



INVESTIGACION Y DESARROLLO EN NUTRICION ACUICOLA

**Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez,
Denis Ricque Marie, Mireya Tapia
Salazar, Martha G. Nieto López,
David A. Villarreal Cavazos, Julián
Gamboa Delgado, Lus Mercedes López
Acuña y Mario Alberto Galaviz
Espinoza**

Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola
2017, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza

Programa Maricultura Facultad
de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2017

Copias disponibles en:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa Maricultura

Cd. Universitaria A.P. F-67

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

C.P. 66455

Tel.+Fax. 818352 6380

E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Editores

L. Elizabeth Cruz Suárez

Denis Ricque Marie

Mireya Tapia Salazar

Martha G. Nieto López

David A. Villarreal Cavazos

Julián Gamboa Delgado

Lus Mercedes López Acuña

Mario Alberto Galaviz Espinoza

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

Autores del escrito. 2017. Nombre del artículo. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza. Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-0822-8. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

AGRADECIMIENTOS

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias
- Y a la imprenta Universitaria de la UANL por el apoyo brindado para la edición de estas memorias.

Directorio

Ing. Rogelio Garza Rivera
Rector

M.A. Carmen del Rosario de la Fuente García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de publicaciones

Dr. Antonio Guzmán Velasco
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455

Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2017. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Denis Ricque Marie, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha G. Nieto López, ©David A. Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado© Lus Mercedes López Acuña y ©Mario Alberto Galaviz Espinoza.

ISBN: 978-607-27-0822-8. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Índice

<i>Development of antibiofilm biosurfactants from marine bacteria against shrimp Vibrio pathogens</i>	284
G. Seghal Kiran*, Saba Rathnam, Sethu Priyadharsini and Joseph Selvin University of Pondicherry, India	
<i>A Meta-Analysis of Essential Amino Acid Requirements of Fish</i>	303
Guillaume Salze*, Quinton Margaret, and Bureau Dominique P. University of Auburn, USA	
<i>Diversification of Fads2 finfish species: Implications in aquaculture</i>	338
Naoki Kabeya*, Goro Yoshizaki, Douglas R. Tocher, Óscar Monroig University of Tokyo, Japón	
<i>Non-coding RNAs: uncovering their potential relevance in fish nutrition</i>	363
Ignacio Fernández Monzón*, Carlos Alfonso Alvarez-González, Dariel Tovar-Ramírez and Mario Galaviz Universidad de Algarve Portugal	
<i>Enfoques transcriptómicos en el jurel <i>Seriola rivoliana</i></i>	390
Dariel Tovar Ramírez*, Teles, A., Salas-Leiva, J.S., Hernández-Contreras, A., Asencio-Alcudia, G.G., Le Du, J., Burgoin-Cota, M., Alvarez-González, C.A., Llera-Herrera, R., Gisbert, E., Fernández, I., Pérez-Urbiola, J.C., Ibarra-Castro, L., Mazón-Suástegui, J.M., Núñez-Vázquez, E.J., Guzmán-Villanueva, L.T., Reyes-Becerril, M. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste Unidad La Paz, México	
<i>Change in protein digestion capacity during juvenile fish ontogeny: Approach on spotted rose snapper (<i>Lutjanus guttatus</i>)</i>	408
Emyr Peña*, Crisantema Hernández, Carlos Alfonso Álvarez-González Leonardo Ibarra-Castro, Patricia Domínguez-Jiménez Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México	
<i>Synthetic growth hormone secretagogue GHRP-6 exhibits enhanced growth activity and immune system stimulation in teleost fish and shrimp</i>	432
Rebeca Martínez Rodríguez*, Yamila Carpio, Liz Hernandez, Antonio Morales, Fidel Herrera, Reynold Morales y Mario Pablo Estrada. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba	
<i>Protein and amino acid nutrition of marine fish species</i>	439
Helena Peres* and Aires Oliva-Teles Universidad do Porto	
<i>Role of Marine Metabolites in Shrimp Growth, Production and Disease Prevention</i>	498
Anuj Nishanth Lipton*, Joseph Selvin, Seghal Kiran and Aaron Premnath Lipton University of Pondicherry, India	

Enfoques Transcriptómicos en el Jurel *Seriola rivoliana*

Tovar-Ramírez, D.^{1*}, Teles, A.¹, Salas-Leiva, J.S.¹, Hernández-Contreras, A.¹, Asencio-Alcudia, G.G.¹, Le Du, J.¹, Burgoin-Cota, M.¹, Alvarez-González, C.A.², Llera-Herrera, R.³, Gisbert, E.⁴, Fernández, I.⁵, Pérez-Urbiola, J.C.¹, Ibarra-Castro, L.⁶, Mazón-Suástegui, J.M.¹, Núñez-Vázquez, E.J.¹, Guzmán-Villanueva, L.T.¹, Reyes-Becerril, M.¹

¹Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Calle Instituto Politécnico Nacional 195, La Paz, B.C.S. 23096, México, ²Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL-UJAT, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco 96139, México, ³CONACyT - Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Mazatlán, Av. Sábalo-Cerritos s/n. Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa 82000, México, ⁴Unitat de Cultius Aquícoles, IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries), IRTA-SRC, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain, ⁵Centre of Marine Sciences (CCMAR), University of Algarve, Faro, Portugal, ⁶Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Av. Sábalo-Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, México E-mail: dtovar04@cibnor.mx

Resumen

Las investigaciones con las especies del género *Seriola* van en aumento por la importancia económica que representan para varias regiones del planeta. Mediante las herramientas genómicas, el grupo de Fisiología y Genómica Funcional del CIBNOR en colaboración con otras instituciones, están desarrollando diferentes investigaciones que permitirán conocer la biología de la especie y así optimizar la producción de juveniles. Los enfoques planteados en este trabajo comprenden el estudio de la ontogenia de diversos genes que permiten conocer la evolución de algunos componentes del sistema inmune, así como de factores de crecimiento, proliferación y diferenciación celular, en esquemas básicos de alimentación y en presencia de levaduras como probióticos. Tras estos experimentos, el transcriptoma obtenido representa el primer registro bioinformático en extenso para esta especie y permitirá realizar estudios de biología comparativa, expresión de genes seleccionados bajo contextos experimentales diversos (nutrición, metabolismo, inmunología), y se constituye como una base para la exploración de marcadores genético-poblacionales (SNPs, microsatélites). Por otro lado, se presentan datos preliminares del uso de fitobióticos solos o combinados con probióticos, la presencia de toxinas marinas y su efecto en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y al desarrollo de larvas de jurel *Seriola rivoliana*.

Palabras clave: *Seriola rivoliana*; genómica funcional; nutrición

Herramientas genómicas para el estudio de *S. rivoliana*: RNA-Seq y qPCR

Los peces del género *Seriola* han despertado el interés por la iniciativa privada en diversas partes del mundo, siendo las especies *Seriola lalandi*, *S. dumerili*, *S. quinqueradiata* y *S. rivoliana* las más estudiadas. En México se han establecido diversas empresas en la región noroeste, con la finalidad de cultivar *S. rivoliana*, principalmente para engorda, ya que la producción de juveniles es limitada y aún presenta varios cuellos de botella. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la biología básica de esta especie que limita la superación de brechas tecnológicas. Con la implementación de nuevas técnicas de secuenciación masiva de genomas y de transcriptomas, se ha acelerado el conocimiento básico, que nos permite entender aspectos más específicos asociados al desarrollo, metabolismo, crecimiento, nutrición, inmunología y sobre todo de su genética y genómica funcional.

Con el uso de técnicas de genómica funcional como microarreglos, qPCR y RNA-Seq, se han abordado diversos aspectos que nos permiten estudiar efectos sobre numerosos genes relacionados a la inmunología, la digestión, el crecimiento, la diferenciación y proliferación celular y el metabolismo, por ejemplo. Los trabajos de genómica funcional desarrollados por nuestro grupo de trabajo, se han enfocado en *S. rivoliana*, especie cultivada por la empresa Kampachi Farms Co., y que está establecida en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) mediante un convenio de colaboración.

Los estudios de genómica llevados a cabo por el grupo de Fisiología y Genómica Funcional del CIBNOR, se han direccionado desde diferentes puntos de vista, abordando la nutrición, desarrollo ontogénico, inmunología, metabolismo y salud, para entender cómo los factores bióticos y abióticos del cultivo afectan diversos procesos biológicos que nos permitan optimizar las condiciones de cultivo e incrementar la productividad y calidad desde las primeras fases de su desarrollo.

Información genómica primaria: transcriptoma *de novo*

Para lograr el desarrollo práctico de la investigación a nivel molecular de los procesos fisiológicos, consideramos que la plataforma de inicio, podría ser el uso de la información primaria del genoma traducido, es decir, a partir de la secuenciación de los transcritos.

Las estrategias tradicionales para la obtención de transcritos se basaban en la secuenciación dideoxi-terminal (Sanger) de fragmentos parciales de transcritos denominados ESTs (del inglés *expressed sequence tags*) a partir de la generación de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) obtenidas por clonación de fragmentos. Las tecnologías recientes de secuenciación, han permitido facilitar esta tarea, al obtener de forma directa (denominado secuenciación *shotgun*) la secuencia de millones de fragmentos de ADNc para que a través de procesos computacionales de ensambles de secuencias parciales, se reconstruyan los transcritos completos y/o parciales expresados en una muestra biológica. Recientemente, hemos aplicado esta estrategia de obtención del transcriptoma *de novo* en larvas de jurel *S. rivoliana* obtenidas en un cultivo larvario, empleando muestras a los 15 y 30 dpe. Las larvas en ayuno de 12 hrs fueron homogenizadas en TRIzol y el ARN total fue aislado y su integridad fue verificada. A partir del ARN total se generaron librerías de ADNc (TruSeq RNA library kit; Illumina), y las bibliotecas fueron ecualizadas en concentración y secuenciadas en pool en la plataforma NextSeq500 de Illumina, empleando la química de secuenciación de 2x75 ciclos. Con este procedimiento se obtuvieron millones de lecturas totales.

Las secuencias obtenidas fueron depuradas por criterios estrictos de calidad, y los adaptadores fueron removidos con la herramienta Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014). Las secuencias depuradas fueron ensambladas *de novo* mediante el algoritmo de Bruijn implementado en el software Trinity (Grabherr *et al.* 2011). Se generaron traducciones conceptuales con el software Transdecoder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875132/>) y los transcritos y sus traducciones conceptuales fueron anotadas mediante similitud con la base de datos SwissProt, pFAM y Gene Ontology (Tabla 1).

Tabla 1. Estadísticas descriptivas obtenidas a partir del ensamble *de novo* de transcriptoma de *Seriola rivoliana*

<i>Transcritos ensamblados</i>	117,997
<i>Genes identificados</i>	81,680
<i>Tamaño N50 de transcritos</i>	2,015 pb
<i>Proteínas identificadas</i>	63,344
<i>Proteínas completas</i>	32,015
<i>Parciales internos</i>	10,557
<i>Parciales 5'</i>	5' – 16,325
<i>Parciales 3'</i>	3' – 4,447
<i>Proteínas con anotación SwissProt (evaluate < 1e-5)</i>	45,690
<i>Proteínas con término ontológico asignado</i>	19,154

El transcriptoma obtenido constituye el primer recurso bioinformático extenso para la especie *S. rivoliana*, que permitirá realizar estudios de biología comparativa, expresión de genes seleccionados bajo contextos experimentales diversos (nutrición, metabolismo, inmunología), y es una base para la exploración de marcadores genético-poblacionales (SNPs, microsatélites). Los datos se encuentran en proceso de incorporación a bases de datos públicas para ser disponibles a la comunidad científica.

Nutrición (Aditivos Funcionales)

Desde el punto de vista nutricional, se han utilizado diversos aditivos funcionales como los probióticos, para incrementar la maduración digestiva en las primeras fases del desarrollo, y en la etapa juvenil de algunas especies. En este sentido, se han utilizado prebióticos como β -glucanos y simbióticos para estimular el crecimiento y modular la respuesta inmune innata y adaptativa en peces serránidos, así como aceites esenciales extraídos del orégano, y medicamentos homeopáticos para incrementar la respuesta inmune y antioxidante de *S. rivoliana*.

a. Probióticos: levaduras

La fase larvaria del cultivo de peces representa un cuello de botella tecnológico para las especies que se deseen cultivar, dada la fragilidad, el desconocimiento de su fisiología y la

Tovar-Ramírez, D. et al., 2017. Enfoques transcriptómicos en el jurel *Seriola rivoliana*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. (Eds), Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 390-407. ISBN 978-607-27-0822-8.

falta de esquemas de alimentación apropiados en cada una de ellas. Las altas tasas de mortalidad constituyen una brecha importante tecnológica a superar no solo para la industria, sino también para la parte científica porque limita llevar a cabo estudios relacionados al desarrollo, fisiología digestiva, respuesta inmune entre otros. Una de las alternativas para aumentar las tasas de supervivencia y mejora en la salud de larvas de peces marinos, es el uso de probióticos, cuya utilización se incrementa cada vez más debido a los efectos benéficos que éstos aportan al hospedero. Los efectos más relevantes de la administración de la levadura *Debaryomyces hansenii* son la estimulación del crecimiento, maduración digestiva, supervivencia y estatus antioxidante en diversas especies de peces marinos (Tovar *et al.* 2002, 2004, 2010; Guzmán-Villanueva *et al.* 2008; Reyes-Becerril *et al.* 2008a, 2008b, 2011, 2012; Angulo *et al.* 2017; Tapia-Paniagua *et al.* 2011).

Teniendo lo anterior como antecedente, se realizó un experimento por 30 días en el que las larvas de *S. rivoliana* recibieron la levadura *D. hansenii* como suplemento en la dieta (Burgoin 2015). Las larvas fueron suplementadas con levadura a partir del día 5 post-eclosión (dpe), mediante bioencapsulación de la levadura utilizando como vector el alimento vivo (*Artemia* sp. y rotífero, *Brachionus rotundiformis*) donde el 50% del enriquecedor comercial fue sustituido por la levadura (Fig. 1). Una vez enriquecido el alimento vivo, este se administró a las larvas de *S. rivoliana*.

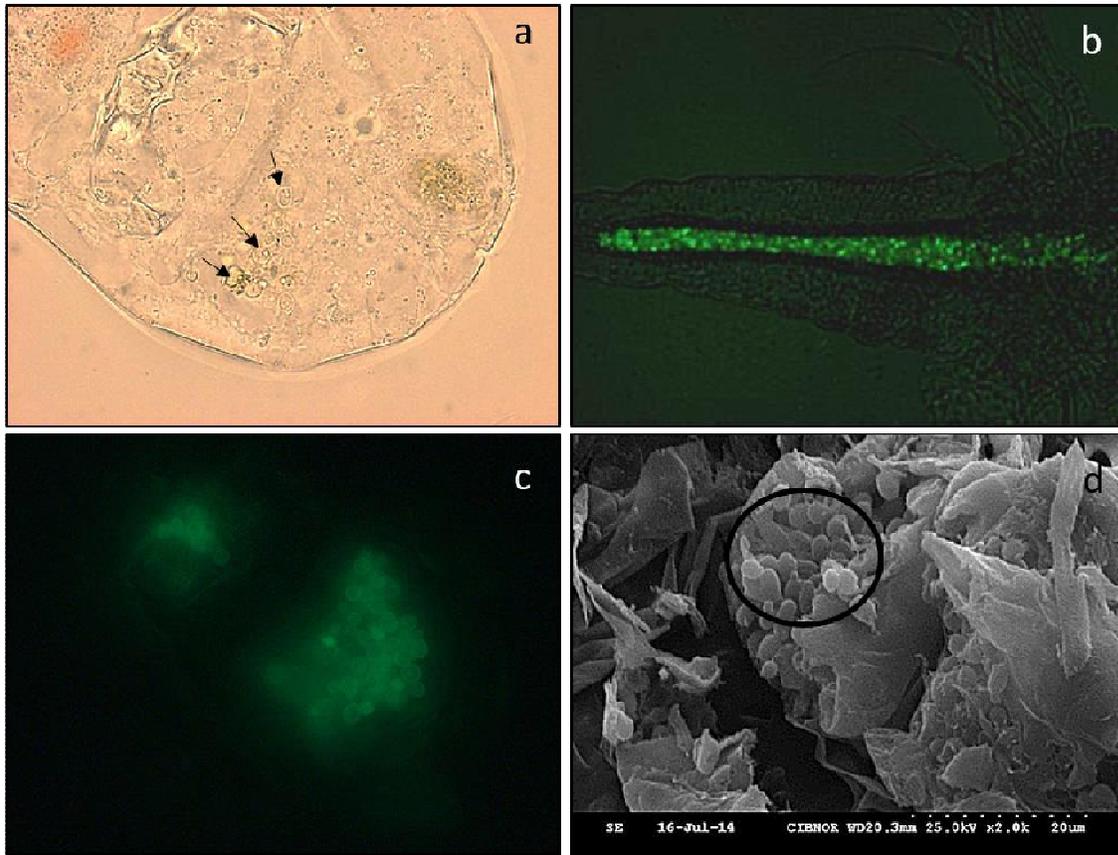


Figura 1. Microscopia de fluorescencia a 40X, donde se aprecian algunas levaduras marcadas con fluoresceína (DTAF) dentro del rotífero y metanauplios de *Artemia* A, B y C. Fig. D microscopia electrónica de barrido a 2000X que muestra el interior del rotífero *B. rotundiformis* con levadura. Flechas y círculo señalan las levaduras en el tracto del rotífero.

El crecimiento y maduración digestiva de larvas de *S. rivoliana* alimentadas con levadura, mostraron un incremento en talla y peso. Por otro lado, para la identificación de los procesos involucrados en la utilización de la levadura como suplemento para larvas de *S. rivoliana*, fueron realizados análisis de expresión génica correspondientes a los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular a través de qPCR. Se analizaron 6 genes de interés donde se pudo observar una mayor expresión del *antígeno nuclear de proliferación celular* (PCNA), *proteína morfogénica ósea* (BMP) quien juega un papel clave en el desarrollo óseo induciendo la diferenciación de células mesenquimales en los precursores de osteoblastos; y el *colágeno del tipo 1 α 1* (COL1 α 1) encontrado en la mayoría de los tejidos

conectivos, así como en el hueso. Aunque no se pudo observar diferencias estadísticas significativas en el *Factor de crecimiento insulínico tipo 1* (IGF1) a los 30 dpe, se pudo observar una mayor expresión del IGF1 en las larvas suplementadas con levadura al día 15 (datos no mostrados). Para el IGF2 y la *hormona de crecimiento* (GH) no se observaron diferencias significativas entre las larvas del control y las alimentadas con levadura al final del experimento (Fig. 2).

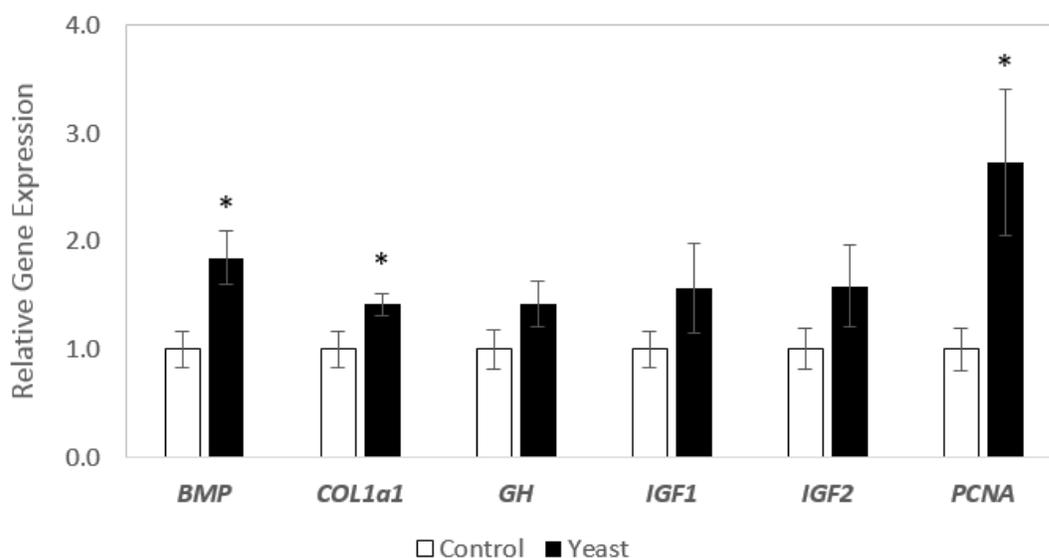


Figura. 2. Expresión relativa de diversos genes involucrados en el crecimiento, inmunología y diferenciación celular de larvas de *S. rivoliana* a los 30 días después de la eclosión en peces alimentados con (Yeast) y sin levadura (Control). La expresión relativa de los genes diana ha sido normalizada al gen de referencia *Factor de elongación 1* (EF1) y de la *Subunidad 18 s ribosomal* (18S). Los datos representan la media \pm D.S. (n=3) de incremento en relación al control (1.0). El asterisco indica diferencias estadísticas significativas entre larvas Control y alimentadas con la levadura (*t*-test, $p < 0.05$).

La expresión de genes clave para el desarrollo, como aquellos involucrados en rutas metabólicas como la de la vitamina D, la síntesis de diversas enzimas digestivas (hidrolasas), metabolismo de polisacáridos, lípidos y actividad ATPasa también fue aumentada (resultados no mostrados). Por otro lado, actualmente se está procediendo al estudio de las rutas

metabólicas estimuladas por la presencia de levaduras, particularmente las involucradas en la proliferación y diferenciación celular, no sólo a nivel morfo-histológico sino también utilizado aproximaciones transcriptómicas de mayor rendimiento como la identificación de los miles/cientos/decenas de genes diferencialmente expresos entre las larvas Control y las alimentadas con la levadura por RNA-Seq.

Para conocer el efecto de los diferentes aditivos funcionales utilizados, es necesario contar con marcadores moleculares de maduración digestiva y respuesta inmune; de tal manera que a lo largo de los primeros 30 días del desarrollo del jurel, se cuantificó la expresión de los genes *Interleukina 1 beta* (IL1B), *Interleukina 10* (IL10), *Gen 88 de respuesta a diferenciación mieloide primaria* (MYD88), y *Fosfatidilinositol sintetasa* (PIS) (Fig. 3). El objetivo de este trabajo fue conocer el patrón de expresión de algunos genes que codifican moléculas relevantes para diferentes respuestas del sistema inmune durante el desarrollo ontogenético. El perfil de expresión se muestra en la Fig. 3.

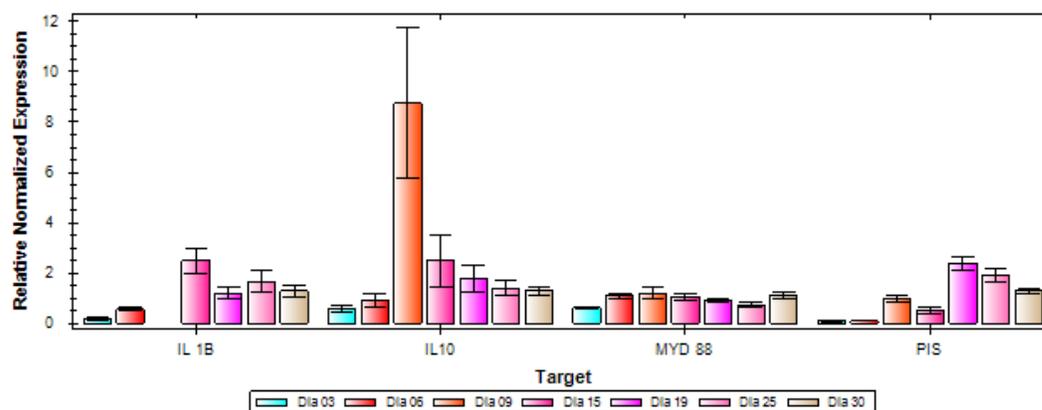


Figura 3. Ontogenia de expresión de algunos genes del sistema inmune como la *Interleukina 1 beta* (IL1B), *Interleukina 10* (IL10), *Gen 88 de respuesta a diferenciación mieloide primaria* (MYD88), y *Fosfatidilinositol sintetasa* (PIS) en larvas de *S. rivoliana* a diferentes días post eclosión. Valores relativos al promedio de la expresión de los genes Ef1 y 18s de *S. rivoliana*.

El análisis de qPCR mostró incrementos significativas para IL-1B al día 15, y en el nivel más bajo de expresión se observó el 03 dpe, y ausencia de transcritos para el 09 dpe. Para IL-10 se observó un incremento significativo de la expresión al 09 dpe con respecto al tiempo y a los niveles de los otros genes analizados en este experimento. MyD88 se expresó constantemente y no presentó variaciones significativas en su regulación a través del tiempo. El nivel más alto de expresión para PIS fue el 19 y 25 dpe.

El conocimiento del desarrollo larvario, así como el optimizar la nutrición y reforzar la respuesta inmune, son aspectos que permiten abatir las mortandades de los peces que están siendo considerados como especies emergentes para la industria.

b. Fitobióticos: Experiencias en la combinación de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) y probióticos (*Debaryomyces hansenii*)

Recientemente, y aunque en menor escala, los fitobióticos han sido utilizados como inmunoestimulantes, aunque con resultados prometedores (Van Hai *et al.* 2015). Se definen como productos obtenidos de plantas que son añadidos al alimento para incrementar el rendimiento de animales destinados al consumo humano y generalmente incluyen hierbas, especias, aceites esenciales y oleoresinas entre otros (Windisch *et al.* 2008). En los últimos años, se ha estudiado el efecto inmunomodulador de algunos aceites esenciales y de compuestos aromáticos incluidos en ellos, principalmente los terpenos. Entre estos compuestos, el carvacrol es un inmunomodulador y promotor del crecimiento en peces. Por otro lado, sus efectos en el sistema inmune se han estudiado a nivel celular, molecular e histológico en diversos modelos animales (Karkabounas *et al.* 2006; Lee *et al.* 2008; Hotta *et al.* 2010; Choet *et al.* 2012; Lima *et al.* 2013).

La combinación de probióticos y fitobióticos podría constituirse como una estrategia responsable con el medio ambiente en el desarrollo de futuros aditivos funcionales para peces. El trabajo de Hassan y Soltan (2016), es el primer estudio que explora la posibilidad de incluir aceites esenciales de plantas medicinales y bacterias probióticas al mismo tiempo, obteniendo buenos resultados en el crecimiento y en algunos parámetros relacionados con la salud de los peces. Recientemente, Hernández-Contreras *et al.*, (com. personal) incorporaron

aceite esencial de orégano y la levadura *D. hansenii*, por separado y en combinación, en piensos para juveniles de *S. rivoliana*. En estos peces se analizó los efectos sobre el crecimiento, el sistema inmune innato, el estatus oxidativo y el crecimiento luego de seis semanas de alimentación con 4 dietas: control (sin aditivos), con levadura viva (1.1% de inclusión), con 500 mg kg⁻¹ de aceite esencial de orégano (OEO), y levadura + orégano. Como resultado inicial, se obtuvo que los peces aceptaron adecuadamente todas las dietas experimentales con factores de crecimiento y conversión alimenticia excepcionales con respecto a otras especies y similar al reportado por Kissinger *et al.* (2016). Los resultados obtenidos en parámetros sanguíneos, mucus y expresión de genes del sistema inmune mostraron un efecto superior con el uso de los aditivos por separado, y más potente en el caso de la levadura. Sin embargo, la combinación de los tratamientos tuvo un efecto negativo. Por otro lado, el mayor nivel de expresión de MyD88 en riñón cefálico, con un papel central en el sistema inmune, se observó con la dieta que contenía aceite esencial de orégano; el resto de genes se expresaron con un nivel más alto en el grupo alimentado con la dieta con levadura. En los peces alimentados con la combinación de aditivos, los tres genes relacionados con el sistema inmune fueron sub-expresados con respecto a los de la dieta control (Fig. 4).

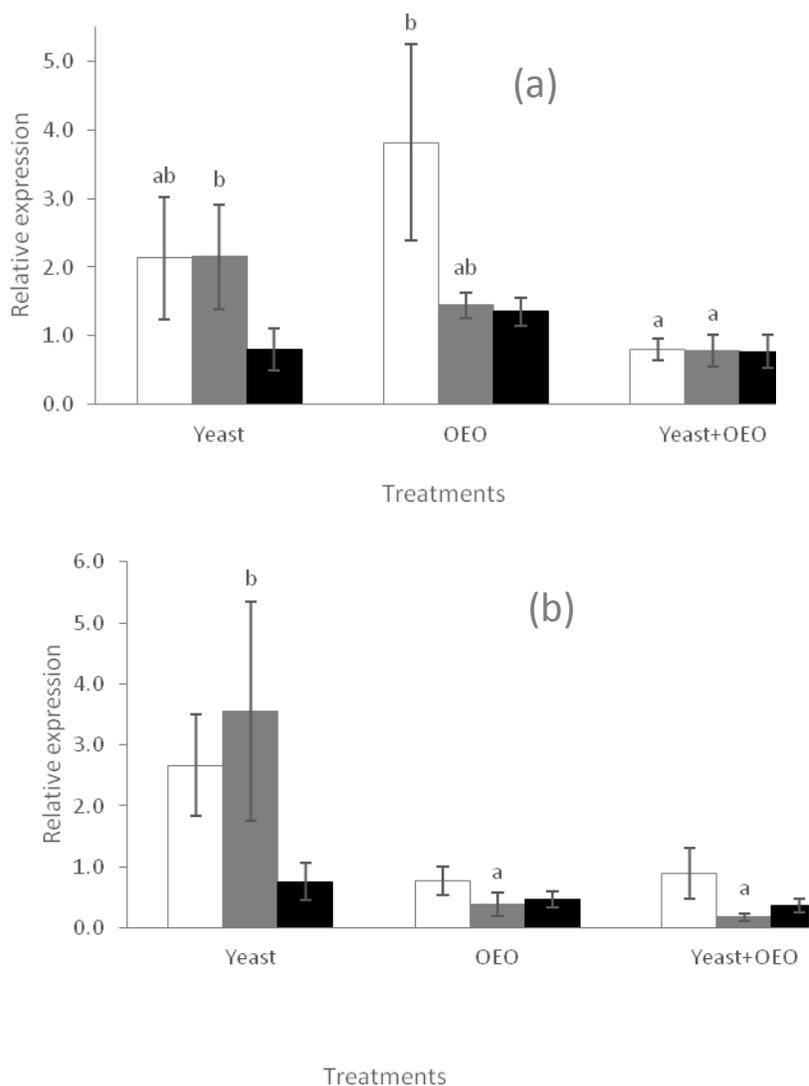


Figura 4. Expresión relativa de los genes *Gen 88 de respuesta a diferenciación mieloide primaria* (MyD88) (blanco), *Tumor necrosis factor* (TNF- α) (gris) y piscidina (negro) en el riñón cefálico (a) y en el bazo (b) de jurel alimentado durante seis semanas con cuatro dietas (control, *D. hansenii* (Yeast), aceite esencial de orégano (OEO) y *D. hansenii* + OEO (Yeast + OEO)). Los datos representan la media \pm D.S. (n=3) de incremento en relación al control (1.0). Letras diferentes expresan diferencias significativas entre grupos (p < 0.05).

Salud

a. Toxicogenómica

Uno de los mayores retos en los estudios de toxicología, es conectar la respuesta de genes con los fenotipos estresantes ambientales (Pavey *et al.* 2012). Para hacer frente a este desafío se requiere integrar enfoques interdisciplinarios que permitan entender los procesos que actúan en los diferentes niveles de organización, desde los ecosistemas hasta los genes. Conocer los efectos de las toxinas en el transcriptoma, es una herramienta comúnmente utilizada hoy, ya que muestra una visión crucial de los procesos biológicos afectados y su mecanismo de acción.

Dada la problemática de la aparición de intoxicaciones producidas por diversas toxinas marinas en organismos de importancia económica y su repercusión en la salud humana por su consumo; y por otro lado, el crecimiento y futuro de la industria de cultivo de peces marinos, es importante efectuar investigaciones para determinar los mecanismos implicados en la toxicidad, así como encontrar métodos de prevención y monitoreo. En el CIBNOR, se ha abordado esta problemática desde varios puntos de vista interdisciplinarios, desde aislamiento, identificación y caracterización de las toxinas producidas por organismos marinos hasta el establecimiento de métodos moleculares de detección, y programas de monitoreo.

El ácido okadaico (AO), entre otras toxinas marinas, es producido por varias especies de dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*, siendo responsable de problemas de salud humana asociados al consumo de algunos mariscos, tales como náusea, vómito, diarrea, dolores abdominales (Aune *et al.* 2012), se ha comprobado que inhiben las proteínas fosfatasa del tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A) (Biolojan & Takai, 1988), implicadas en varios procesos intracelulares importantes como la contractibilidad, metabolismo, transcripción y mantenimiento del citoesqueleto (Traoré *et al.* 2003; Ehlers *et al.* 2010). Otro ejemplo es la saxitoxina (STX) y análogos (PSP) son toxinas paralizantes, solubles en agua y que actúan bloqueando los canales de sodio de las neuronas y son producidas por algunos dinoflagelados y algunas cianobacterias en mares tropicales y subtropicales, pero también en agua dulce (Da

Silva *et al.* 2014). Algunos reportes, aunque no concluyentes, indican que existen evidencias de genotoxicidad asociada a eventos de estrés oxidativo, por lo que algunos de los mecanismos de la toxicidad aún son desconocidos en peces y eso representa una oportunidad de estudio importante para la caracterización de su impacto en la industria agroalimentaria relacionada con la pesquería y/o la acuicultura.

Debido a que los peces son componentes de los sistemas acuáticos y que constituyen parte importante de la cadena trófica y alimento para los humanos, actúan como centinelas ambientales en la ecotoxicología. El pez cebrá y la tilapia son peces dulceacuícolas que han sido usados como modelo en ecotoxicología (Zhou *et al.* 2005), sin embargo, los eventos de toxicidad más importantes y donde ocasionan pérdidas millonarias, se dan en el medio marino, que constituye el medio donde se generará la futura producción que surtirá la cadena alimenticia humana. Los trabajos que se realizan por el grupo de Fisiología y Genómica Funcional en esta área, han permitido conocer el efecto de la presencia de toxinas marinas sobre el desarrollo embrionario y larvario del jurel *S. rivoliana*, lo cual constituye un factor limitante en la disponibilidad de larvas y juveniles en su ambiente de reclutamiento.

Para conocer el efecto de la presencia del AO y STX durante el desarrollo embrionario y larvario inicial de *S. rivoliana*, se desarrollaron varios experimentos en el CIBNOR para conocer la respuesta transcriptómica en estas etapas. Por un lado se observó que la expresión de la *proteína morfogénica ósea* (BMP) y del *antígeno nuclear de proliferación celular* (PCNA), disminuyen naturalmente de las 8 a las 28 horas del desarrollo embrionario, pero en dosis bajas de ácido okadaico se estimula su expresión (Fig. 5 y 6). En el caso de la BMP, ésta es requerida durante la embriogénesis para la organización del segmento caudal y mesodermo ventral, evitando la formación de dos colas por ejemplo cuando su expresión se ve alterada. La expresión de la PCNA es importante durante las primeras horas del desarrollo por la proliferación celular acelerada y posterior diferenciación en los diferentes tejidos y órganos. Ambos valores de expresión son modificados durante la embriogénesis, pero mayormente significativos en dosis bajas de AO (Fig. 6).

Desde el punto de vista del metabolismo lipídico, la presencia de toxinas marinas como el AO y la STX inducen la expresión de genes como el de la lipasa pancreática, sin embargo, ambas toxinas inhiben el desarrollo embrionario y la eclosión.

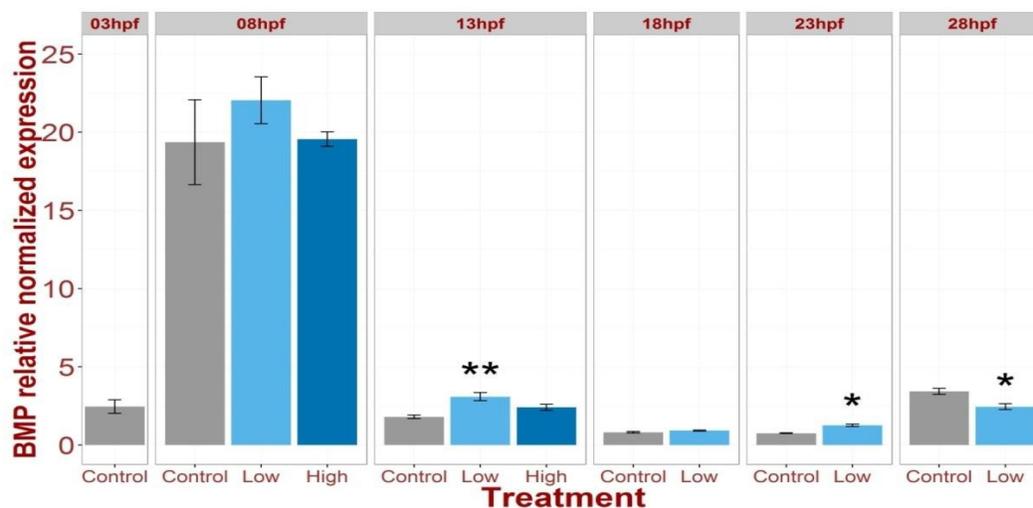


Figure 5: Valores medios de expresión relativa de la *proteína morfogénica ósea* (BMP) en embriones de *S. rivoliana* expuestos al ácido okadaico (AO) durante 28 horas post-fertilización (hpf). Control: huevos cultivados sin AO; Low: huevos cultivados a dosis baja de AO ($120\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ AO eq.), High: huevos cultivados con dosis alta de AO ($175\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ AO eq.). Valores con diferencia significativa contra el control son señalados con “*” y “**” con significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. Para la expresión está referida al gen de referencia Efl

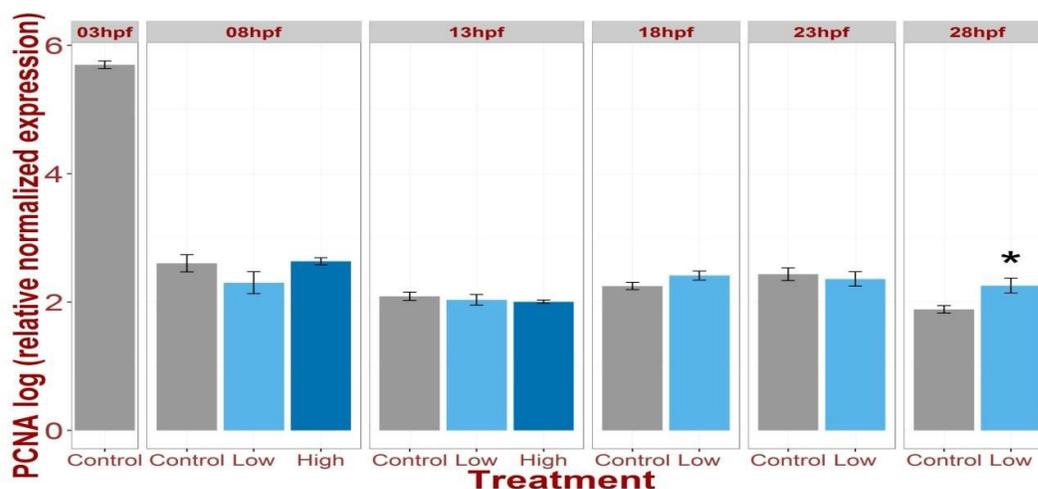


Figure 6: Valores medios de expresión relativa del *anticuerpo nuclear de proliferación celular* (PCNA) en embriones de *S. rivoliana* expuestos al ácido okadaico (AO) durante 28 horas post-fertilización (hpf). Control: huevos cultivados sin AO; Low: dosis baja de AO ($120\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ AO eq.), High: huevos cultivados con dosis alta de AO ($175\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ AO eq.). Valores con diferencia significativa contra el control son señalados con “*” y “**” con significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. Para la expresión está referida al gen de referencia Efl.

Perspectivas

Los estudios de nutrigenómica y transcriptómica aportan conocimiento de vanguardia y complementan las técnicas tradicionales, aportando un conocimiento para describir la biología de nuevas especies de interés en acuicultura. Los estudios que actualmente se desarrollan en el CIBNOR con el jurel *Seriola rivoliana*, incluyen la fisiología digestiva bajo diferentes aditivos funcionales, inmuoestimulación temprana con medicamentos homeopáticos y uso de fuentes proteicas alternativas para su engorda y el uso de embriones para describir procesos de toxicología y metabolismo lipídico, son solo algunos de los ejes de investigación que darán como resultado la generación de conocimiento de frontera, con aplicabilidad en el desarrollo, innovación y mejora continua de protocolos de cultivo y tecnologías de producción de esta especie.

Agradecimientos

A la empresa Kampachi Farms por las facilidades en la obtención de huevos y embriones; a la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, B.M. Jorge Sandoval Soto, Dr. Marcos Quiñones Arreola, M.C. Pablo Monsalvo Spencer, Delfino Barajas, Pablo Ormart por el apoyo técnico otorgado. IF ha sido financiado por la Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) con una beca postdoctoral (Referencia: SFRH/BPD/82049/2011). Los autores también agradecen el soporte de la RED LARVAplus “Estrategias de desarrollo y mejora de la producción de larvas de peces en Iberoamérica” (117RT0521) financiada por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Literatura citada

- Angulo C, Maldonado M, Delgado K, Reyes-Becerril M (2017) *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Developmental & Comparative Immunology* 71: 18-27
- Augimeri RV, Strap JL (2015) The phytohormone ethylene enhances cellulose production, regulates CRP/FNR(Kx) transcription and causes differential gene expression within the bacterial cellulose synthesis operon of *Komagataeibacter* (*Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582. *Frontiers in Microbiology* 6: 1459.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Burgoin-Cota M (2015) Estudio de la incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Brachionus rotundiformis* durante los primeros días de desarrollo del jurel *Seriola rivoliana*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis maestría. 87 p.
- Cho S, Choi Y, Park S, Park T (2012) Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet, *J. Nutr. Biochem.* 23: 192-201, doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.016.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7), 644-6452. doi: 10.1038/nbt.1883. PubMed PMID: 21572440.
- Guzmán-Villanueva LT, Ascencio-Valle F, Macías-Rodríguez ME, Tovar-Ramírez D (2013) Effects of dietary β -glucan 1,3/1,6 on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. *Fish. Physiol. Biochem.* 40: 827-837.
- Hassaan MS, Soltan MA (2016) Evaluation of Essential Oil of Fennel and Garlic Separately or Combined with *Bacillus licheniformis* on the Growth, Feeding Behaviour, Hemato-biochemical Indices of *Oreochromis niloticus* (L.) Fry, *J. Aquac. Res. Dev.* 7: 4-11.
- Hotta M, Nakata R, Katsukawa M, Hori K, Takahashi S, Inoue H (2010) Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression, *J. Lipid Res.* 51: 132-139. doi:10.1194/jlr.M900255-JLR200.
- Karkabounas S, Kostoula OK, Daskalou T, Veltsistas P, Karamouzis M, Zelovitis I, et al. (2006) Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol, *Exp. Oncol.* 28: 121-125.
- Kissinger KR, García-Ortega A, Trushenski JT (2016) Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture* 452: 37-44. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.022.

- Navarrete P, Tovar-Ramírez D (2014) Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture, sustainable aquaculture techniques. In Hernandez-Vergara M (Ed.), ISBN: 978-953-51-1224-2, InTech, DOI: 10.5772/57196. Available from: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-aquaculture-techniques/use-of-yeasts-as-probiotics-in-fish-aquaculture>
- Le Du J, Tovar-Ramírez D, Núñez-Vázquez EJ (2017) Embryotoxic effects of dissolved okadaic acid on the development of Longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquatic Toxicology* 190: 210-216.
- Lima MDS, Quintans-Júnior LJ, De-Osantana WA, Martins-Kaneto C, Pereira-Soares MB, Villarreal CF (2013) Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10, *Eur. J. Pharmacol.* 699: 112-117. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.040.
- Pavey SA, Bernatchez L, Aubin-Horth N, Landry CR (2012). What is needed for next-generation ecological and evolutionary genomics?. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 673-678.
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-López V, Barbosa-Solomieu V (2008) Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* 280: 39-44.
- Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, Meseguer J, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, et al. (2008) Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25: 731-739.
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-Lopez V, Barbosa-Solomieu V, et al. (2011) Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture Research*, 42: 1676-1686.
- Reyes-Becerril MC, Ascencio-Valle F, Meseguer J, Tapia-Paniagua ST, Moriñigo MA, Esteban MA (2012) *Debaryomyces hasenii* L2-enriched diets enhance the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture research* 43(8): 1107-1118
- Tapia-Paniagua S T, Reyes-Becerril M, Ascencio-Valle F, Esteban MA, Clavijo E, Balebona MC, et a. (2011) Modulation of the intestinal microbiota and immune system of farmed *Sparus aurata* by the administration of the yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in conjunction with inulin. *J Aquac Res Develop S*, 1.
- Teles A, Salas-Leiva J, Alvarez-González CA, Gisbert E, Ibarra-Castro L, Pérez-Urbiola JC, et al. (2017) Histological and histochemical study of gastrointestinal tract of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae, *Fish. Physiol. Biochem*, DOI: 10.1007/s10695-017-0397-5.
- Tovar-Ramirez D, Mazurais D, Gatesoupe JF, Quazuguel P, Cahu CL, Zambonino-Infante JL (2010) Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300: 142-147.

- Tovar D, Zambonino J, Cahu C, Gatesoupe FJ, Vázquez-Juárez R, Lésel R (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture* 204: 113-123.
- Tovar-Ramírez D, Zambonino J, Cahu C, Gatesoupe FJ, Vázquez-Juárez R (2004) Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234: 415-427.
- Van Hai N (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review, *Aquaculture*. 446: 88-96.
- Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A (2008) Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86: E140-148.