

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL INTESTINO DISTAL EN JUVENILES  
DE *Totoaba macdonaldi* ALIMENTADOS CON DIFERENTES NIVELES DE  
CONCENTRADO PROTEICO DE SOYA.**

**T E S I S**

**PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**Gustavo Alexis Cárdenas López**

**Ensenada, Baja California, México a 25 de abril de 2025**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**

**PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL INTESTINO DISTAL EN JUVENILES  
DE *Totoaba macdonaldi* ALIMENTADOS CON DIFERENTES NIVELES  
DE CONCENTRADO PROTEICO DE SOYA.**

TESIS


PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA


**Gustavo Alexis Cárdenas López**

Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ernesto Larios Soriano  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Lus Mercedes López Acuña  
Codirectora de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Samuel Sánchez Serrano  
Sinodal

## DEDICATORIA

*A mis padres por educarme, por su apoyo y por el amor que nos han brindado a través de los años.*

*A mi cuata Valeria que siempre hemos estado juntos y por estar ahí para mí en mis momentos difíciles y felices, no hay palabras para agradecerte.*

*A mis perros Capi y Freya que me han mantenido sano y muy querido.*

*A mis amigos autistas Shey, Pabis que me han hecho sentir que no estoy solo y que somos personas que merecemos ser entendidas, gracias por aparecer en mi vida.*

*A mis amigos de Calabozos and Dragones Isa, Thomas, Frank, Raúl y Aket, gracias por darme un lugar seguro para expresarme y divertirme con ustedes.*

*Y finalmente agradezco a todos los que han estado presentes de alguna manera en este proceso.*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco la Universidad Autónoma de Baja California por la oportunidad de estudiar en la Facultad de Ciencias Marinas y poder continuar formándome en el posgrado de Oceanografía Costera. Agradezco al Grupo de Investigación en Nutrición Acuícola por el espacio en sus instalaciones y la oportunidad de trabajar y aprender de cada uno de ellos y de ellas.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, CONAHACYT, por la oportunidad de recibir la beca (1255891) para lograr continuar con mi formación como Maestro en Ciencias. Así como, al proyecto (SADER-CONHACYT 291837) que financió mi investigación.

A mis directores de tesis Dra. Lus Mercedes López Acuña y Dr. Ernesto Larios por su orientación, paciencia, apoyo y compromiso. Sus conocimientos y comentarios fueron cruciales para mi desarrollo en este proyecto y siempre estaré agradecido por su tiempo y dedicación.

A mi sinodal Dr. Mario Galaviz por su ayuda en todo momento, a la Dra. Laura López Galindo por apoyarnos con equipo para análisis moleculares. A la técnica Samantha Victoria Cota por apoyarme con los experimentos y la parte técnica.

Quiero expresar mi sincera gratitud a todas las personas que hicieron posible este mi proyecto académico, ya que cada una de ellas ha dejado una marca significativa en este camino de emprendimiento académico.

A mis compañeros de posgrado Vladimir Montoya, José Politrón, Paulina Pérez, Natalye Manríquez, Camila Bernal, Andrea Mungia, Leslie Soto y Elisa Villegas por compartir su tiempo, las risas, los momentos de cafecito y chisme que hicieron que este proceso fuera más llevadero.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTO .....	4
ÍNDICE GENERAL .....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
RESUMEN.....	8
<i>Palabras Claves</i> .....	8
ABSTRACT .....	9
<i>Keywords:</i> .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1. Partes del intestino y su funcionamiento.....	14
2.2. Concentrado proteico de soya y factores antinutricionales (FANs).....	15
2.3. Enteritis en peces carnívoros .....	16
2.4. Deficiencia de aminoácidos en el CPS (concentrado proteico de soya) .....	17
2.5. Uso de transcriptómica en estudios de nutrición acuícola .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo General .....	20
5.2. Objetivo Específicos .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Análisis de calidad de secuenciación con FASTQC.....	25
Limpieza de secuencias con TRIMMOMATIC.....	26
Ensamble de transcriptoma con Trinity .....	26
Validación de ensamble con TRANSRATE .....	27
Análisis de expresión génica.....	27
Enriquecimiento de procesos biológicos .....	28
7. RESULTADOS.....	30
8. DISCUSIÓN .....	39
Efecto de la harina de pescado como fuente principal de proteína en el transcriptoma intestinal de totoaba: nivel de procesos biológicos.....	39

Efecto de la dieta a base de harina de pescado como fuente principal de proteína en el transcriptoma intestinal de totoaba: nivel de genes.....	42
Procesos biológicos afectados por el CPS30 (concentrado proteico de soya al 30%)...44	44
Genes afectados en CPS30 (concentrado proteico de soya al 30%).....	45
Procesos biológicos afectados por en CPS60 (concentrado proteico de soya al 60%) .	47
Genes afectados por en CPS60 (concentrado proteico de soya al 60%).....	49
9. CONCLUSIONES .....	51
10. REFERENCIAS .....	53
ANEXO.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de ingredientes de los alimentos que contienen 30 y 60% de CPS (concentrado proteico de soya).....	24
Tabla 2. Principales genes extraídos del enriquecimiento funcional en el tratamiento con inclusión de harina de pescado .....	36
Tabla 3. Principales genes extraídos del enriquecimiento funcional con el tratamiento con 30% de inclusión de CPS (concentrado proteico de soya).....	37
Tabla 4. Principales genes extraídos del enriquecimiento funcional con el tratamiento con 60% de inclusión de CPS (concentrado proteico de soya).....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfiles de transcritos diferencialmente expresados en el intestino distal de <i>Totoaba macdonaldi</i> en cada tratamiento (columnas).....	31
Figura 2. Proporción de transcritos específicos en cada tratamiento .....	32
Figura 3. Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con harina de pescado (HP).....	33
Figura 4. P Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con inclusión del 30% de concentrado proteico de soya (CPS30) .....	34
Figura 5. Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con inclusión del 60% de concentrado proteico de soya (CPS60).....	35

## RESUMEN

El concentrado proteico de soya (CPS) es un ingrediente sostenible para la formulación de alimentos para la acuicultura y su producción es razonable cuando se compara con la harina de pescado (HP). Sin embargo, la harina de soya y el CPS contiene factores antinutricionales (FANs), los cual puede afectar de manera negativa la digestión y la salud de especies de peces marinos carnívoros. Además, el CPS no cuenta con ciertos aminoácidos como la metionina y taurina que son indispensables para el crecimiento y salud óptima de algunos peces carnívoros marinos de aguas cálidas como *Totoaba macdonaldi*. Por otro lado, la transcriptómica es una herramienta que permite observar el total de transcritos de RNA dentro de las células bajo determinadas condiciones. Estas técnicas nos dan una idea de los procesos celulares que están activos y no activos a través de la valoración de los elementos expresados del genoma. De esta manera es posible la interpretación de las respuestas de totoaba alimentada con fuentes alternativas de proteína como el CPS. Hasta el día de hoy, son pocos los estudios de nutrigenómica desarrollados en *T. macdonaldi*, por ello, la presente tesis tiene como objetivo determinar el efecto de la suplementación de CPS en la dieta a través de la valoración del transcriptoma del intestino distal. Los organismos fueron alimentados con dietas que contenían diferentes niveles de inclusión de CPS con un 30 y 60% (CPS30 y CPS60, respectivamente) y una dieta control que contenía HP como fuente principal de proteína, y se identificaron a través de transcriptómica los principales procesos biológicos afectados por el efecto de las dietas. Después de analizar el transcriptoma del intestino distal de totoaba se encontraron 99,261 transcritos los cuales tuvieron diferentes niveles de expresión en cada tratamiento. Estos genes se pueden agrupar en diferentes procesos biológicos dependiendo de la dieta que consumieron. Para los peces que consumieron la dieta control presentaron: Metabolismo de nucleósidos y ribonucleósidos (procesos para la síntesis de RNA y DNA), así como, mecanismos para generación de energía (fosforilación oxidativa). Por otro lado, en los organismos que consumieron CPS30 se observaron indicadores que mostraron inflamación (respuesta a la interleucina-1), al igual, se observaron respuestas inmunológicas antimicrobial y virales indicando un probable daño en el intestino distal. Los organismos que se alimentaron con la dieta CPS60 presentaron procesos biológicos como: metabolismo de proteínas, metabólicos celulares, metabólicos de sustancias orgánicas, metabólicos de macromoléculas, también presentaron procesos biológicos que están asociados a la apoptosis. Por todo lo anterior, el presente estudio demostró que las dietas basadas en harina de pescado promueven procesos metabólicos esenciales para la replicación celular, la generación de energía y el mantenimiento de la fisiología intestinal saludable. Sin embargo, las dietas con altos niveles de CPS, generan efectos adversos en la salud intestinal, como inflamación, disbiosis y apoptosis. Esto subraya la necesidad de evaluar cuidadosamente la proporción de CPS en las dietas de *T. macdonaldi* para optimizar su crecimiento y bienestar.

**Palabras Claves:** Transcriptómica, modulación génica, concentrado proteico de soya, bioinformática, *Totoaba macdonaldi*.

## ABSTRACT

Soy protein concentrate (SPC) is a sustainable ingredient, for aquaculture feed formulation, and its production is more sustainable compared to fishmeal (FM). However, soybean meal and SPC contain antinutritional factors (ANFs), which can negatively affect digestion and the health of marine carnivorous fish species. Additionally, SPC lacks certain essential amino acids such as methionine and taurine, which are indispensable for the optimal growth and health of some warm-water marine carnivorous fish, such as *Totoaba macdonaldi*. On the other hand, transcriptomics is a tool that allows us to observe the total RNA transcripts within cells under specific conditions. These techniques provide insight into which cellular processes are active or inactive by evaluating the expressed elements of the genome. This approach enables the interpretation of gene functions and the measurement of gene expression in totoaba fed with alternative protein sources such as SPC. To date, few nutrigenomic studies have had been conducted on the intestine of *T. macdonaldi*. Therefore, the study aims to determine the effect of SPC supplementation in the diet by evaluating the transcriptome of the distal intestine. The organisms were fed diets containing 30 and 60% SPC inclusion levels (CPS30 and CPS60, respectively), with fishmeal (FM) as the main protein source, and the primary biological processes affected by SPC were identified. After analyzing the transcriptome of the distal intestine of totoaba, 99,261 transcripts were found, showing different levels of expression depending on the treatment. These genes can be grouped into different biological processes based on the diet consumed. Fish fed with FM exhibited processes related to nucleoside and ribonucleoside metabolism (essential for RNA and DNA synthesis) as well as energy production mechanisms (oxidative phosphorylation). In contrast, organisms fed the CPS30 diet showed indicators of inflammation (response to interleukin-1), as well as antimicrobial and viral immune responses, suggesting potential damage to the distal intestine. Fish fed the CPS60 diet exhibited biological processes related to protein metabolism, cellular metabolism, organic substance metabolism, macromolecule metabolism, and processes associated with apoptosis. Overall, this study demonstrated the fishmeal-based diets promote essential metabolic processes for cell replication, energy generation, and maintaining healthy intestinal physiology. However, diets with high levels of SPC have adverse effects on intestinal health, including inflammation, dysbiosis, and apoptosis. These findings highlight the need for careful evaluation of SPC inclusion levels in *T. macdonaldi* diets to optimize growth and overall well-being.

**Keywords:** Transcriptomics, gene modulation, soy protein concentrate, bioinformatics, *Totoaba macdonaldi*

## 1. INTRODUCCIÓN

La nutrición es uno de los factores más importantes para el desarrollo de la acuicultura sustentable en el mundo. Los peces carnívoros, por ejemplo, requieren un perfil de proteínas y lípidos muy específico para mantener un alto desempeño fisiológico y salud bajo las diferentes condiciones de cultivo (FAO *et al.*, 2022). Cabe señalar que la fuente de proteína con mayor demanda para la formulación de dietas para la acuicultura es la harina de pescado (HP), lo que ha generado en los últimos años un incremento en la demanda y precios de este insumo debido a su escases (Naylor *et al.*, 2009). Por tal motivo, es de suma importancia formular dietas con los ingredientes correctos que provean los requerimientos de aminoácidos y ácidos grasos de acuerdo con cada especie. De esta manera, uno de los nuevos retos para la acuicultura sustentable es buscar alternativas proteicas que sean más accesibles.

Como alternativas a la HP, se conoce que el concentrado proteico de soya (CPS) es una alternativa proteica con uno de los niveles más altos de proteína (52-65%) de las fuentes vegetales. Además, el CPS es uno de los ingredientes con menores cantidades de factores antinutricionales (ANFs) en comparación con la soya entera (Fuentes-Quesada *et al.*, 2017). Debido a su disponibilidad y alto contenido de proteína, además de un perfil amplio de aminoácidos, en las últimas dos décadas el CPS ha sido implementado en la formulación de dietas para el cultivo de organismos carnívoros (Gatlin *et al.*, 2007). Para disminuir los efectos negativos que provocan los ANFs en la fisiología intestinal de los peces carnívoros se realizan a la harina de soya varios procesos tales como tratamientos térmicos, enzimáticos y/o fermentativos. Estos tratamientos en la soya mejoran su digestibilidad proteica debido a la importante disminución de los porcentajes de ANFs como las saponinas, lectinas, ácido fítico, alcaloides, oligosacáridos y antígenos (Zhou *et al.*, 2011;

[Kumar et al., 2020](#)). La disminución de los ANFs es de suma importancia ya que se ha estudiado que estos pueden afectar a peces carnívoros al generar pérdida de integridad de la mucosa intestinal provocando enteritis, y por consecuencia, disminución de la capacidad de absorción de nutrientes y pérdida de peso ([Krogdahl et al., 2010](#)).

Uno de los efectos más notorios al utilizar soya (o sus derivados como el CPS) para la formulación de las dietas para peces carnívoros marinos es la posibilidad de ocasionar una disbiosis intestinal. La disbiosis intestinal es una afectación que genera inflamación crónica la cual dificulta la absorción de los nutrientes, además provoca susceptibilidad a la entrada de patógenos oportunistas, todo esto dependiendo de la proporción de inclusión de soya o CPS en la formulación de la dieta ([Kumar et al., 2020](#)). Además, otro de los problemas del CPS es que en sus perfiles de aminoácidos puede existir deficiencias de tres aminoácidos: metionina, cisteína, así como taurina, la cual es indispensable para evitar la enfermedad del síndrome de hígado verde en *T. macdonaldi* ([López et al., 2015](#)). A pesar del todo el conocimiento con el que se cuenta actualmente sobre el efecto de la soya en la fisiología intestinal de los peces, aún se buscan las mejores estrategias para su uso. Por ejemplo, en el caso de la totoaba, además de sustituir a la HP en proporciones entre 15 y 30%, no mayor a 40%, también se requiere la suplementación de las dietas con aminoácidos (específicamente taurina). Estas estrategias parecen cubrir los requerimientos de la totoaba, sin embargo, estudios recientes demuestran que en peces carnívoros los efectos del CPS pueden ser más amplios y no tan fácil de diagnosticar.

Actualmente, los estudios de transcriptómica son muy importantes ya que nos permiten realizar una valoración de los elementos funcionales del genoma. Estos análisis permiten la interpretación de las funciones fisiológicas de los genes que codifican diferentes moléculas, así mismo, es posible realizar una cuantificación de la expresión de estos genes

en condiciones diversas (Liu *et al.*, 2013; Chandhini y Kumar, 2019). De tal manera que los trabajos de transcriptómica son de suma importancia debido a que permite observar el total de transcritos de RNA dentro de las células, lo cual nos da una idea de los procesos celulares que están activos y no activos. Por ello, la transcriptómica nos puede ayudar a caracterizar las respuestas fisiológicas de los organismos expuestos a condiciones experimentales a un nivel diferente al que tradicionalmente se han evaluado. Por ejemplo, en el estudio de Kiron *et al.* (2020) se observó que se sobre expresaron 53 genes y se sub expresaron 38 genes en muestras de intestino distal en el salmón del Atlántico (*S. salar*) alimentado con ingredientes derivados de soya. Los genes evaluados en este mismo estudio indicaron signos de inflamación, así como otros procesos biológicos relacionados con transporte de nutrientes y metabolismo. De esta manera, la implementación de transcriptómica en estudios de nutrición acuícola puede ayudar a dilucidar el espectro de procesos biológicos afectados con el uso de elementos alternativos de las dietas y con ello explorar alternativas que generen una nutrición óptima.

El intestino de peces carnívoros es un órgano importante para la digestión y absorción de nutrientes obtenidos a través de la alimentación y por lo tanto tiene un rol en el mantenimiento del metabolismo energético y desempeño fisiológico (Bakke *et al.*, 2010). Además, este órgano es fundamental ya que actúa como barrera inmunológica contra patógenos evitando que se propaguen (Jiao *et al.*, 2022). En general, el intestino de los vertebrados es un órgano fundamental para la interacción entre el entorno externo y el interno de los organismos. Este órgano está repleto de terminales nerviosas (sistema nervioso entérico) que intervienen en la regulación de diferentes funciones intestinales, como la absorción de nutrientes mediante la regulación del flujo sanguíneo, la secreción de enzimas y la peristalsis intestinal (Olsson, 2010). Además, la importancia de la comunicación entre el intestino y el hígado de los vertebrados se reconoce mediante el

concepto del eje intestino-hígado, en el que las bacterias intestinales se incluyen como un factor adicional que modula la salud intestinal y hepática en los peces ([Butt y Volkof, 2019](#)). Este eje intestino-hígado genera un equilibrio energético e inmunológico que conduce a un estado de salud óptimo. Sin embargo, cuando esta comunicación se ve alterada por factores externos como la dieta, puede causar daños importantes y afectar la bioenergética, la inmunidad y el estado de salud de los organismos. Por esta razón, este órgano podría ser un blanco para los análisis de transcriptómica al investigar el efecto de las dietas formuladas.

*T. macdonaldi* es la especie más grande perteneciente a la familia Sciaenidae ([Flanagan y Hendrickson, 1976](#)), siendo endémica del Golfo de California, México. En los años de 1920 esta especie fue explotada por la gran demanda de China debido al alto valor que la vejiga natatoria (buche) representaba para su cultura gastronómica ([Hilborn y Walters, 1992](#)). Ante la problemática de la disminución de las poblaciones naturales de totoaba, el gobierno mexicano decidió establecer una veda permanente en el año 1975 ([Flanagan y Hendrickson, 1976](#)). La totoaba es un pez marino que se alimenta de peces pelágicos menores como anchovetas y sardinas, y algunos crustáceos bentónicos como cangrejos y camarones ([Cisneros-Mata et al. 1995](#)). En la actualidad, la totoaba es cultivada en México y algunos de sus alimentos comerciales contienen soya o algún derivado de esta. En el estudio de Trejo-Escamilla *et al.* ([2017](#)), determinaron que la inclusión de CPS debe ser en porcentajes menores al 45% de sustitución de la harina de pescado ya que a porcentajes mayores se observó disminución del crecimiento. Hasta el día de hoy son pocos estudios de nutrigenómica desarrollados en el intestino de *T. macdonaldi*, por ello, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto en el transcriptoma en totoabas alimentadas con diferentes niveles de inclusión de concentrado proteico de soya para identificar los principales procesos biológicos afectados.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Partes del intestino y su funcionamiento

En peces carnívoros el intestino está dividido en dos partes; el intestino anterior y el intestino distal, en el último de ellos, es donde ocurre mayormente la absorción de los nutrientes. Los procesos de absorción de nutrientes ocurren en el borde de cepillo, a través de los enterocitos de las vellosidades intestinales. En el caso de los lípidos, estos deben ser emulsificados en parte por las sales biliares, lo cual permite a las micelas de grasa ser absorbidos a través del borde de cepillo. En cuanto a las proteínas, los polipéptidos procedentes del estómago se digieren en el intestino por acción de las enzimas proteolíticas procedentes del hepatopáncreas para la obtención de aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos. Estos péptidos, se absorben a través de los canales de sodio o son co-transportados al interior de las células por medio del sistema de H<sup>+</sup> para ser hidrolizados por peptidasas intracelulares y poder ser transportados al torrente sanguíneo ([Cudeiro, 2005](#)).

Por otro lado, el tracto digestivo tiene muchas funciones dentro de las cuales destaca, además de la absorción de nutrientes, la función de barrera o defensa ante cualquier patógeno o toxina. Esta función protectora es mantenida por una capa mucosa la cual es producida por células caliciformes protegiendo el epitelio intestinal al formar una barrera física que regula el paso de sustancias a través del órgano ([Gallo y Hooper, 2012](#)). El intestino también tiene tejido linfoide el cual está asociado con poblaciones de leucocitos que asiste a los organismos en funciones inmunológicas. Los leucocitos al igual que otras células de defensa como las células B, T, macrófagos y granulocitos, reconocen y responden a la presencia de patógenos ([Peterson y Artis, 2014](#)). Del mismo modo, el

sistema digestivo también permite que se modulen las comunidades microbianas dentro del tracto digestivo para aumentar dicha inmunología contra patógenos bacterianos desplazándolos y evitando infección (Byadgi *et al.*, 2014; Tafalla *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2020).

Finalmente, una de las funciones más importantes del intestino es la osmorregulación de agua, nutrientes y electrolitos, la cual se realiza mediante procesos de transporte hidro-salino en las células epiteliales intestinales (Cudeiro, 2005). De esta manera, el intestino también realiza tareas homeostáticas como el mantenimiento del equilibrio del medio interno hidro-salino, el cual mantiene la concentración de potasio sanguíneo y la regulación del volumen plasmático (Quintana, 1988).

## **2.2. Concentrado proteico de soya y factores antinutricionales (FANs)**

Los FANs son sustancias que afectan a los organismos de varias formas, principalmente interfieren con la correcta absorción de nutrientes y la salud en general de los organismos carnívoros. Los FANs se dividen en cuatro grupos: 1) los que afectan la utilización o digestión de las proteínas como los inhibidores de proteasas, ejemplo: taninos y lectinas. 2) Los que afectan la utilización de minerales, que por general son los fitatos, oxalatos, glucosinolatos y pigmentos de gossipol. 3) Los que actúan como antivitaminas, y finalmente 4) sustancias diversas como las micotoxinas, mimosina, cianógenos, nitratos, alcaloides, fitoestrógenos y saponinas. Además, los FANs también pueden ser catalogados dependiendo de su capacidad de resistir el procesamiento térmico, desafortunadamente no elimina por completo a los inhibidores de la proteasa Bowman-Birk, lectinas resistentes, rafinosa, estaquiosa, saponinas y fitatos (Huisman *et al.* 1989; Francis, Makkar y Becker, 2001). Por otro lado, existen otras dos formas de procesar la harina de soya para obtener CPS los cual son: por extracción con alcohol o por degradación enzimática, por lo general

estos dos procesos dan pocas diferencias en la composición nutricional. Al obtener el CPS por medio de extracción con alcohol etílico (de 60 a 90%) resulta en un 65.0% de proteína, 1.0% de lípidos y 6.0% de cenizas. Por otro lado, cuando la harina de soya es tratada con enzimas, el resultado es 57.5% de proteína, 2.5% de lípidos y 6.8% de cenizas. Con estas dos formas, se ha demostrado que los FANs se eliminan en gran medida, sin embargo, permanecen concentraciones de los inhibidores de tripsina entre 1 mg g<sup>-1</sup> en tratamiento enzimático, 2 mg g<sup>-1</sup> en el extraído por alcohol, glicinia menor de 100 p.p.m., β-conglicinina menor de 10 p.p.m, lectinas 1 p.p.m. en ambos tratamientos, y oligosacáridos a 1.0% en la CPS tratado por enzimas y a 3.0% en el CPS tratado por extracción por alcohol. De esta manera, cuando se procesa la soya a concentrado de proteína de soya se reducen mayormente estos factores antinutricionales, dependiendo del tratamiento que se le dé al ingrediente, sin embargo, tal como comenta Peisker (2001), los FANs que contiene el concentrado proteico de soya depende del tratamiento que se aplica a la materia prima (soya).

### **2.3. Enteritis en peces carnívoros**

El proceso inflamatorio en el intestino o un desbalance del estado normal del tracto digestivo es conocido como enteritis y algunos de los principales factores que afectan o inducen la inflamación en peces carnívoros son los FANs (Zhang *et al.*, 2013, 2023). La enteritis intestinal se caracteriza por el acortamiento de los pliegues mucosos, pérdidas de las células epiteliales, además el estroma central entre el pliegue mucoso se expande y se infiltran células inflamatorias en la lámina propia, así como la disminución de las microvellosidades (Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Kumar *et al.*, 2020). La capacidad del organismo para regular la inflamación está ligada a las citocinas las cuales son proteínas

secretadas para combatir la inflamación (Zhang y An, 2007) por lo que su presencia permite utilizarlos como buenos indicadores de inflamación.

#### **2.4. Deficiencia de aminoácidos en el CPS (concentrado proteico de soya)**

Se sabe que el concentrado proteico de soya es un ingrediente rico en proteína, aunque contiene ciertas deficiencias de aminoácidos principalmente metionina, cisteína, lisina y taurina, los cuales son fundamentales para el crecimiento, para el mantenimiento del metabolismo, para la síntesis de proteínas, fungen como antioxidantes y generan un buen estado de salud (Aragão *et al.*, 2003; Salze *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2023). Además, en el estudio de López *et al.* (2015) observaron que tan solo el uso de 0.5% de taurina favorece a *T. macdonaldi* previniendo el síndrome del hígado verde, lo cual es una condición donde la biliverdina no es debidamente degradada y se almacena en los tejidos del órgano. Afortunadamente las deficiencias de estos aminoácidos en las dietas con CPS se pueden corregir fácilmente añadiendo los aminoácidos faltantes a las fórmulas y minimizar deficiencias alimenticias en los organismos de cultivo (Day *et al.*, 2000).

#### **2.5. Uso de transcriptómica en estudios de nutrición acuícola**

La transcriptómica es una herramienta que nos ayuda a conocer los diferentes procesos biológicos afectados en un tejido u órgano a través del análisis de los transcritos de ARNm expresados bajo una condición. Por ejemplo, en el estudio de Kiron *et al.* (2020) se analizó el efecto de la soya en salmón Atlántico (*S. salar*) a través de estudios transcriptómicos y se evidenció la presencia de signos de inflamación en el intestino distal a través de la sobreexpresión de varios genes como cathelicidinas, galectina, necrosis tumoral tipo 1B y lisosoma CII. Así mismo, en el estudio de Kiron *et al.* (2020), también se observó que los productos de soya afectan mecanismos de transporte y metabolismo en el

salmón lo cual generó una disminución de la integridad del epitelio intestinal. Además, en el estudio de Juárez-Gutiérrez *et al.* (2021) se realizó la comparación de micro dietas elaboradas a bases de calamar y krill con respecto a dita a base de rotíferos para alimentar larvas de pez blanco (*Chirostoma estor*), durante 27 días, y se encontró que la dieta de rotíferos fue mejor ya que los organismos presentaron genes de desarrollo de fibras de musculo y homeostasis de células de músculo relacionado con el hecho de que crecieron más que los que fueron alimentados con micro dietas. En otro estudio de Kortner *et al.* (2012) alimentaron salmón del Atlántico (*S. salar*) con dietas de harina de pescado como control y con varias inclusiones de harinas a base de proteínas vegetales, al final del estudio los organismos que se alimentaron con dietas de concentrado de proteína de chícharo presentaron genes del intestino relacionados con procesos inflamatorios como interleucina 18 y 22 y citosinas, entre otros. Finalmente, en el estudio de Valenzuela *et al.* (2021) observaron en pez cebra (*Danio rerio*) que el gen CYP7A fue sobre expresado en peces menos tolerantes a la soya, lo que generó oxiesteroles los cuales tienen propiedades inflamatorias.

Como se ha descrito anteriormente, el intestino de los peces carnívoros es un órgano de suma importancia para la nutrición, inmunoestimulación y osmorregulación, lo cual suma importancia para mantener tasas de crecimiento adecuadas y mantener un estado de salud optima de los peces en cultivo. Sin embargo, los ANFs en concentraciones traza permanecen en el CPS, lo que podría tener efectos en la fisiología intestinal que podrían no ser evidentes con técnicas como histología. Estos efectos deletéreos del CPS podrían vulnerar a los organismos de cultivo si se exponen a condiciones estresantes, por lo que es de suma importancia analizar los efectos del CPS con diferentes aproximaciones. Por tal motivo, el análisis del transcriptoma intestinal de la totoaba, podría ayudar a determinar si existe un efecto negativo provocado por el uso de diferentes proporciones de CPS y si

existen mecanismos de resiliencia que ayuden a la totoaba a mantener un desempeño fisiológico a pesar del uso de CPS.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Con base en los estudios moleculares realizados anteriormente, ahora se sabe que los efectos de los componentes de las dietas formuladas sobre la fisiología del intestino distal de peces carnívoros marinos pueden ser muy amplio. Estas afectaciones en el intestino pueden abarcar respuestas de los proceso energéticos, inmunológicos y metabólicos a diferentes niveles. Por ejemplo, en algunos estudios de transcriptómica desarrollados en peces herbívoros y omnívoros han encontrado una cierta resiliencia a los efectos negativos de las dietas con proteína vegetal. Sin embargo, en peces carnívoros marinos de ambientes cálidos como *T. macdonaldi* se ha demostrado con técnicas convencionales cierta tolerancia al concentrado proteico de soya en niveles inferiores a 45% de inclusión. Por el contrario, en algunos otros estudios se ha reportado una inducción de la inflamación y desequilibrio energético que podrían significar una baja o nula aceptación del concentrado proteico de soya. Debido a esto, es de suma importancia analizar el perfil transcriptómico del intestino distal de *T. macdonaldi* con el objetivo de caracterizar las respuestas fisiológicas a un nivel molecular y con esto determinar los efectos del concentrado proteico de soya en diferentes procesos biológico en los peces.

### **4. HIPÓTESIS**

El uso de concentrado de proteína de soya en la formulación del alimento para *Totoaba macdonaldi* generará un efecto en el transcriptoma intestinal donde se

evidenciarán los procesos biológicos afectados. Debido al papel que juega el intestino en diferentes procesos biológicos para mantener sanos a los peces, el CPS podrá activar mecanismos como el de inmunoestimulación, metabolismo energético, homeostasis, inflamación, entre otros. Estas respuestas podrían presentar una intensidad directamente proporcional al nivel de inclusión de este ingrediente vegetal. Además, debido a los estudios anteriores que ha demostrado que *T. macdonaldi* puede ser alimentada con concentrado proteico de soya en proporciones menores al 45%, se evidenciarán los mecanismos de resiliencia que puedan indicar bajo que parámetros es factible el uso de estas fuentes proteicas vegetales.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Caracterizar los procesos biológicos y las respuestas fisiológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* en respuesta a la inclusión de concentrado proteico de soya en las dietas formuladas a partir del análisis transcriptómico.

### **5.2. Objetivo Específicos**

- I. Realizar un ensamble *de novo* con datos del transcriptoma intestinal (región distal) de *Totoaba macdonaldi* alimentada con diferentes niveles de inclusión de concentrado proteico de soya y harina de pescado.
- II. Comparar los perfiles de transcripción a través de un análisis de expresión diferencial en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentada con harina de pescado como principal fuente de proteína y dos niveles de sustitución parcial con concentrado proteico de soya (30 y 60%).

- III. Identificar los principales procesos biológicos afectados en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi* debido a la inclusión del concentrado proteico de soya en las diferentes dietas de los organismos.
- IV. Identificar los principales genes afectados por la inclusión del concentrado proteico de soya en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente estudio, se obtuvieron juveniles de *T. macdonaldi* de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, México. Estos fueron alimentados con una dieta comercial (a base de harina de pescado como fuente principal de proteína y sin adición de soya) con un contenido proximal de 46% de proteína, 12% de lípidos, 12% de cenizas, 8% humedad y 17% de ELN. Con esta dieta comercial los peces se alimentaron durante dos semanas previo del bioensayo. Los parámetros de temperatura oxígeno y salinidad se monitorearon con un Dissolved Oxygen Instrument (YSI 550A, OH) y refractómetro. Los organismos se mantuvieron en un sistema de tanques suministrados por agua de mar a una temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinidad de 35 ppm, y oxígeno disuelto de  $6 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ .

El bioensayo se realizó en el laboratorio de NutriAcua de la FCM-UABC que consiste en 9 tanque de 1100 L cada uno. Estos tanques se conectaron a un sistema de recirculación de agua de mar que contiene un sedimentador de sólidos con filtros, además, un filtro biológico y lámpara de UV. Así mismo, el sistema de recirculación de agua marina contiene un sistema de control de temperatura el cual mantiene el sistema en  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  durante el bioensayo, además se colocó un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad. El total de Amonio-Nitrógeno ( $\text{NH}_4^{+-}\text{N}$ ) y Nitrito-Nitrógeno ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) fueron medidos diariamente antes de la primera comida con kits colorimétricos (Aquarium Pharmaceutical, Mars, PA, USA). El pH fue medido utilizando Oakton pHTestr10 pH meter. Esta investigación cumplió con los Lineamientos del Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU) y del Gobierno Mexicano (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de experimentación, además, cumplió los lineamientos ARRIVE, así mismo, fue aprobado por el comité de ética de la UABC. El bioensayo se realizó con juveniles con un peso inicial de  $153 \pm 0.84 \text{ g}$ , los

cuales se distribuyeron en 9 tanques con 12 peces cada uno ( $n = 108$ ). Los peces fueron alimentados con tres dietas experimentales (**Tabla 1**) una dieta comercial (HP) de la marca Skretting © con numero de producto de #12143085. Además, dos dietas experimentales con 30 y 60% de inclusión de concentrado proteico de soya (CPS30 y CPS60) como fuente principal proteína. La alimentación de los peces con las diferentes dietas se realizó por duplicado para cada tratamiento administrando, y las dietas se administraron dos veces al día (8:00 y 16:00 h) durante 3 meses.

**Tabla 1.** Ingredientes utilizados para elaborar los alimentos que contienen 30 y 60% de CPS (concentrado proteico de soya), así como, contenido proximal de la dieta control (HP) y las experimentales (CP30 y CP60).

<b>Ingredientes (gr 100g<sup>-1</sup>)</b>	<b>HP</b>	<b>CPS30</b>	<b>CPS60</b>
Harina de <b>pescado</b>	-	42.1	25.3
CPS*	-	20.3	39.0
Harina de trigo	-	4.0	4.0
Harina de maíz	-	4.0	4.0
Aceite de pescado	-	3.0	3.0
Grenetina	-	2.5	2.5
Celulosa	-	2.1	2.1
Mezcla <b>de minerales</b>		3.5	3.5
Mezcla de vitaminas		1.59	1.59
Otros nutrientes**	-	18.5	16.6
<b>Composición proximal (%)</b>			
Proteína cruda	46	44.2	44.8
Lípidos crudos	12	11.1	11.3
Almidón total	-	14.5	13.7
Cenizas totales	12	9.1	5.9
Humedad remanente	8	7.3	7.6
ELN	17	13.8	16.7

Cantidad de los ingredientes (gr 100 g<sup>-1</sup>) del estudio con 30 y 60% de sustitución de harina de pescado (HP) por concentrado proteico de soya (CPS), composición proximal (% base seca) para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (Gorriño, 2022; Olmos et al., 2022). \*CPS- concentrado proteico de soya, \*\*Otros nutrientes: lípidos, otros carbohidratos, vitaminas, minerales, aminoácidos. ELN: extracto libre de nitrógeno: 100 – (%proteína cruda+ %lípidos crudos + % ceniza total + % almidón + % humedad remanente).

Al finalizar el periodo de experimentación, se realizó una disección a tres peces por tanque o replica (n = 9), de cada uno de ellos se extrajo la porción distal del intestino. Para ser sacrificados los peces se anestesiaron con una solución de aceite de clavo en agua de mar (10 ml clavo en 20 L<sup>-1</sup>). Cuando ya no se presentaron signos de movimiento, se realizó una incisión en la parte superior de la cabeza, en seguida se realizó una incisión en el abdomen para exponer las vísceras sobre un cristal frío para seleccionar los órganos. Se detecto el intestino distal y se realizó un corte con tijeras quirúrgicas previamente

esterilizadas. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2.0 ml con buffer NAP ([Camacho-Sanchez et al., 2013](#)) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La extracción de RNA total se procesó a través protocolo TRI Reagent-Cloroformo-Etanol, se verificó la integridad de RNA a través de electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% y se cuantifico la concentración de RNA a través de un Nanodrop (2000 Thermo scientific). Una vez que se determinaron los parámetros de calidad del RNA, se realizaron tres pools los cuales contenían el RNA de dos organismos cada uno. Con los pools obtenidos se realizaron librerías de cada tratamiento (n = 3) para la secuenciación paired-end con la tecnología de Illumina en un HighSeq.

### **Análisis de calidad de secuenciación con FASTQC**

Para realizar el análisis de calidad de la secuenciación se utilizó la herramienta FASTQC, esta herramienta evalúa la calidad de las secuencias, la distribución de la calidad a lo largo de las secuencias y lo resume en un histograma de valores medio de calidad *Per base sequence quality* (Phred quality score 0 a 38 = 1 error en 1000 bases) ([Illumina, 2011](#)). *Per sequence quality scores* indica la calidad por lectura usando el Phred score para determinar la calidad de las secuenciaciones realizadas. Así mismo determina el contenido de Guaninas y Citocinas por secuencia (*Per sequence GC conten*). *Per base N content* nos indica la cantidad de bases que no fueron identificadas y se les asigno una N en lugar de C, G, T, A. Todos estos análisis nos ayudan a caracterizar la calidad de secuenciación y nos ayudan a tomar decisiones para seguir o no con los siguientes análisis.

## **Limpieza de secuencias con TRIMMOMATIC**

Para la limpieza de las secuencias se utilizó la herramienta TRIMMOMATIC la cual utiliza diferentes códigos para: Retirar los adaptadores (ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE. fa: 2:30:10), elimina las bases iniciales de baja calidad o N (por debajo de la calidad 3) (LEADING:3), eliminar las bases finales de baja calidad o N (por debajo de la calidad 3) (TRAILING:3), escanea la lectura con una ventana deslizante de 4 bases de ancho, cortando cuando la calidad promedio por base caiga por debajo de 15 (SLIDINGWINDOW:4:15). La descripción de estos pasos de trimming son: ILLUMINACLIP la cual corta adaptador y otras secuencias de la lectura ilumina-especificos. SLIDINGWINDOW: Realiza un recorte de window trimming, cortando a la vez que la calidad promedio dentro la ventana caiga por debajo de un umbral. LEADING: corta las bases del inicio de una lectura, si están debajo de un umbral. TRAILING: corta las bases del final de una lectura, si están por debajo de un umbral. CROP: corta la lectura a una longitud especificada. HEADCROP: corta el número especificado de bases desde el inicio de la lectura. MINLEN: elimina la lectura si esta debajo de una longitud especificada. TOPHRED33: convierte puntuaciones de calidad a Phred-33. TOPHRED64: convierte puntuaciones de calidad a Phred-64 (funciona con FASTQ utilizando puntuaciones de calidad phred + 33 o phred + 64, según el canal de ilumina utilizado, ya sea FASTQ sin comprimir o comprimido con gzip.

## **Ensamble de transcriptoma con Trinity**

La herramienta de Trinity utiliza tres programas para transformar los datos de lectura RNA-Seq, primero se usa el programa de Inchworm para traducir Rna-Seq a contigs lineares, segundo se usa el programa de Chrysalis para convertir contigs a graficas de de-

Bruijn y por último el programa de Butterfly utiliza las gráficas para traducirlos en Transcritos e Isoformas.

### **Validación de ensamble con TRANSRATE**

Se examinaron los contigs ensamblados con Trinity y se evaluaron usando lecturas de RNAseq (nota se requiere en formato FASTA y paired reads en FASTQ separados para lecturas de izquierda y derecha). Transrate utiliza SNAP para alinear las lecturas y SALMON para asignar lecturas multi-mapa. Luego se tiene que elegir las lecturas correctas ya que diferentes conjuntos de lecturas corresponden a plantear diferentes preguntas del análisis. Se requiere escoger una referencia para asegurar la calidad de un transcriptoma *de-novo*, y se comparan dos o más ensamblajes para medir la calidad de el ensamblaje usando el Transrate score, si se obtiene un puntaje alto más biológicamente preciso (0 en menor y 1.0 es lo máximo)([Smith-Unna et al., 1865](#)).

### **Análisis de expresión génica**

Después del ensamble de las secuencias y la validación de dicho ensamble, se realizó un análisis expresión con DESeq2 en RStudio (4.2.1). El primer paso que se realizó es la normalización para tener en cuenta las diferencias de tamaño de bibliotecas y profundidad de secuenciación entre las muestras (normalización de recuentos de lectura). Segundo se tiene en cuenta la observación de la variabilidad biológica y técnica para estimar la dispersión de las lecturas. DESeq modela la dispersión utilizando una distribución binomial negativa, que se adecuada para datos de recuento que a menudo muestran sobre dispersión. Después de la normalización y la estimación de la dispersión, DESeq ajusta un modelo lineal generalizado a los datos. Se utiliza la distribución binomial negativa para

modelar los datos de recuento, teniendo en cuenta la media y la dispersión de cada gen. El modelo lineal generalizado incorpora variables específicas de la muestra para modelar las diferencias sistemáticas en la expresión génica. Después DESeq realiza la prueba de Wald para identificar genes expresados diferencialmente. La hipótesis nula es que no hay diferencias en la expresión génica entre la condición, mientras que la hipótesis alternativa es que hay una diferencia significativa. Los valores  $p < 0.05$  se ajustan luego para pruebas múltiples utilizando métodos como el procedimiento de Benjamini y Hochberg (1995) para controlar la tasa de descubrimiento falso. Finalmente, para la interpretación de resultados se incluye una lista de genes clasificados por su nivel de significancia para identificar genes expresados diferencialmente o DEGs (Love *et al.*, 2014).

### **Enriquecimiento de procesos biológicos**

Finalmente se realizó un enriquecimiento de procesos biológicos con los ids que se obtuvieron de la anotación funcional. Para ello se utilizó la herramienta Goseq que requiere dos factores: Para iniciar el análisis de goseq se requiere cuantificar la cantidad de datos en la matriz de conteos (realizada anteriormente con DESeq), esto se hace calculando el Probability Weighting Function o PWF la cual es probabilidad que un gen va a expresarse diferente (DE) basado en su longitud. Además, el análisis Go de datos RNASeq requiere el uso de muestreo aleatorio para generar una distribución nula adecuada para la categoría GO y calcular cada categoría de importancia para la sobrerrepresentación entre los genes DE. Ya establecido una distribución nula cada categoría GO se prueba para determinar si hay más o menos representación entre el conjunto de genes expresados diferencialmente y el nulo se utilizar para calcular un valor de  $p$  para la disminución de la expresión o sobre representación. Para ligar categorías go a genes, goseq utiliza paquetes de organismos de

Bioconductor. Estos paquetes son nombrados org.<Genome>.<ID>.db, donde <Genome> está identificando el genoma y <ID> está identificando el identificador de genes. Así, Goseq automáticamente ordenara los genes en diferentes procesos biológicos.

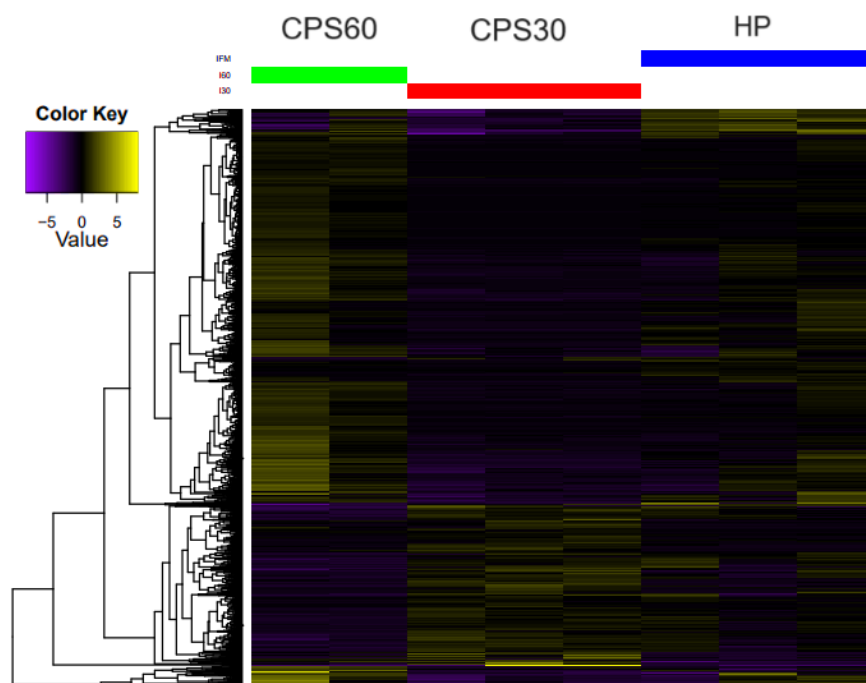
## 7. RESULTADOS

Todos los organismos iniciaron con un peso de  $153.9 \pm 0.84$  g al principio del bioensayo. Al finalizar el bioensayo, en 3 meses, los organismos alimentados con HP obtuvieron un peso final de  $618.4 \pm 20.13$ , por otro lado, los de CPS30 obtuvieron un peso final de  $624.4 \pm 16.97$ , y el grupo CPS60 termino con un peso final de  $260.1 \pm 57.65$ . Los organismos de los tratamientos de HP y CPS30 obtuvieron una sobrevivencia del 100% y los organismos del CPS60 tuvieron una sobrevivencia del 61.11% (Olmos *et al.*, 2022).

Después de la secuenciación del RNA obtenido del intestino distal de *T. macdonaldi* se tuvieron un total de 601,586,596 secuencias con un promedio de 37,599,162 por muestra. Se realizó un análisis de calidad con los datos crudos usando la herramienta FASTQC donde se determinó el Phred quality score de las secuencias indicando un valor de entre 36-34 lo que nos indica que las secuencias se encuentran en una calidad alta (Phred quality score de 30, significa que, 1 de cada 1000 bases tiene un error) y es confiable ya que tienen una probabilidad muy baja de que las bases estén mal asignadas. Además, en este análisis se puede observar la longitud de las secuencias, el contenido de citocinas y guaninas y el nivel de duplicación (**Anexo: Tabla 1**).

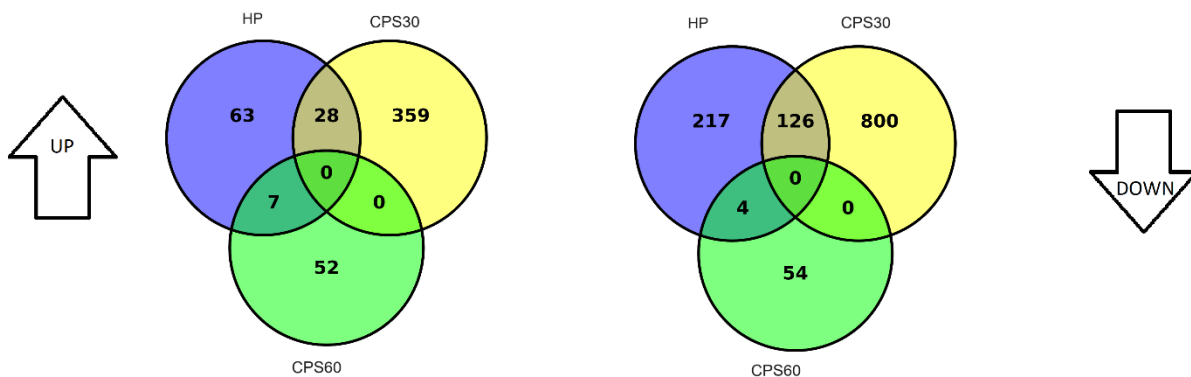
Se realizó la limpieza de secuencias usando TRIMMOMATIC el cual eliminó los adaptadores de Illumina y las secuencias de mala calidad y permitió observar la cantidad y los porcentajes de las lecturas de buena calidad por cada muestra al igual que la cantidad de secuencias que fueron eliminadas (**Anexo: Tabla 2**). Después de TRIMMOMATIC se volvieron a someter las muestras de post limpieza al FASTQC donde se observaron un total de 570,164,066 secuencias con un promedio de 35,635,254 lecturas por muestra (**Anexo: Tabla 3**).

Con las lecturas limpias se realizó un ensamble *de novo* donde se obtuvieron un total de 107,394 genes y 130,013 transcritos. Se realizó una validación del ensamble *de novo*, con TRANSRATE y se obtuvieron un total de 99,261 transcritos distribuidos en las diferentes muestras, los cuales fueron analizados con DeSEQ para identificar los niveles de expresión diferencial. Los resultados de expresión diferencial se representaron a través de un heatmap donde el Color Key nos indica con amarillo los genes sobre expresados y el color morado nos indica aquellos genes sub expresados. Además, el heatmap nos indica las diferencias y similitudes entre los perfiles de transcripción en el intestino distal de la totoaba alimentada con diferentes niveles de inclusión de CPS. Por ejemplo, en el clúster de diferentes colores están los tratamientos con mayor similitud donde los perfiles de transcripción agrupan las réplicas para definir al clúster que pertenecen (**Figura 1**).



**Figura 1.** Perfiles de transcritos diferencialmente expresados en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi* en cada tratamiento (columnas): HP (Harina de pescado), CPS30 (Inclusión del 30% de concentrado proteico de soya) y CPS60 (Inclusión de 60% de concentrado proteico de soya). diffExpr. P = 0.05, C1.matrix.log2.centred.

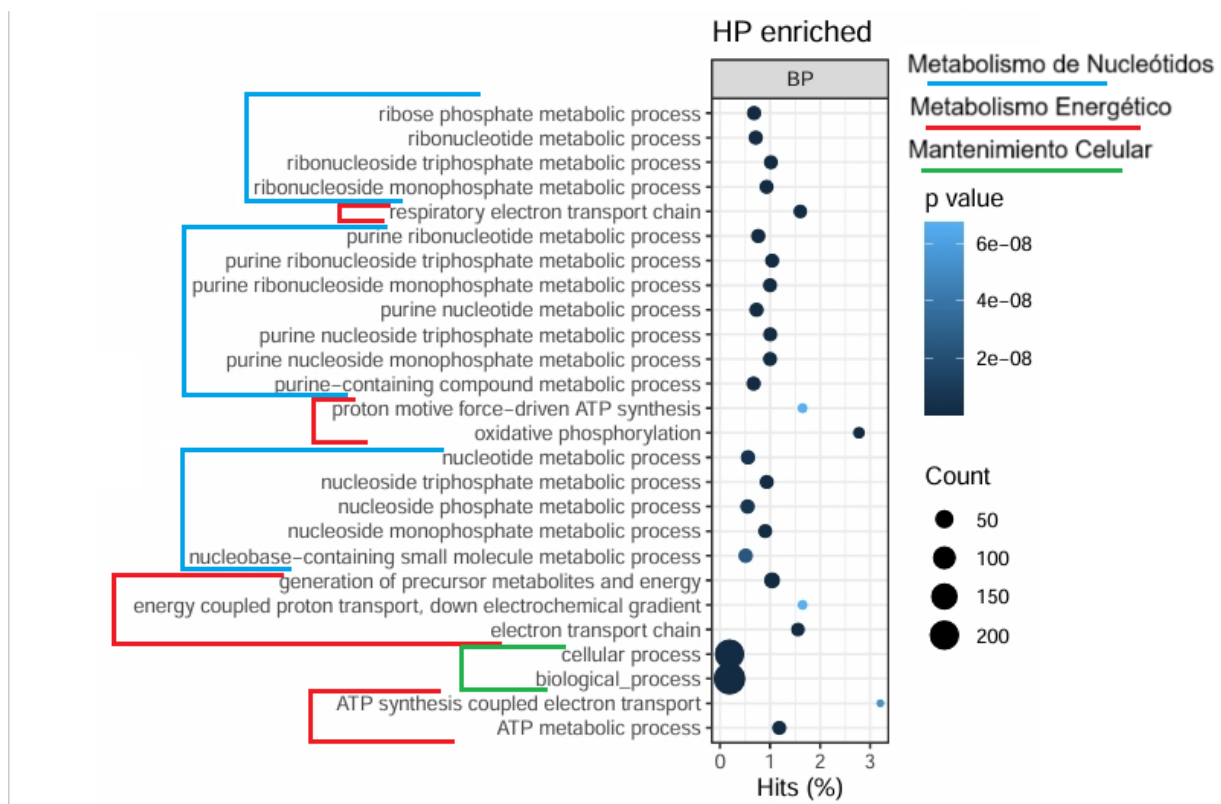
En la **Figura 2** se representan los transcritos específicos y compartidos UP-regulados (líneas amarillas de la Figura 1) y los transcritos específicos y compartidos DOWN-regulados (líneas moradas de la Figura 1). El tratamiento HP contiene 63 transcritos únicos UP-regulados, CPS30 presentó 359 UP-regulados y el tratamiento CPS60 solo presentó 52 transcritos UP-regulados. En cuanto a la regulación DOWN, el tratamiento HP contiene 217 transcritos únicos DOWN-regulados, CPS30 presentó 800 transcritos DOWN-regulados y CPS60 54 transcritos DOWN-regulados. Además, en esta figura también se puede observar los transcritos compartidos entre cada tratamiento.



**Figura 2.** Proporción de transcritos específicos en cada tratamiento. Transcritos regulados de manera positiva (sobre expresados) y negativa (sub expresados) en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. HP (Harina de pescado), CPS30 (Inclusión del 30% de concentrado proteico de soya) y CPS60 (Inclusión de 60% de concentrado proteico de soya): UP (HP, CPS30, CPS60), DOWN (HP, CPS30, CPS60).

Se realizó el enriquecimiento de los procesos biológicos con los transcritos expresados (UP-REGULATED) diferencialmente en cada tratamiento, donde en el tratamiento control HP reveló principalmente tres grupos de procesos biológicos. El primer grupo representa el **metabolismo de nucleótidos** (purinas y pirimidinas), el cual contiene los procesos del metabolismo de ribonucleósido trifosfato y monofosfato, el siguiente grupo

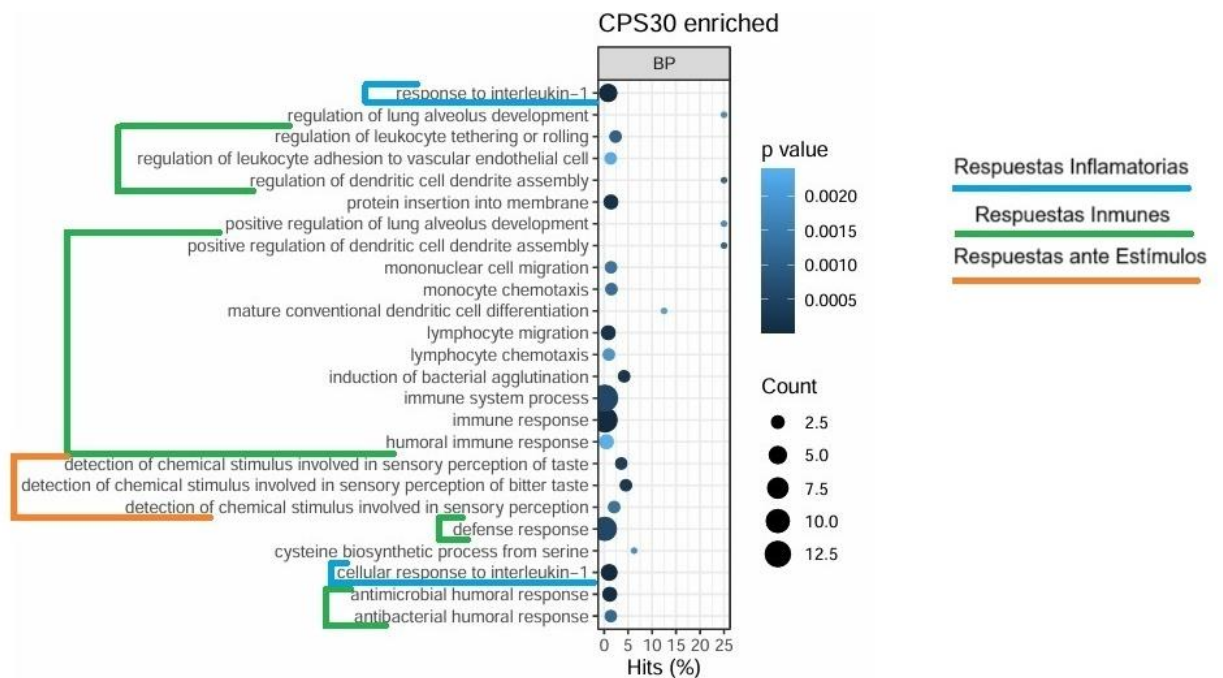
representa el **metabolismo energético** que contiene los procesos de: la cadena de transporte de electrones, generación de metabolitos precursores y energía, proceso metabólico del ATP y finalmente la fosforilación oxidativa, este último grupo representa los procesos generales de **mantenimiento celular**, el cual se refiere a cualquier proceso que involucra cambios químicos y físicos que ocurren en los organismos para asegurar el mantenimiento y la funcionalidad celular (**Figura 3**).



**Figura 3.** Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con harina de pescado (HP). Counts: proporción de transcritos asignados a dicho proceso biológico. Hits %: porcentaje de coincidencias con genes anotados.

En el tratamiento de 30% de concentrado de soya se observaron tres grupos principales de procesos biológicos. El primer grupo de procesos biológicos son los de **inflamación** que presentó los procesos de: respuesta a la interleucina-1 y respuesta

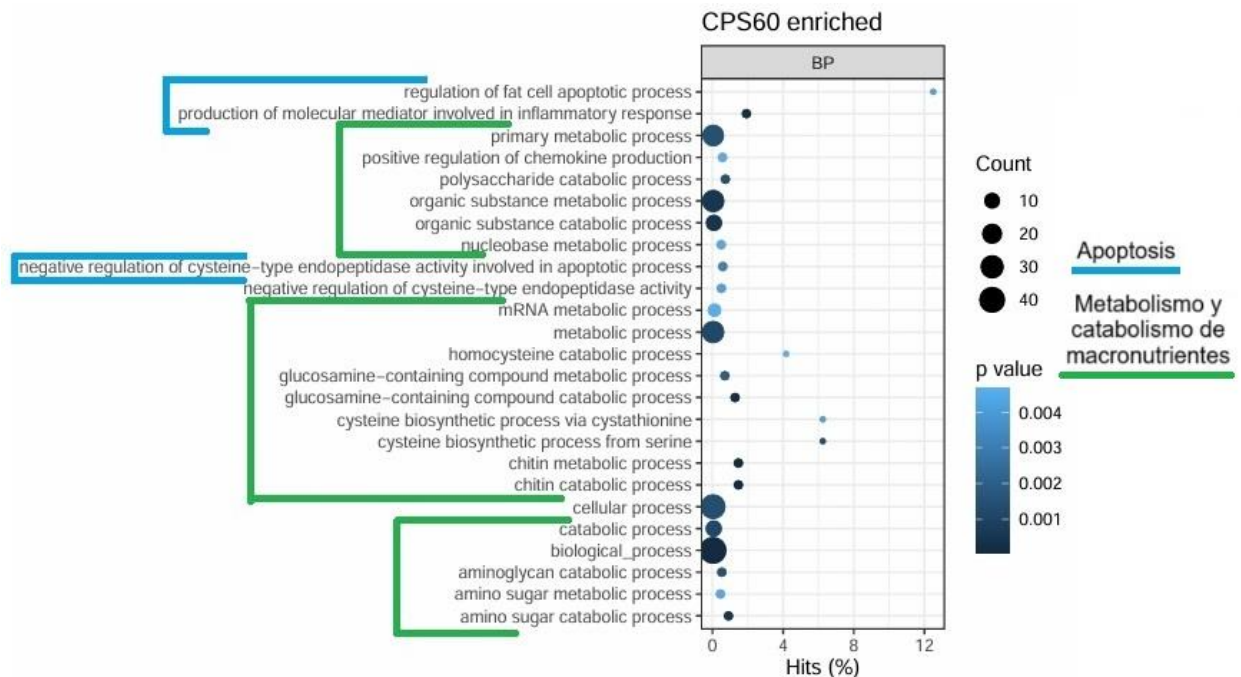
inflamatoria, el siguiente grupo presentó las **respuestas inmunes** y los procesos biológicos que destacan son: migración de células mononucleares y linfocitos, inducción de aglutinación bacteriana, proceso del sistema inmunológico, respuesta inmune, respuesta de defensa, respuesta humoral antimicrobiana y antibacteriana. Finalmente, el tercer grupo de procesos biológicos son las de **respuestas ante estímulos** como la respuesta a estímulos bióticos y la detección química de amargor y sabor, además, también se observó que hubo estímulos sensoriales de percepción químicos (**Figura 4**).



**Figura 4.** Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con inclusión del 30% de concentrado proteico de soya (CPS30). Counts: proporción de transcritos asignados a dicho proceso biológico. Hits %: porcentaje de coincidencias con genes anotados.

En el tratamiento CPS60 se observaron dos grupos principales de procesos biológicos: El primer grupo se relaciona con la **apoptosis**, en este, se observaron procesos como ruta de señalización de apoptosis insertico en respuesta a daños en ADN, regulación

del proceso apoptótico de las células el cual indica programación a la muerte celular en los juveniles de totoaba. Finalmente, el último grupo está relacionado con el **metabolismo y catabolismo de macronutrientes**, en este grupo se observaron procesos de catabolismo y metabolismo de sustancias orgánicas, como los polisacáridos y las proteínas, los cuales involucran la síntesis, modificación, degradación y reciclaje de proteínas, nucleótidos, lípidos, compuestos con glucosamina, amino azúcares y quitina, lo cual indica que los organismos están abriendo nuevas rutas para obtener energía para su sobrevivencia (Figura 5).



**Figura 5.** Procesos Biológicos (BP) del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con inclusión del 60% de concentrado proteico de soya (CPS60). Counts: proporción de transcritos asignados a dicho proceso biológico. Hits %: porcentaje de coincidencias con genes anotados.

De los procesos biológicos enriquecidos en cada tratamiento se extrajeron los principales genes sobre expresados en cada caso. En los enriquecimientos observados en HP del intestino distal de totoaba se observaron desde 50 hasta 200 ids asociados a los

diferentes procesos biológicos (**Figura 3**; Count) por lo que se eligieron únicamente los procesos biológicos relacionados con la generación de energía. Los genes a los que pertenecieron los ids enriquecidos en el tratamiento HP se pueden observar en la **Tabla 2**.

**TABLA 2.** Principales genes extraídos del enriquecimiento funcional en el tratamiento con inclusión de harina de pescado.

ID UNIPROT	PROTEÍNA	FUNCIÓN
<b>COX1, COX3</b>	Subunidad 1,3 del citocromo c oxidasa	La última enzima de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que impulsa la fosforilación oxidativa.
<b>CYB</b>	Citocromo b	Contribuye a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial que luego se utiliza para la síntesis de ATP.
<b>ENOA</b>	Alfa-enolasa	Además de la glucólisis, interviene en diversos procesos como el control del crecimiento, la tolerancia a la hipoxia y las respuestas alérgicas.
<b>G3P2</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2	Enzima clave en la glucólisis que cataliza el primer paso de la vía al convertir D-gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en 3-fosfo-D-glicerato fosfato.
<b>NU2M, NU4M, NU5M</b>	Cadena NADH-ubiquinona oxidorreductasa 2,4,5	Cataliza la transferencia de electrones del NADH a través de la cadena respiratoria, utilizando la ubiquinona como aceptor de electrones.
<b>ATP6</b>	Subunidad a de ATP sintasa	Produce ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana generado por complejos de transporte de electrones de la cadena respiratoria.
<b>KAD5</b>	Isoenzima 5 de adenilato quinasa	Nucleósido monofosfato (NMP) quinasa que cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre nucleósidos trifosfatos y monofosfatos.

Metabolismo Energético

Las funciones asociadas con los diferentes genes fueron descritas a partir de la base de datos de UniProt.

Por otro lado, los genes que enriquecieron los procesos biológicos en los tratamientos de CPS30 y CPS60 presentaron conteos desde 2.5 a 12.5 y de 10 a 40 respectivamente (**Figura 4 y 5**; Counts) por lo que se lograron extraer un número mayor de genes asociados a cada proceso biológico (**Tabla 3 y 4**).

**TABLA 3.** Principales genes extraídos del enriquecimiento funcional con el tratamiento con 30% de inclusión de CPS (Concentrado Proteico de Soya).

ID UNIPROT	PROTEÍNA	FUNCIÓN	
<b>ANXA1</b>	Anexina A1	Tiene actividad antiinflamatoria y desempeña un papel en la fagocitosis al mediar en la interacción dependiente de Ca <sup>2+</sup> entre los fagosomas y el citoesqueleto de actina.	Inflamación
<b>IL8</b>	Interleucina-8	Factor quimiotáctico que media la respuesta inflamatoria al atraer neutrófilos, basófilos y células T para eliminar patógenos y proteger al huésped de infecciones. También juega un papel importante en la activación de neutrófilos.	
<b>AJL2</b>	Lectina L-2 fijadora de lactosa	Participa en la defensa del huésped en la superficie del cuerpo. Provoca aglutinación y suprime el crecimiento de la bacteria Gramnegativa <i>E. coli</i> K12.	
<b>KV401</b>	Inmunoglobulina kappa variable 4-1	En la fase de reconocimiento de la inmunidad humoral, las inmunoglobulinas unidas a la membrana sirven como receptores que, al unirse a un antígeno específico, desencadenan la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas.	Sistema inmunológico
<b>DHX15</b>	ARN helicasa DHX15 dependiente de ATP	Participa en la inmunidad innata antiviral intestinal junto con NLRP6: reconoce y se une al dsRNA viral y promueve la activación del inflamasoma NLRP6 en las células epiteliales intestinales para restringir la infección por virus entéricos.	
<b>ZNFX1</b>	Proteína NFX1	Proteína de unión a ARN que inicia la respuesta antiviral y es necesaria para restringir la replicación de los virus de ARN.	
<b>HV307</b>	Inmunoglobulina pesada variable 3-7	Región V del dominio variable de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas que participa en el reconocimiento del antígeno.	
<b>SPON2</b>	Espondina-2	Esencial en el inicio de la respuesta inmune innata y representa una molécula única de reconocimiento de patrones en la matriz extracelular (MEC) para patógenos microbianos. Se une al lipopolisacárido bacteriano (LPS)	
<b>STAB2</b>	Estabilina-2	Receptor de fosfatidilserina que mejora la absorción de células apoptóticas. Se une tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas y puede desempeñar un papel en la defensa contra infecciones bacterianas.	Respuesta a estrés.
<b>ATF2</b>	Factor de transcripción ATF-2	Activador transcripcional que regula la transcripción de varios genes, incluidos los implicados en la anti-apoptosis, el crecimiento celular y la respuesta al daño del ADN.	
<b>TRI27</b>	RFP de proteína dedos de zinc	Induce la apoptosis activando la quinasa Jun N-terminal y la quinasa p38 y también aumenta la actividad similar a la caspasa-3 independientemente de los eventos mitocondriales.	
<b>MMP2</b>	Colagenasa tipo IV de 72 kDa	Metaloproteínasa ubiquitina que participa en diversas funciones como remodelación de la vasculatura, angiogénesis, reparación de tejidos, invasión tumoral, inflamación y ruptura de la placa aterosclerótica.	

Las funciones asociadas con los diferentes genes fueron descritas a partir de la base de datos de UniProt.

**TABLA 4.** principales genes extraídos del enriquecimiento funcional con el tratamiento con 60% de inclusión de CPS (Concentrado Proteico de Soya).

ID UNIPROT	PROTEÍNA	FUNCIÓN	
<b>ACOT4</b>	Succinil-coenzima A tioesterasa peroxisomal	Cataliza la hidrólisis de acil-CoAs en ácidos grasos libres y coenzima A (CoASH), regulando sus respectivos niveles intracelulares.	Met. Lípidos
<b>ELOV4</b>	Elongasa 4 de ácidos grasos de cadena muy larga	Cataliza la primera y limitante reacción de las cuatro reacciones que constituyen el ciclo de elongación de los ácidos grasos de cadena larga. Intervienen en múltiples procesos biológicos como precursores de lípidos de membrana y mediadores lipídicos	
<b>SPTC1</b>	Serina palmitoiltransferasa 1	Componente de la enzima multisubunidad (SPT) serina palmitoiltransferasa que cataliza el paso inicial y limitante de la velocidad en la biosíntesis de esfingolípidos para formar bases de cadena larga.	
<b>CBS</b>	Cistationina beta-sintasa	Hidrolasa que cataliza el primer paso de la vía de transulfuración. Esta ruta catabólica permite la eliminación de la L-metionina y del metabolito tóxico L-homocisteína.	Met. proteínas
<b>DNJB9</b>	Miembro 9 de la subfamilia B del homólogo de DnaJ	Implicado en la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) de proteínas mal plegadas. Requerido para la supervivencia de los progenitores de células B y la producción normal de anticuerpos.	
<b>NTAN1</b>	Proteína asparagina amidohidrolasa N-terminal	Asparagina desamidasa N-terminal que media en la desaminación de los residuos de asparagina N-terminal a aspartato. Requerido para el recambio dependiente de ubiquitina de proteínas intracelulares que se inician con Met-Asn.	
<b>TRI25</b>	Ubiquitina E3/ligasa ISG15 TRIM25	Funciona como ligasa de ubiquitina E3 y como ligasa E3 ISG15. Implicado en la defensa inmune innata contra virus mediando la ubiquitinación de RIGI e IFIH1	Defensa
<b>ABHD12</b>	Lipasa lisofosfatidilserina ABHD12	Media la hidrólisis de la lisofosfatidilserina, también capaz de hidrolizar la fosfatidilserina oxidada; La fosfatidilserina oxidada se produce en respuesta a un estrés inflamatorio severo y constituye una señal proapoptótica.	
<b>CHIA</b>	Quitinasa ácida de mamíferos	Degrada la quitina y la quitotriosa. Puede participar en la defensa contra nematodos, hongos y otros patógenos. También funciona en la respuesta inflamatoria y en la protección de las células contra la apoptosis.	

Las funciones asociadas con los diferentes genes fueron descritas a partir de la base de datos de UniProt.

## 8. DISCUSIÓN

Debido a que aún existe la interrogante de si es adecuado o no el uso de concentrado proteico de soya para la alimentación de peces carnívoros, el presente estudio tuvo como objetivo analizar los efectos del concentrado proteico de soya en las respuestas fisiológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* a través de una aproximación transcriptómica. Este estudio contribuirá a dilucidar la amplitud de los efectos del CPS en la fisiología intestinal y podrá aportar información relevante para generar estrategias que contribuyan al uso de CPS como fuente proteica alternativa para la alimentación de peces carnívoros tropicales.

Es importante señalar que la ganancia de peso de los organismos alimentados con CPS60 fue afectada significativamente con la menor tasa ( $105.8 \pm 57.65$  g) en comparación con los peces alimentados con CPS30 y HP ( $472.2 \pm 16.97$  g y  $465.8 \pm 20.13$  g, respectivamente; [Olmos et al., 2022](#)). De igual manera, solo el tratamiento de CPS60 presentó mortalidades (39%) lo que indica un estado deletéreo.

### **Efecto de la harina de pescado como fuente principal de proteína en el transcriptoma intestinal de totoaba: nivel de procesos biológicos**

Los organismos alimentados con la dieta control HP presentaron diversos procesos biológicos asociados a la producción de precursores de ADN o ARN como el metabolismo de purinas y pirimidinas (nucleótidos). Estos nucleótidos pueden ser obtenidos a través de procesos de digestión enzimática del alimento, principalmente con nucleasas, fosfodiesterasa, nucleosidasas y fosfatasas intestinales, los cuales son descompuestos a sus formas básicas para la absorción y la formación de ácidos nucleicos para el recambio y reparación celular (división celular) en el intestino ([Uauy et al., 1990](#)). Además, los

precursores de ADN también juegan un papel muy importante en las vías de señalización ya que permite codificar las instrucciones celulares a partir de la traducción de los ácidos nucleicos (Carver y Walker, 1995; Cosgrove, 1998; Li y Gatlin, 2006; Gatlin, 2006). Hay ciertas rutas metabólicas como el metabolismo de nucleótidos (trifosfato y monofosfato) que ayudan a reciclar hasta el 90% de las bases de purinas (adenina A y guanina G) en el organismo (Sauer *et al.*, 2011). Además, también existen rutas de síntesis de *novo* las cuales producen purinas a partir de precursores como aminoácidos, CO<sub>2</sub> y ácido fólico lo cual ocurre cuando no hay suficientes nucleótidos en la dieta para administrar la demanda de estos. La síntesis *de novo* ocurre en el citoplasma de las células, principalmente en células con una alta tasa de proliferación como las epiteliales del intestino (Hernández *et al.*, 2022). La vía *de novo* es un proceso que consume alta energía para sostenerse y comienza con pequeñas moléculas de aminoácidos y CO<sub>2</sub> la cual produce monofosfato de nucleósido (Horton *et al.*, 2008). Los productos de la ruta *de novo* son la biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, que después son reducidos por la ribonucleótido reductasa a desoxirribonucleótidos al nivel de difosfato. Estos compuestos son fosforilados por nucleósido difosfato quinasas (NDPKs) a los dNTP correspondientes para asegurar la replicación del genoma nuclear (Elledge *et al.*, 1993). Estas rutas, además de mantener el recambio y reparación celular (división celular), son necesarios los nucleósidos para la reparación y replicación mitocondrial y mantener la energía necesaria para asegurar el funcionamiento correcto de las células (Wang, 2016).

Además, entre los procesos biológicos adicionales encontrados en HP se observó la regulación positiva de las enzimas que participan en la cadena de transferencia de electrones, complejo citocromo, actividad citocromo C oxidasa y proceso metabólico de ATP. Todos estos procesos están directamente ligados con la mitocondria y la fosforilación oxidativa. La mitocondria se encarga de la generación de energía celular a través de

fosforilación oxidativa (OXPHOS) la cual produce la mayoría de ATP en las células (Gobelli, 2018). Estos procesos biológicos fueron ampliamente enriquecidos en el transcriptoma del intestino distal de *T. macdonaldi* alimentada con HP.

Los resultados observados en HP sugieren que las dietas elaboradas a base de harina de pescado podrían tener un efecto positivo al proveer la cantidad suficiente de nucleótidos (purinas y pirimidinas) que son de suma importancia para la replicación y transcripción del ADN del intestino (Sachan *et al.*, 2012). Además, también se evidencia la importancia de otorgar una alimentación adecuada a los organismos en cultivo, ya que los procesos biológicos presentes en el transcriptoma del intestino de los juveniles de totoaba alimentados con HP están relacionados con la obtención de energía a través del transporte de electrones para la generación de ATP, asegurando un mejor desempeño energético. Anteriormente, en el estudio de Dam *et al.* (2020) se analizó el transcriptoma de intestino distal del jurel de castilla (*Seriola lalandi*) que fueron alimentados con harina de pescado, el cual reflejó procesos biológicos típico de un intestino distal saludable siendo los procesos biológicos de metabolismo de proteína y de ribonucleoproteína (la cual asiste en la transcripción de ADN y procesamiento de ADN) de los principales observados. Según estos autores, estos procesos biológicos generan un equilibrio esencial a los tejidos metabólicamente activos, donde la producción de nucleótidos y energía aseguran la homeostasis y la adaptación celular frente a las demandas fisiológicas en los juveniles que fueron alimentados con harina de pescado.

## Efecto de la dieta a base de harina de pescado como fuente principal de proteína en el transcriptoma intestinal de totoaba: nivel de genes

De los procesos biológicos observados en el tratamiento control, se encontró la expresión del gen *cox1*, *cox3*, *cyb*, *nu2m*, *nu4m* y *atpg*, todos estos genes relacionados directamente con el transporte de electrones en la mitocondria. COX1 y COX3 participan en la transferencia de electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular, proceso que produce agua. Este proceso libera la energía la cual se utiliza para el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo cual contribuye al gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP (Iwata *et al.*, 1995; Kadenbach, 2012). Por otra parte, los genes *nu2m* y *nu4m* producen las proteínas NU2M y NU4M (parte del complejo 1) las cuales se encargan de generar el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna para producir ATP a través de NADH hacia la ubiquinona (CoQ) (Wirth *et al.*, 2016). El siguiente gen, *cyb*, codifica para la subunidad b del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, ubiquinol-citocromo c reductasa. Este complejo tiene un papel importante en la transferencia de electrones dentro de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, específicamente desde el ubiquinol hasta el citocromo c (Trumpower, 1990; Vasta *et al.*, 2011). Finalmente, el gen *atpg* codifica la subunidad gamma de la ATP sintasa y es parte del complejo V de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y es responsable de la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico utilizando la energía generada por el gradiente de protones (Walker y Dickson, 2006).

Por otro lado, también se observó la sobre expresión del gen *enoa*, el cual codifica a la enolasa  $\alpha$ , la cual es una enzima clave en la glucólisis (vía metabólica que transforma la glucosa en piruvato) generando ATP por medio de la catálisis del 2-fosfoglicerato a

fosfoenolpiruvato ([Avilán et al., 2011](#)). Otro gen que participa en la glucólisis se encontró en el HP es *g3p2*, el cual codifica la enzima de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para catalizar la conversión de gliceraldehido-3-fosfato a 1,3-bisfoglicerato para la degradación de glucosa para generar ATP y energía ([Nicholls y Ferguson, 2013](#)).

Además de la relevancia energética, existen procesos de señalización metabólica que están mediados por la producción de ATP, por ejemplo, las ATP sintasas producen ATP en la membrana mitocondrial utilizando un gradiente de H<sup>+</sup>; el ATP disponible puede ser utilizada por la isoenzima 5 de la adenilato quinasa (*kad5*; gen sobre expresado en HP) para la interconversión de nucleótidos (AMP, CMP y dCMP; [Amiri et al., 2015](#)). Este proceso está regulado por las demandas energéticas locales y es importante para proporcionar nucleótidos para la síntesis de ADN y ARN y, por lo tanto, puede modular las señales metabólicas a través de la transcripción génica ([Noma, 2005](#); [Solaroli et al., 2009](#)).

Finalmente, el metabolismo de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), así como el control de los estados redox intracelulares y el transporte de electrones, pueden conducir a la incorporación y distribución de azufre en el intestino y el cuerpo. En este caso, se ha reportado que el metabolismo de los aminoácidos azufrados es muy importante en el tracto gastrointestinal de vertebrados donde la metionina es utilizada para producir homocisteína (precursores del donador de metilo biológico) y cisteína (en este contexto, importante para la síntesis de taurina) que permiten una regulación del crecimiento y la función intestinales ([Bauchart-Thevret et al., 2009](#)). De esta manera, la incorporación de azufre genera el subproducto 3-fosfoadenosina 5 fosfato (PAP), cuya concentración debe ser regulada por la nucleotidasa *bpnt1* (sobreexpresada en HP) para evitar defectos fisiológicos severos (condensación de núcleos en enterocitos) en hígado e intestino ([Hudson y York, 2014](#)).

Los genes detectados sugieren un efecto positivo de la HP en la obtención de energía en el intestino distal para el funcionamiento adecuado de este órgano. Esta energía puede ser utilizada para la estimulación de movimientos peristálticos del bolo alimenticio, la estimulación inmune y el funcionamiento adecuado de la barrera física y recambio de los enterocitos (Niklasson *et al.*, 2011; Saenz *et al.*, 2008).

### **Procesos biológicos afectados por el CPS30 (concentrado proteico de soya al 30%)**

Se ha observado en peces carnívoros que la inclusión de soya en dietas formuladas ocasiona inflamación intestinal y alteraciones de la sangre (Kiron *et al.*, 2020). La presencia de factores antinutricionales y/o la inclusión alta de soya a las dietas son reportadas como factores principales de la condición inflamatoria en los peces carnívoros. Al alimentar con tan solo el 30% de inclusión de CPS pueden presentar cambios intestinales en peces carnívoros (Zhang *et al.*, 2013; Kiron *et al.*, 2020). Además, se relaciona la severidad de la inflamación con los niveles de factores antinutricionales presentes en el alimento. En el presente estudio después de 90 días de alimentación con 30% de CPS se observaron diferentes procesos biológicos relacionados a una respuesta inflamatoria como la respuesta a Interleucina-1, y respuesta celular a interleucina. Las interleucinas son un grupo de proteínas que actúan como moléculas de señalización para regular la respuesta inmune estimulando la activación de linfocitos, además están relacionadas con efectos inflamatorias e inmunes potentes (Boraschi, 2022). Además, el tratamiento de CPS30 también se encontró un enriquecimiento de la respuesta inmunológica humoral no específica, la cual es la primera respuesta ante patógenos como el desarrollo de la barrera mucosa la cual se encuentra en el tracto digestivo y branquias de peces evitando que los patógenos traspasen e invadan al organismo (Rubio-Godoy, 2010). Por otro lado, se observó una clara respuesta

de defensa activada ya que varios procesos biológicos como la quimiotaxis de linfocitos y de monocitos fueron identificados en CPS30, los cuales por quimiotaxis se desplazan de manera guiada hacia áreas específicas en respuesta a un gradiente de señales químicas, principalmente con quimiocinas (Olabuena, 2000; Griffith *et al.*, 2014).

Los resultados observados en CPS30 sugieren que las dietas elaboradas con una inclusión del 30% de concentrado proteico de soya pudiera tener efectos debilitantes al intestino distal abriendo paso a patógenos y en respuesta invocando a respuestas inmunes como la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos B, las cuales son responsables de la generación de anticuerpos e inflamatorios como la respuesta al interleucina 1. Lo cual indica que el uso CPS al 30% es suficiente para generar que los procesos biológicos del organismo se deban principalmente a las respuestas inmunes e inflamatorias. Resultados anteriores, muestran respuestas inmunológicas activadas por el uso de proteína vegetal en los alimentos de peces carnívoros al realizarles estudios de transcriptómica. Por ejemplo, Kiron *et al.* (2020) obtuvieron procesos biológicos como la péptido cathelicidinas la cual es antimicrobiana y actúa como un antibiótico endógeno y modifica las respuestas inflamatorias, y galectina 3 la cual es secretada por macrófagos para señalar peligro ante patógenos en el salmón del atlántico (*Salmo salar*) alimentados con > 30% de proteína vegetal.

### **Genes afectados en CPS30 (concentrado proteico de soya al 30%)**

Debido a que en el tratamiento de CPS30 se encontraron respuestas inmunológicas e inflamatorias, se identificaron genes que participaron en dichos procesos biológicos tales como: *anxa1* y *il8* son dos genes que transcriben a la Anexina A1 y la Interleucina-8 respectivamente y que regulan la inflamación, la fagocitosis y activación de neutrófilos. *Anxa1* modula la inflamación (**efecto antiinflamatorio**), facilita la migración de leucocitos y

contribuye a la fagocitosis de los restos celulares y patógenos (Perretti y D'Acquisto, 2009), mientras que la Interleucina 8 es un factor quimiotáctico que media la respuesta inflamatoria (**efecto proinflamatorio**) al atraer neutrófilos, basófilos y células T.

Los genes que regulan los procesos del sistema inmunológico fueron diversos, como, por ejemplo: *ajl2*, *kv401* y *hv307* los cuales transcriben una lectina, una inmunoglobulina 4-1 y la inmunoglobulina 3-7, respectivamente. Estos genes están involucrados en la defensa de la piel al aglutinar bacterias y suprime su crecimiento contribuyendo a la inmunidad cutánea (*ajl2*) y, por otro lado, las inmunoglobulinas participan en el reconocimiento de antígenos específicos (*kv401* y *hv307*) que provocan la diferenciación de linfocitos B (Tasumi *et al.*, 2002; Lefranc, 2014; Tsutsui *et al.*, 2015).

Por otro lado, en el tratamiento de CPS30 se expresaron dos genes que regulan la respuesta antiviral intestinal (*dhx15* y *znfx1*). Estos genes detectan ARN virales y se unen a dsRNA, lo que genera que se restrinja su replicación y activan vías de defensa como las de los interferones (Lu *et al.*, 2014; Knight *et al.*, 2015).

Finalmente, otros genes sobre expresados en CPS30 fueron *atf2*, *tri27* y *mmp2* los cuales responde al estrés celular, participando de diferentes maneras. En el caso de *atf2* participa en la reparación de ADN dañado previniendo la apoptosis (Bhoumik *et al.*, 2007), sin embargo, *tri27* induce a la apoptosis a través de quinasas y *mmp2*, el cual promueve la angiogénesis y remodelación vascular.

Lo que se observa en el tratamiento CPS30 es una respuesta inmunológica activa en el intestino distal de *T. macdonaldi* ya que se presentó un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con inflamación cuando son alimentados con tan solo 30% de CPS. Además, este estudio demostró que el uso de derivados de la soya puede ocasionar cambios en el transcriptoma del intestino distal en totoaba indicando una posible disbiosis

por las respuestas inflamatorias al nivel celular y molecular, por cual es un modelo ideal para la investigación sobre enteritis ocasionada por los factores antinutricionales de la soya. Como se ha observado en otros trabajos sobre transcriptómica (Dam *et al.*, 2020; Kiron *et al.*, 2020) el uso de proteínas vegetales puede ocasionar inflamación en el intestino distal y ocasionar la activación del sistema inmunológico.

### **Procesos biológicos afectados por en CPS60 (concentrado proteico de soya al 60%)**

En el intestino distal de totobas alimentadas con el tratamiento CPS60 se observaron ciertos procesos biológicos, como la apoptosis indicando que hay daños de ADN, los cuales activan rutas de señalización para la apoptosis intrínseca de las células del intestino distal (Elmore, 2007; Pei y Strauss, 2013). La apoptosis es un proceso biológico importante de programación de muerte celular donde una o varias células son inducidas a su ruptura ocasionando la muerte celular o del tejido. Este proceso previene y elimina tumores, células defectuosas y puede dar espacio para que se regenere el tejido con daño tisular. Además, existen dos vías de apoptosis: la vía extrínseca, la cual, mediante mensajes hacia receptores celulares detona la programación de apoptosis y la vía intrínseca mediada por las mitocondrias (Contreras Villa *et al.*, 2011).

También se observaron procesos biológicos generales como: procesos metabólicos primarios y procesos biológicos donde se encuentra principalmente el metabolismo de lípidos. Es conocido que los lípidos después del proceso de digestión son absorbidos por medio del fluido biliar producido y secretado por el hígado (almacenado en la vesícula biliar), el cual facilita la digestión de los alimentos que se han procesado en el estómago, para su posterior absorción a través de los enterocitos del intestino (Kuipers *et al.*, 2014). Los lípidos son absorbidos principalmente a través de los enterocitos para su transformación a

moléculas como triglicéridos y colesterol para su transporte y usos como reserva energética para las células y tejidos (Field, 2001). Los lípidos también se utilizan para la síntesis de triacilgliceroles, fosfolípidos y ésteres de colesterol en el retículo endoplasmático liso para la formación de membrana plasmática y esteroides (Wetterau y Zilversmit, 1986; Marza *et al.*, 2005). Los ácidos grasos que no son metabolizados directamente por el intestino se dirigen a las mitocondrias para la Beta-oxidación donde el organelo lo procesa para obtener ATP (Hoyos Serrano *et al.*, 2014).

Además, se observaron en el intestino distal de totoabas alimentadas con el tratamiento CPS60 procesos biológicos ligados al metabolismo de aminoácidos (metabolismo primario, procesos catabólicos y procesos biológicos). El alimento fue previamente digerido en el estómago del organismo por medio de enzimas proteolíticas, una vez transportado el bolo alimenticio hacia el intestino se liberan enzimas pancreáticas como endopeptidasas para activar la tripsina, quimiotripsina, entre otros, para la obtención de tripéptidos, dipéptidos y aminoácidos libres los cuales con la acción del borde de cepillo del enterocito intestinal se absorben los aminoácidos (Hirji y Courtney, 1982; Kuz'mina y Gelman, 1997; Tengjaroenkul *et al.*, 2000). Durante el metabolismo de estos compuestos los enterocitos utilizan estos aminoácidos para la síntesis de proteínas, síntesis de proteínas que son destinadas para el remplazo de células perdidas por descamación y finalmente para la obtención de energía donde las mitocondrias se encargan de obtener ATP transformando el amoniaco a carbamoil fosfato por intervención de carbamoil sintetasa fosfato I generando 2 ATP (Torres *et al.*, 2014).

El tratamiento CPS60 parece inducir procesos biológicos los cuales impactan al intestino distal al activar apoptosis, metabolismo de lípidos y aminoácidos. La apoptosis, inducida por danos en el ADN, favorece la eliminación de células defectuosas y la

regeneración tisular. En cuando a los lípidos, pueden ser absorbidos y transformados en triglicéridos y colesterol para la formación de membranas y producción de energía mediante  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Los aminoácidos, tras su digestión y absorción, pueden ser utilizados en la síntesis de proteínas y generación de ATP. Estos hallazgos sugieren que CPS60 modula funciones intestinales clave para la homeostasis y regeneración celular. De igual forma, en el estudio de Tacchi *et al.* (2012) cuando se alimentó proteína vegetal a salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se observaron, a través de transcriptómica del intestino, procesos biológicos como apoptosis y regulación de apoptosis, así como, procesos metabólicos de lípidos y proteína.

### **Genes afectados por en CPS60 (concentrado proteico de soya al 60%)**

Los genes identificados en el tratamiento de CPS60 están relacionados con diversos procesos fisiológicos como el metabolismo de lípidos: genes como *acot4* y *elov4* los cuales regulan rutas metabólicas clave para la producción de lípidos, esteroides y ácidos grasos, esenciales en situaciones de estrés. El gen *acot4* produce la enzima ACOT4 que cataliza la hidrólisis de acil-CoAs, regulando los niveles de ácidos grasos libres y coenzima A intracelulares (Hunt *et al.*, 2006). Este gen ayuda en el manejo del metabolismo energético y lipídico bajo condiciones de estrés. Por otro lado, *elov4*: participa y codifica a la elongasa que participa en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, necesaria para la formación de lípidos esenciales en la barrera epidérmica (Ohno *et al.*, 2010; Barabas *et al.*, 2013).

Para el metabolismo de proteínas *Cbs*: codifica una enzima clave en la vía de transulfuración, convirtiendo homocisteína en cistationina, esencial para la síntesis de cisteína y el metabolismo del azufre (Kožich *et al.*, 2010). Este previene el daño por el estrés

oxidativo al regular los niveles de homocisteína. *Dnjb9*: Participa en la degradación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático y es esencial para la supervivencia de células B progenitoras y la producción de anticuerpos (Dong *et al.*, 2008). Finalmente, el gen *allc*: permite el uso de purinas como fuentes de nitrógeno secundarias cuando las primarias son escasas (Noguchi *et al.*, 1986).

Defensa: genes como *abd12* indica adaptaciones a condiciones inflamatorias, oxidativas hipóxicas. El gen *abhd12* es crucial para la hidrólisis de fosfatidilserina oxidada, una señal proapoptótica asociada al estrés inflamatorio severo (Savinainen *et al.*, 2014). Este protege contra el daño inflamatorio y mantiene la homeostasis lipídica. Por otro lado, *chia* fortalecen las defensas inmunológicas innatas y adaptativa frente a patógenos. *Chia* codifica una quitinasa que degrada quitina y quitotriosa, involucrada en la defensa contra patógenos como nematodos y hongos, además de proteger las células de la apoptosis (Boot *et al.*, 2001; Hartl *et al.*, 2009).

El tratamiento CPS60 parece inducir respuestas adaptativas en el organismo, reforzando la capacidad para enfrentar el estrés metabólico, oxidativo e inflamatorio. Estos procesos aseguran la funcionalidad del epitelio intestinal, el metabolismo energético y la respuesta inmune. En el estudio de Kiron *et al.* (2020) observaron genes como TNF (factor tumoral necrótico y Lisosoma CII) las cuales fueron sobre reguladas sugiriendo la activación de apoptosis en el intestino del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cuando fueron alimentados con altos niveles de proteína vegetal. Además, en el estudio de Tacchi *et al.* (2020) cuando alimentaron al *S. salar* con proteína vegetal observaron 16 genes como la *capasa-3*, 8, 14 asociados con apoptosis y proliferación celular y, se encontró el gen *TNFAIP2*, el cual está involucrado en la inflamación y quimiotaxis celular en el intestino medio.

## 9. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que las dietas basadas en harina de pescado y las formuladas con diferentes proporciones de concentrado proteico de soya tiene efectos específicos sobre los procesos biológicos y la expresión génica en el intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

### ***Dieta control HP***

La alimentación con la dieta elaborada con harina de pescado como fuente principal de proteína enriqueció procesos metabólicos relacionado con la síntesis y reciclaje de nucleótidos (purinas y pirimidinas), esenciales para la replicación celular, la reparación genómica y la producción de energía en el intestino distal. Además, los genes asociados con la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones destacaron por su rol en la generación eficiente de ATP, asegurando un adecuado desempeño energético y un intestino distal saludable.

### ***Dieta CPS30***

La inclusión del 30% de concentrado proteico de soya indujo alteraciones inflamatorias e inmunológicas en el transcriptoma del intestino distal de totoaba. Se observaron respuestas asociadas con inflamación y defensa inmunológica, incluyendo la activación de citocinas proinflamatorias con la interleucina-1, quimiotaxis celular y mecanismos inmunitarios humorales e innato. Los genes identificados sugieren un impacto negativo de los factores antinutricionales presentes en la soya, promoviendo enteritis y una posible disbiosis en *T. macdonaldi*.

## ***Dieta CPS60***

La inclusión del 60% de concentrado proteico de soya intensificó los efectos negativos en el intestino distal. Se evidenciaron procesos relacionados con apoptosis, alteraciones en el metabolismo de lípidos y daños en el ADN celular. Estas respuestas sugieren un deterioro de la salud intestinal, reflejando un impacto severo en la funcionalidad y homeostasis del intestino distal de totoaba.

En conclusión, el uso de concentrado proteico de soya para *T. macdonaldi* debe ser cuidadosamente evaluado, ya que niveles elevados generan efectos adversos sobre la salud intestinal, y el equilibrio inmunológico. Por otro lado, las dietas basadas en harina de pescado ofrecen beneficios en términos de replicación celular, energía y mantenimiento de la homeostasis intestinal. Este trabajo subraya la importancia de encontrar ingredientes adecuados para formular dietas balanceadas para optimizar la salud y el crecimiento de esta especie y de los organismos en cultivo, con el fin de proveer productos saludables al consumidor, así como, en caso de suplementación de totoaba al medio natural, estos organismos sean competentes.

## 10. REFERENCIAS

- Amiri, S., Amini-Khoei, H., Haj-Mirzaian, A., Rahimi-Balaei, M., Naserzadeh, P., Dehpour, A., & Hosseini, M. J. (2015). Tropicisetron attenuated the anxiogenic effects of social isolation by modulating nitrenergic system and mitochondrial function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(12), 2464-2475.
- Aragão, C., Conceição, L. E., Dias, J., Marques, A. C., Gomes, E., & Dinis, M. T. (2003). Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research*, 34(15), 1443-1452.
- Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A., & Concepción, J. L. (2011). Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites—perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme research*, 2011(1), 932549.
- Baeverfjord, G., & Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19(5), 375-387.
- Bakke, A. M., et al. "Fish physiology: The multifunctional gut of fish" (2010): 57-110.
- Barabas, P., Liu, A., Xing, W., Chen, C. K., Tong, Z., Watt, C. B., ... & Križaj, D. (2013). Role of ELOVL4 and very long-chain polyunsaturated fatty acids in mouse models of Stargardt type 3 retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5181-5186.
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., & Burrin, D. G. (2009). Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition research reviews*, 22(2), 175-187.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Bhoulmik, A., Lopez-Bergami, P., & Ronai, Z. E. (2007). ATF2 on the double—activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Research*, 20(6), 498-506.
- Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., & Aerts, J. M. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of biological chemistry*, 276(9), 6770-6778.
- Boraschi, D. (2022). What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. *Frontiers in immunology*, 13, 872155.
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 9.
- Byadgi, O., Puteri, D., Lee, J. W., Chang, T. C., Lee, Y. H., Chu, C. Y., & Cheng, T. C. (2014). The effect of TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotides on the intestinal immune response of cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Immunology Research*, 2014(1), 273284.
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular ecology resources*, 13(4), 663-673.
- Carver, J. D., & Walker, W. A. (1995). The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 6(2), 58-72.
- Chandhini, S., & Rejish Kumar, V. J. (2019). Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1379-1397.
- Cisneros-Mata, M., Montemayor-Lopez, G. and Roman-Rodriguez, M. (1995) 'Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*', *Conservation Biology*, 9(No. 4), pp. 806–814.

- Contreras Villa, D. D. (2011). Histopatología de las apendicitis agudas-necrosis versus apoptosis. *Morfología*.
- Cosgrove, M. (1998). Nucleotides. *Nutrition*, 14(10), 748-751.
- Cudeiro, J. (2005) Fisiología y fisiopatología de la nutrición. Fisiología de la absorción intestinal. Capítulo 3 I curso de especialización en nutrición, 2005: 37-42. ISBN: 84-9749-135-
- Day, O.J. and Plascencia González, H.G. (2000) 'Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L', *Aquaculture Nutrition*, 6(4), pp. 221–228. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00147.x>.
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. E. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Molecular biology of the cell*, 19(6), 2620-2630.
- Elledge, S. J., Zhou, Z., Allen, J. B., & Navas, T. A. (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*, 15(5), 333-339.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- FAO (2022) El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022, El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF; Available at: <https://doi.org/10.4060/cc0639es>.
- Field, F.J. (2001) 'Regulation of Intestinal Cholesterol Metabolism', in C.M. Mansbach, P. Tso, and A. Kuksis (eds) *Intestinal Lipid Metabolism*. Boston, MA: Springer US, pp. 235–262. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1195-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1195-3_13).
- Flanagan, C. and Hendrickson, J. (1976) 'Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *cynoscion macdonaldi*, in the northern gulf of california', January, pp. 531–544. Available at: <https://vivavaquita.org/wp-content/uploads/2020/04/FlanaganHendrickson76FB.pdf> (Accessed: 21 March 2023).
- Francis, G., Makkar, P.S. and Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture*. Available at: [www.elsevier.nl/locate/aqua-online](http://www.elsevier.nl/locate/aqua-online).
- Fuentes-Quesada, J. P., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Viana, M. T., Lazo, J. P., & Mata-Sotres, J. A. (2017). Enteritis Inducida por la Harina de Soya en las Dietas de Peces Marinos: Efectos Sobre la Integridad del Intestino Distal y la Respuesta Inmune en Totoaba macdonaldi. *Avances en Nutrición Acuicola*.
- Gallo, R.L. and Hooper, L. V. (2012) 'Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine', *Nature Reviews Immunology*, pp. 503–516. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3228>.
- Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 38(6), 551-579.
- Gobelli, D.J. (2018) Generación de Modelos Celulares para el Estudio de la Función de la Mitocondria en la Respuesta Inmune Innata.
- Gorriño, A.A. (2022) Inducción de la microbiota benéfica en *Totoaba macdonaldi* utilizando probióticos del género *Bacillus* y su efecto en el estatus de salud y en el crecimiento.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32(1), 659-702.
- Hartl, D., He, C. H., Koller, B., Da Silva, C. A., Kobayashi, Y., Lee, C. G., & Elias, J. A. (2009). Acidic mammalian chitinase regulates epithelial cell apoptosis via a chitinolytic-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, 182(8), 5098-5106.

- Hilborn, R. and Walters, C.J. (1992) 'Stock and Recruitment', Quantitative Fisheries Stock Assessment, pp. 241–296. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3598-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3598-0_7).
- Hirji, K.N. and Courtney, W.A.M. (1982) Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L, J. Fish Biol.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D. & Rawn, J. D. Principles of Biochemistry. In (eds. Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D. & Rawn, J. D.) 976 (Pearson Education, 2008).
- Hoyos Serrano, M., Rosales, C. and Vicenta, V. (2014) LIPIDOS: CARACTERISTICAS PRINCIPALES Y SU METABOLISMO.
- Hudson, B. H., & York, J. D. (2014). Tissue-specific regulation of 3'-nucleotide hydrolysis and nucleolar architecture. *Advances in biological regulation*, 54, 208-213.
- Huisman, J., Poel, T.F.B. van der. and Liener, I.E. (1989) Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: animal nutrition, feed technology, analytical methods: proceedings of the International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds', November 23-25, 1988, Wageningen, the Netherlands. Pudoc.
- Hunt, M., Rautanen, A., Westin, M., Svensson, T., & Alexson, S. (2006). Analysis of the mouse and human acyl-CoA thioesterase (ACOT) gene clusters shows that convergent, functional evolution results in a reduced number of human peroxisomal ACOTs.
- Illumina (2011) Quality Scores for Next-Generation Sequencing. Available at: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/).
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., & Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376(6542), 660-669.
- Jiao, F., Zhang, L., Limbu, S. M., Yin, H., Xie, Y., Yang, Z., ... & Rong, H. (2023). A comparison of digestive strategies for fishes with different feeding habits: Digestive enzyme activities, intestinal morphology, and gut microbiota. *Ecology and Evolution*, 13(9), e10499.
- Juárez-Gutiérrez, M. E., Navarrete-Ramírez, P., Monroy de la Peña, F. A., Llera-Herrera, R. A., Martínez-Chávez, C. C., Ríos-Durán, M. G., ... & Martínez-Palacios, C. A. (2021). Using nutrigenomics to evaluate microdiet performance in pike silverside larvae. *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1659-1670.
- Kadenbach, B. (2012) 'Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748, pp. 1–11. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_1).
- Kiron, V., Park, Y., Siriappagounder, P., Dahle, D., Vasanth, G. K., Dias, J., ... & Trichet, V. V. (2020). Intestinal transcriptome analysis reveals soy derivative-linked changes in Atlantic salmon. *Frontiers in Immunology*, 11, 596514.
- Knight, S. C., Xie, L., Deng, W., Guglielmi, B., Witkowsky, L. B., Bosanac, L., ... & Tjian, R. (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 350(6262), 823-826.
- Kortner, T. M., Skugor, S., Penn, M. H., Mydland, L. T., Djordjevic, B., Hillestad, M., ... & Krogdahl, Å. (2012). Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*, 8, 1-17.
- Kožich, V., Sokolová, J., Klatovská, V., Krijt, J., Janošík, M., Jelínek, K., & Kraus, J. P. (2010). Cystathionine β-synthase mutations: effect of mutation topology on folding and activity. *Human mutation*, 31(7), 809-819.
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture research*, 41(3), 333-344.

- Kuipers, F., Bloks, V.W. and Groen, A.K. (2014) 'Beyond intestinal soap - Bile acids in metabolic control', *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, pp. 488–498. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.60>.
- Kumar, V., Hossain, S., Ragaza, J. A., & Benito, M. R. (2020). The potential impacts of soy protein on fish gut health. In *Soybean Hum. Consum. Anim. Feed* (Vol. 2020). IntechOpen.
- Kuz'mina, V. V. and Gelman, A.G. (1997) 'Membrane-linked digestion in fish', *Reviews in Fisheries Science*, 5(2), pp. 99–129. Available at: <https://doi.org/10.1080/10641269709388595>.
- Lefranc, M. P. (2014). Immunoglobulin and T cell receptor genes: IMGT® and the birth and rise of immunoinformatics. *Frontiers in immunology*, 5, 22.
- Li, P. and Gatlin, D.M. (2006) 'Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications', *Aquaculture*, pp. 141–152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.009>.
- Liu, S., Wang, X., Sun, F., Zhang, J., Feng, J., Liu, H., ... & Liu, Z. (2013). RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. *Physiological genomics*, 45(12), 462-476.
- López, L. M., Flores-Ibarra, M., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M. A., & True, C. D. (2015). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 921-936.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*, 15(12). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Lu, H., Lu, N., Weng, L., Yuan, B., Liu, Y. J., & Zhang, Z. (2014). DHX15 senses double-stranded RNA in myeloid dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 193(3), 1364-1372.
- Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Hérou, C., & Babin, P. J. (2005). Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 232(2), 506-518.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., ... & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15103-15110.
- Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). "Bioenergetics 4." Academic Press (Capítulos sobre glucólisis y cadena de transporte de electrones).
- Niklasson L, Sundh H, Fridell F, Taranger GL, Sundell K. Disturbance of the intestinal mucosal immune system of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), in response to long-term hypoxic conditions. *Fish Shellfish Immunol*. 2011 Dec;31(6):1072-80. doi: 10.1016/j.fsi.2011.09.011. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21959038.
- Noguchi, T., Fujiwara, S., & Hayashi, S. (1986). Evolution of allantoinase and allantoicase involved in urate degradation in liver peroxisomes. A rapid purification of amphibian allantoinase and allantoicase complex, its subunit locations of the two enzymes, and its comparison with fish allantoinase and allantoicase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(9), 4221-4223.
- Noma, T. (2005) 'Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena.', *The Journal of Medical Investigation*, 52, pp. 127–136.
- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., ... & Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18439-18444.

- Olabuenaga, S.E. (2000) 'SISTEMA INMUNE EN PECES', *Gayana (Concepción)*, 64(2), pp. 205–215. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0717-65382000000200010>.
- Olmos, Jorge, et al. "Bacillus subtilis effects on growth performance and health status of *Totoaba macdonaldi* fed with high levels of soy protein concentrate" *Animals* 12.23 (2022): 3422.
- Olsson, C. (2010). The enteric nervous system. In *Fish Physiology* (Vol. 30, pp. 319-349). Academic Press.
- Pei, D. S., & Strauss, P. R. (2013). Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 743, 151-159.
- Peisker, M. (2001) Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition.
- Perretti, M., & D'acquistio, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(1), 62-70.
- Peterson, L.W. and Artis, D. (2014) 'Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis', *Nature Reviews Immunology*, pp. 141–153. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3608>.
- Quintana, C. (1988) 'Transporte intestinal de agua y electrolitos en el adulto', *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 17(2), pp. 69–74.
- Rubio-Godoy, M. (2010) Inmunología de los peces óseos. Revisión Teleost fish immunology. Review, *REVISIÓN Rev Mex Cienc Pecu*.
- Sachan, D., Gangwar, S., Gangwar, B., Sharma, N., (2012). Biological activities of purine analogues: a review. *J Pharm Sci Innovation*. 1. 29-34.
- Saenz, S. A., Taylor, B. C., & Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological reviews*, 226(1), 172-190.
- Salze, G. P., Davis, D. A., Resley, M., Rhody, N., Maine, K., Stuart, K., & Drawbridge, M. (2015). Advances in Understanding of Taurine Functions in Fishes Across Species and Life Stages. *Avances en Nutrición Acuicola*.
- Sauer, N., Mosenthin, R. and Bauer, E. (2011) 'The role of dietary nucleotides in single-stomached animals', *Nutrition Research Reviews*, pp. 46–59. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0954422410000326>.
- Savinainen, J. R., Patel, J. Z., Parkkari, T., Navia-Paldanius, D., Marjamaa, J. J., Laitinen, T., ... & Laitinen, J. T. (2014). Biochemical and pharmacological characterization of the human lymphocyte antigen B-associated transcript 5 (BAT5/ABHD16A). *PLoS One*, 9(10), e109869.
- Smith-Unna, R., Bournsnell, C., Patro, R., Hibberd, J. M., & Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome research*, 26(8), 1134-1144.
- Solaroli, N., Panayiotou, C., Johansson, M., & Karlsson, A. (2009). Identification of two active functional domains of human adenylate kinase 5. *FEBS letters*, 583(17), 2872-2876.
- Tafalla, C., Leal, E., Yamaguchi, T., & Fischer, U. (2016). T cell immunity in the teleost digestive tract. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 167-177.
- Tasumi, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Suetake, H., Suzuki, Y., & Aida, K. (2002). Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27305-27311.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T., & Smith, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 182(3-4), 317-327.

- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M. A., Flores-Ibarra, M., Alvarez Gonzalez, C. A., & López, L. M. (2017). Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, *48*(8), 4038-4057.
- Torres Camacho, V., & Alí Paz, G. I. (2014). Metabolismo de proteínas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, *41*, 2137.
- Trumpower, B.L. (1990) 'The protonmotive Q cycle: Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., pp. 11409–11412. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38410-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38410-8).
- Tsutsui, S., Yoshinaga, T., Watanabe, S., Aoyama, J., Tsukamoto, K., & Nakamura, O. (2015). Skin mucus C-type lectin genes from all 19 *Anguilla* species/subspecies. *Fisheries science*, *81*, 1043-1051.
- Uauy, R., Stringel, G., Thomas, R., & Quan, R. (1990). Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *10*(4), 497-503.
- Valenzuela, L., Pacheco, S., Rincón, G., Pavez, L., Lam, N., Hernández, A. J., ... & Ulloa, P. E. (2021). Intestinal transcriptome analysis reveals enrichment of genes associated with immune and lipid mechanisms, favoring soybean meal tolerance in high-growth zebrafish (*Danio Rerio*). *Genes*, *12*(5), 700.
- Vasta, V., Sedensky, M., Morgan, P., & Hahn, S. H. (2011). Altered redox status of coenzyme Q9 reflects mitochondrial electron transport chain deficiencies in *Caenorhabditis elegans*. *Mitochondrion*, *11*(1), 136-138.
- Walker, J.E. and Dickson, V.K. (2006) 'The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, pp. 286–296. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.01.001>.
- Wang, L. (2016) 'Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. Taylor and Francis Inc., pp. 578–594. Available at: <https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1125001>.
- Wang, L., Gao, C., Wang, B., Wang, C., Sagada, G., & Yan, Y. (2023). Methionine in fish health and nutrition: potential mechanisms, affecting factors, and future perspectives. *Aquaculture*, *568*, 739310.
- Wetterau, J.R. and Zilversmit, D.B. (1986) Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues, *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1857*(7), 902-914.
- Zhang, J.M. and An, J. (2007) 'Cytokines, inflammation, and pain', *International Anesthesiology Clinics*, pp. 27–37. Available at: <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.
- Zhang, J. X., Guo, L. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., ... & Zhou, X. Q. (2013). Soybean  $\beta$ -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. *PLoS one*, *8*(3), e58115.
- Zhang, W., Tan, B., Deng, J., Yang, Q., Chi, S., Pang, A., ... & Zhang, H. (2023). Soybean protein concentrate causes enteritis in juvenile pearl gentian groupers (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ x *Epinephelus lanceolatus*♂). *Animal Nutrition*, *12*, 171-185.
- Zhou, F., Song, W., Shao, Q., Peng, X., Xiao, J., Hua, Y., ... & Ng, W. K. (2011). Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles. *Journal of the world Aquaculture Society*, *42*(2), 184-197.

## ANEXO

**Tabla 1.** Análisis de calidad de las secuencias obtenidas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*, alimentadas con dietas formuladas a base de harina de pescado y de concentrado proteico de soya como fuente principal de proteína.

FASTQC PRE					
Secuencias Totales	Longitud de Secuencias	Quality Score	% GC	Nivel de Duplicación (%)	Muestra
41525020	150	36	49	4.24	INT 5-1
41525020	150	35	49	5.21	INT 5-2
33034625	150	36	47	10.29	INT 6-1
33034625	150	35	47	11.26	INT 6-2
39116854	150	36	46	4.71	INT 8-1
39116854	150	34	46	6.79	INT 8 -2
39378534	150	36	46	4.80	INT 9-1
39378534	150	36	46	5.38	INT 9-2
33836181	150	36	45	5.89	INT15-1
33836181	150	36	45	6.57	INT15-2
37181366	150	36	44	4.41	INT 23-1
37181366	150	34	44	5.01	INT 23-2
33937426	150	36	49	14.19	INT 26-1
33937426	150	36	49	14.78	INT 26-2
42783292	150	36	49	4.99	INT 27-1
42783292	150	34	49	6.57	INT 27-2
<b>Sumatoria</b>					
<b>601586596</b>					
<b>Promedio</b>					
<b>37599162.25</b>					

**Tabla 2.** Limpieza de secuencias obtenidas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*, alimentadas con dietas formuladas a base de harina de pescado y de concentrado proteico de soya como fuente principal de proteína.

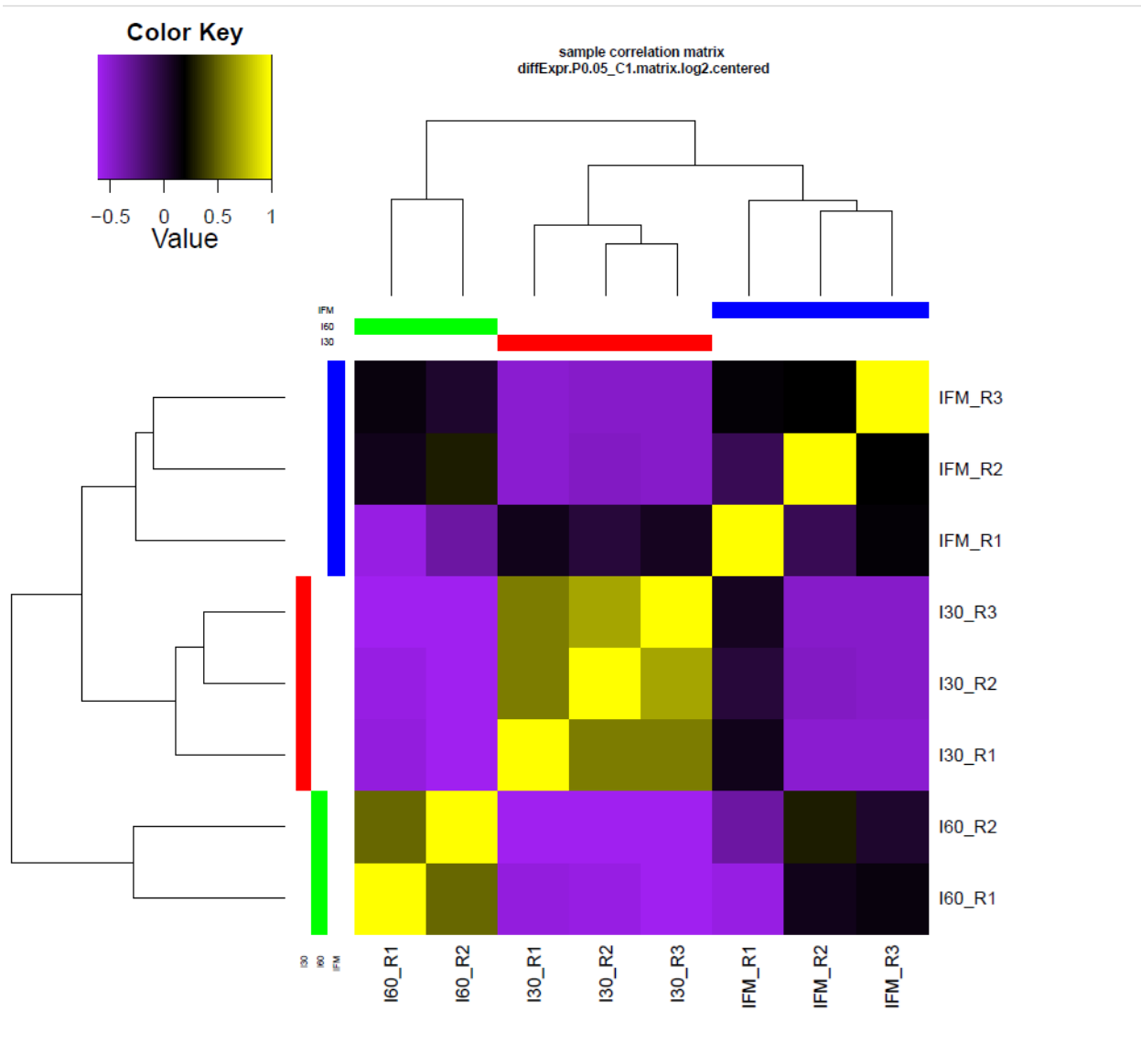
TRIMMOMATIC								
Muestra	INT5	INT6	INT8	INT9	INT15	INT23	INT26	INT27
<b>Pares de lectura de entrada</b>	41525020	33034625	39116854	39378534	33836181	37181366	33937426	42783292
<b>Sobrevivencia de Ambas</b>	39413309	31385686	36919984	37329765	31898440	35149491	32347760	40637598
<b>Sobrevivencia de Ambas %</b>	94.91	95.01	94.38	94.80%	94.27	94.54	95.32	94.98
<b>Sobrevivencia de complementaria forward</b>	1956131	1528089	2062251	1904427	1805886	1894300	1474907	2001458
<b>Sobrevivencia de complementaria forward %</b>	4.71	4.63	5.27	4.84	5.34	5.09	4.35	4.68
<b>Sobrevivencia de complementaria reverse</b>	122312	95441	101369	115646	106357	206269	91019	110150
<b>Sobrevivencia de complementaria reverse %</b>	0.29	0.29	0.26	0.29	0.13	0.29	0.27	0.26
<b>Eliminadas</b>	33268	25409	33250	28696	25498	31306	23740	34086
<b>Eliminadas %</b>	0.08	0.08	0.09	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08

**Tabla: 3** Análisis de calidad post limpieza de secuencias obtenidas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con dietas formuladas a base de harina de pescado y de concentrado proteico de soya como fuente principal de proteína.

FASTQC POST					
Secuencias Totales	Longitud de Secuencias	Quality Score	% GC	Nivel de Duplicación (%)	Muestra
39413309	36-150	36	49	3.77	INT 5-1
39413309	36-150	36	49	4.39	INT 5-2
31385686	36-150	36	47	9.66	INT 6-1
31385686	36-150	36	47	10.34	INT 6-2
36919984	36-150	36	46	4.15	INT 8-1
36919984	36-150	36	46	5.65	INT 8 -2
37329765	36-150	36	46	4.29	INT 9-1
37329765	36-150	36	46	4.54	INT 9-2
31898440	36-150	36	45	5.35	INT15-1
31898440	36-150	36	45	5.73	INT15-2
35149491	36-150	36	44	4.12	INT 23-1
35149491	36-150	36	44	4.55	INT 23-2
32347760	36-150	36	49	13.74	INT 26-1
32347760	36-150	36	49	14.12	INT 26-2
40637598	36-150	36	49	4.50	INT 27-1
40637598	36-150	36	49	5.62	INT 27-2
<b>Sumatorio</b>					
<b>570164066</b>					
<b>Promedio</b>					
<b>35635254.13</b>					

**Tabla 4.** Ensamble de secuencias obtenidas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con dietas formuladas a base de harina de pescado y de concentrado proteico de soya como fuente principal de proteína.

<b>Datos basados en todos los contigs transcritos:</b>		
	Contig N10:	3257
	Contig N20:	2467
	Contig N30:	1950
	Contig N40:	1531
	Contig N50:	1168
	Longitud mediana del contig:	368
	Contig Promedio:	692.07
	Bases ensamblados totales:	89978551
<b>Datos basados en solo el Isoforma más largo por GEN:</b>		
	Contig N10:	2951
	Contig N20:	2175
	Contig N30:	1673
	Contig N40:	1256
	Contig N50:	897
	Longitud mediana del contig:	330
	Contig Promedio:	594.6
	Bases ensamblados totales:	63856374



**Figura 6.** Heatmap de la variación entre tratamientos: HP (harina de pescado como fuente principal de proteína), CPS30 (concentrado proteico de soya inclusión al 30%) y CPS60 (concentrado proteico de soya inclusión al 60%) alimentados a juveniles de *Totoaba macdonaldi*.