 2008).

En larvas de pescado blanco de Pátzcuaro (*C. estor*), se evaluó la adición de ALA a microdietas en diferentes concentraciones (0, 20, 40, 80, 160 mg kg<sup>-1</sup>), con la finalidad de mejorar el crecimiento y supervivencia. Como resultado se obtuvo que la microdieta adicionada con 20 mg kg<sup>-1</sup> de ALA tiene un efecto positivo en la supervivencia y en algunos parámetros nutricionales, aunque no sobre el crecimiento en términos de peso seco, en comparación con las larvas a las que no se les proporcionó ALA (Monroy de la Peña, 2018). El efecto positivo del ALA en larvas de *C. estor* podría explicarse por su efecto antioxidante, sin embargo, esto aún no ha sido dilucidado. Es por ello que en el presente trabajo se pretende realizar un análisis nutrigenómico de las larvas con la finalidad de conocer el efecto de ALA en la expresión de genes posiblemente relacionados a la disminución del estrés oxidativo.

#### **4.7 Nutrigenómica en peces**

La nutrigenómica es una ciencia que forma parte de las llamadas “ciencias ómicas”, la cual evalúa los efectos o implicaciones asociadas o derivadas de una intervención dietaria a nivel genómico (Pavasovic *et al.*, 2014), esto a través del análisis de la expresión de todos los genes que conforman un organismo, solamente un conjunto de genes, o una red de genes de interés que participen en vías metabólicas específicas (Panserat y Kaushik, 2010).

Una vez que el alimento (vivo o microdieta) es digerido y absorbido, los nutrientes tienen un efecto en la activación y transcripción de genes, en la síntesis de proteínas y la actividad enzimática, en el metabolismo, así como en la microbiota y sus genes componentes. Es decir, el perfil de expresión genética

(transcriptómica), junto con el monitoreo de la expresión de proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica), en conjunto con el microbioma (microbiómica), proveen un panorama holístico o integral de esos cambios inducidos por las modificaciones en la dieta y sus impactos en el desarrollo del pez (Martin y Król, 2017).

Por ejemplo, Morais *et al.*, (2011) analizaron la interacción genotipo-dieta en el transcriptoma del salmón del Atlántico (sp) incorporando en su dieta aceite vegetal; los autores identificaron rutas metabólicas y reguladores clave que pueden responder de manera diferente al alimento con ingredientes vegetales, dependiendo del genotipo.

Por otro lado, utilizando la secuenciación de RNA (RNA-seq), se identificaron 23 marcadores de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP's) asociados con la respuesta a crecimiento en trucha arcoíris con una dieta comercial a base de harina de pescado. Esto fue relevante en el sentido de que los SNPs explican el 90% de las diferencias genéticas entre individuos, de tal forma que los peces que presentaron dichos SNPs relacionados al crecimiento, el cual es un rasgo deseable en la acuicultura, serían buenos candidatos para selección genética (Salem *et al.* 2012).

Estos trabajos pueden dar un panorama del desarrollo en el campo de la investigación nutrigenómica y que, actualmente, se cuenta con la tecnología que puede ser aplicada en una gran variedad de especies, con el fin de comprender las redes de interacción entre los genes y la dieta.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos de estudios nutricionales, son comúnmente difíciles de comparar, esto debido al diferente origen de un mismo ingrediente, la formulación usada, la carga genética del pez y el diseño experimental (Ulloa *et al.*, 2014).

La nutrigenómica hace uso de diversas técnicas de alto rendimiento, como la secuenciación de RNA (*RNA-seq*), con la que se puede identificar la expresión de genes y vías moleculares modificadas por la mencionada intervención dietaria (Martin y Król, 2017). Ésta técnica ha revolucionado la disciplina y continúa en constante avance (Martin *et al.*, 2016), lo que ha permitido el estudio de peces a nivel del transcriptoma completo, en lugar de solamente transcritos individuales (Qian *et al.*, 2014; Li y Li, 2014).

Los experimentos de *RNA-seq* estiman el número de genes expresados en un transcriptoma, así como sus frecuencias relativas (García-Ortega y Martínez, 2015). El transcriptoma se refiere al conjunto completo de transcritos en una célula, tejido u organismo específico, incluyendo todos los RNA mensajeros (RNAm) de proteínas codificantes, así como los RNA no codificantes, los cuales regulan la expresión de genes y mantienen la homeostasis celular (Lindberg y Lundeborg, 2010).

A diferencia del genoma que es relativamente estable, el transcriptoma varía según el estadio de desarrollo, la condición fisiológica y el ambiente externo. La secuenciación del transcriptoma completo provee un panorama exhaustivo del perfil transcripcional en un momento biológico dado, permitiendo la identificación y cuantificación de los transcritos. Esto puede volverse más complejo por la presencia de isoformas debidas a “splicing”, transcritos nuevos, fusión de genes, variantes de nucleótidos simples, modificaciones post-traduccionales y controles epigenéticos (Mastoridis *et al.*, 2015).

El análisis génico a gran escala, comúnmente referido como transcriptómica, se ha convertido en una herramienta muy poderosa para lograr el entendimiento de interacciones complejas entre el genotipo y el fenotipo, proporcionando información sobre mecanismos moleculares que controlan la función y desarrollo celular, tanto en la salud como en presencia de alguna patología. La transcriptómica es esencial

también para guiar e interpretar análisis subsecuentes por medio de la proteómica, metabolómica y otras tecnologías emergentes (Wang *et al.*, 2009).

La implementación de nuevas tecnologías como la secuenciación de RNA, junto con el progreso en la secuenciación de genomas de diferentes peces, han permitido identificar los genes afectados por la nutrición (nutrigenómica) y también la identificación de las variantes genéticas que influyen en la respuesta del organismo a los nutrientes (nutrigenética) (Ulloa *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo la secuenciación de ácidos nucleicos, existe una amplia variedad de plataformas y métodos que permiten a los investigadores realizar preguntas virtuales relacionadas con el genoma, transcriptoma o epigenoma de cualquier organismo. Los métodos de secuenciación difieren principalmente de dónde son obtenidas las muestras de DNA o RNA (organismo, tipo de tejido, normal o afectado, condiciones experimentales, etc.) y de las opciones utilizadas para el análisis de datos (Illumina, 2012). Por otro lado, El advenimiento de la secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*) ha permitido a los investigadores estudiar los sistemas biológicos a un nivel que no era posible anteriormente. A medida que ésta tecnología ha evolucionado, así también han incrementado y se han innovado el número de métodos de preparación de muestras y los algoritmos para sus análisis, lo que ha permitido un amplio rango de aplicaciones científicas (Illumina, 2012).

Hoy en día la ultrasecuenciación permite de una forma mucho más inmediata y con menos manipulación manual, secuenciar las muestras sometidas a un estímulo concreto y después cuantificar los genes (de forma global, sin necesidad de seleccionar candidatos) que se estaban expresando más en el momento de la secuenciación en función de la cantidad de lecturas que se obtienen de cada transcrito (Guerrero-Fernández, 2015).

La interpretación de los datos obtenidos de estudios de *RNA-Seq*, es un punto importante, ya que la manipulación manual o con métodos informáticos tradicionales de grandes volúmenes de datos, resulta poco viable (Guerrero-Fernández, 2015). Prueba de ello son las cantidades masivas de información generada de miles de especies que se han depositado y están disponibles en repositorios públicos (Rodríguez-Ezpeleta y Aransay, 2012). Dicha cantidad de datos provoca problemas de almacenamiento y procesamiento de los mismos. En este sentido, la bioinformática es una herramienta indispensable y por ello se encuentra en constante crecimiento. Existe una amplia variedad de softwares bioinformáticos con los que pueden realizarse gran cantidad de análisis, según el método empleado, la tarea a realizar o los pasos del flujo de trabajo del análisis general (Paszkievicz y Studholme, 2012; Guerrero-Fernández, 2015).

## 5. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para reducir el período de alimentación de larvas con alimento vivo es continuo y va en incremento, enfocándose en el diseño y desarrollo de alimentos formulados conocidos como microdietas.

Por lo tanto, se hace indispensable conocer el desempeño de las larvas de las especies de importancia comercial alimentadas con microdietas. En el caso de *C. estor*, las larvas alimentadas con alimento vivo (rotífero) logran un desempeño mayor (supervivencia y crecimiento) que las larvas alimentadas únicamente con microdieta. Actualmente, se cuenta con una microdieta adicionada con ácido alfa-lipoico ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) la cual influyó de manera positiva sobre la supervivencia y algunos parámetros nutricionales, pero las implicaciones a nivel nutrigenómico, en términos de cambios en el transcriptoma de las larvas, de la adición del ácido alfa-lipoico a la microdieta y la alimentación con alimento vivo, no han sido evaluadas.

Con ello se pretende aportar conocimiento para que las microdietas puedan ser empleadas para coadyuvar en la larvicultura de esta especie.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del alimento vivo y microdietas (con y sin ALA) en el crecimiento y la expresión de genes de larvas de *C. estor*.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la influencia de ALA en la expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo de larvas de pescado blanco.
2. Determinar la influencia del alimento vivo y microdieta sin ALA (testigo) en la expresión de genes de larvas de pescado blanco.
3. Identificar procesos biológicos importantes en donde participen los genes sobre-expresados en larvas alimentadas con alimento vivo y microdietas con y sin ALA.

## **7. HIPÓTESIS**

El alimento vivo y la adición de ácido alfa-lipoico en la microdieta, modificará la expresión de genes relacionado al crecimiento y estrés oxidativo en larvas de *C. estor*.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Obtención de organismos y diseño experimental**

A continuación, se describen las condiciones experimentales bajo las cuales se obtuvieron las muestras que fueron la base del presente trabajo.

El experimento se llevó a cabo en la planta de producción de pescado blanco de Pátzcuaro dentro de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA), IIAF-UMSNH. El experimento se realizó en un sistema de recirculación de agua que constó de tres sedimentadores con 300 L de capacidad, un filtro biológico de 50 L y 6 tinas de cultivo para los tratamientos experimentales. En cada tina se colocaron 5 tanques de PVC con un volumen de  $1.92 \pm 0.065$  L cada uno, para un total de 30 tanques.

Se mantuvieron aproximadamente 1,500 larvas por tina durante los primeros 7 días post-eclosión (dpe), lo cual facilitó la alimentación inicial realizada exclusivamente con alimento vivo (*Brachionus plicatilis*). A partir del octavo día se distribuyeron aleatoriamente 200 larvas en cada uno de los 30 tanques para iniciar la adaptación al alimento artificial de los tratamientos correspondientes. Cabe mencionar que durante toda la fase experimental las larvas se mantuvieron bajo un fotoperiodo 24L:0D.

Para la elaboración del alimento artificial (microdieta) se utilizó una combinación de fuentes de proteínas fibrosas (PF) y proteínas solubles (PS). La microdieta se preparó en forma de microagregados, con un tamaño de partícula que varió de 1 a 100  $\mu$  aproximadamente, utilizando el método de Spray-Drying (Martínez-Ángeles, 2016 y Monroy de la Peña, 2018). Se evaluó el efecto de 5 microdietas, con una proporción de 52% de proteínas y 22% de lípidos. Cada una de las microdietas fue adicionada con ALA en concentraciones de 0 (microdieta control), 20, 40, 80 y 160 mg kg<sup>-1</sup>, y se contó con otro control que consistió en

alimentar a las larvas solo con alimento vivo (rotífero), por lo tanto, el diseño experimental constó de 6 tratamientos con 5 repeticiones cada uno.

Durante el octavo y noveno dpe, las larvas fueron alimentadas alternando alimento vivo y microdieta para llevar a cabo el proceso de adaptación al alimento artificial (destete). A partir del décimo dpe se retiró el alimento vivo y se alimentó únicamente con las diferentes microdietas. Las larvas fueron alimentadas de forma manual cada hora durante las primeras 12 horas del día. Para las 12 horas subsecuentes se utilizaron alimentadores automáticos (BOYU ZW-82), los cuales proporcionaron cuatro alimentaciones con un intervalo de 3 horas cada una. La duración total del experimento fue de 27 días.

Se tomaron muestras de larvas de *C. estor* alimentadas con rotífero y de los tratamientos ALA-0 (control), ALA-20 y ALA-160 a las cuales se les realizó un análisis del transcriptoma para observar los efectos nutrigenómicos por la adición de ALA y la alimentación con rotífero.

## **8.2 Muestras**

### **8.2.1 Obtención de muestras para histología**

Larvas de 27 dpe de ambos tratamientos (rotífero y microdietas) (N=7) se fijaron en una solución Bouin's y se procesaron en el Laboratorio de Histopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) campus Mazatlán. Las larvas se deshidrataron a diferentes grados de alcohol, fueron incluidas en parafina y con ayuda de un microtomo se realizaron cortes seriales transversales de 5 µm justo detrás del ano, posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina-floxina. Los cortes transversales fueron fotografiados para obtener los datos morfométricos utilizando un microscopio equipado con una cámara digital y procesados con el software de análisis de imágenes *CaptureQ*.

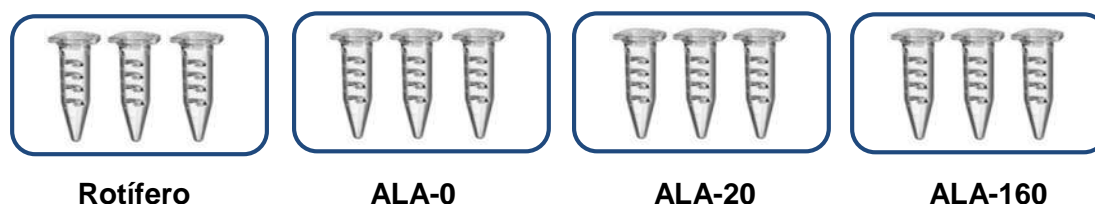
### 8.2.2 Obtención de muestras para extracción de RNA y secuenciación

Se colectaron lotes de 20 larvas del tratamiento de alimentación con rotífero, tratamiento control (ALA-0), del mejor tratamiento con ALA (ALA-20) y del tratamiento con la mayor concentración de ALA (ALA-160), las cuales fueron preservadas en RNA $later$  (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) y almacenadas a 4°C durante 24 horas para permitir una correcta permeabilidad del RNA $later$  en todos los especímenes, posteriormente fueron congeladas a -80°C hasta la extracción de RNA y su consecutiva secuenciación.

### 8.3 Extracción de RNA

Tanto la extracción y la secuenciación del RNA, se realizaron en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

Para la extracción de RNA se llevaron al Instituto de Biotecnología tres réplicas por tratamiento, sumando un total de 12 muestras; cada réplica consistió en un pool de 4 larvas completas (**Fig. 2**).



**Fig. 2.** Muestras para la extracción de RNA. **Rotífero:** tres réplicas de pools de 4 larvas alimentadas únicamente con rotífero. **ALA-0:** tres réplicas de pools de 4 larvas alimentadas únicamente con microdieta. **ALA-20:** tres réplicas de pools de 4 larvas alimentadas con microdieta adicionada con 20 mg kg<sup>-1</sup> de ALA. **ALA-160:** tres réplicas de pools de 4 larvas alimentadas con microdieta adicionada con 160 mg kg<sup>-1</sup> de ALA

Se siguió el protocolo de Quick-RNA™ MicroPrep de la compañía Zymo Research, para posteriormente evaluarse en un chip de RNA Agilent 6000 Nano de Bioanalyzer.

#### 8.4 Construcción de las librerías RNA-seq

Se sintetizó una librería para cada una de las muestras utilizando el kit de preparación TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit de Illumina, siguiendo detalladamente el protocolo HT (*High-Throughput*).

#### 8.5 Secuenciación de RNA (*RNA-seq*)

La plataforma utilizada para la secuenciación fue Illumina, con un sistema NextSeq-500, el cual se basa en el método de secuenciación por síntesis. El tipo de lectura fue “*paired-end*”, con una configuración de 2 x 75 ciclos (dos lecturas de 75 nucleótidos o pares de bases), con un desempeño aproximado de 10 millones de lecturas por librería.

#### 8.6 Análisis bioinformático

Una vez obtenidas las lecturas del proceso de secuenciación, el análisis recayó sobre la bioinformática, donde se llevaron a cabo una serie de pasos (*pipeline*) (**Fig. 3**) utilizando varios softwares y paquetes bioinformáticos.

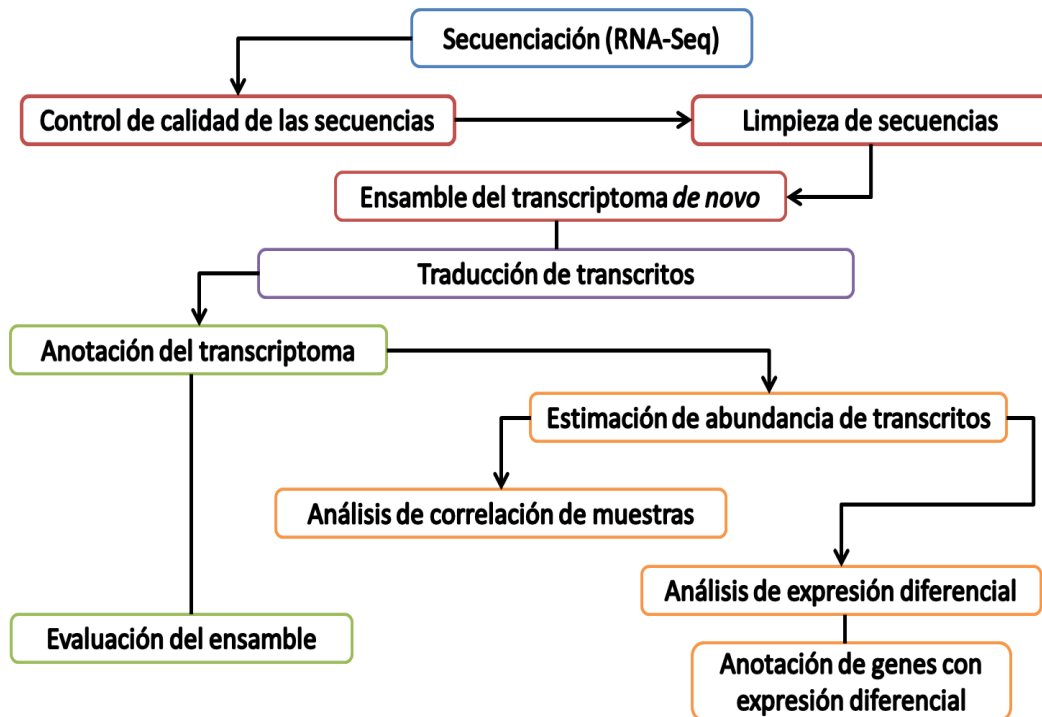


Fig. 3. Pipeline del análisis bioinformático

El análisis bioinformático se desarrolló en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM) campus Mazatlán, donde se llevó a cabo una amplia capacitación en el ensamblaje del transcriptoma y sus posteriores análisis de expresión génica. Se trabajó bajo el Sistema Operativo (OS) Linux, accediendo a la terminal del servidor de cómputo BioBacter del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo).

### 8.6.1 Control de calidad de las secuencias

Se realizó un análisis de calidad de las secuencias crudas (archivos fastq) ejecutando el software FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) antes y después de realizar la limpieza. Esto con la finalidad de observar la calidad con la que se habían recibido las lecturas secuenciadas y determinar el manejo de las mismas.

### 8.6.2 Limpieza de secuencias

Al realizar la limpieza de las secuencias se puede mejorar el ensamblaje del transcriptoma (MacManes, 2014). La herramienta utilizada para la limpieza fue Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), con la cual fue posible eliminar aquellas secuencias de baja calidad (alta probabilidad de error en las bases) o con un *QScore* <5 (*Phred Quality Score*, indica la probabilidad de que una base determinada sea llamada incorrectamente por el secuenciador). También se eliminaron secuencias menores a 25 pares de bases de longitud y se removieron adaptadores que aún estuvieran presentes como producto del proceso de secuenciación.

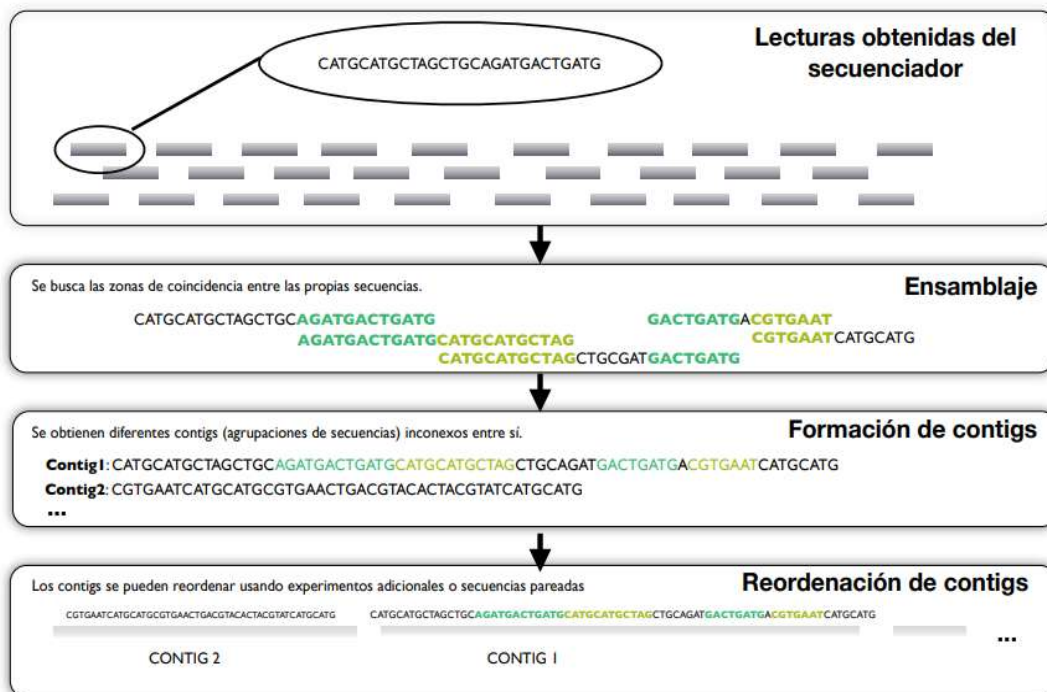
Los parámetros utilizados en Trimmomatic fueron los siguientes:

- ILLUMINACLIP:\$TRIMMOMATIC\_DIR/adapters/TruSeq3-PE.fa:2:30:10
- SLIDINGWINDOW:4:5
- LEADING:5
- TRAILING:5
- MINLEN:25

### 8.6.3 Ensamble del transcriptoma *de novo*

El ensamblaje *de novo* se realiza cuando se pretende estudiar el transcriptoma de un organismo “no modelo”, es decir, del que aún se requieren estudios y del cual no existen información genómica o ésta es muy pobre (Lowe *et al.*, 2017).

El punto de inicio de cada lectura es aleatorio, por lo que tendrán zonas comunes entre ellas que ayudarán a reconstruir la secuencia final mediante un procedimiento de ensamblaje que consiste en la búsqueda de las regiones que solapan entre sí mediante criterios heurísticos apropiados para ir formando una cadena de nucleótidos cada vez mayor hasta conseguir formar la cadena completa. En el caso de que la cadena completa sea imposible de formar, se intenta conseguir los fragmentos más grandes que sea posible. Los fragmentos obtenidos se denominan “*contigs*” para dar la idea de que son todos los nucleótidos contiguos que se han logrado yuxtaponer (**Fig. 4**) (Guerrero-Fernández, 2015).



**Fig. 4.** Esquematización del proceso de ensamblaje (Guerrero-Fernández, 2015)

El ensamble del transcriptoma se realizó con todas las lecturas pre-procesadas. Se utilizó el software bioinformático Trinity v2.8.3 (Haas *et al.*, 2013), el cual se utiliza ampliamente para ensamblar secuencias de transcritos provenientes de datos de *RNA-Seq* de Illumina.

Trinity, combina tres módulos de software independientes: “*Inchworm*”, “*Chrysalis*” y “*Butterfly*”, los cuales son aplicados secuencialmente para procesar grandes volúmenes de lecturas de *RNA-Seq*. De manera general, Trinity particiona toda la información de las secuencias en varios gráficos de Bruijn individuales, cada uno representando la complejidad transcripcional de un gen o locus dado (*Inchworm*), después procesa cada gráfico independiente para extraer las isoformas de mayor longitud posibles debidas al *splicing* (*Chrysalis*) y separar posteriormente transcritos derivados de genes parálogos (*Butterfly*).

Como resultado del proceso de ensamblaje se obtuvieron todos los *contigs* o secuencias de transcritos provenientes de las lecturas iniciales.

#### 8.6.4 Traducción de transcritos

Los transcritos obtenidos del proceso de ensamblaje (archivos fasta), fueron el sustrato del software TransDecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>), el cual se divide en dos partes, según su *pipeline*: primero se utilizó TransDecoder.LongOrfs, para realizar la traducción conceptual (nucleótidos-proteína), con el que se obtuvieron los marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames* - ORFs) o regiones codificantes de cada transcrito. Dichos ORFs se compararon con algunas bases de datos con evidencia basada en similitud, tales como BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), específicamente Blastp (proteína-proteína) y Blastx (nucleótido-proteína), además de Pfam (caracterización de dominios proteicos) (Finn *et al.*, 2006). Esta búsqueda por homología se realizó para maximizar la sensibilidad de capturar ORFs que tuvieran significancia funcional; posteriormente se utilizó TransDecoder.Predict para volver a buscar homologías entre los

transcritos y las bases de datos antes mencionadas, y así localizar las proteínas con las que coincidieron o se asemejan los transcritos sometidos a revisión.

#### **8.6.5. Anotación funcional del transcriptoma**

La anotación del transcriptoma se realizó para establecer, si según las bases de datos públicas consultadas para homología proteica (Blast/Swiss-prot), dominio proteico, péptido señal y dominios transmembranales (HMMER/Pfam) (Bryant *et al.*, 2017), existe parecido entre el transcrito del transcriptoma *de novo* y las secuencias conocidas en éstas bases de datos, y si dicha similitud es suficiente para permitir asignarle las mismas funciones.

El software empleado para la anotación del transcriptoma ensamblado fue Trinotate (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>), el cual realizó una integración en una base de datos SQLite de toda la información generada previamente y arrojó un reporte de anotación en donde se pudieron identificar los genes o transcritos con su respectivo ID y función asociada en términos de GO (componente celular, función molecular y proceso biológico en que participa).

#### **8.6.6 Evaluación general del ensamble**

Una vez que se concluyó con el proceso de ensamblaje, se procedió a evaluar la calidad o integridad (cuantitativa) de dicho ensamble en términos de cantidad de genes esperados, es decir, se realizó un análisis para conocer qué tan completo estaba el ensamble, comparando los transcritos ensamblados contra una base de datos de genes ortólogos en peces.

La evaluación se realizó a través de BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*), que emplea la base de datos OrthoDB ([www.orthodb.org](http://www.orthodb.org)) para proveer las medidas cuantitativas del ensamble. Las métricas que genera BUSCO son en función de genes completos (simples y duplicados); simples cuando sus longitudes están dentro de dos desviaciones estándar del grupo BUSCO, es

decir, dentro de una expectativa del 95%; mientras que, duplicados cuando son genes completos que se encuentran en más de una sola copia. Los genes incompletos o fragmentados, son aquellos genes que solo fueron recuperados parcialmente. Por último, genes “perdidos” (*missing genes*) aquellos que no fueron recuperados (Simão *et al.*, 2015).

Dentro de OrthoDB se encuentran las bases de datos de los linajes que se utilizan para generar los *clústers* de genes ortólogos según el organismo que se esté analizando. El linaje empleado para éste estudio fue Actinopterygii.

Como parte de las métricas generadas al utilizar BUSCO, la cantidad de genes duplicados obtenidos, llevaron a discriminar y seleccionar aquellos que eran duplicados verdaderos, es decir, que el hit del gen ortólogo en la base de datos (OrthoDB) fuera representado realmente por un gen distinto dentro del transcriptoma, que tuviera un número de identificación (ID) diferente y así descartar que el análisis estuviera basado en las isoformas de los genes; de esta forma se redujo la cantidad de genes duplicados totales. Dichos genes pueden ser de utilidad en investigaciones posteriores.

Finalmente, aquellos genes que aparentemente no aparecieron en el transcriptoma generado (*missing genes*), se sometieron a un enriquecimiento de funciones en términos de GO (*GO-terms*). Esto para obtener aquellos términos ontológicos relacionados a estos genes e introducirlos posteriormente en REVIGO, herramienta de la web que crea *clústers* de los “*GO terms*” que son semánticamente similares y los representa en varios estilos de visualización, de tal manera que se pudieron conocer aquellos procesos biológicos en que están involucrados aquellos genes que no se ven reflejados en el transcriptoma ensamblado.

#### **8.6.7 Estimación de abundancia de transcritos**

En la búsqueda de los genes con expresión diferencial entre los tratamientos, previamente se realizó la estimación de abundancia de transcritos y el mapeo de

estos contra el transcriptoma ensamblado (de referencia), esto mediante un pseudo-alineamiento con el programa de cuantificación Kallisto (Bray *et al.*, 2016).

El concepto general parte de que, si no se realiza ninguna manipulación de las muestras, la probabilidad de que aparezcan las lecturas pertenecientes a cada gen es la misma en todos los casos. Por ese motivo, si las lecturas pertenecientes a un gen aparecen relativamente más veces, sugiere que es porque ese gen está sobre-expresado en determinada muestra (Guerrero-Fernández, 2015).

#### **8.6.8 Análisis de correlación de muestras**

La estimación de abundancia de transcritos llevó a la construcción de las matrices de expresión de transcritos con valores de expresión normalizados, con lo que se pudo crear la matriz de correlación de muestras y sus respectivas réplicas, además de un análisis de componentes principales (PCA), todo esto para verificar el efecto de la alimentación con rotífero, con la microdieta control y la adición de ALA a la microdieta, a nivel transcripcional en las larvas de *C. estor*. Todos los plots fueron generados mediante scripts en R.

#### **8.6.9 Análisis de expresión diferencial**

Las matrices y los plots antes mencionados, fueron utilizados para el análisis de expresión diferencial de genes, donde se empleó el paquete EdgeR/Bioconductor, el cual realiza comparaciones a la par de cada una de las muestras y como resultado genera un análisis donde incluye el *fold-change* utilizado (*fold-change* = 4) y el valor de significancia estadística empleado (*p-value* = 0.01), mostrando solamente el subset de genes expresados diferencialmente en cada uno de los tratamientos.

#### **8.6.10 Anotación de genes con expresión diferencial**

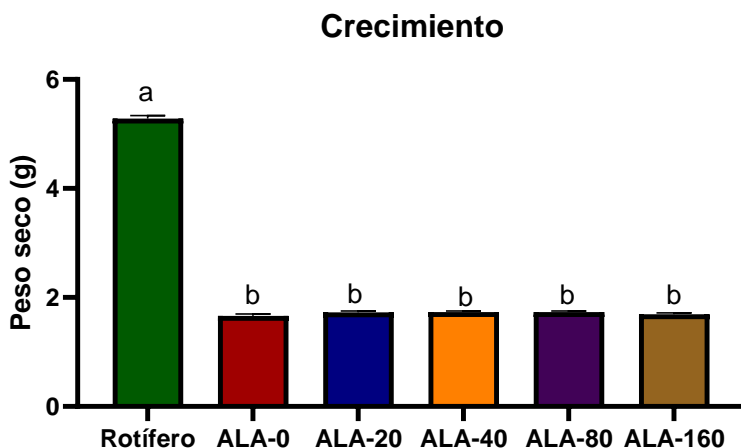
Con el reporte de anotación generado por TRINOTATE, se localizaron el total de genes obtenidos con expresión diferencial en cada uno de los tratamientos, con

la finalidad de conocer los procesos biológicos en los que dichos genes están involucrados.

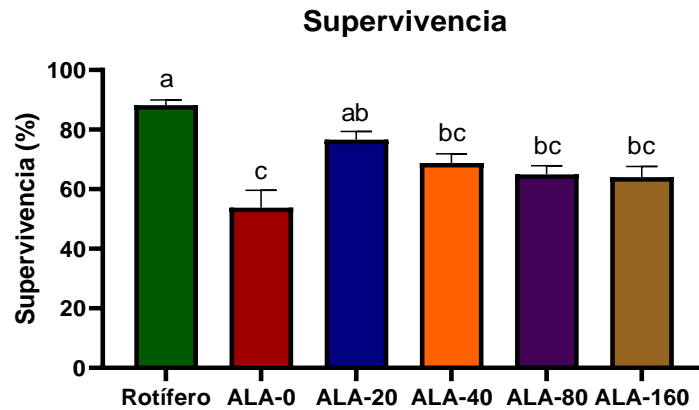
## 9. RESULTADOS

### 9.1 Desempeño larvario y evaluación histológica

Los resultados obtenidos del experimento de alimentación demuestran que las larvas alimentadas con rotífero lograron el mejor desempeño en términos de crecimiento ( $5.28 \text{ g} \pm 1.1$ ), siendo significativamente mayor que el resto de los tratamientos (**Gráfica. 1**). Respecto a la supervivencia, no hubo diferencia significativa entre las larvas alimentadas con rotífero ( $88.24\% \pm 3.85$ ) y el tratamiento adicionado con  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  de ALA (ALA-20) ( $76.64\% \pm 6.20$ ) (**Gráfica 2**). De los tratamientos de las microdietas adicionadas con ALA, la de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  obtuvo la mayor supervivencia, siendo significativamente diferente con la microdieta control (ALA-0) ( $53.52\% \pm 13.19$ ). El tratamiento ALA-20 tuvo también el mejor aprovechamiento del alimento para convertirlo en peso corporal, ya que presentó la mejor tasa de conversión alimenticia (FCR) (ALA-20 = 1.07 vs ALA-0 = 1.67) con el menor consumo de alimento (FI) (ALA-20 = 17.75mg vs ALA-0 = 25.47mg); adicionalmente, la tasa de eficiencia proteica (PER) presentó el mayor valor (1.93) en dicho tratamiento, el cual fue diferente al resto de los tratamientos de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ).

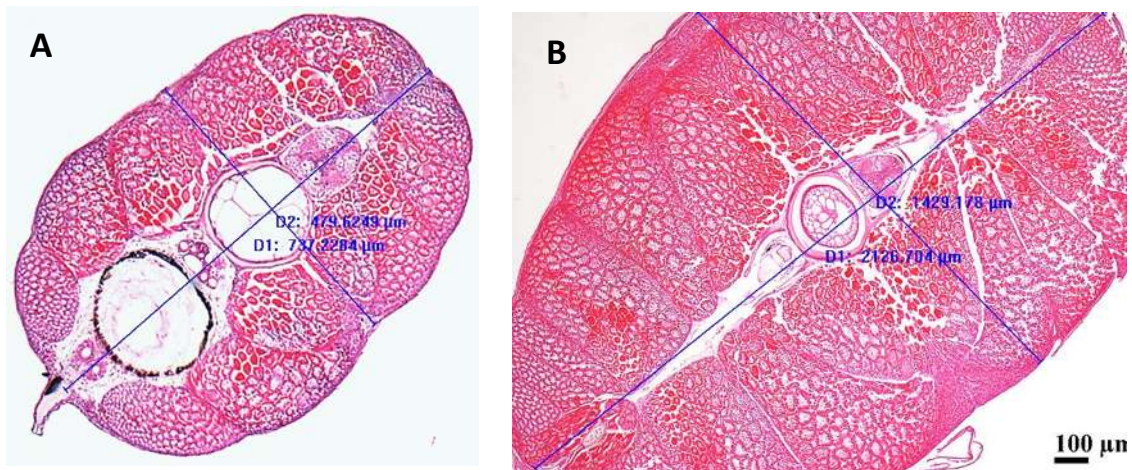


**Gráfica 1.** Crecimiento de larvas de *C. estor* bajo diferentes tratamientos de alimentación (alimento vivo y microdietas) al finalizar 27 días de experimentación. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )



**Gráfica 2.** Supervivencia de larvas de *C. estor* bajo diferentes tratamientos de alimentación (alimento vivo y microdietas) al finalizar 27 días de experimentación. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )

Debido a los resultados de crecimiento mencionados anteriormente, se realizó una evaluación histológica de las larvas de los tratamientos de alimentación con rotífero y con la microdieta control (**Fig. 5A y 5B**).



**Fig. 5.** **A.** Corte transversal de larva de *C. estor* alimentada con microdieta. **B.** Corte transversal de larva de *C. estor* alimentada con alimento vivo (rotífero).

En la **Fig. 5.** logra apreciarse claramente la diferencia en el desarrollo de la musculatura entre larvas alimentadas con rotífero vs alimentadas con microdieta,

mostrando evidentemente mayor crecimiento muscular en las larvas alimentadas con rotífero.

## 9.2 Extracción de RNA

El RNA extraído de las 12 muestras en total (3 réplicas por tratamiento) de los “pooles” de larvas de los cuatro tratamientos (Rotífero, ALA-0, ALA-20 y ALA-160), se evaluó en un chip de RNA Agilent 6000 Nano de Bioanalyzer. Se reportó de alta calidad, observando buena concentración (751-1000 ng/μl) y valores de RIN (*RNA Integrity Number*) por arriba de 8.8.

## 9.3 Secuenciación de RNA (*RNA-seq*)

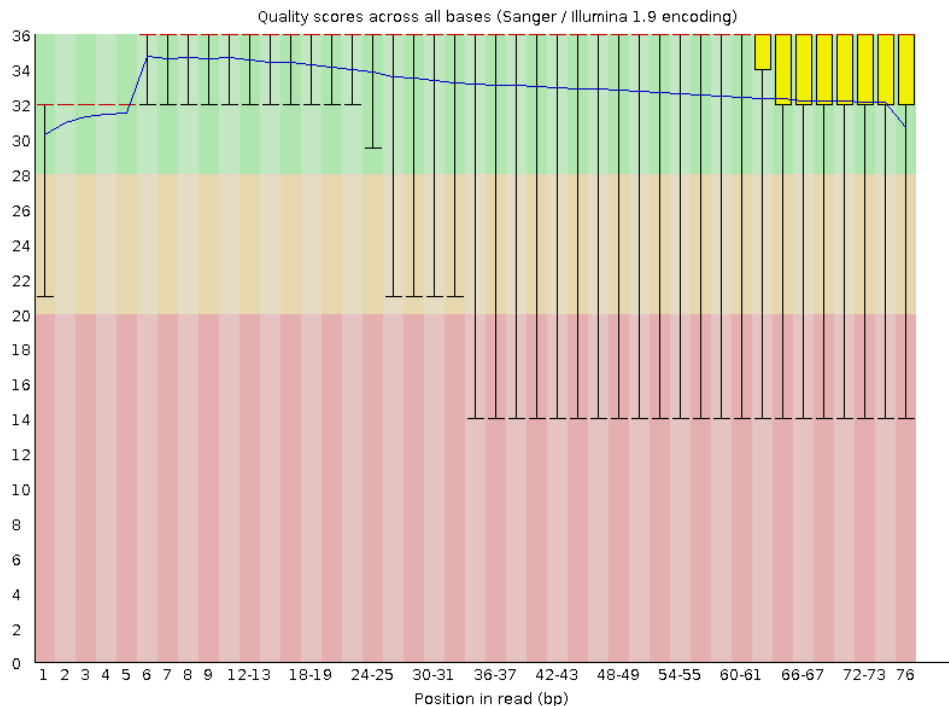
Por medio del equipo de secuenciación Next-Seq500-Illumina, se obtuvo un rendimiento aproximado de 10,000,000 (diez millones) de lecturas por muestra, con una longitud de 75 pb cada una.

## 9.4 Control de calidad de las secuencias

Las secuencias o lecturas con las que se ensambló el transcriptoma tuvieron un *Q-score* > 30 (**Fig. 6.**). El *Q-score* o puntuación de calidad es la probabilidad de que una base se haya integrado de manera errónea en el proceso de secuenciación. Ésta puntuación está basada en el algoritmo Phred, donde a mayor *Q-score*, la llamada de base es de mayor calidad o tiene mayor precisión.

Un *Q-score* de 30, indica que la probabilidad de error es de 1 en 1000 (99.9% de precisión), por lo que las lecturas llegaron de alta calidad; de esta manera se pudieron realizar el resto de los análisis bioinformáticos sin ningún inconveniente.

## ✓ Per base sequence quality



**Fig. 6.** Resumen del análisis de control de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación. Software FastQC (version 0.11.8)

### 9.5 Ensamble del transcriptoma *de novo*

En una investigación previa realizada con cabezas de juveniles de pescado blanco, se había ensamblado un transcriptoma con sus respectivas estadísticas (Corona-Herrera, 2017), por lo que con la finalidad de obtener en este trabajo un transcriptoma *de novo* lo más completo posible, que incluyera los datos generados por las cabezas de juveniles y las larvas de pescado blanco, se obtuvo la información de ambos ensambles por separado y en conjunto (**Tabla. 1**).

El transcriptoma *de novo* se ensambló haciendo uso del software bioinformático Trinity (v2.8.3). Las métricas tanto del ensamble general (cabezas de juveniles y larvas de pescado blanco) fueron originadas con el programa TrinityStats.pl, dando como resultado un total de 80,693 genes y 112,070 transcritos para el ensamble del transcriptoma de las larvas, y un total de 101,136 genes y

156,100 transcritos para el ensamble general (cabezas de juveniles y larvas de *C. estor*) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Métricas del ensamblaje del transcriptoma *de novo* de larvas de *Chirostoma estor* y métricas del ensamblaje del transcriptoma *de novo* de larvas y cabezas de juveniles de pescado blanco (*Chirostoma estor*) (general).

	<b>Larvas</b>	<b>General</b> (larvas + cabeza de juveniles)
<b>Total de genes</b>	80,693	101,136
<b>Total de transcritos</b>	112,070	156,100

Dado que con el ensamble general resultó más robusto en cuanto métricas se refiere (cantidad de genes y transcritos), fue con el que se realizaron el resto de los análisis bioinformáticos.

Según las estadísticas, el N50 de los transcritos del ensamble de las larvas fue de 2,138 y el del ensamble general fue de 2,496 con una mediana de longitud de 516 y 521 pares de bases (pb) respectivamente. El total de bases ensambladas fue de 122,489,186 para el transcriptoma de larvas y de 187,357,250 pb para el ensamble del transcriptoma general (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Estadísticas basadas en los contigs de todos los transcritos de ambos ensambles (larvas y general)

#### Estadísticas de los contigs de todos los transcritos

	<b>Larvas</b>	<b>General</b> (larvas + cabeza de juveniles)
<b>Contig N10</b>	5,765	6,238
<b>Contig N20</b>	4,188	4,679
<b>Contig N30</b>	3,271	3,734
<b>Contig N40</b>	2,661	3,057
<b>Contig N50</b>	2,138	2,496
<b>Mediana de la longitud de los contig</b>	516	521

<b>Contig promedio</b>	1,092.97	1,200.24
<b>Total de bases ensambladas</b>	122,489,186	187,357,250

### 9.6 Traducción de transcritos

El total de ORFs o regiones codificantes obtenidos con TransDecoder a partir de los transcritos del ensamble fue de 172,775; de los cuales 111,028 se identificaron como completos, es decir, con sus respectivos codones de inicio y paro (**Tabla 3**). El ORF más largo tuvo una longitud de 1,666 pb.

**Tabla 3.** ORFs o regiones codificantes de cada transcrito obtenidos a partir del proceso de ensamblaje.

#### ORFs – Open Reading Frames

<b>Internos</b>	17,330
<b>Parcial 3'</b>	10,570
<b>Parcial 5'</b>	33,847
<b>Completos</b>	111,028
<b>Total</b>	172,775

Los ORFs identificados se filtraron en bases de datos (Blast, Pfam) para maximizar la sensibilidad de capturar OFRs que tuvieran significancia funcional y realizar la predicción de proteínas del transcriptoma. El *e-value* aplicado para el filtrado en las bases de datos fue de  $1e^{-3}$ , de ésta manera se discriminó estadísticamente la cantidad de proteínas finales, obteniendo un total de 78,949 proteínas, de las cuales 49,930 fueron encontradas completas (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Cuantificación de proteínas del ensamble del transcriptoma *de novo* que fueron traducidas conceptualmente con ayuda de diversas bases de datos públicas.

<b>Proteínas</b>	
<b>Internas</b>	9,089

<b>Parcial 3'</b>	6,313
<b>Parcial 5'</b>	13,217
<b>Completas</b>	49,930
<b>Total</b>	78,949

### 9.7 Anotación funcional del transcriptoma

Todos los datos derivados del análisis de transcritos, se integraron en una base de datos SQLite a través de Trinotate, lo que permite una búsqueda eficiente y rápida de cada transcrito en el reporte de anotación generado, con su respectiva función asociada, componente celular, función molecular y proceso biológico en que participa.

### 9.8 Evaluación general del ensamble

La evaluación general se realizó a través de BUSCO y las métricas del ensamble obtenidas se muestran en la **Tabla 5**. En el transcriptoma ensamblado *de novo*, todos los genes son evaluados usando HMMER (*Hidden Markov Model*) y perfiles de BUSCO que son linaje específico, por ello es importante recordar que el linaje empleado para éste estudio fue Actinopterygii.

De los 4,584 ortólogos de copia única del linaje Actinopterygii, se recuperaron más de 90% de genes completos en nuestro ensamble (4,168 genes), el 4.4% se identificaron como genes fragmentados y un 4.7% de los genes no fueron encontrados.

Del total de genes duplicados resultantes del ensamble (1,650), se seleccionaron únicamente los genes duplicados verdaderos (93). Estos genes pueden ser de utilidad en investigaciones posteriores, por ejemplo, en estudios de función adaptativa.

**Tabla 5.** Métricas de la evaluación del ensamble de transcriptoma *de novo*

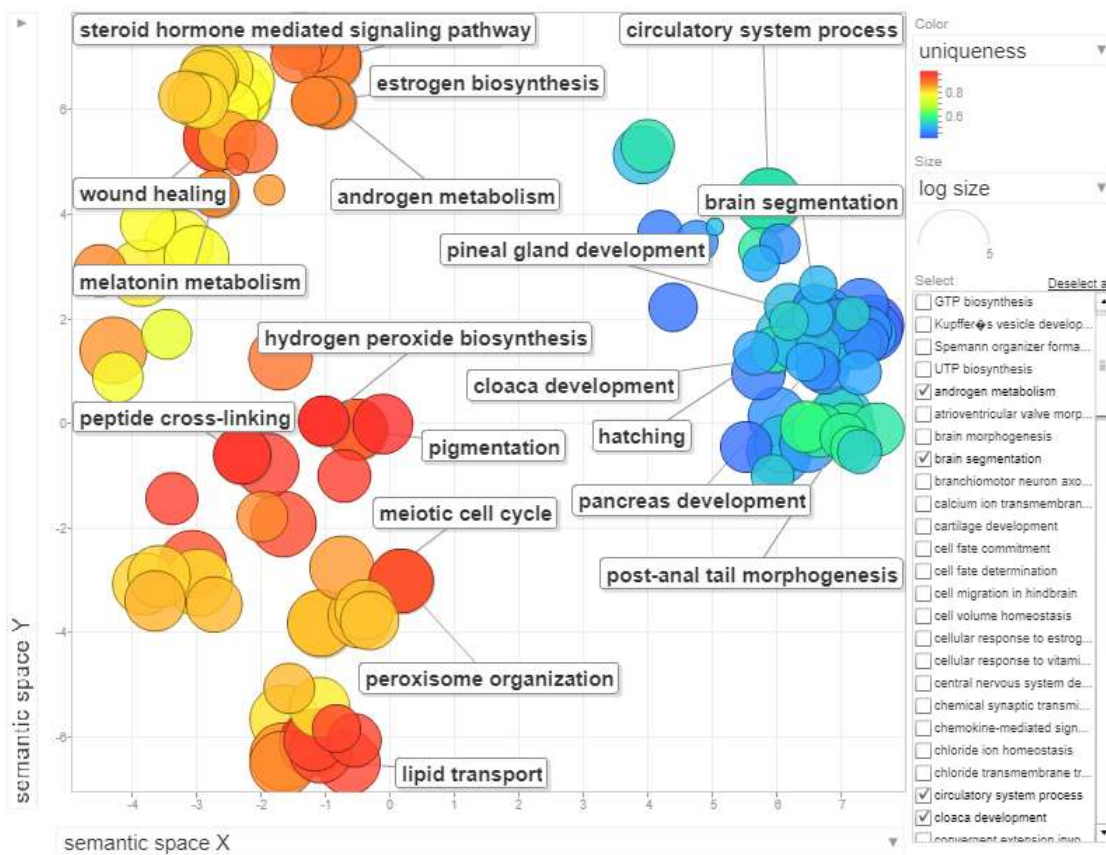
Evaluación del ensamble		
	Porcentaje (%)	Cantidad
<b>C</b>	90.9	4,168
<b>S</b>	54.9	2,518
<b>D</b>	36.0	1,650
<b>F</b>	4.4	202
<b>M</b>	4.7	214

**n:** 4584

**C:** BUSCOs completos; **S:** BUSCOs completos y de copia única; **D:** BUSCOs completos y duplicados; **F:** BUSCOs fragmentados o incompletos; **M:** BUSCOs “perdidos” (estos ortólogos no se encuentran en el transcriptoma ensamblado); **n:** Grupos empleados según el linaje

Finalmente, mediante la anotación del transcriptoma se extrajeron los términos ontológicos (*GO terms*) de los *missing genes* o genes que aparentemente no aparecieron en el transcriptoma generado y mediante la herramienta de la web, REVIGO, se logró esquematizarlos y visualizarlos en diferentes gráficos o *plots* basados en similitud semántica, es decir, se agruparon automáticamente aquellos *GO terms* de los genes o productos génicos que tienen funciones asociadas o participan en conjunto (**Fig. 7**). Esto se realizó con la finalidad de conocer los procesos biológicos en los que están involucrados los genes faltantes en el transcriptoma *de novo*.

En el gráfico de dispersión (**Fig. 7**) se muestran solamente algunos procesos biológicos propios de los *missing genes*, ya que al ser 563, no resultó posible representarlos en su totalidad, pero se pueden apreciar algunos de ellos. Cada círculo o burbuja es un proceso biológico diferente. Varios de los procesos biológicos encontrados están relacionados a el metabolismo de hormonas reproductivas o vías de señalización de hormonas esteroideas, así como ciclos celulares mitóticos y meióticos, lo cual era de esperarse, ya que por la etapa fisiológica de los organismos utilizados para el presente estudio (larvas), los *GO terms* de dichos procesos no estuvieron presentes en el transcriptoma ensamblado.



**Fig. 7.** Gráfico de dispersión de los *missing genes*. Muestra una distribución de los GO terms y los representa como burbujas en un espacio 2D. Los GO terms que se encuentran más cercanos son semánticamente más similares

## 9.9 Efecto del ALA en las larvas

### 9.9.1 Análisis de correlación de muestras (ALA-0 vs ALA20)

El análisis de estas muestras se realizó debido a que el tratamiento ALA-20 presentó mayor supervivencia que ALA-0, sin mostrar diferencias significativas con el tratamiento de alimentación con rotífero (**Gráfica 2**), por lo que se decidió evaluar el efecto de ALA en las larvas.

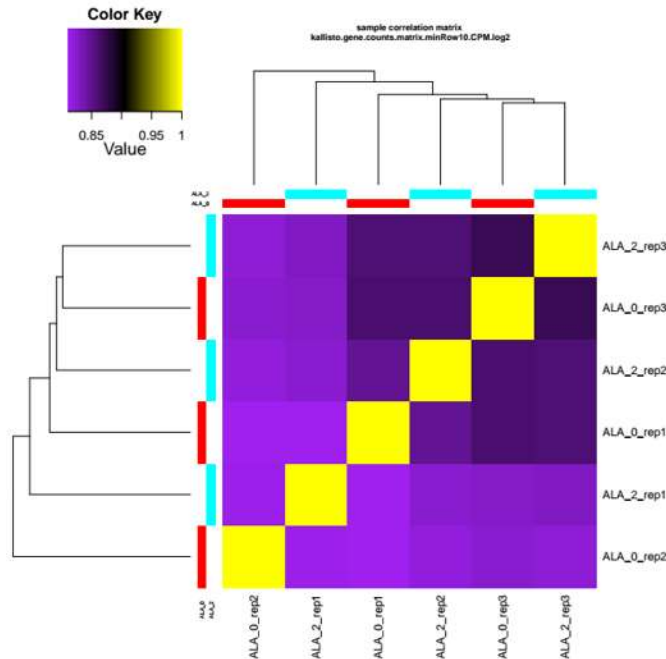
A partir del apartado 9.4 de la sección de “Resultados” (Ensamble del transcriptoma *de novo*) se hizo mención de que el ensamble se realizó utilizando los datos de una investigación previa (cabezas de juveniles de pescado blanco) y el

presente trabajo (larvas de pescado blanco); esto con la finalidad de obtener un transcriptoma lo más completo y robusto posible. Es importante mencionar que para el “Análisis de correlación de muestras” (9.7), el “Análisis de expresión diferencial” (9.8), y la “Anotación de genes con expresión diferencial” (9.9), se creó el archivo manifiesto únicamente con los datos de las muestras del presente trabajo (larva) para un análisis más preciso.

Como resultado de la cuantificación de la abundancia de transcritos realizada con Kallisto (software de cuantificación), se construyeron matrices de conteo y de valores de expresión normalizada para dar lugar a la matriz de correlación de muestras y sus respectivas réplicas (**Fig. 8**), y el análisis de componentes principales (PCA) (**Fig. 9**), para los cuales se empleó un logaritmo en base 2 o logaritmo binario (Log2). Ambos análisis se realizaron para verificar el efecto del tratamiento del ALA en las muestras.

En la matriz de correlación se estiman los perfiles de expresión de todos los transcritos en todas las muestras y se espera encontrar una clusterización o agrupación de muestras con perfiles de expresión similares, así como alta correlación entre réplicas biológicas de un mismo tratamiento, pero baja correlación entre tratamientos, lo que indicaría un efecto a nivel transcripcional entre tratamientos

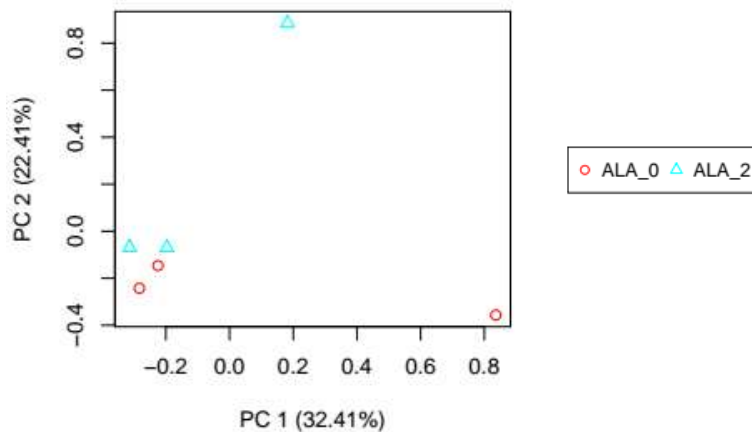
Como resultado de la matriz de correlación, se observó una alta correlación (0.85 a 1) entre las muestras y réplicas de ambos tratamientos, es decir, no existió tal formación de *clústers* y los perfiles de expresión son similares entre tratamientos, lo que inicialmente indica que al parecer el ALA en la concentración de 20 mg kg<sup>-1</sup> no muestra modificaciones diferenciales a nivel transcripcional.



**Fig. 8.** Matriz de correlación de muestras (**ALA-0 vs ALA-20**) y sus respectivas réplicas.

Para corroborar los hallazgos de la matriz de correlación, se procedió a realizar el análisis de componentes principales (PCA), en donde se busca un agrupamiento de viñetas entre réplicas de un mismo tratamiento, pero no así entre tratamientos.

Como resultado del PCA, se encontraron prácticamente juntas las viñetas que representan las muestras y réplicas de ambos tratamientos, lo que indica que no existe un efecto del tratamiento con ALA-20 en el transcriptoma de las larvas de pescado blanco.

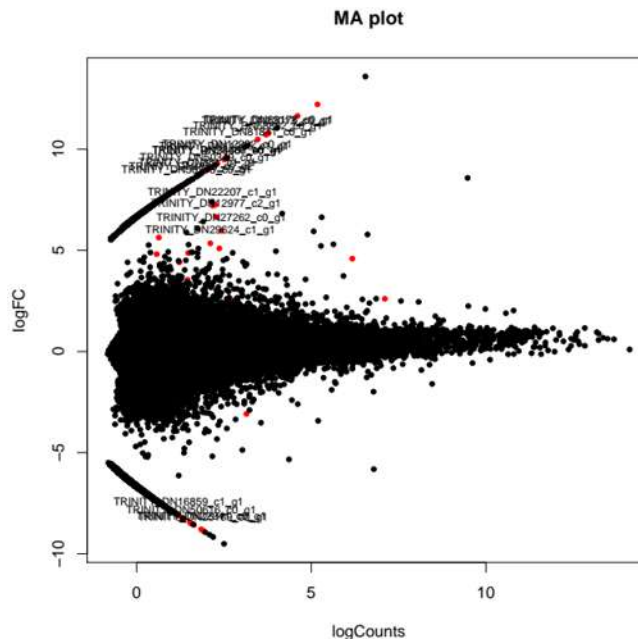


**Fig. 9.** Análisis de componentes principales representando por 2 componentes (PC1, PC2). Los círculos color rojo representan las tres réplicas del tratamiento con ALA-0. Los triángulos color turquesa representan las tres réplicas del tratamiento con ALA-20

### 9.9.2 Análisis de expresión diferencial (ALA-0 vs ALA-20)

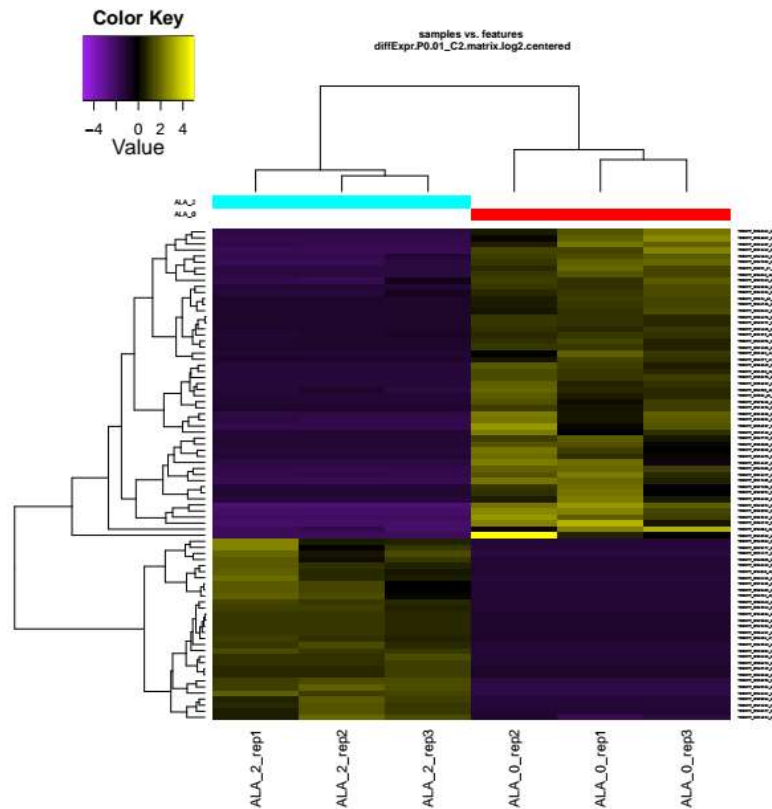
La matriz de correlación de muestras ayudó para la realización del análisis de expresión diferencial de los genes, donde haciendo uso del paquete EdgeR/Bioconductor se obtuvieron los “*subsets*” o subconjuntos de genes expresados diferencialmente (*fold-change* = 4 y *p-value* = 0.01) entre tratamientos.

En el *plot* MA se obtuvo un primer acercamiento de la expresión diferencial, donde se representan la cantidad de genes expresados y la sobre o sub-expresión de estos. Los puntos rojos en el *plot* representan únicamente los genes con expresión diferencial; tomando esto en cuenta y considerando solamente los genes sobre-expresados, se encontraron relativamente pocos genes expresados diferencialmente entre tratamientos, como se aprecia en el *plot* (**Fig. 10**).



**Fig. 10. Plot MA.** Representación de los resultados del análisis de expresión diferencial, cantidad de genes expresados (*logCounts*) y mayor o menor expresión de los mismos (*logFC*). Puntos coloreados en rojos son los genes con expresión diferencial entre tratamientos (*fold-change* = 4 y *p-value* = 0.01)





**Fig. 12. Heat map.** Representación de genes expresados diferencialmente (*fold-change* = 4 y *p-value* = 0.01) para cada tratamiento. De acuerdo a la paleta de color (*Color key* – esquina superior izquierda), aquellos genes que se encuentre entre la gama de colores negro-morado son los sub-expresados; aquellos genes que se encuentren entre la gama de colores marrón-amarillo son los genes sobre-expresados según el tratamiento.  
**ALA-0** (línea azul turquesa superior) o **ALA-20** (línea roja superior).

### 9.9.3 Anotación de genes con expresión diferencial (ALA-0 vs ALA-20)

El reporte de anotación generado previamente con TRINOTATE, sirvió como base para referir los genes con expresión diferencial entre tratamientos. Esto con la finalidad de conocer los procesos biológicos en los que pudieran estar involucrados dichos genes.

Los genes sobre-expresados diferencialmente y anotados para el tratamiento con ALA20 se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Anotación de genes con expresión diferencial para el tratamiento de ALA20 (larvas alimentadas con la microdieta adicionada con 20 mg kg<sup>-1</sup>).

Gen	Componente celular, función molecular y/o procesos biológicos en los que está involucrado cada gen según la anotación del transcriptoma
1. Miembro de la sub-familia A del canal dependiente de voltaje de potasio 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transporte transmembranal de iones de potasio</li> </ul>
2. Proteína bicaudal D homóloga 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localización del centrosoma</li> </ul>
3. Probable ARN dependiente de ATP helicasa DDX27	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento de ARNr</li> </ul>
4. Sub-unidad del canal de Calcio tipo T dependiente del voltaje alfa-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Importación de iones de Calcio</li> <li>• Motilidad espermática flagelada</li> </ul>
5. Claudin-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organización de unión célula-célula</li> </ul>
6. Sub-unidad 3 del citocromo C oxidasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cadena aerobia de transporte de electrones</li> <li>• Conjunto de cadenas respiratorias IV</li> </ul>
7. Complejo FACT sub-unidad SPT16	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reparación de DNA</li> <li>• Replicación de DNA</li> </ul>

Los genes con expresión diferencial en el tratamiento con ALA-20, participan en procesos biológicos naturales propios de la célula (transporte transmembranal de iones de potasio, procesamiento de ácidos nucleicos, organización celular, etc.), sin embargo, contrariamente a lo que se esperaba, debido a la naturaleza antioxidante del ALA, no se encontró ningún gen o conjunto de genes que estén relacionados al contrarresto del estrés oxidativo por medio del ALA.

#### 9.9.4 Anotación de genes con expresión diferencial (ALA-0 vs ALA-160)

Con la finalidad de descartar que la dosis de ALA utilizada fuera muy baja (20 mg kg<sup>-1</sup>) y que por ello no se observó un efecto claro a nivel transcripcional, se decidió trabajar con las muestras de las larvas alimentadas con la microdieta adicionada con la concentración más elevada de ALA (160 mg kg<sup>-1</sup>), y evaluar la expresión génica en este tratamiento para observar un posible efecto del ALA que no se observó en la concentración más baja.

En el PCA realizado con las muestras iniciales (ALA-0 y ALA-20), hay dos muestras que se desfasan del resto (ALA0\_rep2 y ALA20\_rep3), es decir, fueron las que tuvieron mayor variabilidad entre las muestras (*batch effects*), por lo que se decidió eliminarlas y juntar las muestras del tratamiento control (ALA-0) y las del tratamiento con ALA-20, ya que no varían en gran medida en cuanto a expresión génica, y así poder realizar inferencias estadísticas.

Los efectos de lote o *batch effects* pueden ocurrir debido a condiciones de laboratorio, lotes de reactivos, diferencias individuales, etc., y pueden conducir a conclusiones incorrectas (Leek *et al.*, 2010). De tal manera que al final se contrastaron 2 réplicas de ALA-0 y 2 réplicas de ALA-20, que constituyeron ahora el tratamiento control, contra las 3 réplicas de ALA160.

En el reporte de anotación se buscaron los genes con expresión diferencial en el tratamiento ALA160, para conocer los procesos biológicos en los que están involucrados dichos genes. Se encontraron 91 genes con expresión diferencial, de los cuales únicamente se encontró la anotación de 10 (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Anotación de genes con expresión diferencial para el tratamiento ALA160

Gen	Componente celular, función molecular y/o procesos biológicos en los que está involucrado cada gen según la anotación del transcriptoma
<b>1. Neuropéptidos de la familia del glucagón</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormona peptídica</li> <li>• Actividad hormonal</li> </ul>
<b>2. Proteína del miembro 2 del dominio similar a la ubiquitina residente en el retículo endoplásmico sensible a la homocisteína</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta a proteína desdoblada</li> <li>• Espermatogénesis</li> </ul>
<b>3. 1-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa delta-4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transducción de señales</li> <li>• Proceso catabólico de lípidos</li> <li>• Proceso metabólico del fosfatidilinositol</li> </ul>
<b>4. Proteína YIPF6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Componente integral del aparato de Golgi</li> </ul>

<b>5. Proteína de anclaje relacionada con la nebulina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adherencia a fascia</li> <li>• Unión de tendón muscular</li> <li>• Enlace a actina muscular</li> </ul>
<b>6. Proteína 3 asociada a ARN polimerasa II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conecta la RNA polimerasa II a reguladores de la formación de complejos proteicos</li> </ul>
<b>7. Epóxido hidrolasa 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catabolismo de compuestos aromáticos</li> <li>• Respuesta a sustancias tóxicas</li> </ul>
<b>8. Cadena pesada de miosina, músculo esquelético</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filamento de actina y miosina</li> <li>• Unión a calmodulina</li> <li>• Actividad motora</li> </ul>
<b>9. Partículas de reconocimiento de señal subunidad SRP72</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respuesta a fármacos</li> <li>• Proteína co-translacional dependiente de SRP dirigida a membrana</li> </ul>
<b>10. Subunidad alfa-1H tipo T del canal de calcio dependiente de voltaje</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso biosintético de aldosterona y cortisol <ul style="list-style-type: none"> <li>• Importe de iones de calcio</li> </ul> </li> <li>• Respuesta celular a estímulo hormonal</li> <li>• Contracción y desarrollo muscular</li> <li>• Regulación de la contracción cardíaca</li> <li>• Regulación del potencial de membrana</li> </ul>

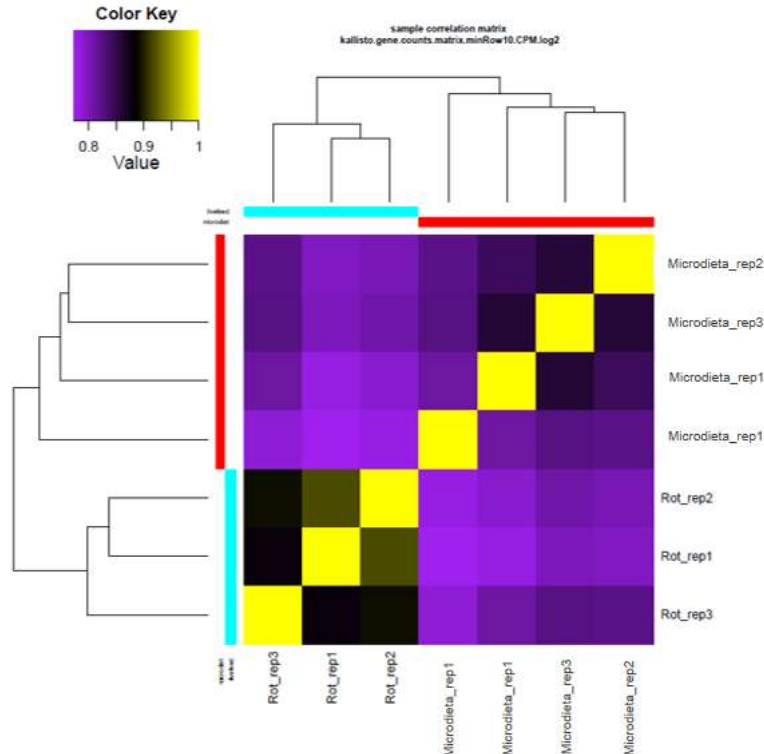
Los genes con expresión diferencial en el tratamiento con ALA160, participan también en procesos biológicos propios de la célula, como en la transcripción, transducción de señales, transporte de iones; así también en otros procesos como en el metabolismo de moléculas como lípidos, cortisol, compuestos aromáticos, etc.; también se encontraron genes que están relacionados con respuesta a estímulos hormonales, actividad de filamentos musculares y contracción muscular, respuesta a fármacos y sustancias tóxicas, sin embargo, no se encontró ningún gen o genes que participen en conjunto en alguna vía que esté relacionada al contrarresto del estrés oxidativo.

## 9.10 Efecto del alimento vivo vs microdietas en las larvas

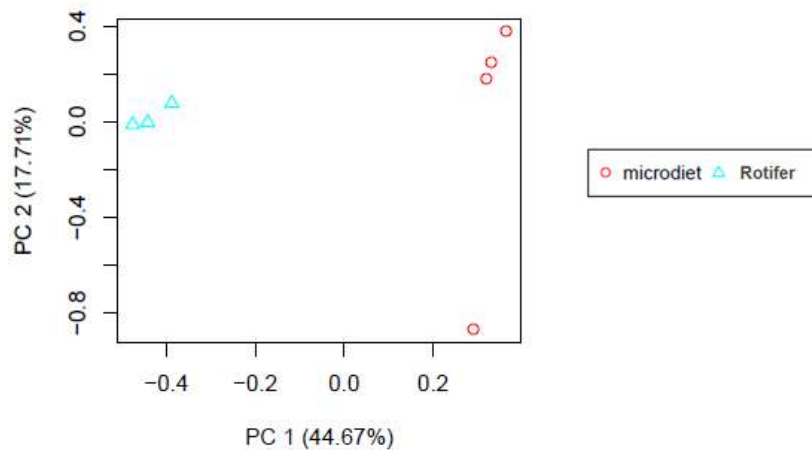
### 9.10.1 Anotación de genes con expresión diferencial (Microdieta vs Alimento vivo)

Como ya se mencionó, el tratamiento donde las larvas fueron alimentadas solamente con rotífero, presentó los mejores resultados de desempeño larvario (**Gráfica 1 y 2**), lo cual fue corroborado histológicamente. Por lo anterior, se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de dichas muestras para comparar el perfil de expresión de las larvas alimentadas con microdieta y de las larvas alimentadas con rotífero, y así conocer los cambios en la expresión génica generados por la alimentación con rotífero y utilizarlos como posibles herramientas de mejora de la microdieta que se brinda a *C. estor*.

En este caso, en el análisis de correlación de muestras y en el PCA, ambos tratamientos mostraron agrupación de muestras con sus respectivas réplicas según sus perfiles de expresión (**Fig. 13 y 14**).

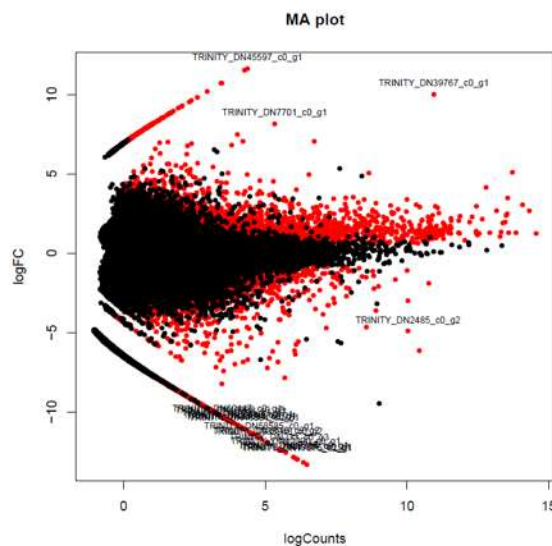


**Fig. 13.** Matriz de correlación de muestras y sus respectivas réplicas de larvas alimentadas con microdieta vs larvas alimentadas con alimento vivo



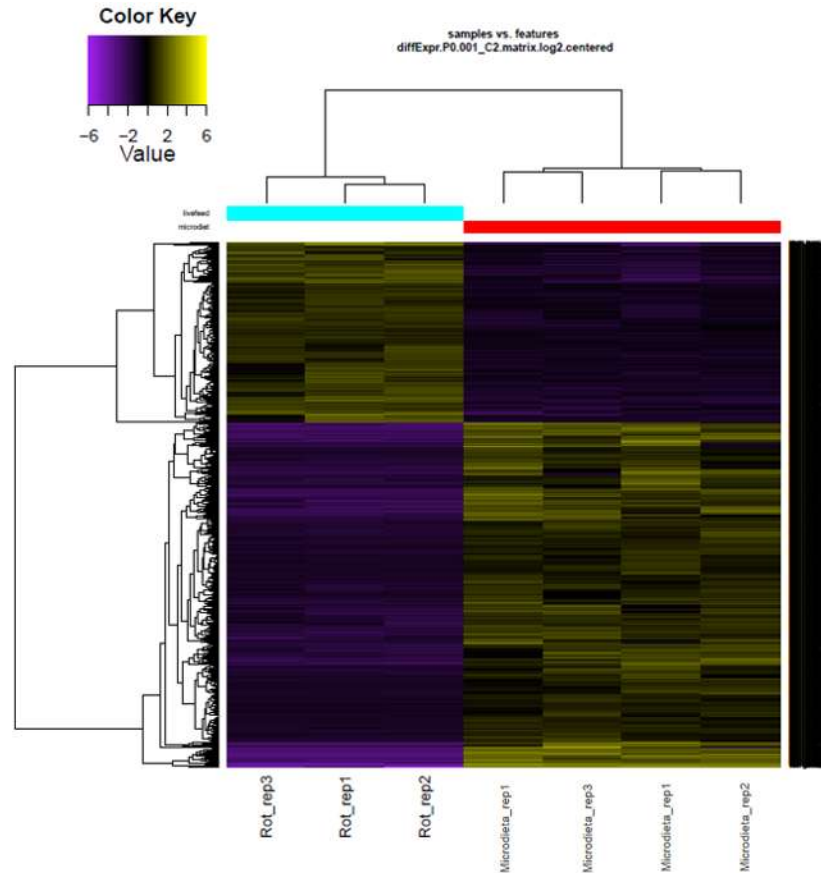
**Fig. 14.** Análisis de componentes principales de las muestras de las larvas alimentadas con microdieta y de las larvas alimentadas con alimento vivo.

En la comparación entre las muestras de las larvas alimentadas con microdieta y aquellas alimentadas con rotífero, resaltaron mayor cantidad de genes con expresión diferencial, a diferencia de los otros tratamientos contrastados (ALA0 vs ALA-20 y ALA0 vs ALA160), como puede apreciarse en los *plots* MA y *Volcano* (puntos rojos) (**Fig. 15 y 16**).



**Fig. 15. Plot MA.** Resultados del análisis de expresión diferencial entre el tratamiento control (microdieta) y larvas alimentadas con alimento vivo. Representa la cantidad de genes expresados (*logCounts*) y mayor o menor expresión de los mismos (*logFC*). Puntos coloreados en rojos son los genes con expresión diferencial (*fold-change* = 4 y *p-value* = 0.01)





**Fig. 17. Heat map.** Representación de genes expresados diferencialmente ( $fold-change = 4$  y  $p-value = 0.01$ ) para cada tratamiento. De acuerdo a la paleta de color (*Color key* – esquina superior izquierda), aquellos genes que se encuentre entre la gama de colores negro-morado son los sub-expresados; aquellos genes que se encuentren entre la gama de colores marrón-amarillo son los sobre expresados según el tratamiento, **microdieta** (línea roja superior) y **alimento vivo** (línea azul turquesa superior).

El total de genes diferencialmente expresados para el tratamiento con alimento vivo fueron 554, de los cuales se contó solamente con la anotación de 179 de ellos. Dichos genes estuvieron distribuidos en procesos importantes como el metabolismo de carbohidratos (glucólisis, gluconeogénesis) y lípidos (biosíntesis y transporte de ácidos grasos de cadena media y cadena larga); en el proceso de percepción visual (fototransducción, desarrollo de la retina y vía de señalización mediada por la rodopsina), genes que participan en el desarrollo nervioso (hipotálamo, migración celular a la cresta neural, morfogénesis axonal), angiogénesis y hematopoyesis; regulación del proceso apoptótico, ritmo circadiano, respuesta inmune (regulación de la proliferación de células T, activación del complemento, inmunidad innata) y

respuesta al estrés (proceso óxido-reducción); queratinización, pigmentación (biosíntesis de melanina), y genes de algunas enzimas digestivas proteolíticas, así como algunos genes involucrados en la morfogénesis del tracto digestivo, el desarrollo del páncreas exócrino y la morfogénesis del hígado (**Anexo 1**).

También se encontró sobre-expresado un conjunto de genes relacionados con el crecimiento y desarrollo de cartílago (desarrollo de condrocitos, condensación del cartílago), hueso (mineralización, osificación) y principalmente músculo, involucrado en la unión de los filamentos de actina, miosina y tropomiosina y su acción motora, en la regulación de la contracción muscular, ensamble y desarrollo de fibras musculares, organización del sarcómero y homeostasis celular muscular, además se encontraron 2 genes relacionado a la remodelación de la cromatina por medio de metilación, pero con regulación positiva hacia la diferenciación celular y desarrollo del tejido músculo esquelético (**Anexo 1**)

Como ya se mencionó anteriormente, el crecimiento de las larvas alimentadas con rotífero es varias veces mayor que el de las larvas alimentadas con microdieta (**Gráfica 1 y 2**); el conjunto de genes sobre-expresados en las larvas alimentadas con rotífero, involucrados con el desarrollo muscular, cartilaginoso y óseo, está correlacionado con el efecto observado histológicamente del crecimiento muscular de las larvas de éste tratamiento comparadas con las larvas alimentadas con la microdieta.

Además, los genes sobre-expresados en éste tratamiento de algunas enzimas digestivas y los involucrados en la morfogénesis de estructuras digestivas, son muy relevantes, partiendo de que las larvas alimentadas con microdietas, a diferencia de las alimentadas con rotífero, tienen un menor desempeño debido entre otros factores a un sistema digestivo inmaduro y baja capacidad enzimática (Kolkovski, 2001).

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1 Evaluación general del ensamble

Las métricas de evaluación de un ensamble de transcriptoma *de novo*, basadas en el tamaño y que valoran continuidad del mismo, generalmente incluían la mediana de la longitud de los contigs, el número total de contigs y el N50 (longitud del contig más largo) (Li *et al.*, 2014), de tal forma que todos los contigs de al menos esa longitud, componían el 50% del total de bases ensambladas, por lo que a mayor N50 resultaría en un mejor ensamble (Miller *et al.*, 2010).

Estas métricas han mostrado ser inciertas (O'Neil y Emrich, 2013), ya que por ejemplo, en un ensamble construido por la concatenación de todas sus lecturas (*reads*) en un solo contig, maximizaría dichas medidas (Li, *et al.*, 2014), además de que éstas no pueden ser utilizadas para determinar lo completo del ensamble, por lo que actualmente están disponibles otros métodos de evaluación precisos e incluso linaje específico, como es el caso de BUSCO (*Benchmarking set of Universal Single-Copy Orthologs*) (Simão *et al.*, 2015; Carruthers *et al.*, 2018)

De los 4,584 ortólogos de copia única del linaje Actinopterygii, se recuperaron más de 90% de genes completos en nuestro ensamble (4,168 genes), el 4.4% se identificaron como genes fragmentados y un 4.7% de los genes no fueron encontrados. Esto revela que nuestro ensamble fue de alta calidad y buena cobertura, a pesar de que se utilizaron especímenes completos de un único estadio y las cabezas de peces juveniles, ya que, al parecer la tendencia de recuperación de genes a través de BUSCO, tiende a ser mayor cuando se utilizan organismos completos y en múltiples etapas de desarrollo (Carruthers *et al.*, 2018).

Por ejemplo, en un trabajo publicado por Grabherr *et al.*, (2013) emplearon 3 especies de organismos, recuperando el 95% de identidad de las secuencias mapeadas a la referencia. O bien, la contraparte, en donde Theissinger *et al.*, (2016)

combinaron 4 tejidos del cangrejo de río de agua dulce (*Astacus astacus*) reportando un 64% de lo completo de su ensamble de transcriptoma *de novo*.

Una de las categorías representadas como parte de la evaluación del ensamble *de novo*, se refiere a los genes faltantes o genes que no fueron encontrados en el transcriptoma (*missing genes*). Los procesos biológicos de dichos genes estuvieron relacionados al metabolismo de hormonas reproductivas, vías de señalización de hormonas esteroideas, o con el ciclo celular meiótico, lo cual es otro indicativo de que el ensamble se realizó correctamente, ya que por la etapa fisiológica de los organismos utilizados para éste estudio (larvas), se esperaba que los *GO terms* de dichos procesos no estuvieran presentes en el transcriptoma ensamblado.

En un trabajo publicado recientemente por Carruthers *et al.*, (2018) donde se evaluó un ensamble *de novo* de 4 diferentes tipos de salmónidos en etapa juvenil, y cuyo *pipeline* transcriptómico tiene cierta similitud con el empleado en el presente estudio, obtuvieron ~33,126 a ~36,505 transcritos que codifican para proteínas, mientras que en éste trabajo se obtuvieron 49,930. Para evaluar el ensamble, utilizaron la misma herramienta (BUSCO), recuperando ~78% de genes completos, ~10% de genes fragmentados y ~12% de los *missing genes*, a diferencia del 90%, 4,4% y 4.7 respectivamente, encontrados en el presente ensamble. No basta con comparar los trabajos, trata de hipotetizar porque sucede esto. Aquí entraría lo que te pregunte de si estas diferencias se deben a la metodología de secuenciación, pipeline y/ o calidad de la extracción?

El ensamblaje del transcriptoma *de novo* de larvas de pescado blanco representa una importante contribución a los recursos genómicos de la especie y puede ser utilizado como referencia para trabajos futuros de análisis de expresión diferencial en esta especie, ya que según su evaluación cualitativa y cuantitativa, resultó de alta calidad; o bien, junto a él, emplear diferentes etapas de desarrollo para elaborar un transcriptoma aún más robusto. También, los datos pueden tener

distintas aplicaciones más allá de las alcanzadas en el presente trabajo, ya que se espera que el campo de la transcriptómica continúe evolucionando a la par con el mejoramiento de las tecnologías de secuenciación (Lowe *et al.*, 2017).

## 10.2 Efecto del ácido alfa-lipoico en microdietas para larvas

En peces, la etapa larval es donde se presenta la mayor mortalidad concomitante con pobre crecimiento, por lo que investigaciones que ayuden a eliminar o reducir dicha mortalidad e incrementar el crecimiento, serán benéficas para la industria acuícola (Langdon *et al.*, 2008). En éste sentido, con la finalidad de incrementar el desempeño de las larvas, se ha hecho uso de diversos aditivos incorporados de diversas formas a los organismos.

El ácido alfa-lipoico (ALA) es un aditivo que ha generado gran interés entre los investigadores debido a su capacidad antioxidante. Se ha evaluado su efecto en diversos modelos experimentales. Específicamente en organismos acuáticos, las investigaciones se han realizado en algunas especies de vertebrados (carpa, pámpano plateado, coridoras, pez cebra), invertebrados (abulón), crustáceos (cangrejo chino), con concentraciones variables ( $\mu\text{M}$ , 70-3200  $\text{mg kg}^{-1}$ ), vías de aplicación o administración diversas y en distintos estadíos (embriones, juveniles y adultos) (Monserrat *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2012; Kütter *et al.*, 2012; Enamorado *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017). Lo anterior ha generado que los resultados obtenidos sean de igual forma variados, mostrando efectos favorables en diversas funciones biológicas como: crecimiento, supervivencia, respuesta inmune, resistencia a daños por contaminantes y principalmente disminuye los niveles de estrés oxidativo de los peces (Kütter *et al.*, 2014).

Es importante considerar que un exceso en la adición de ALA ha demostrado tener un impacto negativo, tanto en el crecimiento como en la capacidad antioxidante de algunos organismos, por ello es importante determinar la dosis apropiada para especies de importancia económica (Sigler *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017), e incluso específicamente para cada órgano, y con ello maximizar el

beneficio del efecto antioxidante y minimizar los efectos co-laterales pro-oxidantes (Kutter *et al.*, 2014). En el caso de las larvas de *C. estor*, ALA no había sido probado en ningún estadio, por lo tanto, se desconocía las concentraciones adecuada en la que pudiera observarse un efecto positivo en el desmepeño larvario, de tal forma que, partiendo de la literatura publicada, se utilizaron concentraciones relativamente bajas, sin embargo, no se encuentran en el orden micromolar, como las empleadas en embriones de pez cebra (Francis *et al.*, 2012). En el presente trabajo, la concentración de 20 mg kg<sup>-1</sup> fue la que presentó los mejores resultados, mostrando la mayor supervivencia y los mejores parámetros nutricionales (PER, FCR).

A pesar de los diferentes estudios realizados hasta la fecha en organismos acuáticos, dentro de los estadios de los organismos estudiados no figuran las larvas, por lo que, hasta donde sabemos, éste sería el primer trabajo realizado en dicha etapa en donde se empleó el ácido alfa-lipoico, tanto para evaluar el desempeño de los organismos como para conocer su efecto a nivel transcripcional.

Como ya se mencionó, los resultados obtenidos en las investigaciones con ALA han sido variables, sin coincidir en gran medida con lo alcanzado en el presente estudio. Por ejemplo, en el caso de las larvas de *C. estor*, no se observó un efecto del ALA en el crecimiento, a diferencia de otros estudios realizados en otras especies como como el abulón (Zhang *et al.*, 2010), el pámpano plateado (Kütter *et al.*, 2012) y el cangrejo chino (Xu *et al.*, 2017), sin embargo, en estos trabajos no se reportó que la adición de ALA ejerciera un efecto positivo en la supervivencia de los organismos.

Para *C. estor*, ALA presentó un efecto positivo en la supervivencia, coincidiendo con un estudio en tilapia la cual fue alimentada con una dieta adicionada con ALA, donde las tasas de supervivencia fueron más altas aún cuando los peces fueron infectados con *Aeromonas hydrophila* (Lu *et al.*, 2019).

A diferencia de la mayoría de las investigaciones con ALA, en donde valoran su efecto antioxidante a través de la medición de la actividad de algunas enzimas antioxidantes (SOD, GPX, GSH) (Montserrat *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2012; Kutter *et al.*, 2012), en éste trabajo, fueron analizados los perfiles transcripcionales de las larvas alimentadas con la microdieta adicionada con ALA. En este caso, a pesar de los resultados positivos obtenidos en cuanto a supervivencia y mejora de ciertos parámetros nutricionales en las larvas de *C. estor*, no se encontró ningún gen o genes que estuvieran involucrados directamente o relacionados a ciertas vías moleculares respecto al contrarresto del estrés oxidativo, por lo tanto se concluye que el ALA en las dos concentraciones evaluadas (20 y 160 mg kg<sup>-1</sup>) no tiene un efecto a nivel transcripcional en cuanto al proceso de estrés oxidativo en larvas de *C. estor*

El ALA, al ser un compuesto bioactivo y aplicarse en determinadas concentraciones en la alimentación de las larvas, podría generar cambios en la respuesta fisiológica del organismo, los cuales pudieran no ser observados a nivel transcripcional.

Por ello, se propone un enfoque integrativo para analizar otras respuestas que pudiera haber generado la inclusión del ALA, por ejemplo, la medición de actividad de enzimas antioxidantes (Panserat y Kaushik, 2010), la concentración de ROS, la oxidación de proteínas (Montserrat *et al.*, 2008) o la peroxidación lipídica en determinados órganos (Xu *et al.*, 2017), así como también una posible modificación en los niveles de significancia estadística (0.01) y *fold-change* (4) manejados en éste estudio.

Algunos autores como Rise *et al.*, (2015) relacionan una sobre o sub-expresión de genes redox con un aumento o disminución en la actividad de las mismas enzimas antioxidantes.

En éste sentido, Panserat y Kaushik (2010) mencionan que existe una cinética entre transcripción (regulación de genes) y la traducción (síntesis de proteínas), lo que posibilita cambios post-transcripcionales indicados por la ausencia de RNAm en la traducción y/o maduración de proteínas. Por lo tanto, es muy importante no confiar únicamente en estudios moleculares utilizando solamente niveles de RNAm sin análisis complementarios de expresión fenotípica.

Los organismos aeróbicos están sometidos a gran cantidad de factores que pueden generar estrés oxidativo, promoviendo un aumento en las ROS tanto por el metabolismo interno, que desencadena un ambiente celular oxidado, como numerosos factores externos, tales como variaciones en salinidad, concentración de oxígeno disuelto, temperatura, hipoxia, calidad del agua, parásitos, enfermedades infecciosas, químicos, toxicidad con metales pesados, radiación UV (Francis *et al.*, 2012; Oliva-Teles, 2012). Los genes antioxidantes presentan elementos de respuesta antioxidante (AREs), los cuales son motivos reconocidos por factores de transcripción como el Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2- related factor 2*), que se une a la región regulatoria de los genes blanco para activar su transcripción (Aleksunes y Manautou, 2007) y cuya migración nuclear es un proceso clave para la activación de los genes antioxidantes (Su *et al.*, 2004). Bajo condiciones celulares reducidas, es decir, sin que la célula presente estrés oxidativo, el Nrf2 se encuentra unido a una proteína llamada Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), la cual libera al Nrf2 al presentarse condiciones de oxidación (presencia de estrés oxidativo) (Su *et al.*, 2004; Holland y Fishbein, 2010).

El complejo Keap1-Nrf2 está altamente conservado entre vertebrados, incluyendo el pez cebra (*D. rerio*) y su función es indispensable para la regulación de la respuesta antioxidante (Kobayashi *et al.*, 2002). Dicho lo anterior, habría que valorarse el hecho de que en el presente estudio, aparentemente, no se utilizó una fuente o factor que generara estrés oxidativo en las larvas, lo que posiblemente llevó a que no se expresaran altamente los genes antioxidantes al no liberarse el factor de transcripción Nrf2. Sin embargo, un estudio realizado por Su *et al.*, (2004) en

ratas de edad avanzada, demostraron que la administración sola de ALA incrementa los niveles de Nrf2 e induce su unión a los AREs de los genes antioxidantes blanco, por lo que, posiblemente las concentraciones de ALA empleadas en este trabajo, fueron bajas y por ello no se vio reflejado un efecto antioxidante en los peces que pudiera observarse a nivel transcripcional. Sin embargo, para comprobarlo habría que desarrollarse nuevos estudios que incluyeran, por ejemplo, la medición de la concentración de dicho factor de transcripción.

Todos los vertebrados, incluyendo los peces, poseen antioxidantes endógenos que ayudan a mantener el balance entre los agentes oxidantes y antioxidantes (Francis *et al.*, 2012). Uno de los efectos perjudiciales de las ROS, cuando no existe dicho balance, es el daño al DNA (McCord, 2000). Si bien, dentro de los genes sobre-expresados en los tratamientos ALA-20 y ALA-160, no se encontró ninguno relacionado al contrarresto del estrés oxidativo, se observó la sobreexpresión del gen Complejo FACT sub-unidad SPT16 en el tratamiento ALA-20 que participa en el proceso de reparación y replicación de DNA, que pudiera estar relacionado a la alta supervivencia en este tratamiento, sin embargo, se requeriría de otro experimento independiente en donde se evaluara el daño oxidativo al DNA, además de la concentración de ROS (Montserrat *et al.*, 2008) y comprobar el efecto de ALA en las larvas sobre estos parámetros de valoración de estrés oxidativo.

En un trabajo desarrollado por Monserrat *et al.*, (2008) en peces coridora (*C. paleatus*), mencionan que cada órgano de los peces tiene diferente capacidad para lidiar con el estrés oxidativo y lo comprueban al analizar el efecto antioxidante modulador del ALA y la respuesta al estrés oxidativo mediante medición de enzimas antioxidantes y proteínas oxidadas en el cerebro, branquias, músculo e hígado de dichos peces. Obtuvieron que el ALA no aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes GCL y GSH en músculo, lo que relacionaron a la condición reducida de éste órgano, hecho que no permite la migración del Nrf2 del citoplasma al núcleo y por lo tanto, no se da la transcripción de genes antioxidantes; a diferencia del

cerebro y el hígado en donde a los peces del grupo donde se adicionó el ALA, aumenta la actividad de estas dos enzimas, lo que sugiere una reducción del estrés oxidativo en estos tejidos (Monserrat *et al.*, 2008). Es bien conocido que el hígado es el principal órgano de acción del ALA (Bustamante *et al.*, 1998). En el presente trabajo se emplearon pools de 4 larvas completas para realizar el análisis transcriptómico, por lo que no se descarta que el efecto antioxidante del ALA en determinados órganos, se haya visto diluido.

En un trabajo de expresión génica en pollos de engorde alimentados con 40 mg kg<sup>-1</sup> de ALA vs otros que no fueron alimentados con ALA, bajo la técnica de qPCR analizaron específicamente 7 genes de enzimas hepáticas relacionadas a la acción celular de ALA, y mencionan que la relativamente baja dosis de ALA empleada en el estudio, disminuyó los niveles de expresión de dichos genes en el hígado, a excepción de GPX3 (glutación peroxidasa 3) que no mostró diferencias. Por otro lado, utilizando la técnica de RNA-seq, se identificaron únicamente 8 genes sobre-expresados diferencialmente pero únicamente en el grupo control, es decir, en el tratamiento en donde los pollos no fueron alimentados con ALA (Mora *et al.*, 2017). Éste es un ejemplo de un trabajo en donde haciendo uso de dos técnicas de cuantificación génica (qPCR y RNA-seq) no se obtuvieron los resultados esperados. Igualmente, en el presente trabajo por la técnica RNA-seq no se obtuvieron los resultados esperados, sin embargo, habría que evaluarse si mediante otra técnica o diseño experimental y de muestreo se observa algún efecto del ALA.

A la fecha, existen múltiples trabajos del uso de ALA en organismos diversos (humanos, ratas, peces, cultivos celulares, aves) (Su *et al.*, 2004; May *et al.*, 2006; Maczurek *et al.*, 2008; Yasin *et al.*, 2012; Kutter *et al.*, 2014), sin embargo, los trabajos en donde se emplea la técnica de RNA-seq para evaluar el efecto de dicho antioxidante, son contados. En organismos acuáticos, no se encontró ninguno en donde se utilizara tal técnica, lo que podría ser de gran ayuda para verificar y resaltar el potencial real de éste compuesto (ALA) en dosis adecuadas e incluso descubrir

vías que podrían ser diferentes a aquellas relacionadas a la respuesta antioxidante (Kutter *et al.*, 2014) y contribuirían a mejorar el desempeño de los peces.

A pesar del alto valor que ha adquirido el ALA por sus efectos benéficos sobre el desempeño de diversos organismos acuáticos y terrestres, aún se requieren de muchos estudios en peces para lograr un entendimiento real sobre éste antioxidante y sus mecanismos de acción (Xu *et al.*, 2017)

### 10.3 Efecto del alimento vivo vs microdietas sobre las larvas

La evaluación histológica mostró diferencias evidentes entre ambos tratamientos (rotífero vs microdieta), con mayor crecimiento muscular en las larvas alimentadas con rotífero, lo cual representa claramente la influencia del rotífero sobre algunos de los genes asociados a mayor crecimiento. Esto coincide con los resultados obtenidos por Katan *et al.*, (2016), quienes reportaron mayor número de células en el músculo esquelético, con aumento de tamaño y número de fibras musculares en juveniles de bacalao (35dph) que fueron alimentadas en su etapa larvaria con rotífero y zooplancton

De igual forma, existen más trabajos que han evaluado la influencia de la alimentación inicial en el desarrollo y crecimiento muscular, detectando un mayor crecimiento muscular, es decir, un aumento en el tamaño y número de fibras musculares por hiperplasia y/o hipertrofia (Weatherley *et al.*, 1988) en especies de peces como juveniles de lucioperca (*Sander lucioperca*) (Ostaszewska *et al.*, 2008), los cuales en etapa larvaria fueron alimentados con nauplios de artemia, y exhibieron mayor tasa de crecimiento (mayor área del corte transversal y área promedio de las fibras musculares) que las alimentadas con alimento formulado.

El presente trabajo y los mencionados anteriormente reflejan el efecto de la alimentación con rotífero en el incremento del desarrollo muscular, recordando que las fibras musculares son plásticas en su respuesta al crecimiento a factores externos, como la alimentación (Johnston, 1999). Dicha plasticidad suele ser

irreversible en etapas embrionaria y larval, debido a la rápida ontogenia (Johnston, 2006). Un mayor crecimiento muscular en larvas, tendrá efectos fuertes especialmente en el desempeño locomotor de la misma, lo cual impactará en su crecimiento y supervivencia (Vo *et al.*, 2016). Esto es de suma importancia al considerar que, en la producción acuícola, se espera mayor peso y talla corporal tanto en la etapa juvenil como en la adulta.

De los alimentos utilizados en este estudio para alimentar a las larvas, el rotífero fue el que presentó un mejor desempeño, lo cual ya ha sido mencionado en varias ocasiones por diversos autores, quienes señalan que el alimento vivo (rotífero, nauplios de *Artemia* y copépodos) es el mejor alimento para la etapa larvaria, reflejando mayor supervivencia y crecimiento en comparación con las larvas alimentadas con microdietas o alimento formulado (Cahu y Zambonino, 1997; Yúfera y Darias, 2007).

El bajo desempeño de las larvas alimentadas con microdietas se ha atribuido a un sistema digestivo inmaduro y baja capacidad enzimática, entre otros aspectos (Kolkovski, 2001; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Panserat y Kaushik, 2010). En el presente estudio, algunos de los genes sobre-expresados diferencialmente en el tratamiento con rotífero, son de enzimas digestivas o precursores de éstas, como *Elastase-1*, *Chymotrypsin C*, *Chymotrypsin-like elastase family member 2A*, *Chymotrypsinogen B*, todas éstas con capacidad de proteólisis, y la *Phospholipase A2*, con capacidad lipolítica, además de otro gen relacionado a la morfogénesis del tracto digestivo, hígado y desarrollo del páncreas exocrino (*Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46*).

Lo anterior se complementa con lo expuesto por varios autores, quienes sugieren que las presas vivas consumidas por las larvas de peces, ayudan en el proceso de digestión, facilitando sus enzimas digestivas (40-80% de la actividad enzimática), promoviendo la autólisis (el alimento se digiere a sí mismo) o activando los zimógenos que activan las enzimas digestivas endógenas de las

larvas, además de contener neuropéptidos y factores de crecimiento que mejoran la absorción y asimilación proteica hasta que el sistema digestivo de las larvas esté completamente diferenciado y desarrollado (Dabrowski, 1984; Lauff y Hofer, 1984; Kolkovski *et al.*, 1993). Más aún, Hara *et al.*, (1979) encontraron que los rotíferos contienen proteinasa ácida, proteinasa alcalina y proteasas alcalinas. Por otro lado, algunos autores (Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu and Zambonino-Infante, 1997), argumentan que la contribución del alimento vivo directamente a enzimas digestivas puede ser insignificante, por lo que concluyen que dicha contribución puede ser de forma indirecta. Por ejemplo, que fracciones lipídicas o protéicas propias del alimento vivo estén involucradas como precursores o activadores en los procesos de absorción y asimilación digestiva (Kolkovski *et al.*, 1997), o bien, que el bajo desempeño larvario se deba a una dieta artificial inadecuada que no cubra todos sus requerimientos nutricionales ni las proporciones adecuadas para que su sistema digestivo pueda digerirlo y asimilarlo (Koven *et al.*, 1998).

En este sentido, otro de los argumentos propuestos para explicar el mejor desempeño larvario bajo una alimentación con rotífero, es la composición proteica del mismo. El rotífero cuenta con alto porcentaje de proteína soluble y bajo porcentaje de materia seca (10%), a diferencia de las microdietas (60-90%), lo cual facilita su digestión en el intestino de las larvas (Yufera *et al.*, 1998). Según la literatura, el contenido de proteína del rotífero es altamente variable, va desde 28 a 63% (peso seco), de la cual más del 50.6% es proteína soluble (Lubzens y Zmora, 2003; Srivastava *et al.*, 2006). Según Carvalho *et al.* (2004), la fracción de proteína soluble parece estar más disponible para las proteasas intestinales y al mismo tiempo puede ser introducida a la célula por pinocitosis (captación de macromoléculas y digestión intracelular en el intestino posterior). Dicho mecanismo fue propuesto como el principal método de absorción de proteínas en larvas en ausencia de un estómago funcional (Watanabe, 1984; Govoni *et al.*, 1986), como es el caso de los miembros de la familia Atherinopsidae (Horn *et al.*, 2006). Por ello, la elaboración de la microdieta utilizada en el presente estudio fue formulada con una proporción de 25% de proteína fibrosa y 75% proteína soluble (Martínez-

Ángeles, 2016; Monroy de la Peña, 2018), con la finalidad de que la digestión de la microdieta por parte de las larvas fuera más efectiva y se lograra el desempeño deseado, sin embargo, debido a los resultados observados se sugiere el uso de aditivos a las microdietas, algunos ejemplos serían: enzimas digestivas, como se ha trabajado en otras especies de peces, tal es el caso de juveniles de carpa común (Dabrowski y Glogowski, 1977) y la dorada (Kolkovski *et al.*, 1993); así como la posible adición de probióticos que favorezcan la microbiota de las larvas, lo que podría resultar en una mejora en la utilización de la microdieta y sus nutrientes y mejorar el desempeño larvario debido a su impacto en la maduración de sistema digestivo (Lazo, 2000).

De acuerdo con Pedersen *et al.* (1987), la capacidad digestiva está directamente relacionada con la cantidad de enzimas digestivas disponibles necesarias para el rompimiento extracelular de un alimento. Además, la ontogenia de las enzimas digestivas está principalmente “pre-programada” y puede ser sutilmente modificada por la composición de la dieta (Henning *et al.* 1994). En un estudio realizado por Toledo-Cuevas *et al.* (2011) en donde se midió la actividad de diferentes enzimas digestivas de *C. estor*, muestra que las larvas de esta especie tienen la capacidad de digerir lípidos (lipasa) y proteínas (tripsina) eficientemente, mostrando ésta última una mayor actividad a los 20 dpe. Por otro lado, la enzima Leucin-Alanin peptidasa (enzima citosólica) mostró su mayor actividad durante la etapa larval, lo cual es indicativo de un sistema digestivo no completamente desarrollado, lo que explica el pobre desarrollo encontrado en ésta especie hasta la fecha en etapas tempranas a pesar de ser alimentada con dietas de alta calidad.

Dicho lo anterior, se sugiere un tiempo de destete de las larvas mayor a los 10 dpe, acompañado de una co-alimentación de alimento vivo y microdieta por tiempo determinado (Hamre *et al.*, 2013), o bien, la elaboración de una microdieta apta para un sistema digestivo inmaduro, como es el caso de las larvas de *C. estor* en etapa de desarrollo temprana.

Diversos autores argumentan que en algunas especies, la aceptación de dietas inertes es más baja después de un periodo de alimentación prolongado exclusivamente con presas vivas (Person-LeRuyet, 1989; Fernández-Díaz *et al.*, 1994). La co-alimentación puede contribuir a mejorar el desempeño y cubrir deficiencias nutricionales de las larvas debidas a un nivel subóptimo de nutrientes en el alimento vivo. Dicha co-alimentación tendrá ventajas desde ambos puntos de vista, el alimento vivo (comportamiento de alimentación por estimulación) y las microdietas (composición nutricional óptima de alta calidad) (Kolkovski, 2001), evidentemente sin dejar de lado el balance económico al alimentar a las larvas con ambos alimentos.

Al hablar sobre la estimulación de las larvas por medio del alimento vivo, no se puede descartar la posibilidad de que el mayor crecimiento logrado por las larvas alimentadas con rotífero haya sido en parte, a un incremento en la alimentación debido a los movimientos dinámicos específicos del rotífero dentro de la columna de agua, al tiempo de residencia de los mismos en la columna de agua y una mayor capacidad de detección de estos por parte de las larvas (Katan *et al.*, 2016).

En este sentido, en este trabajo, se sobre-expresaron en el tratamiento de alimentación con rotífero, diversos genes involucrados en el proceso de percepción visual (fototransducción, desarrollo de la retina, vía de señalización mediada por la rodopsina, desarrollo celular de los fotorreceptores del ojo), lo cual nos indica que posiblemente, las larvas de éste tratamiento tuvieron mejor capacidad visual, lo que benefició la captación del alimento. Blaxter (1985) señala que las larvas de peces marinos dependen principalmente de la visión para localizar su alimento, como resultado de la retina de conos puros que se encuentran en la mayoría de las larvas marinas, teniendo en cuenta que entre especies de peces, la tasa de desarrollo y la adquisición de estructuras retinales es altamente variable (Evans y Browman, 2004).

La transcripción y su regulación es un componente clave de la respuesta celular al ambiente, en éste caso, al tipo de alimentación (alimento vivo vs alimento

formulado) (García de la serrana *et al.*, 2012). Del total de genes diferencialmente expresados en el tratamiento de alimentación con rotífero fueron 554, y se contó la anotación de 179 de ellos. Dichos genes estuvieron distribuidos en procesos importantes como el metabolismo de carbohidratos (glucólisis, gluconeogénesis) y lípidos (biosíntesis y transporte de ácidos grasos de cadena media y cadena larga); genes que participan en el desarrollo nervioso (hipotálamo, migración celular a la cresta neural, morfogénesis axonal), angiogénesis y hematopoyesis; regulación del proceso apoptótico, ritmo circadiano, respuesta inmune (regulación de la proliferación de células T, activación del complemento, inmunidad innata) y respuesta al estrés (proceso óxido-reducción); queratinización, pigmentación (biosíntesis de melanina). También, como ya se había mencionado anteriormente, algunos de los genes sobre-expresados en éste tratamiento son de algunas enzimas digestivas y están involucrados en el proceso de percepción visual. Como se puede observar, la alimentación con rotífero ejerce un efecto relevante sobre la expresión de varios genes que participan en procesos importantes para el desarrollo de las larvas.

Es importante tener en cuenta que los estudios nutrigenómicos basados en transcryptómica, son comúnmente difíciles de comparar, debido al origen o naturaleza propia de un mismo ingrediente o insumo, las condiciones experimentales, la formulación alimenticia, la especie en estudio, la edad y carga genética, el diseño experimental, etc. (Ulloa *et al.*, 2014). Éste trabajo, es el primer estudio en donde se comparan los perfiles transcripcionales de larvas de pescado blanco alimentadas con alimento vivo (rotífero) y un alimento formulado (microdieta).

Otros autores han evaluado perfiles transcripcionales en larvas de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) alimentadas con alimentos vivos (zooplancton, en su mayoría copépodos, rotíferos y artemia), utilizando diferentes técnicas como micro-arreglos y RNAseq observando que, incluso entre peces de la misma especie y edades relativamente iguales, algunos de los datos obtenidos son muy variables por el simple hecho de que el producto con que enriquecieron al alimento vivo, fue

diferente y con concentraciones variables de nutrientes (Rise *et al.*, 2015; Penglase *et al.*, 2015; Karlsen *et al.*, 2015). Estos estudios en larvas de bacalao encontraron que el sistema redox y la tasa de crecimiento, fueron fuertemente influenciados por la alimentación con copépodos, sin embargo, las diferencias en la composición del rotífero, el zooplancton y su respectivo enriquecimiento, conlleva cambios a nivel transcripcional.

Al igual que en los resultados obtenidos por Rise *et al.*, (2015) y Penglase *et al.*, (2015), en donde también utilizaron alimento vivo para la alimentación en etapa larvaria, en el tratamiento en donde se alimentaron larvas con rotífero, se destacaron genes involucrados en procesos propios de la célula, como adhesión celular, organización del citoesqueleto de actina, regulación del ciclo celular, diferenciación celular, regulación del potencial de membrana, entre otros.

También se encontraron genes sobre-expresados en respuesta al estrés, involucrados en el proceso redox (*Heat shock protein beta-11*, *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10*, *Glutathione peroxidase 7*, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1B*). A pesar de que en éste trabajo se encontraron genes que coincidieron en algunos de los procesos mencionados, también resaltaron gran cantidad de genes involucrados en otros procesos importantes, como ya se mencionó en párrafos anteriores.

Es por ello que es importante considerar la posible influencia de la composición propia del rotífero, según su medio de cultivo y alimentación, donde algún nutriente o compuesto específico que lo conforma podría afectar o beneficiar la sobre-expresión de algunos genes en particular. Los niveles de biodisponibilidad de un solo nutriente pueden producir una regulación génica diferencial de toda una vía molecular (Penglase *et al.*, 2015).

En la presente investigación, en el tratamiento de alimentación con rotífero, resultó sobre-expresado un conjunto de genes relacionados con el desarrollo y crecimiento de cartílago, hueso y principalmente músculo:

- **Cartílago:**

- Desarrollo de condrocitos (*Leukocyte cell-derived chemotaxin 1, Collagen alpha-1(I) chain*)
- Condensación del cartílago (*Collagen alpha-2(XI) chain*)

- **Hueso**

- Mineralización (*Tetranectin, Osteocalcin, Osteocalcin 2, Unique cartilage matrix-associated protein*)
- Osificación (*Extracellular calcium-sensing receptor, Four and a half LIM domains protein 2, Ryanodine receptor 1, PDZ and LIM domain protein 7, Unique cartilage matrix-associated protein*)
- Remodelación (*Secreted phosphoprotein 24*)

- **Músculo**

- En la unión de los filamentos de actina, miosina y tropomiosina y su acción motora (*Myosin heavy chain, fast skeletal muscle, Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1, Myosin-binding protein C, fast-type*)
- En la regulación de la contracción muscular (*Troponin T, Troponin I, fast skeletal muscle, Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein, Triadin, Sodium channel subunit beta-3, Myosin light chain 1, Troponin C, skeletal muscle*)
- Ensamble y desarrollo de fibras musculares (*Tropomodulin-4, Myosin-6, Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform, Myosin light chain 3, Myosin regulatory light chain 2, Collagen alpha-3(VI) chain, Myozenin-1*)
- Organización del sarcómero (*Calsequestrin-1, M-protein, striated muscle, Myozenin-2*)

- Homeostasis celular muscular (*ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type, Tropomyosin alpha-1 chain*)

Además se encontraron 2 genes (*Protein-lysine methyltransferase METTL21C, Histone-lysine N-methyltransferase SMYD1*) relacionados a la remodelación de la cromatina por medio de metilación, pero con regulación positiva hacia la diferenciación celular y desarrollo del tejido músculo esquelético.

En el área de la nutrición de larvas, los estudios realizados donde se utilizan dietas formuladas y alimento vivo, permiten mostrar implicaciones de nutrientes específicos seleccionados (nutrigenómica) y el efecto de la alimentación natural, en el desarrollo del sistema digestivo, músculo o hueso (Panserat y Kaushik, 2010).

En un trabajo realizado por Katan *et al.*, (2016), trabajaron con larvas de bacalao de 30 dpe. Evaluaron la suplementación dietaria con alimento vivo (rotífero y artemia enriquecidos con Ori-Green, rotífero + proteína hidrolizada y rotífero suplementado con 5 y 10% de zooplancton “salvaje” (>90% copépodos)) y su relación con la expresión de genes del crecimiento y celularidad muscular (*Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1 e IGF-2); *Growth Hormone* (GH); *GH Receptor-1* (GHR-1 y GHR-2); y miostatina (MSTN)) por medio de qPCR.

Dichos autores reportaron un mejor crecimiento en las larvas alimentadas con rotífero + zooplancton, por lo menos hasta los 60 dpe. Dicha mejora no estuvo relacionada con diferencias en los niveles de transcritos de los genes relacionados al crecimiento, ya que no hubo diferencias entre los tres grupos tratados, pero sí estuvo relacionado con un incremento en el número y tamaño de las fibras musculares esqueléticas.

En el presente trabajo con las larvas de *C. estor*, de igual manera, en los transcritos encontrados, no figura ninguno de los genes que se buscaron por Katan *et al.*, (2016), siendo dichos genes (IGF, GH y miostatina) reguladores del

crecimiento a través de efectos directos e indirectos de éstas hormonas (Biga *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014) y subsecuentemente el complejo proceso de miogénesis (Fuentes *et al.*, 2013). Una de las causas por la cual no se encontraron transcritos de éstos genes del crecimiento podría ser por su baja concentración a nivel sanguíneo, por lo que resulta complicada su identificación.

En un estudio realizado por Leitão *et al.*, (2011), evaluaron la expresión diferencial de dos genes de factores de regulación miogénica (MFRs), MyoD (factor de proliferación de mioblastos) y miogenina (factor de diferenciación de mioblastos) (Johnston, 2006) en el músculo esquelético de larvas de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) de 35 dpe bajo diferentes esquemas de alimentación (alimento vivo vs alimentos formulados).

Estos factores de transcripción comparten dominios altamente conservados *basic-helix-loop-helix* (bHLH) y reconocen a través de éste dominio básico una secuencia consenso de ADN conocida como E-box, que se encuentra en las regiones promotoras de muchos genes específicos del músculo esquelético, lo que induce su expresión (Johnston, 2006).

Por lo anterior, es posible que la alimentación con rotífero pudiera estar regulando la expresión de algunos MRFs, que contribuyen a la sobre-expresión de genes relacionados al mayor crecimiento de las larvas de pescado blanco alimentadas bajo régimen de alimento vivo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los genes contiguos a secuencias E-box, son inhibidos por la luz y en éste trabajo, las larvas se mantuvieron en un fotoperiodo de luz continua de 24:0.

La proliferación y diferenciación de mioblastos (células progenitoras miogénicas), que es uno de los pasos que involucra la miogénesis, es un proceso altamente plástico, que puede modificarse según señales internas o externas, por factores bióticos (alimento vivo) y abióticos (actividad de nado, temperatura, fotoperiodo, hipoxia) (Johnston, 2006).

Con la comparación realizada anteriormente, se puede destacar el poder de las actuales técnicas de secuenciación, que pueden ofrecer un panorama más amplio e integral sobre la expresión génica (transcriptómica), como en éste caso, en donde se obtuvieron un gran número de transcritos relacionados al crecimiento y desarrollo muscular, lo cual en un futuro, con ayuda de otro tipo de técnicas o ciencias ómicas se pueden obtener resultados más robustos. La aplicación de tecnologías genómicas promete revolucionar el entendimiento de las bases moleculares y genéticas del crecimiento y plasticidad muscular en peces de cultivo, incrementando de esta forma la eficiencia y sustentabilidad de la producción acuícola (García de la serrana *et al.*, 2012).

## 11. CONCLUSIONES

Con todos los resultados podemos concluir que el ALA, en las concentraciones empleadas, bajo las condiciones experimentales utilizadas, con un *fold-change* de 4 y un *p-value* de 0.01, no presentó efecto en la disminución del estrés oxidativo a nivel transcripcional en las larvas de *C. estor*, no obstante, no se descarta que a concentraciones más elevadas de este antioxidante y/o en tejidos específicos pueda apreciarse un efecto en el transcriptoma de las larvas.

Se destaca la importancia de la secuenciación como tecnología genómica y su aplicación en la larvicultura de peces, sin embargo, se requieren más estudios para obtener un panorama integral de la respuesta fisiológica de las larvas de pescado blanco ante diferentes regímenes alimenticios. Es importante mencionar que con la elaboración del transcriptoma *de novo* y el análisis de expresión génica diferencial, se logró obtener una aproximación del efecto del alimento vivo y una microdieta sin ALA, sobre el transcriptoma de las larvas, lo que se espera coadyuve a formulaciones futuras en la larvicultura de ésta especie.

El efecto del rotífero como alimentación en larvas de pescado blanco, ejerce un efecto positivo en la expresión de genes relacionados al crecimiento de cartílago, hueso y músculo, además de genes de enzimas digestivas y desarrollo del sistema digestivo. Esto podría explicar el mayor crecimiento de las larvas alimentadas con rotífero, a diferencia de las alimentadas con la microdieta, sin embargo, hay que recordar que la calidad y composición nutricional del alimento juega un papel clave en desempeño del pez, así como la modificación de su transcriptoma.

Por ello, se sugiere realizar estudios posteriores para determinar el mecanismo preciso por medio del cual el rotífero está ejerciendo dicha regulación positiva sobre éste importante conjunto de genes. O bien, elaborar una microdieta específica que estimule la expresión de dichos genes.

El transcriptoma generado para *C. estor* servirá como herramienta de referencia para trabajos futuros de investigación en expresión génica, epigenómica y estudios comparativos en ésta especie y otros atherinópsidos.

## **12. RECOMENDACIONES**

La elaboración del transcriptoma *de novo*, promueve investigaciones futuras en la búsqueda de marcadores moleculares de crecimiento en larvas de *C. estor*, ya que además de que las larvas alimentadas con rotíferos lograron un crecimiento significativo mayor que las microdietas, resultado que se consiguió apreciar mejor por medio de la histología, también se obtuvieron varios transcritos expresados de forma importante en éste tratamiento, por lo que posiblemente pudieran seleccionarse y evaluarse aquellos genes con los niveles de expresión más altos.

Dentro de la información generada en éste trabajo se incluye un anexo con los genes duplicados verdaderos que se obtuvieron de la evaluación general del ensamble. Estos genes pueden ser útiles para estudios futuros de función adaptativa. Es importante mencionar que la respuesta dada de determinadas especies ante una modificación dietaria dependerá de su composición genética, así como de su capacidad adaptativa basada en su estado evolutivo. En peces, esto toma relevancia, debido a la duplicación del genoma completo que existe en teleósteos y los recientes eventos de tetraploidización en salmónidos, que conducen a numerosos genes duplicados (Panserat y Kaushik, 2010).

Debido a los resultados obtenidos en éste estudio, y los estudios previos de capacidad digestivas en larvas de *C. estor*, se propone la posible adición de enzimas digestivas en la microdieta ofrecida a las larvas, como se ha estudiado en otras especies, con la finalidad de ayudar en el proceso de digestión de las mismas e intentar mejorar su desempeño, sin dejar de lado que el efecto de las enzimas digestivas dependerá de características intrínsecas propias de la especie, además de factores como la edad de la larva y desarrollo intestinal, además del tipo de enzima empleada.

Se propone también el uso de probióticos debido a su efecto benéfico incrementando el crecimiento en los peces, además de mejorar la digestibilidad del

alimento por medio de un aumento en la actividad de algunas enzimas como proteasas y amilasas (Zhang *et al.*, 2019). A pesar de que el rol actual de los prebióticos en la regulación del crecimiento muscular a nivel celular y molecular, necesita aún ser clarificado, hay estudios en donde a través de análisis morfométricos musculares reportan hipertrofia de fibras musculares indicando un incremento en la tasa de crecimiento (Asaduzzaman *et al.*, 2018), por lo que también podría considerarse aditivos potenciales.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, M. S., Watanabe, W., Rezek, T. C., Myers, A. R., Carroll, P. M., y Daniels, H. V. 2015. Growth performance, survival and body composition of southern flounder *Paralichthys lethostigma* larvae fed different formulated microdiets. *Aquaculture Research*. 2015, 46, 1924–1936
- Aleksunes, L. M. y Manautou, J. E. 2007. Emerging Role of Nrf2 in Protecting Against Hepatic and Gastrointestinal Disease. *Toxicologic Pathology*. 35:459-473. DOI: 10.1080/01926230701311344
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y J.Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3).403-410
- Assaduzzaman, M., Sofia, E., Shakil, A., Haque, N., Khan, M., Ikeda, D., Kinoshita, S. y Abol-Munafi, A. 2018. Host gut-derived probiotic bacteria promote hypertrophic muscle progression and upregulate growth-related gene expression of slow-growing Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*. 9:37-45
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. R., Carnevali, O. 2009. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 298:R359-R371.
- Barbour, C. D. 1973. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* swainson (Pisces, Atherinidae). *Tulane studies in zoology and botany*. 18(3):97-141.
- Bengtson, D. A., 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *J. World Aquacult. Soc.* 24 (2): 285-293.
- Biga, P. R., Cain, K. D., Hardy, R. W., Schelling, G. T., Overturf, K., Roberts, S. B., Goetz, F. W. y Ott, T. L. 2004. Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and -2 and increases circulating cortisol in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*. 138:1, 32-41.

- Blair, T., Castell. J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P., y Ogunmoye, K. 2003. Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*. 225(1-4):451-461.
- Blaxter, J. H. S. 1985. Fish vision and applied research. *In*: M. A. Ali (ed), *Vision in fishes: new approaches in research*. Plenum press, New York. Pp. 757-773.
- Blaxter, J. H. S., 1988. Pattern and variety in development. In hoar, W. S. and Randall, D. J. (Eds.) *Fish Physiology*. Vol. IX: The physiology of developing fish. Part A: Eggs and larvae. Academic Press, Inc.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. y Pachter, L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification, *Nature Biotechnology* 34, 525–527 (2016), doi:10.1038/nbt.3519
- Bustamante, J, Lodge, J. K., Marcocci, L., Tritschler, H. J., Packer, L. y Rihn, B. H. 1998.  $\alpha$ -lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 24(6):1023-1039
- Butler, J.A., Hagen, T.M., Moreau, R., 2009. Lipoic acid improves hypertriglyceridemia by stimulating triacylglycerol clearance and down-regulating liver triacylglycerol secretion. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 63–71.
- Cahu C. L., J. L., Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200 (1-2):161-180. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00699-8
- Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L., Le Gall M.M. y Quazuguel P. 1995. Early Weaning of Seabass: Are Digestive Enzymes Limiting?. *Larvi '95 – Fish and Shellfish larviculture Symposium*. P. Lavens, E. Jasperse I. Roelants (Eds.). 1995 Gent, Belgium European Aquaculture Society, Special Publication N° 24: 268-271.
- Cahu Ch. y Zambonino-Infante J. L., 1997. Is the Digestive Capacity of Marine Fish Larvae Sufficient for Compound Diet Feeding?. *Aquaculture* 5: 151-160.

- Campos-Mendoza A., 2000. Comparación del crecimiento de tres especies del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae), en cultivo experimental dentro de sistemas parciales de recirculación de agua. Tesis de Maestría. U.M.S.N.H. Morelia, Michoacán. 70 p.
- Carrillo O., F. Vega-Villasante, H. Nolasco, N. Gallardo. 2000. Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola”. Mérida, Yucatán., México. pp. 90-101.
- Carruthers, M., Yurchenko, A. A., Augley J. J., Adams, C. E., Herzyk, P. y Elmer, K. R. 2018. De novo transcriptome assembly, annotation and comparison of four ecological and evolutionary model salmonid fish species. *BMC Genomics*. 19:32. DOI 10.1186/s12864-017-4379-x
- Carvalho, A.P., Sa, R., Oliva-Teles, A., Bergot, P., 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234: 319–333.
- Celada, J. D., J. B. Fuertes, J. M. Carral, M. Sáez-Royuela, Á. González, A. González-Rodríguez. (2013). Effects of vitamin C in practical diets on survival and growth of juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, Astacidae) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture Nutrition*, 19 (1):110–116. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2012.00949.x
- Chen, W. L., C. H. Kang, S. G. Wang, H. M. Lee. (2012).  $\alpha$ -Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*, 55:1824–1835. DOI:10.1007/s00125-012-2530-4
- Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J. 2004. “Nutrición y alimentación de peces marinos”. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque Marie D., Nieto López M.G., Villareal D., Scholz U., González M. (Eds.). “Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola”. Hermosillo, Sonora, México.
- Clay, H.B., A. K. Parl, S. L. Mitchell, L. Singh, L. N. Bell, D. G. Murdock. (2016). Altering the Mitochondrial Fatty Acid Synthesis (mtFASII) Pathway

Modulates Cellular Metabolic States and Bioactive Lipid Profiles as Revealed by Metabolomic Profiling. *PLoS ONE*, 11 (3):e0151171. DOI:10.1371/journal.pone.0151171.

- Cole D.W., Cole R., Gaydos S.J., Gray J., Hyland G., Jacques M.L., Powell-Dunford N., Sawhney C. y AuW.W. 2009. Aquaculture: environmental, toxicology, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 369-377.
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M. T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*. 41, 613-640. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x
- Corona- Herrera, G.A. (2017). El efecto del fotoperiodo en el crecimiento, alimentación y determinación sexual del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan, 1880). Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, IIAF, Morelia, Michoacán, 228 pp.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: present “a state of the art” and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 24:6 807–833.
- Dabrowski, K., Glogowski, J. 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54, 129–134.
- De Oliveira, A. L., Wollesen, T., Kristof, A., Scherholz, M., Redl, E., Todt, C., Bleidorn, C. y Wanninger, A. 2016. Comparative transcriptomics enlarges the toolkit of known developmental genes in mollusks. *BCM Genomics*. 17:905. DOI 10.1186/s12864-016-3080-9
- Dominy, J. E., y P. Puigserver. 2013. Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (7):a015008. DOI:10.1101/cshperspect.a015008
- Dyer, B.S. y Chernoff, B. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomopha). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 117(1):1-69
- Evans, B. I. y Browman, H. I. 2004. Variation in the development of the fish retina. *American Fisheries Society Symposium*. 40, 145-166.

- Exadalyctos, A. 2014. Nutrigenomics in Aquaculture Research. *Fisheries and Aquaculture Journal*. 5(2)
- FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed Sep 2018
- Feng, D., A. Witkowski, S. Smith. (2009). Down-regulation of Mitochondrial Acyl Carrier Protein in Mammalian Cells Compromises Protein Lipoylation and Respiratory Complex I and Results in Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (17):11436–11445. DOI:10.1074/jbc.M806991200
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E. y Yúfera, M. 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Marine biology*. 118:2. pp: 323-328
- Fernández-Galilea M., P. Pérez-Matute, P. L. Prieto-Hontoria, M. Houssier M, M. A. Burrell, D. Langin, J. A. Martínez, M. J. Moreno-Aliaga. (2014).  $\alpha$ -Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (3):273-81. DOI:10.1016/j.bbaliip.2014.12.013.
- Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Eddy, R. D. S. R., Sonnhammer, E. L. L. y Bateman, A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acid Research*. 34(1):D247-D251.
- Francis, S., R. Delgoda, R. Young (2012). Effects of embryonic exposure to  $\alpha$ -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Research*, 43, 777–788. DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.02889.x
- Fuentes, E. N., Valdés, J. A., Molina, A. y Björnsson, B. T. 2013. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone—insuline-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*. 192, 136-148

- García de la serrana, D., Estévez, A., Andree, K. y Johnston. I. A. 2012. Fast skeletal muscle transcriptome of the Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) determined by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 13:181
- García-Ortega, L F. y Martínez, O. 2015. How Many Genes Are Expressed in a Transcriptome? Estimation and Results for RNA-Seq. *PLoS ONE*. 10(6)
- Gomes, M. B. y C. A. Negrato. (2014). Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6 (1):80. DOI: 10.1186/1758-5996-6-80
- González-Pérez, O., N. A. Moy-López, J. Guzmán-Muñiz. 2008. El alfa-tocoferol y el ácido alfa-lipoico. Una sinergia antioxidante con potencial en medicina preventiva. *Rev. de Investigación Clínica*, 60 (1):58-67.
- Govoni, J.J., Bochlert, G.W., Watanake, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59–77.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. y Regev, A. 2013. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*. 29(7):644-652
- Guerrero-Fernández, D. D. 2015. Plataforma de supercomputación para bioinformática. Tesis doctoral. Universidad de Málaga. Pp: 47-52
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M. MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. y Regev, A. 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. 8(8):1494–1512

- Hadi M., L. Packer, N.E. L. Saris. 2002. Antioxidant and Prooxidant Activities of  $\alpha$ -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid, Review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182, 84–90. DOI:10.1006/taap.2002.9437
- Hamre, K., M. Yúfera, I. Rønnestad, C. Boglione, L. E. C. Conceição, M. Izquierdo. 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5 (1):S26-S58. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x
- Hayes, J.D. y McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cáncer. *Trends in Biochemical Science*. 34(4):176–188 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2008.12.00819321346>.
- Henning, S. J., Rubin D. C., Shulman R.J. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In Johnson I. R (Ed.), *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 571-610.
- Hiltunen JK, Chen Z, Haapalainen AM, Wierenga RK, Kastaniotis AJ. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis—an adopted set of enzymes making a pathway of major importance for the cellular metabolism. Review. *Progress in Lipid Research* 49 (1):27–45. DOI:10.1016/j.plipres.2009.08.001
- Hoffer, R., y Nassir-Uddin A., 1985. Digestive processes during the development of the roach, *Rutilus rutilus* L. *J. Fish. Biol.* 26, 683-689.
- Holland, R. y Fishbein, J. C. 2010. Chemistry of the Cysteine Sensors in Kelch-Like ECH-Associated Protein 1. *Antioxidants and Redox Signaling*. 13(11):1749-1761
- Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., Logothetis, E.A., Cavanagh, J.W. y Boyle, K. S. 2006. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of new world silversides fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology* 149, 1237-1245.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. y Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat. Protoc.* 4:44-57.

- Illumina (2012). *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. Diciembre 15, 2018. Sitio web: [https://www.illumina.com/Documents/products/Illumina\\_Sequencing\\_Introduction.pdf](https://www.illumina.com/Documents/products/Illumina_Sequencing_Introduction.pdf)  
involved in oxidation-reduction, mitosis, and selenium homeostasis.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*. 7, 576–587.
- Johnston, I. A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I.A., 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. 209, 2249–2264.
- Jones, A. y Houde, E.D. 1986. Mass rearing of fish fry for aquaculture. In: Bilio, M. Rosenthal, H. y C. F. Sindermann (Eds.), *Realism in Aquaculture: Achievements, constraints and perspectives*. *European Aquaculture Society, Bredene*. Pp.351-373.
- Jones, D. A., M. S. Kamarudin, L. L. Vay. 1993. The Potential for Replacement of Live Feeds in Larval Culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24 (2):199–210. DOI:10.1111/j.1749-7345.1993.tb00009.x
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal*. 8, 1865–1879.
- Jornayvaz, F. R. y G. I. Shulman. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47:10.1042/bse0470069. DOI:10.1042/bse0470069
- Karlsen, Ø., van der Meeren, T., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A., Galloway, T. F., Kjørsvik, E. y Hamre, K. 2015 Copepods enhance nutritional status, growth and development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae – can we identify the underlying factors?. *PeerJ*. 3:e902
- Katan, T., Nash, G. W., Rise, M. L., Hall, J. R, Fernandes, J. M. O., Boyce, D., Johnsen, C. A., Gamperl, A. K. 2016. A Little Goes a Long Way: Improved

growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed small amounts of wild zooplankton. *Aquaculture*. 451, 271-282.

- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*. 200. 181-201
- Kolkovski, S. 2013. Microdiets as alternatives to live feeds for fish larvae in aquaculture: improving the efficiency of feed particle utilization. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Pp. 203-222
- Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo, M.S., 1997. Effects of live food, dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 148, 313–322.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W., Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol Biochem*. 12(3):203-9.
- Koven, W.M., Parra, G., Kolkovski, S., Tandler, A., 1998. The effect of dietary phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and fatty acid absorption rate in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquacult. Nutr.* 4, 39–45.
- Kütter, M. T., J. M. Monserrat, E. G. Primel, S. S. Caldas, M. B. Tesser. 2012. Effects of dietary  $\alpha$ -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture*, 368-369: 29-35. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.09.010
- Kütter, M. T., L. A. Romano, J. Ventura-Lima, M. B. Tessera, J. M. Monserrat. 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 162: 70-76. DOI:10.1016/j.cbpc.2014.03.008
- Langdon, C. 2003. Microparticles types for delivery nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227: 259-275.
- Langdon, C., Nordgreen, A., Hawkyard, M. y Hamre, K. 2008. Evaluation of wax spray beads for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and antibiotics to *Artemia*. *Aquaculture*. 284(1-4):151-158.

- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335–346.
- Lazo, J. P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 de Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.*
- Leek, J. T., Scharpf, R. B., Corrada-Bravo, H., Simcha, D., Langmead, B., Johnson, W. E., Geman, D., Baggerly, K. y Irizarry, R. 2010. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics*. 11(10). doi:10.1038/nrg2825
- Leitão, N. d. J., Pai-Silva, M. D., de Almeida, F. L. A. y Portella, M. C. (2011). The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture* 315, 78-85.
- Li, B., Fillmore, N., Bai, Y., Collins, M., Thomson, J. A., Stewart, R. y Dewey, C. N. 2014. Evaluation of *de novo* transcriptome assemblies from RNA-Seq data. *Genome Biology*. 15:553. DOI 10.1186/s13059-014-0553-5
- Li, D., Lou, Q., Zhai, G., Peng, X., Cheng, X., Dai, X., Zhuo, Z., Shang, G., Jin, X., Chen, X., Han, D., He, J. y Yin, Z. 2014. Hyperplasia and Cellularity Changes in IGF-1-Overexpressing Skeletal Muscle of Crucian Carp. *Endocrinology*. 155:6, 2199-2212
- Li, E. y Li, C., 2014. Use of RNA-seq in aquaculture research. *Poult. Fish. Wildl. Sci.* 2:108.
- Lindberg J, and Lundeberg J. (2010). The plasticity of the mammalian transcriptome. *Genomics* 95, 1–6.
- Longaray-Garcia, M., J. A. Flores, I. C. Kulkamp-Guerreiro, S. S. Guterres, T. C. Pereira, M. R. Bogo, J. M. Monserrat. 2013. Modulation of antioxidant and detoxifying capacity in fish *cyprinus carpio* after treatment with nanocapsules containing lipoic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 165 (4):468-75. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.004

- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., Shafee, T. (2017) Transcriptomics technologies
- Lu, C.-Y., Lee, C.-F., Ma, Y.-S., Liu, C.-Y., Wei, C.-Y., Chen, Y.-C., Wu, S.-B., Wei, Y.-H., 2006. Oxidative stress and mitochondrial disease. In: Singh, Keshav (Ed.), Oxidative stress disease and cancer. Imperial College Press, London, pp. 649–672.
- Lu, D. L., Limbu, S. M., Ly, H. B., Ma, Q., Chen, L. Q., Zhang, M. L., Du, Z. Y. 2019. The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary  $\alpha$ -lipoic acid,  $\beta$ -glucan and l-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 86:785-793
- Lubzens E. y Zmora O. 2003. Production and nutritional value of rotifers. Live Feeds in Marine Aquaculture (ed. by L.A. McEvoy), pp. 17-64. Blackwell publishing, Oxford, UK.
- Lyons, J., González-Hernández, J., Soto-Galera, J. y Guzmán-Arroyo, M. 1998. Decline of freshwater fishes and fisheries in selected drainages of west-central Mexico. *Fisheries*. 23(4):10-18.
- MacManes, M. D. 2014. On the optimal trimming of high-throughput mRNA sequence data. *Frontiers in genetics*. 5:1-7
- Martin, S. A. M., Dehler, C.E. y Król, E. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental and Comparative Immunology*. 64:103-107
- Martin, S. y Król, E. 2017. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Developmental and Comparative Immunology*. 75:86-98
- Martínez-Angeles E. 2016. “Uso de Microagregados como primer alimento en larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*)”. Tesis de Maestría. IIAF, UMSNH. 79 pp.
- Martínez-Chávez, C.C., A. Tello-Ballinas, J. Fonseca-Madrigal, L.G. Ross, C.A. Martínez-Palacios. 2014. Photoperiodic growth enhancement in a tropical batch spawning atherinopsid, pike silverside *Chirostoma estor*. *J Fish Biol.*, 85(2):546-53. DOI:10.1111/jfb.12442.

- Martínez-Palacios, C. A., Aguilar-Valdez, M. C., Strüssmann, C. A., Ríos-Durán, M. G., Toledo-Cuevas, E. M., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrigal, J., Martínez-Chávez, C. C., Ross, L. G. 2019. The orobranchial structures in four neotropical silversides (Teleostei: Atherinopsidae) related with feeding habits. *Zoomorphology*. 138(4):511-523.
- Martínez-Palacios, C. A., M. G. Ríos-Durán, A. Campos-Mendoza, M. Toledo-Cuevas, M. C. Aguilar-Valdez, L. G. Ross. 2003. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. Historia y avances del cultivo de pescado blanco, INAPESCA. pp. 169-190.
- Martínez-Palacios, C. A., M. G. Ríos-Durán, L. Ambriz-Cervantes, K. J. Jauncey, L. G. Ross. 2007. Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor*, Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquaculture Nutrition*, 13 (4):304–310. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2007.00479.x
- Martínez-Palacios, C. A.; Ríos-Durán, M. G; Campos-Mendoza, A; Toledo-Cuevas, M; Aguilar-Valdez, M.C. y L. G. Ross., 2002. Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). *Ciencia Nicolaita*, 32: 73-90.
- Martínez-Palacios, C.A., Barriga Tovar, E., Taylor, J.F., Rios Duran, G. and Ross, L.G., 2002. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor* Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209:369–377.
- Martínez-Palacios, C.A., Morte, C.J., Tello-Ballinas, J.A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. 2004. The effect of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture*. 238:509-522
- Martínez-Palacios, C.A., Racotta, I.S., Ríos-Durán, M.G., Palacios, E., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell* 30(1):137-148.

- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Durán, M.G., Campos-Mendoza, A., Toledo-Cuevas, M., Ross, L.G. 2002. Avances en el Cultivo del Pescado Blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Martínez-Palacios, C.A., Ríos-Duran, M.G., Fonseca-Madrigal, J., Toledo Cuevas, M., Sotelo López, A., Ross, L. 2008. "Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880". *Aquaculture Research*. 39(7):738-747. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.01926.x
- Martínez-Palacios, C.A., Toledo-Cuevas, M., Racotta-Dimitrov, E., Ríos-Durán, M.G., Palacios-Metchenov, E., Fonseca-Madrigal, J., Campos-Mendoza, A., Ross, L.G. 2006. Aspectos nutricionales del pescado blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor* Jordan, 1879). Avances en nutrición acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mastoridis, S., Llordella, M.M. y Sánchez-Fueyo, A. Emergent Transcriptomic Technologies and Their Role in the Discovery of Biomarkers of Liver Transplant Tolerance. 2015. *Front Immunol*. 6:304.
- McCord, J. M. 2000. The evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*. 108:652-659.
- Miller, J.R., Koren, S. y Sutton, G. 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*. 95:315–327.
- Miller, R. R., W.L. Minckley, S. Norris. 2005. Freshwater fishes of Mexico. Chicago, IL: University of Chicago Press. 490 pp.
- Monroy de la Peña, F. A. 2018. Evaluación del efecto del ácido alfa lipoico en el crecimiento y la supervivencia de larvas de pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*). Tesis de licenciatura. UMSNH. Morelia, Michoacán.
- Monserrat, J. M., J. V. Lima, J. L. Ferreira, D. Acosta, M. Longaray-Garcia, P. B. Ramos, T. B. Moraes, L. C. Dos Santos, L. L. Amado. 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and*

Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology, 148 (3):287–292.  
DOI:10.1016/j.cbpc.2008.06.011

- Monserrat, J. M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Lima, J.V., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 221–234.
- Mora, O., Álvarez-Alonso, C., Pérez-Serrano, R., González-Dávalos, L., Vargas-Chávez, C., Shimada, A. y Piña, E. 2017. Lipoic acid promotes the down-regulation of hepatic gene expression in broilers. *European Poultry Science*. 81
- Morais, S., Pratoomyot, J., Taggart, J.B., Bron, J.E., Guy, D.R., Bell, J.G. y Tocher, D.R. 2011. Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics*. 12:255
- O’Neil, S. T. y Emrich, S. 2017. Assessing De Novo transcriptome assembly metrics for consistency and utility. *BMC Genomics*. 14:465
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*. 35(2):83-108
- Önal, U. y Langdon, C., 2000. Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 157-170.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Wegner, A., Krawiec, M. 2008. The Effects of Feeding on Muscle Growth Dynamics and the Proliferation of Myogenic Progenitor Cells during Pike Perch Development (*Sander lucioperca*). *Journal of the World Aquaculture Society*. 39:2, 184-195. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00151.x>
- Panserat, S. y Kaushik, S. J. 2010. Regulation of gene expression by nutritional factors in fish. *Aquaculture Research*, 41(751-762).
- Park, H. K., B. F. Terjesen, M. B. Tesser, M. C. Portella, K. Dabrowski. (2006).  $\alpha$ -Lipoic acid-enrichment partially reverses tissue ascorbic acid depletion in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed vitamin C-devoid diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32 (4):329-338. DOI 10.1007/s10695-006-9110-9

- Pavasovic, A., Keerthiratne-Dammannagoda, L., Amin, S. y Prentis, P. J. 2014. Nutrigenomics in Aquaculture – analysis of gene expression patterns to elucidate digestive capacity in freshwater crayfish.
- Pedersen, B. H., Nilssen, E. M. y Hjelmeland, K. 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea arengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology*, 94: 171-181.
- Pedroza-Islas, R., P. Gallardo, E. J. Vernon-Carter, T. García-Galano, C. Rosas, C. Pascual, G. Gaxiola. (2004). Growth, survival, quality and digestive enzyme activities of larval shrimp fed microencapsulated, mixed and live diets. *Aquaculture Nutrition*, 10 (3):167-173. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2004.00284.x
- Penglase, S., Edvardsen, R. B., Furmanek, T., Rønnestad, I., Karlsen, Ø., van der Meer, T. y Hamre, K. 2015. Diet affects the redox system in developing Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Redox Biology*. 5,308-318
- Person-Le Ruyet, J., 1989. Early weaning of fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. *In Advances in Tropical Aquaculture*, Aquacop. Infremer, Actes de Colloque 9, pp 625-642.
- Pohls, P., González-Dávalos, L., Mora, O., Shimada, A., Varela-Echavarría, A., Toledo-Cuevas, E.M., Martínez-Palacios, C.A. 2016. A complete chitinolytic system in the atherinopsid pike silverside *Chirostoma estor*: gene expression and activities. *Journal of Fish Biology*. Mayo.
- PubChem. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thioctic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thioctic_acid).  
Accesed junio, 2019
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Zhong, G., 2014. RNA-seq technology and its application in fish transcriptomics. *OMICS*. 18:98-110.
- Qin, C., Xie, Y., Wang, Y., Li, S., Ran, C., He, S., y Zhou, Z. 2018. Impact of *Lactobacillus casei* BL23 on the Host Transcriptome, Growth and Disease Resistance in Larval Zebrafish. *Frontiers in Physiology*. 9:1245.
- Ramaswamy, A. V. y A. T. Maurelli. (2010). *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 Can Utilize Exogenous Lipoic Acid through the Action of the Lipoic Acid

Ligase LplA1. *Journal of Bacteriology*, 192 (23):6172–6181.  
DOI:10.1128/JB.00717-10

- Ríos-Durán, M. G., P. Navarrete-Ramírez, J. Fonseca-Madrigal, E. Mendez-Ortiz, E. Palacios, I. S. Racotta, C. C. Martínez-Chávez, L. G. Ross, C. A. Martínez-Palacios. 2014. Optimizing initial feeding of the Pike silverside *Chirostoma estor*: oil droplet depletion, point of no return, growth and fatty acid utilization in larvae fed enriched rotifers. *Aquaculture Nutrition*, 22 (3):517–526. DOI: 10.1111/anu.12272
- Rise, M. L., Hall, J. R., Nash, G. W., Xue, X., Booman, M., Katan, T. y Gamperl, K. 2015. Transcriptome profiling reveals that feeding wild zooplankton to larval Atlantic cod (*Gadus morhua*) influences suites of genes
- Rojas-Carrillo, P. M. 2013. Avances en el cultivo de pescado blanco. Instituto Nacional de Pesca. México, D.F.
- Ross, L.G., Martínez-Palacios, C.A., Aguilar-Valdez, M.A., Del, C., Beveridge, M.C.M. y Chavez Sanchez, Ma.C., 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor* Jordan 1880. *J. Fish Biol.*, 68, 1782–1794.
- Salem, M., Vallejo, R.L., Leeds, T.D., Palti, Y., Liu, S., Sabbagh, A., Rexroad III, C.E. and Yao J. 2012. RNA-Seq Identifies SNP Markers for Growth Traits in Rainbow Trout. 7(5)
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., Von Poeppinghausen, K. J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish. Biol.*, 35: 249-263.
- Shay, K.P., R. F. Moreau, E. J. Smith, A. R. Smith, T. M. Hagen. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica Biophysica Acta*, 1790 (10):1149–1160. DOI:10.1016/j.bbagen.2009.07.026
- Shen, Q. W., C. S. Jones, N. Kalchayanand, M. J. y Zhu, M. Du. 2005. Effect of dietary  $\alpha$ -lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-

activated protein kinase phosphorylation in mice. *J. of Animal Science*, 83 (11):2611–2617.

- Shen, W., J. Hao, Z. Feng, C. Tian, W. Chen, L. Packer, X. Shi, W. Zang, J. Liu. 2011. Lipoamide or lipoic acid stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the endothelial NO synthase-cGMP-protein kinase G signalling pathway. *British Journal of Pharmacology*, 162(5), 1213–1224. DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.01134.x
- Shimada A. 2007. Aditivos en nutrición animal. México D.F. Trillas, 221-230.
- Sigler, S. G. (2015). Efecto del ácido alfa lipóico sobre los parámetros productivos, la calidad de la canal y la biogénesis mitocondrial del pollo de engorda. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 95 pp.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V. y Zdobnov, E.M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*. 31(19):3210–3212
- Spalding, M. D. y S. T. Prigge. (2010). Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (2):200–228. DOI:10.1128/MMBR.00008-10
- Srivastava, A., Hamre, K. y Stoss, J. 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): with emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture* 254: 534–543.
- Storm, J. y S. Müller. (2012). Lipoic Acid Metabolism of Plasmodium - A Suitable Drug Target. *Current Pharmaceutical Design*, 18 (24):3480–3489. DOI:10.2174/138161212801327266
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M. y Hagen, T. M. 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 101(10):3381-3386
- Theissinger, K., Falckenhayn, C., Blande, D., Toljamo, A., Gutekuns, J., Makkonen, J., Jussila, J., Lyko, F., Schrimpf, A., Schulz, R. y Kokko, H. 2016.

*De Novo* assembly and annotation of the freshwater crayfish *Astacus astacus* transcriptome. *Marine Genomics*. 28:7-10

- Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Ramírez, D. T., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C. y Martínez-Palacios, C. A., 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42: 776–786.
- Trenzado, C. E., A. E. Morales, J. M. Pµa, M. de la Higuera. (2009). Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 149 (3):440-7. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.10.105.
- Trinotate. Transcriptome Functional Annotation and Analysis. <https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>. Accessed Sep 2018
- Ulloa, P.E., Iturra, P., Neira, R., y Araneda, C. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 21(4):649-666
- Ulloa, P.E., Medrano, J.F. y Feijoo, C.G. 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics*. 5:1-6.
- Vo, T. A., Galloway, T. F., Bardal, T., Halseth, C. K., Øie, G. y Kjørsvik, E. 2016. Skeletal muscle growth dynamics and the influence of first-feeding diet in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.). *Biology Open*. 5, 1575-1584. doi:10.1242/bio.018556
- Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 10(1):57-63
- Watanabe, T. y V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics, Review. *Aquaculture*, 124 (1-4):223-251.
- Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of freshwater

cottid fish (*Cottus nozawae*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 50:3, 409-416.

- Weatherley, A. H., Gill, H. S. y Lobo, A. F. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *Journal of Fish Biology*. 33:6, 851-859.
- Wenk, C. 2000. Recent advances in animal feed additives such as metabolic modifiers, antimicrobial agents, probiotics, enzymes and highly available minerals. Review. *Asian-Australasian J. of Animal Sciences*, 13 (1):86-95. DOI: 10.5713/ajas.2000.86
- Xu, C., E. Li, S. Liu, Z. Huang, J. G. Qin, L. Chen. 2017. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant status and lipid catabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed different lipid percentage. *Aquaculture*, 484: 286-292. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.09.036
- Yanes-Roca, C., E. M. Toledo-Cuevas, L. J. Sánchez, A. Born-Torrijos, N. Rhody, K. L. Main. 2017. Digestive Enzyme Activity during Larval Development of Black Snook, *Centropomus nigrescens*. *World Aquacult Soc*. DOI:10.1111/jwas.12466
- Yoshikawa, K., Hayakama, K., Katsumata, N., Tanaka, T., Kimura, T., Yamauchi, K., 1996. High-performance liquid chromatographic determination of lipoamidase (lipoyl-Xhydrolase) activity with a novel substrate, lipoyl-6-aminoquinoline. *J. Chromatogr*. 679, 41–47.
- Yúfera, M. y M. J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268 (1-4):53-63. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.050
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., E. Pascual, M.C. Sarasquete, F. J. Moyano, M. Díaz, F. J. Alarcón, M. García-Gallego y G. Parra. 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition* 6; 143-152.
- Yúfera, M., Kolkovski, S., Fernandez-Diaz, C., Dabrowski, K., Thies, C., 1998. Microencapsulated diets for fish larvae—current 'state of art'.

Bioencapsulation VII and Microencapsulation Symposium Proceedings, Easton, Maryland, USA. Naval Research Laboratory, Washington, DC, USA.

- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1996. Sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129–138.
- Zamora, M., y J. A. Villena. 2014. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Treat Insulin Resistance. *Current pharmaceutical design* 20:35. DOI:10.2174/1381612820666140306102514
- Zhang, C., Zhang, J., Fan, W., Huang, M., y Liu, M. 2019. Effects of dietary *Lactobacillus delbrueckii* on growth performance, body composition, digestive and absorptive capacity, and gene expression of common carp (*Cyprinus carpio* Huanghe var). *Aquaculture Nutrition*. 25:166-175
- Zhang, W., Q. Chen, K. Mai, W. Xu, X. Wang, Z. Liufu. 2010. Effects of dietary  $\alpha$ -lipoic acid on the growth and antioxidative responses of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture Research*, 41 (11):e781-e787. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.02592.x

## 14. ANEXOS

### 14.1. Anexo 1. Anotación de genes con expresión diferencial en larvas alimentadas con rotífero.

#### Procesos metabólicos

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Triosephosphate isomerase B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gluconeogenesis</li> <li>- Glycolytic process</li> </ul>	Fatty acid-binding protein, adipocyte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cholesterol homeostasis</li> <li>- Cytokine production</li> <li>- Positive regulation of inflammatory response</li> <li>- Brown and white fat cell differentiation</li> </ul>
Glycogen phosphorylase, muscle form	Glycogen metabolic process	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	Oligosaccharide biosynthetic process
Long-chain fatty acid transport protein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Long-chain and medium-chain fatty acid transport</li> <li>- Regulation of lipid metabolic process</li> </ul>	Glucose-6-phosphate isomerase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gluconeogenesis</li> <li>- Immunoglobulin secretion</li> <li>- Mesoderm formation</li> <li>- Glucose 6-phosphate metabolic process</li> <li>- Angiogenesis</li> </ul>
Acylphosphatase-2	Metabolism of phosphate-containing compounds	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carboxylic ester hydrolase activity</li> <li>- Lipid catabolic process</li> </ul>
Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	Metabolic process	Phosphoglycerate mutase 2	Glycolytic process
Phosphoglucomutase-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carbohydrate metabolic process</li> <li>- Neutrophil degranulation</li> </ul>		
Bile salt-activated lipase	Lipid catabolic process		
Acyl-CoA-binding protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acyl-CoA metabolic process</li> <li>- Phosphatidylcholine acyl-chain remodeling</li> </ul>		
Adenylate kinase isoenzyme 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleoside diphosphate phosphorylation</li> <li>- Nucleoside triphosphate biosynthetic process</li> </ul>		
Fructose-bisphosphate aldolase C-B	Glycolytic process		

#### Desarrollo muscular, óseo y cartilaginoso - 1

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actin and myosin filament binding</li> <li>- Motor action</li> </ul>	Extracellular calcium-sensing receptor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ossification</li> <li>- Positive regulation of cell proliferation</li> <li>- Vasodilation</li> </ul>
Troponin T	Regulation of muscle contraction	M-protein, striated muscle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sarcomere organization</li> <li>- Actin filament organization</li> <li>- Striated muscle myosin thick filament assembly</li> </ul>
Tetranectin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bone mineralization</li> <li>- Cellular response to transforming growth factor beta stimulus</li> </ul>	Troponin I, fast skeletal muscle	Skeletal muscle contraction
Tropomodulin-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Myofibril assembly</li> <li>- Tropomyosin binding y filamento de actina</li> </ul>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glycogen catabolic process</li> <li>- Muscle cell cellular homeostasis</li> </ul>
Myosin-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Myofibril assembly</li> <li>- Sarcomere organization</li> <li>- Visceral muscle development</li> </ul>	Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Z disc</li> <li>- Protein binding</li> </ul>
Calsequestrin-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sarcomere organization</li> <li>- Regulation of skeletal muscle contraction by regulation of release of sequestered calcium</li> </ul>	Collagen alpha-1(I) chain	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cartilage development</li> <li>- Bone morphogenesis</li> <li>- Osteoblast differentiation</li> </ul>
Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell growth involved in cardiac muscle</li> <li>- Cell development</li> <li>- Muscle fiber development</li> <li>- Heart development</li> </ul>	Four and a half LIM domains protein 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Osteoblast differentiation</li> <li>- Ventricular and atrial cardiac muscle</li> <li>- Cell development</li> </ul>
Osteocalcin	Biomaterial tissue development	Myosin light chain 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Skeletal muscle tissue development</li> <li>- Regulation of striated muscle contraction</li> </ul>
Leukocyte cell-derived chemotaxin 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cartilage development</li> <li>- Skeletal system development</li> </ul>	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muscle contraction regulation of calcium ion transmembrane transport</li> </ul>
Osteocalcin 2	Biomaterial tissue development	Triadin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muscle contraction</li> <li>- Regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum</li> </ul>

## Desarrollo muscular, óseo y cartilaginoso – 2

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
<b>Myosin regulatory light chain 2</b>	- Skeletal muscle tissue development - Muscle contraction	<b>Myozenin-1</b>	- Myofibril assembly - Skeletal muscle tissue development
<b>Myosin-binding protein C, fast-type</b>	- Actin filament organization - Sarcomere organization	<b>Myosin light chain 1</b>	- Muscle contraction - Calcium ion binding
<b>Ryanodine receptor 1</b>	- Ossification involved in bone maturation - Skeletal muscle fiber development - Skin development	<b>Troponin C, skeletal muscle</b>	- Muscle filament sliding for muscle contraction
<b>Tropomyosin alpha-1 chain</b>	- Sarcomere organization - Muscle contraction - Cellular response to reactive oxygen species	<b>Secreted phosphoprotein 24</b>	- Bone remodeling
<b>Collagen alpha-3(VI) chain</b>	- Muscle organ development		
<b>PDZ and LIM domain protein 7</b>	- Atrioventricular valve formation - Pectoral fin development - Somitogenesis - Ossification		
<b>Unique cartilage matrix-associated protein</b>	- Regulation of osteoblast differentiation - Skeletal system development		
<b>Collagen alpha-2(XI) chain</b>	- Cartilage development - Chondrocyte development - Cartilage condensation - Ossification - Skeletal system morphogenesis - Tendon development		
<b>Myozenin-2</b>	- Skeletal muscle tissue development - Sarcomere organization		
<b>Sodium channel subunit beta-3</b>	- Cardiac muscle contraction - Positive regulation of sodium ion transport		

## Procesos importantes – 1

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
<b>Guanylyl cyclase-activating protein 2</b>	- Visual perception - Response to stimulus	<b>Heat shock protein beta-11</b>	- Stress response
<b>Homeobox protein GBX-2</b>	- Nervous system development - Thalamus development - Neural crest cell migration	<b>CD59 glycoprotein</b>	- Positive regulation of T cell proliferation - Regulation of complement activation
<b>Putative fibroblast growth factor 1</b>	- Angiogenesis - Hemopoiesis	<b>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10</b>	- Mitochondrial respiratory chain complex I assembly - Oxidation-reduction process
<b>Perforin-1</b>	- Apoptotic process - Circadian rhythm - Immune response	<b>Nuclear factor 7</b>	- Innate immune response - Positive regulation of apoptotic process
<b>Rhodopsin</b>	- Visual perception - Phototransduction	<b>Keratin, type I cytoskeletal 13</b>	- Keratinization - Organización del citoesqueleto
<b>RDS/rin-like protein xRDS35</b>	- Visual perception	<b>Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor</b>	- Aging - Cellular response to lipopolysaccharide - Regulation of cytokine production
<b>Peripherin-2</b>	- Retina development in camera-type eye - Visual perception	<b>Melanocyte protein PMEL</b>	- Developmental pigmentation - Melanin biosynthetic process
<b>Baculoviral IAP repeat-containing protein 7-A</b>	- Multicellular organism development - Protein autoubiquitination	<b>Guanylyl cyclase-activating protein 3</b>	- Phototransduction - Visual perception - Regulation of rhodopsin mediated signaling pathway
<b>2-epi-5-epi-valiolone synthase Bacterias - Actinomyces</b>	- Antibiotic biosynthetic process	<b>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</b>	- Blood vessel remodeling - Positive regulation of inflammatory response - Positive regulation of smooth muscle cell proliferation
<b>S-arrestin</b>	- Regulation of rhodopsin mediated signaling pathway - Visual perception	<b>Rhodopsin kinase</b>	- Regulation of rhodopsin mediated signaling pathway - Visual perception

## Procesos importantes - 2

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Mimecan	- Axon growth and morphogenesis	Pulmonary surfactant-associated protein D	- Innate immune response - Lung alveolus development - Respiratory gaseous exchange
Low and High choriolytic enzyme	- Participates in the breakdown of the egg envelope at the time of hatching. Thus allowing the newly hatched fish to swim free. - Proteolysis	Gamma-crystallin M1	- Structural constituent of eye lens
Guanylyl cyclase-activating protein 2	- Visual perception - Response to stimulus	Signal recognition particle subunit SRP72	- Response to drug
Cellular retinoic acid-binding protein 1	- Retinoic acid catabolic process	Glutathione peroxidase 7	- Response to oxidative stress
Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma	- Visual perception - Response to stimulus	Phosducin	- Response to stimulus - Visual perception - Queuosine biosynthetic process
Otospiralin	- Sensory perception of sound	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1B	- Response to hydrogen peroxide - Response to vitamin E - Response to redox state - T cell proliferation
Guanine nucleotide-binding protein G(T) subunit gamma-T1	- Cellular response to hipoxia - Eye photoreceptor cell development	Protein-lysine methyltransferase METTL21C	- Protein methylation - Skeletal muscle tissue development
Histone H1	- Chromosome condensation - Multicellular organism development - Nucleosome assembly	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma	- Rhodopsin mediated signaling - Pathwayvisual perception/activation of MAPK activity
Selenoprotein M	- Function unknown	Homeobox protein engrailed-2b	- Midbrain-hindbrain boundary morphogenesis - Apoptotic process involved in morphogenesis
Mannose-binding protein	- Complement activation - Defense response to Gram-positive bacterium	Beta-crystallin B1	- Structural constituent of eye lens - Visual perception

## Procesos importantes 3

Gen	Proceso biológico involucrado
Histone-lysine N-methyltransferase SMYD1	- Chromatin remodeling - Transcription corepressor activity - Positive regulation skeletal muscle cell differentiation
Heat shock cognate 71 kDa protein	- Cellular response to starvation - Cellular response to unfolded protein/viral process

## Proceso digestivo

Gen	Proceso biológico involucrado
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	- Digestive tract morphogenesis - Exocrine pancreas development - Liver morphogenesis
Chymotrypsin-like elastase family member 2A	- Proteolysis - Serine-type endopeptidase activity
Nodal modulator 1	- Carbohydrate binding in the mucosa of the colon
Elastase-1	- Proteolysis
Chymotrypsin C	- Cobalamin metabolic process - Proteolysis
Chymotrypsinogen B	- Cobalamin metabolic process
Phospholipase A2	- Cellular response to insulin stimulus - Fatty acid biosynthetic process - Glucose transport - Interleukin-8 production - Neutrophil chemotaxis - Arachidonic acid secretion

## Procesos celulares naturales - 1

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
60S ribosomal protein L37	- Translation	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	- Glucose metabolic process - Cytoskeleton organization - Neuron apoptotic process - Oxidation-reduction process
Transcription elongation factor, mitochondrial	- Oxidative phosphorylation - Regulation of transcription	Calcineurin B homologous protein 1	- Regulation of intracellular pH - Protein export from nucleus
Neurobeachin	- Post-Golgi vesicle-mediated transport - Protein localization	Clusterin-like protein	- Binding to misfolded proteins
ES1 protein	- Mitochondrion morphogenesis	Glucagon family neuropeptides	- Hormone activity
Serine/threonine-protein kinase SBK1	- Protein phosphorylation	Protein FAM183A	- Ribosomal large subunit biogenesis
Protein S100-Z	- Regulation of heart contraction	Parvalbumin-2, 7 y beta	- Calcium ion binding
von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein	- Anatomical structure development	Hemoglobin subunit alpha-1	- Iron ion binding - Oxygen carrier activity - Heme binding
60S ribosomal protein L23a	- Ribosomal large subunit assembly - Translation	Biglycan	- Negative regulation of protein kinase activity
Metabotropic glutamate receptor 8	- Chemical synaptic transmission - Negative regulation of cAMP biosynthetic process	Gamma-crystallin M1	- Structural constituent of the lens
Rab GDP dissociation inhibitor beta	- Membrane organization - Protein transport	Serine/threonine-protein kinase Sgk1	- Cellular response to DNA - Damage stimulus - Protein phosphorylation

## Procesos celulares naturales - 2

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Potassium channel subfamily K member 10	- Potassium ion transmembrane transport - Signal transduction	LIM domain-containing protein 1	- Negative regulation of transcription - Neural crest cell development
PRA1 family protein 2	- Protein transport	Transmembrane protein 17A Danio rerio	- Cilium assembly (citoesqueleto-microtubulos) - Smoothened signaling pathway
Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 2 protein	- Response to unfolded protein	40S ribosomal protein S14	- Erythrocyte differentiation - Ribosomal small subunit assembly - Translation
Tubulin beta-5 chain	- Structural constituent of cytoskeleton microtubule-based process	Selenium-binding protein 1	- Protein transport
U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	- mRNA splicing, via spliceosome	Synaptotagmin-15	- Regulation of calcium ion-dependent - Exocytosis - Vesicle fusión
Tripartite motif-containing protein 35	- Negative regulation of mitotic cell cycle	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	- Extracellular exosome
Regulator of G-protein signaling 9-binding protein B	- Negative regulation of signal transduction	cGMP-gated cation channel alpha-1	- Regulation of membrane potential - Signal transduction
Endoplasmic reticulum resident protein 27	- Protein folding endoplasmic reticulum - Response to stress	Translation initiation factor IF-2	- Translation initiation factor activity
Ankyrin-1	- Positive regulation of organelle organization - ER to Golgi vesicle-mediated transport - Exocytosis	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	- Cellular protein modification process - Protein de-ADP-ribosylation
60S ribosomal protein L39	- Iniciación de la traducción	Cathepsin E	- Protein autoprocessing - Proteolysis

## Procesos celulares naturales - 3

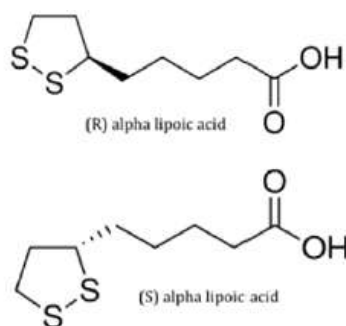
Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Protein tyrosine phosphatase domain-containing protein 1	- Protein dephosphorylation	RNA polymerase II-associated protein 3	- Requerida para conectar a la ARN polimerasa II a complejos de proteínas reguladoras
Heme-binding protein 1	- Heme binding	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	- Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	- Respiratory chain complex IV - Electron transport in the mitochondria	Creatine kinase U-type, mitochondrial	- Important role in signal transduction in tissues with high demands for energy, skeletal muscle, heart, brain and sperm.
Death domain-containing protein CRADD	- Cellular response to mechanical stimulus - Positive regulation of apoptotic process	Dual specificity protein kinase CLK2	- Protein phosphorylation - Response to ionizing radiation - Regulation of RNA splicing - Response to retinoic acid
Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	- Processing and presentation of antigens - Interferon-gamma mediated signaling pathway	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1	- Positive regulation of gene expression - Protein homotetramerization - Regulation of membrane potential
Transmembrane protein 182	- Membrane protein	60S ribosomal protein L3-like	- Ribosomal large subunit assembly - Translation
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2	- Mitochondrial respiratory chain complex IV - Hydrogen ion transmembrane transport	Talin-2	- Cytoskeletal anchoring at plasma membrane - Cell-cell junction assembly
Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	- Autophagosome maturation - Autofagia	Cytochrome c oxidase subunit 7A2	- Mitochondrial respirasome assembly - Regulation of oxidative phosphorylation
Phosphoribosyltransferase domain-containing protein 1	- Nucleoside metabolic process	Receptor activity-modifying protein 1	- G-protein coupled receptor signaling pathway - Intracellular protein transport
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	- Purine nucleotide biosynthetic process - Positive regulation of dopamine metabolic process	Elongation factor 2	- Translational elongation

## Procesos celulares naturales - 4

Gen	Proceso biológico involucrado	Gen	Proceso biológico involucrado
Protein enabled homolog	- Actin cytoskeleton organization	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	- Regulation of transcription - Intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator
Collagen alpha-5(VI) chain	- Cell adhesión	Carboxylesterase notum2	- Negative regulation of canonical Wnt signaling pathway - Protein depalmitoylation
Syntaxin-binding protein 6	- Exocytosis - Golgi to plasma membrane transport	PCNA-associated factor	- Cellular response to DNA damage stimulus - DNA replication - Regulation of cell cycle - Response to UV
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-T2	- G-protein coupled receptor signaling pathway	Endonuclease domain-containing 1 protein	- Endonuclease activity
5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-3	- Cell cycle arrest - Intracellular signal transduction - Macroautophagy - Glucose transport	Uncharacterized protein ORF91	- Uncharacterized hypothetical protein
Rho GTPase-activating protein 24	- Cell differentiation - Signal transduction	Alanine--tRNA ligase, mitochondrial	- Mitochondrial respiratory chain complex assembly - tRNA modification
Shaker-related potassium channel tsha2	- Potassium ion transmembrane		
Poly(U)-specific endoribonuclease-B	- Metal ion binding		
Dual specificity protein phosphatase 26	- Dephosphorylation - Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		
14 kDa phosphohistidine phosphatase	- Positive regulation of cell motility - Regulation of actin cytoskeleton reorganization		

## 14.2. Anexo 2. Síntesis del ácido alfa-lipoico

Molecularmente el ALA está compuesto por ocho átomos de carbono, catorce de hidrógeno, dos de oxígeno y dos de azufre ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ) (**Fig. 1**) (Kütter *et al.*, 2014). El átomo de carbono en la posición 6 (C6) es quiral, por lo que la molécula puede existir tanto en forma enantiomérica R como en S (**Fig. 18**). La forma S puede ser producida sintéticamente, pero sólo la forma R existe en la naturaleza y actúa como co-factor de importantes enzimas mitocondriales en el ciclo de Krebs (piruvato deshidrogenasa y alfa-cetoglutarato deshidrogenasa), que catalizan reacciones de descarboxilación oxidativa y son cruciales para el metabolismo energético (Hadi *et al.*, 2002; Shay *et al.*, 2009; Sigler, 2015; Kütter *et al.*, 2014).



**Fig. 18.** Enantiómeros R y S del ácido alfa-lipoico (Shay *et al.*, 2009)

Los átomos de azufre (carbono 6 y carbono 8) están unidos por un enlace disulfuro. En la forma oxidada se encuentra como un disulfuro cíclico, pero una vez que el ALA es absorbido de la dieta y transportado a las células, se reduce para formar ácido dihidrolipoico (DHLA), el cual puede almacenarse unido a proteínas en donde la enzima lipoamidasa puede escindir tal complejo y liberar ALA para funciones fisiológicas (Yoshikawa *et al.*, 1996). El DHLA posee dos grupos sulfhidrilo (-SH) y potente capacidad antioxidante tanto en ambiente acuoso como lipídico, debido a su propiedad anfífilica para atravesar membrana celular y barrera hematoencefálica (Shay *et al.*, 2009; Kütter *et al.*, 2014; Sigler, 2015).

El ALA puede ser sintetizado *de novo* en la mitocondria en la mayoría de los animales, plantas y microorganismos. Esta síntesis se realiza a partir de la oxidación

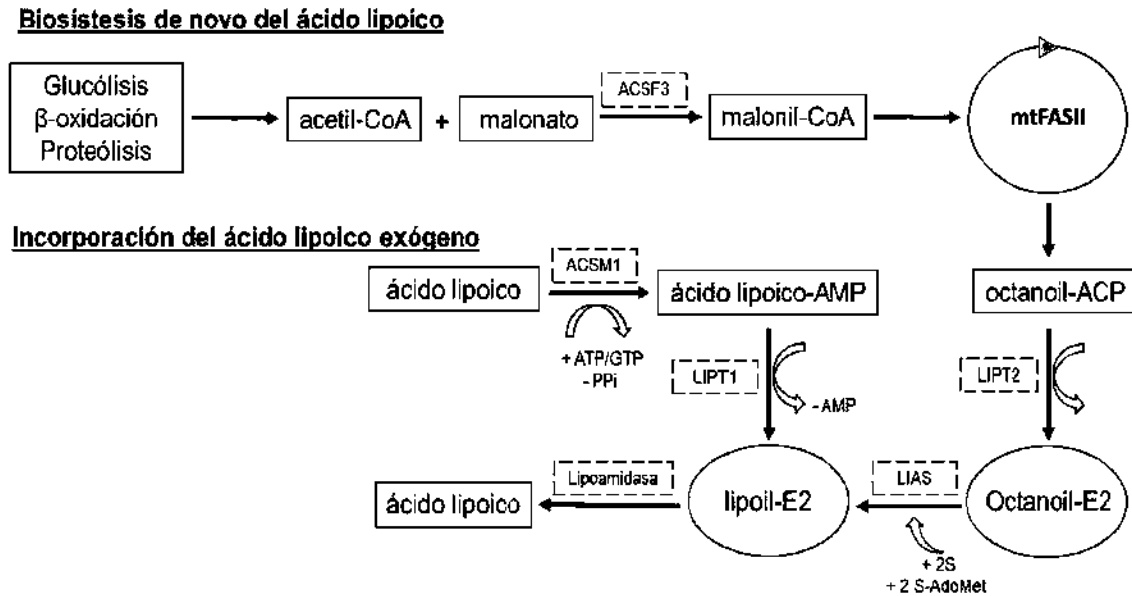
de sustratos energéticos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos), de estos se obtiene acetil coenzima A (acetil-CoA) que se une al malonato para formar el malonil-CoA, por medio de la acción enzimática la malonyl-CoA sintetasa (ACSF3). El malonil-CoA es utilizado en la ruta de síntesis de ácidos grasos mitocondriales (mtFASII), para formar la proteína transportadora de octanoil acilo (octanoil-ACP), la cual se utiliza como precursora en la ruta de síntesis de ALA (Hiltunen *et al.*, 2010; Clay *et al.*, 2016).

En mamíferos, el ALA administrado de manera exógena se une a una molécula de adenosin-trifosfato/guanosin-trifosfato (ATP/GTP) y es activado por la enzima activadora de lipoato (ACSM1), la cual libera dos grupos fosfato (PPi) y produce el ácido lipoico-AMP. Posteriormente la enzima lipoil transferasa (LIPT1) elimina el adenosin monofosfato (AMP) e incorpora el ALA a una molécula de Lipoil-E2 para que actúe la lipoamidasa y libere el ALA (Ramaswamy y Maurelli, 2010; Storm y Müller, 2012) (**Fig. 19**).

Actualmente se sabe que la aplicación de ALA exógeno no sustituye el ALA mitocondrial obtenido de la mtFASII, lo que indica que el origen natural del ALA es necesario para que ocurran los procesos de la lipoilación proteica y la producción energética (Feng *et al.*, 2009), ya que el ALA interviene en la función de diferentes enzimas que actúan en el ciclo de Krebs y en el metabolismo oxidativo mitocondrial (Longaray-Garcia *et al.*, 2013). A pesar que estas rutas metabólicas se han descrito en mamíferos, en peces se desconoce si estas rutas han sido conservadas a través de la evolución.

En diversos estudios, se ha demostrado que el ALA promueve la biogénesis mitocondrial, esto proporciona una mayor cantidad de energía disponible para las funciones metabólicas celulares (Shen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Fernández-Galilea *et al.*, 2014). El ALA promueve la biogénesis cuando es transformado en DHLA, por medio de la lipoamida deshidrogenasa mitocondrial, lo que modula la tasa de NAD<sup>+</sup>/NADH. Esta disponibilidad de NAD<sup>+</sup> activa las funciones de la

Sirtuina1 (SIRT1), la cual activa la LKB1 (*liver kinase B1*) y que a su vez activa el complejo enzimático Proteína Cinasa Activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) (Chen *et al.*, 2012).



**Fig. 19.** Biosíntesis mitocondrial e incorporación del ácido alfa-lipoico exógeno en organismos. (Modificado por Monroy de la Peña (2018), tomado de Ramaswamy y Maurelli, 2010; Spalding y Prigge, 2010; Storm y Müller, 2012; Clay *et al.*, 2016).

Una vez activada la AMPK fosforila la Proteína 1 $\alpha$  co-activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PCG1- $\alpha$ , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), mientras que SIRT1 deacetila y activa la PGC-1 $\alpha$ . En conjunto, la SIRT1 y AMPK activan la ruta de PGC-1 $\alpha$ , la cual es un co-activador para la transcripción de genes encargados de la biogénesis mitocondrial; tales como los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF1/2, *nuclear respiratory factors*). El acoplamiento de PGC-1 $\alpha$  con NRF1/2, promueven la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM, *mitochondrial transcription factor A*), el cual inicia la replicación del DNA mitocondrial (mtDNA, *mitochondrial DNA*) (Jornayvaz y Shulman, 2010; Dominy y Puigserver, 2013; Zamora y Villena, 2014; Sigler, 2015).