

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



**“REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO,  
Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO  
OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*”.**

**T E S I S**

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

**LIZETH ADARELY VEZ BLANDÓN**

Ensenada, Baja California, México, Noviembre del 2024.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

“REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE  
CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL  
DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*”.

T E S I S

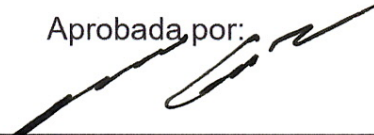
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA:

LIZETH ADARELY VEZ BLANDON

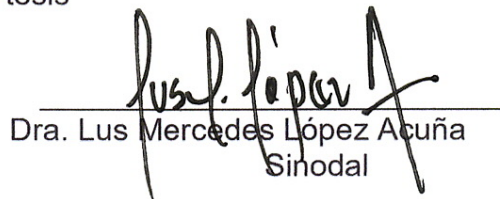
Aprobada por:



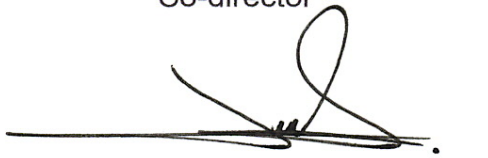
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
Director de tesis



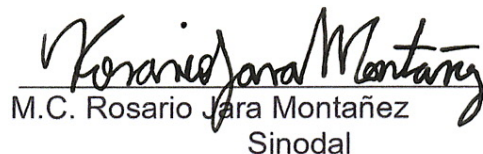
Dr. Ignacio Fernández Monzón  
Co-director



Dra. Lus Mercedes López Acuña  
Sinodal



Dr. Ernesto Larios Soriano  
Sinodal



M.C. Rosario Jara Montañez  
Sinodal

**Asunto:** Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Director de tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Lizeth Adarely Vez Blandon** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 20 de noviembre de 2024

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza**  
Director de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Co-Director de tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Lizeth Adarely Vez Blandon** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 20 de noviembre de 2024



---

**Dr. Ignacio Fernández Monzón**  
Co-Director de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargada de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Lizeth Adarely Vez Blandon** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

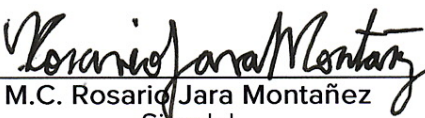
REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 20 de noviembre de 2024

Atentamente,

  
M.C. Rosario Jara Montañez  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

**Asunto:** Voto aprobatorio sobre trabajo de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargada de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Lizeth Adarely Vez Blandon** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

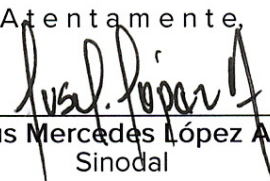
REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 20 de noviembre de 2024

Atentamente,

  
Dra. Lus Mercedes López Acuña  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Lizeth Adarely Vez Blandon** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

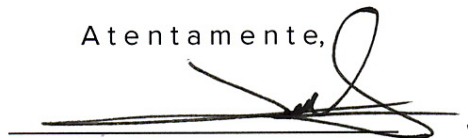
REQUERIMIENTO DE VITAMINA K1 Y K2 Y SU EFECTO SOBRE CRECIMIENTO, Y EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO OSTEOLÓGICO EN LARVAS DE *Totoaba macdonaldi*.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 20 de noviembre de 2024

Atentamente,



**Dr. Ernesto Larios Soriano**  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

## DEDICATORIA

Agradezco el apoyo y esfuerzo que me brindaron mis padres Verona Blandón y Rodolfo Vez al darme la oportunidad de realizar un proyecto más durante mi carrera universitaria, ya que sin su esfuerzo constante día a día nos dieron la oportunidad para crecer académicamente. Los amo siempre con todo mi corazón, gracias por cuidarnos y ser de nosotros mejores personas. Gracias a mis Hermanos Edson, Leslie, Saúl y a mi gemela por darme su cariño y apoyo para seguir con mis estudios, que durante el tiempo de pandemia no nos mirábamos casi, pedía por cada uno de ellos que estuvieran bien de salud, sobre todo a mi hermano mayor que siendo enfermero estaba día a día tras esta enfermedad y aunque solo lo mirábamos de lejos para que no nos llegaran a contagiar, agradezco que Dios lo protegió siempre. A cada uno de mis hermanos les agradezco su apoyo, Saúl gracias por darme ánimos en aquellos días donde solo podías darme aliento con la venta de carros, quizá no lo sepas, pero me dabas un motivo para no pensar en cosas tristes.

Hermanos y hermanas son los mejores compañeros de vida.

Y por último a cada uno de mis sobrinos Katy, Ximena, Sebastián, Valentina, Damián y Elián. Que, aunque soy solo su tía, me han enseñado que el amor de un niño es lo más puro que existe en este mundo. Los cuidaré siempre y estaré siempre para apoyarlos.

Y sé que los compañeros son pasajeros, pero siempre agradeceré a mi compañera Regina por estar conmigo y apoyarme siempre y no dejarme caer. Te quiero mucho

Gracias profe Mario, por brindarme su apoyo y sus consejos para realizar mis estudios, y poder culminar este proyecto académico. Le deseo todo lo mejor en la vida a usted y su familia.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por brindarme la oportunidad de ocupar un lugar en la máxima casa de estudios para poder formarme, el cual es de gran orgullo ser cimarrón y realizarnos como personas profesionales.

Al Consejo Nacional de Ciencias, Humanidades y Tecnología (CONAHCyT) por brindarme la beca de mis estudios de posgrado.

Gracias a la Facultad de Ciencias Marinas, que creo, no se puede igualar a ninguna otra facultad. Su calidez y confianza entre el personal docente y administrativo es inigualable.

Al fondo SADER – CONAHCyT por brindarme participar en el proyecto 291837 denominado: ***“Innovaciones tecnológicas para la conservación y reproducción de peces marinos con énfasis en Totoaba (Totoaba macdonaldi)”***.

Gracias a mi director de Tesis Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza, por permitirme culminar este proyecto el cual fue un gran reto, ya que al principio demostraba un poco de miedo trabajar con temas relacionados con biología molecular y sobre todo las técnicas y herramientas para realizarlo, ya que es tan fino y delicado su proceso, pero que al final fue un gran aprendizaje para mí.

Gracias a mi co-director Dr. Ignacio Fernández Monzón por guiarme en la redacción y análisis de los resultados de este trabajo, además de desarrollar las ideas para realizar este estudio.

Gracias a cada uno de los miembros del comité de tesis: Dra. Lus M. López Acuña, M.C. Rosario Jara Montañez, y Dr. Ernesto Larios Soriano por sus consejos, revisiones y comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo

Gracias a cada uno de ustedes por brindarme su apoyo, en especial al Dr. Ernesto que me brindo su tiempo y experiencia en realizar mis análisis en el laboratorio de genética, me asustó un poco pensar que me dejaría sola en el laboratorio, pero después se volvió mi lugar favorito.

Gracias a la Unidad de Biotecnología de Piscicultura y al Dr. Luis Enríquez por el espacio durante mis análisis de qPCR.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTO .....	4
INDICE GENERAL .....	6
INDICE DE FIGURAS .....	8
INDICE TABLAS .....	9
RESUMEN .....	10
Introducción.....	11
Pregunta problema .....	19
Justificación.....	19
Hipótesis .....	19
Objetivo general .....	19
Objetivos específicos: .....	20
1.- Abstract .....	21
3. Introducción.....	24
4. Materiales y Métodos .....	26
4.1. Obtención de organismos .....	26
4.2. Alimentación .....	27
4.3. Diseño experimental .....	28
4.4. Colecta de las larvas.....	28
4.5. Toma de muestras para biología molecular .....	29
4.6. Análisis estadístico.....	31
5. Resultados .....	31
5.1. Supervivencia y crecimiento.....	31
5.2. Expresión de genes involucrados con el ciclo de la vitamina K y el desarrollo óseo ...	32
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	38
8. Agradecimientos .....	38
9. Conflicto de interés .....	39
10. Referencias .....	40
11. Ethics statement .....	43
12. Credit authorship contribution statement .....	43

ANEXOS .....	44
APÉNDICE 1: Protocolos.....	44
Homogenización del tejido: .....	44
Extracción de ARN:.....	44
Precipitación y lavado de ARN:.....	44
Integridad del ARN:.....	45
Purificación de ARN:.....	45
Transcripción reversa (Síntesis de ADN complementario) .....	46
Combinación de primer con ARN blanco y desnaturalización: .....	47
Transcriptasa reversa: .....	47
Verificación ADN complementario mediante PCR y gel:.....	47
Estandarización de Primers: .....	48
Protocolo PCR tiempo real para realizar curvas de eficiencia: .....	49
Evaluación genes de referencia: .....	50

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2022 ) .....	12
Figura 2. Supervivencia (%) y peso (mg) de larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con alimento vivo enriquecido con diferentes niveles de vitaminas K1 y K2, el cual consiste en Control 0: Sin adición de VK; VK1: VK1 250 mg kg <sup>-1</sup> ; VK1+2B:VK1 250 mg kg <sup>-1</sup> + VK2 125 mg kg <sup>-1</sup> ; VK2B: VK2 125 mg kg <sup>-1</sup> .....	32
Figura 3. Expresión génica relativa de la <i>subunidad 1 del complejo epóxido reductasa de vitamina K (vkorc1)</i> y de la <i>vkorc1 like 1 (vkorc1l1)</i> durante el estadio larvario de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2 .....	32
Figura 4. Expresión génica relativa del gen <i>γ-glutamil-carboxilasa (ggcx)</i> y <i>proteína morfogenética ósea 2 (bmp2)</i> durante el estadio larvario de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2 .....	33
Figura 5. Expresión génica relativa del gen <i>osteocalcina (oc)</i> , durante el estadio larvario de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2. ....	34

## INDICE TABLAS

Tabla 1. Suplementaciones de vitaminas K1 y K2 en las emulsiones de enriquecimiento del alimento vivo para <i>Totoaba macdonaldi</i> ??.....	28
Tabla 2. Primers sintetizados para analizar los niveles de expresión de genes involucrados en el ciclo de la vitamina K y en deformidades esqueléticas de <i>Totoaba macdonaldi</i> ?.....	30
Tabla 3. Preparación de purificación de ARN para larvas de peces ( <i>Totoaba macdonaldi</i> )....	45
Tabla 4. Preparación de transcriptasa reversa para larvas de peces ( <i>Totoaba macdonaldi</i> )...47	
Tabla 5. Preparación de la mezcla de la reacción de PCR a punto final para larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	48
Tabla 6. Productos utilizados para preparación del la mezcla de la reacción de PCR en tiempo real.....	50

## RESUMEN

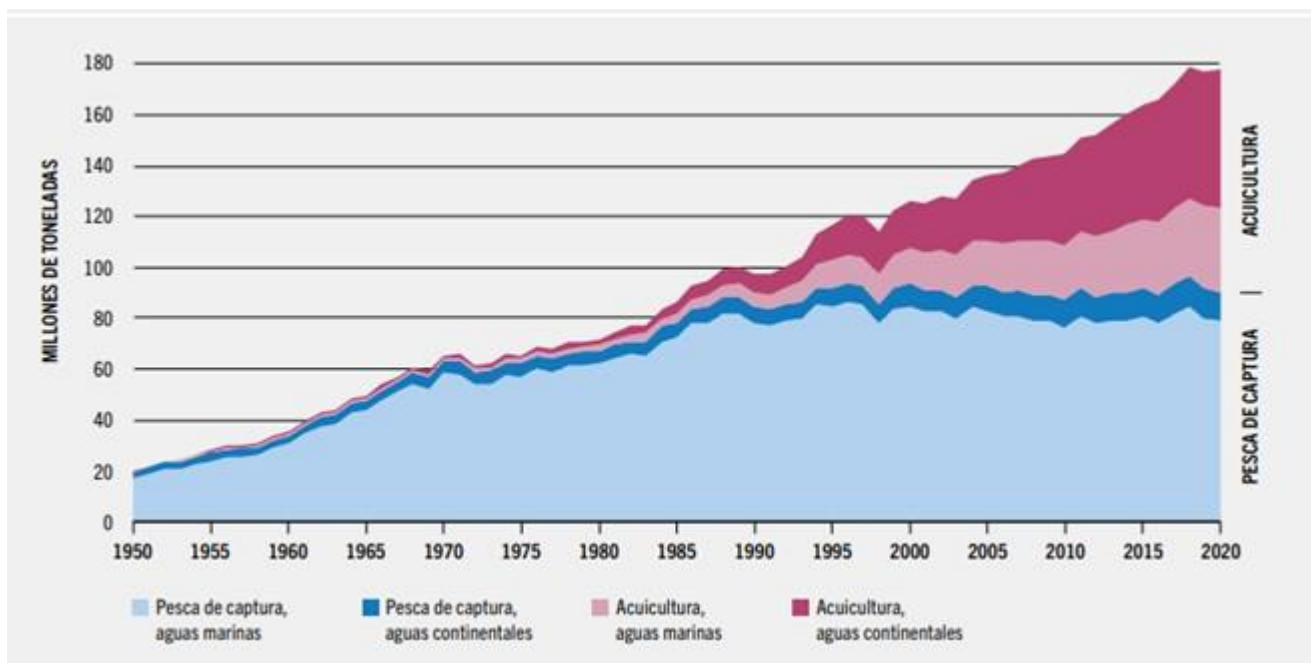
Los esfuerzos de investigación en nutrición acuícola se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen supervivencia, crecimiento y calidad en organismos cultivados en laboratorio durante su estadio larvario. La incidencia de deformaciones puede reducirse considerablemente mediante una dieta ajustada de acuerdo con los requerimientos nutricionales de cada especie. La vitamina K (VK) es una vitamina liposoluble que existe en dos formas naturales (filoquinona (VK1) y menaquinona (VK2)). Su inclusión en el alimento es de gran importancia ya que es un cofactor esencial para distintas proteínas como proteínas óseas y de coagulación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos niveles de enriquecimiento de VK1 y VK2 incorporada en el alimento vivo como rotíferos y artemia y su efecto en el crecimiento, sobrevivencia y calidad larvaria en *Totoaba macdonaldi*. En este estudio se realizaron cuatro tratamientos (cada uno por triplicado) resultantes del enriqueciendo del alimento vivo (rotíferos y Artemia) con diferentes concentraciones de VK1 y VK2. Sin enriquecimiento (Control): 0 mg kg<sup>-1</sup>; suplementando VK1 en 250 mg kg<sup>-1</sup> (VK1); suplementando VK1 en 250 mg kg<sup>-1</sup> y VK2 en 125 mg kg<sup>-1</sup> (VK1+2B); y suplementando VK2 en 125 mg kg<sup>-1</sup> (VK2B). Los tratamientos con VK2B y VK1+2B fueron los que tendieron a mejorar la calidad larvaria de *Totoaba macdonaldi* en el parámetro de la supervivencia, siendo diferentes de manera significativa con respecto al tratamiento Control. La mayor tasa de expresión del gen *subunidad 1 del complejo epóxido reductasa de vitamina K like 1 (vkorc111)* se presentó en el tratamiento Control y VK2B (4.67 ± 5.31 y 5.68 ± 3.58 veces, respectivamente). El gen *γ-glutamyl-carboxilasa (ggcx)* mostró mayor tasa de expresión en el grupo Control y VK2B (0.88 ± 0.32 y 1.26 ± 0.32 veces, respectivamente). Para el gen *proteína morfogenética ósea 2 (bmp2)* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El gen *osteocalcina (oc)*, tampoco presentó diferencias significativas. El uso de la vitamina K en sus distintas formas (VK1 y VK2) contribuyen a modular distintos genes como *vkorc1* y *vkorc111* siendo buenos biomarcadores para la elaboración de protocolos de alimentación óptimos para un mejor desarrollo y supervivencia larval en la *Totoaba macdonaldi*.

**Palabras clave:** Totoaba, Larvas, Vitamina K, Expresión genes, Deformidades.

## Introducción

Los productos acuícolas junto con la producción ganadera y vegetal son primordiales para que se logre satisfacer la creciente demanda global de proteínas (Mata-Sotres *et al.*, 2018). La acuicultura no es solo un complemento a la pesca, también es una de las actividades de mayor crecimiento en lo que respecta a la generación de alimentos de alta calidad, y es debido a que los animales que se cultivan son más eficientes para utilizar los nutrientes de los alimentos para su crecimiento somático en comparación con los animales terrestres (Vallés-Bueno, 2013).

Así mismo, el rápido crecimiento de la acuicultura ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas al mejoramiento de los procesos de producción y los rendimientos económicos en los cultivos. El mejoramiento genético, sanidad, alimentación y nutrición de los organismos que se cultivan, son algunos de los campos de investigación más activos en relación con los organismos marinos (Kraul, 1989). Entre las especies que se cultivan en la actualidad destacan peces, moluscos, crustáceos y macroalgas. El reporte actual de la FAO (2022) estimó un total de 178 millones de toneladas de producción de animales acuáticos provenientes de la pesca y la acuicultura. La acuicultura, por su parte, contribuyó con un 49 % de la producción, representando un total de 88 millones de toneladas (Figura 1). Además de la producción de animales acuáticos, la producción de algas se estimó en 36 millones de toneladas (peso fresco) de los cuales el 97 % procedían de la acuicultura marina.



**Figura 1.** Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2022).

La producción de peces por área de estanque o por unidad de cultivo y, por tanto, la rentabilidad de la cría de peces depende en gran medida de la cantidad y calidad de alimento proporcionado (Hepher, 1988). La obtención y cría de grandes cantidades de larvas de peces marinos es el paso previo para la puesta en cultivo a una escala comercial. Determinar distintos factores como lo son luz, temperatura, oxígeno, sistema de producción, así como una alimentación que cubra los requerimientos esenciales de los animales, es vital para un mejor crecimiento, supervivencia y desarrollo corporal. Por tal razón, esfuerzos de investigación se han dirigido recientemente a determinar las condiciones que permitan incrementar la supervivencia, crecimiento y calidad de las larvas. Estos esfuerzos incluyen estudios de fisiología digestiva, requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo con el objeto de planificar mejor las estrategias de alimentación.

Los requisitos en términos de nutrición con el entorno físico, químico y microbiano deben de cumplirse para garantizar una tasa alta de supervivencia y un desarrollo adecuado durante

las primeras etapas de la vida. Una alimentación de mala calidad provoca deficiencias nutricionales en los organismos, creando desequilibrios en el desarrollo de las larvas, lo que origina mal desarrollo de tejidos vitales como el digestivo y el esquelético. Por ello, las malformaciones permanentes a menudo se presentan en las primeras etapas de desarrollo, deteriorando el bienestar de los peces y el rendimiento en la producción (Helvik *et al.*, 2009). Por ejemplo, las anomalías esqueléticas tienen efecto negativo en la industria de procesamiento primario, lo cual implica que el porcentaje de estas deformidades pueden causar pérdida en la producción, ya que, durante el cultivo los peces con deformidades deben de ser retirados del sistema acuícola. La presencia de estas deformaciones también daña la imagen del producto final hacia los consumidores, lo que ocasiona que exista menor interés en el mercado de obtener producto que presente deformidades (Bonglione *et al.*, 2013).

Distintos factores son responsables de las malformaciones esqueléticas craneales y del eje vertebral (que son deformidades severas si se presentan en etapas tempranas), las cuales se pueden deber a una mala nutrición (por exceso o deficiencia de proteína, lípidos, micro y macronutrientes, entre otros), a densidades de cultivo, condiciones abióticas desfavorables, enfermedades y factores genéticos (Boglione *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2013), entre otros. Por ejemplo, ciertas mutaciones de genes específicos están relacionadas con la fragilidad ósea (e.g., colágeno tipo I (*col1a1*) y II (*col1a2*)), relacionados a su vez con el colágeno, proteína que forma parte del hueso y otras estructuras animales. Otros marcadores ontogénicos importantes son el gen de la *fosfatasa alcalina* (*alp*), necesaria para la mineralización, la cual interviene en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas, o el gen de la *osteocalcina* (*oc*), proteína que contiene ácido  $\gamma$ -carboxil glutámico, aminoácido que liga el calcio y que necesita vitamina K para su modificación post-transduccional (Argüello-Guevara *et al.*, 2014; Pavón *et al.*, 2016).

La incidencia de larvas con deformaciones puede reducirse considerablemente mediante el desarrollo de una dieta ajustada a los requerimientos nutricionales de la especie y de su estadio de desarrollo particular (Gisbert *et al.*, 2008). Los organismos utilizados para la primera alimentación de larvas de peces marinos en cautiverio constan principalmente de rotíferos (*Brachionus sp.*) y Artemia (*Artemia sp.*) por su tamaño ideal pero no por su contenido nutricional. Las concentraciones de vitaminas en rotíferos de cultivo varían según las concentraciones de vitaminas en las dietas y el tipo de enriquecimiento de vitaminas que se pretende utilizar. Si el enriquecimiento es insuficiente, los rotíferos presentan bajos niveles e incluso indetectables de vitaminas A, C y E, entre otras. Además, la Artemia no posee vitamina A y sus concentraciones de vitamina C y E son bajas. Sin embargo, existe la forma de enriquecer con estos micronutrientes a las especies que son utilizadas como presas vivas para los cultivos de larvas (Holt, 2011).

La función fisiológica de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) durante la ontogenia de las larvas de peces marinos son un tema de estudio donde aún no se conocen a ciencia cierta los efectos negativos que causan cada una de ellas cuando se alimenta a los organismos con bajas o nulas dosis de estos micronutrientes. La investigación en su mayoría se ha centrado en los requerimientos de larvas y la disponibilidad de estas vitaminas en el alimento vivo utilizado en la etapa temprana, ya que juegan un papel importante en la homeostasis de las larvas (Fernandez *et al.*, 2018). Un ejemplo es el de la vitamina A, que tiene una función principal en el desarrollo de la embriogénesis de los vertebrados (Hamre *et al.*, 2010).

El conocimiento en las investigaciones de larvas de peces se extrapola de los estudios en otros vertebrados y también en parte de peces juveniles y adultos. La vitamina A es esencial para establecer los ejes del cuerpo y los órganos en embriones de vertebrados e interactúa con la vitamina D (Fernandez *et al.*, 2018). En larvas de peces marinos, un exceso de vitamina A estimula la pigmentación, sin embargo, induce a deformidades vertebrales (Hamre *et al.*,

2010). Los organismos utilizados como alimento vivo contienen muy poca vitamina A, pero las larvas de peces marinos parecen convertir los carotenoides presentes en Artemia y copépodos en vitamina A. En larvas de peces marinos y en juveniles, la vitamina E mejora los síntomas de la deficiencia de vitamina C, al tiempo que protege contra el efecto oxidativo de los ácidos grasos  $\omega$ -3. La vitamina D es importante para la modulación de la homeostasis de calcio y fósforo para el desarrollo del esqueleto de los vertebrados. Se considera que el almacenamiento de vitamina K (VK) es en el hígado, pero, tejidos y sistemas como el plasma sanguíneo, tejido adiposo, los huesos, el corazón, ovarios, páncreas y la piel contienen niveles significativos de VK. Esto se correlaciona con las funciones evolutivamente conservadas de la VK: el rol de activación del receptor X de pregnano (Pxr) y el de cofactor de la  $\gamma$ -glutamil carboxilasa (Ggcx) para la carboxilación de las proteínas VK dependientes, y el reciclaje de la VK en esa reacción de carboxilación por las VK epóxido reductasa (Vkorc1) y la proteína 1 similar a Vkorc1 (Vkorc1l1) (Beato *et al.*, 2020; Hamre *et al.*, 2010).

Las vitaminas son absorbidas en el intestino delgado en presencia de sales biliares, y es transportado en quilomicrones por la circulación linfática hacia el hígado para ser metabolizadas y excretadas (Koolman, 2005). En cuanto a la VK, esta vitamina liposoluble existe en dos formas naturales: filoquinona (VK1), la cual es sintetizada por las plantas encontrándose en vegetales (perejil, col, espinacas, lechuga, brócoli, etc.), en frutas (kiwi, uvas verdes, o aguacate), así como en el hígado, la carne de vacuno y la mantequilla (Diaz, 2015). En el caso de la VK2, ésta se caracteriza por tener varios rangos de formas que tienen por nombre menaquinonas (MK-n), donde (n) representa el número de residuos de isoprenilo insaturados. Estas menaquinonas abarcan desde MK-4 a la MK-10 y son producidas por bacterias. En el caso de la MK-4, es producida por medio de una conversión endógena de filoquinonas endógenas y de las MK-7, -8, o -9. Como tercera forma se encuentra la VK3

(menadiona) que es una sal sintética soluble en agua sin cadena lateral, y necesita metabolizarse para ser funcional (provitamina) (Beato *et al.*, 2020).

Una pequeña parte de filoquinona y la menaquinonas son transportadas en lipoproteínas de muy baja y baja densidad, segregadas por el hígado hacia tejidos extrahepáticos como el hueso. En humanos estos suplementos son considerados para tratar alteraciones de la coagulación, así como el tratamiento de la osteoporosis (Beato *et al.*, 2020; Díaz, 2015). Su deficiencia en el alimento tiene un efecto importante sobre la coagulación sanguínea y en la mineralización ósea en los organismos. A pesar de que la vitamina D y el calcio son las principales sustancias para la salud ósea, la VK también es esencial en el metabolismo óseo.

Se sabe que la VK es un cofactor esencial para distintas proteínas, entre ellas, las proteínas de coagulación, anticoagulantes y proteínas óseas como lo son la osteocalcina (Oc, también conocida como proteína Gla del hueso (Bgp)) y la proteína Gla de la matriz (Mgp). En el caso de la Oc no se conoce bien su rol, pero se deduce que puede participar como un regulador de la formación y maduración mineral ósea. En el caso de la proteína Gla de la matriz, actúa como un inhibidor de la mineralización vascular, además de tener una alta afinidad por iones de calcio participando en la organización del tejido óseo. El rol que ejerce la VK en la carboxilación es la cesión de electrones para modificar un aminoácido, necesario para que las proteínas dependientes de VK puedan hacer su función. Debido a su importancia, los requerimientos de la VK deben ser establecidos, ya que distintos factores como la nutrición, genética, y el entorno, conllevan a alteraciones esqueléticas (Díaz, 2015).

## **Antecedentes**

El hueso es un tejido vascularizado aeróbico fundamental para soportar la musculatura y órganos de los animales. Este tejido se encuentra compuesto por células (osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento ósea), una fase mineral (fosfato de calcio), una matriz

extracelular orgánica mineralizada y su principal componente, el colágeno tipo I y tipo II (este último presente en peces (Bonglione *et al.*,2013).

Schwalfenberg (2017) menciona que el uso de la VK es indispensable como moléculas auxiliares para la producción de proteínas involucradas en la homeostasis del calcio y la coagulación. Siendo la VK1 la que tiene como función principal participar en la coagulación de la sangre, mientras que la VK2 participa en la regulación de la biodisponibilidad del calcio, evitando que este se acumule en los vasos sanguíneos y mejorando la densidad ósea.

En peces, diversos estudios han determinado la importancia de las vitaminas liposolubles para el desarrollo larvario. Udagawa (2000) menciona la importancia de la VK en las dietas para peces ya que la deficiencia de esta induce problemas de coagulación, anemia, así como, problemas durante la etapa de desove y mortalidad en la descendencia. Udagawa (2006) observó malformaciones esqueléticas en las vértebras de larvas de *Fundulus heteroclitus* alimentadas con una baja y alta concentración VK. Haga y colaboradores (2010), reportaron malformaciones esqueléticas en las vértebras de larvas de *Paralichthys olivaceus* alimentadas con nauplios de Artemia conteniendo un exceso de vitamina A. Hernández *et al.* (2013), observaron deformidades en las vértebras de *Rhamdia quelen* utilizando solo nauplios de Artemia. Kertaoui y colaboradores (2019) observaron deformidades en las vértebras en larvas de *Sander lucioperca* cuando utilizaron dietas extruidas comerciales con distintos contenidos en vitaminas A, C, D y E. Fernández y colaboradores (2017) evaluaron niveles de vitamina A en distintos estadios larvario de *Solea senegalensis* y un exceso de esta vitamina en el alimento vivo influyó en la morfogénesis de los peces. Además, Fernández *et al.* (2011) evaluaron distintos marcadores moleculares relacionados con el esqueletogénesis durante el desarrollo larvario de *Sparus aurata* y como se altera su expresión mediante una hipervitaminosis. Fernández *et al.* (2009) realizaron un estudio con larvas de *S. senegalensis* utilizando Artemia enri-

quecida con diferentes emulsiones de vitamina A, sus resultados muestran que las deformidades vertebrales fueron incrementando cuando se ofrecieron altas dosis de vitamina A en las etapas tempranas del desarrollo, afectando la aleta caudal, principalmente.

Beato *et al.* (2020) tuvo como objetivo obtener secuencias de transcritos de las *vkors* completas de *S. senegalensis*, que realizan el reciclaje de la VK, y como este reciclaje es vital para mantener un buen crecimiento y desarrollo en los peces. Además, Fernández *et al.* (2014) observó como a través del uso de warfarina (inhibidor del reciclaje de la VK), la VK está relacionada con el control de la coagulación sanguínea. Al evaluar como la exposición crónica a warfarina (de 5-17 días post eclosión (dpe) sobre el pez cebra (*Danio rerio*) se pudieron observar tejidos con calcificación patológica, corazón subdesarrollado y malformaciones en la aleta caudal, de acuerdo con la expresión alterada de *pxr*, *vkors*, *ggcx* y *oc*.

Es por ello, por lo que para el presente estudio se evaluó el uso de la vitamina K1 y K2 con distintas concentraciones y mezcla en un enriquecedor del alimento vivo como rotíferos y artemia, como vehículo, y su efecto en el crecimiento, sobrevivencia y la expresión de genes que se involucran en estas malformaciones durante la etapa larvaria de *T. macdonaldi*, con la intención de mejorar la calidad en esta etapa de cultivo.

## **Pregunta problema**

¿La supervivencia de *Totoaba macdonaldi* durante la fase larvaria es alterada por el contenido en vitaminas K1 y K2? ¿Dichos efectos se correlacionan con la alteración de la expresión de genes involucrados en el ciclo de la VK?

## **Justificación**

Las malformaciones esqueléticas en larvas de peces cultivados son un problema en la industria, deteriorando el bienestar de los peces y el rendimiento en la producción. A pesar de que la información sobre las vitaminas liposolubles en estos estadios es escasa, se sabe que juegan un papel importante en esta etapa de desarrollo. Por lo tanto, su adición al alimento podría mejorar la calidad larvaria, y por lo tanto su supervivencia.

## **Hipótesis**

La incorporación de vitamina K en sus formas K1 y K2 en alimento vivo como rotíferos y artemia durante la etapa larvaria de *Totoaba macdonaldi* mejora la calidad y supervivencia larvaria de la especie.

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto de distintos niveles de enriquecimiento de vitamina K1 y K2 incorporada en el alimento vivo como rotíferos y artemia y su efecto en el crecimiento, sobrevivencia y calidad larvaria en *Totoaba macdonaldi*.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar el crecimiento, sobrevivencia y parámetros productivos de larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con alimento vivo como rotíferos y artemia enriquecidos con diferentes niveles de vitamina K1 y K2.
- Analizar los niveles de expresión de genes involucrados en deformidades esqueléticas (*vkorc1*, *vkorc1l1*, *ggcx*, *bmp2* y *oc*) en larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con alimento vivo como rotíferos y artemia enriquecidos con diferentes niveles de vitamina K1 y K2.

**Efecto combinado de vitamina K1 y K2 sobre la supervivencia, crecimiento y expresión de genes involucrados en el desarrollo osteológico en larvas de *Totoaba macdonaldi***

Lizeth A. Vez-Blandón <sup>1</sup>, Ignacio Fernández <sup>2\*</sup>, Lus M. López <sup>1</sup>, Ernesto Larios-Soriano <sup>1</sup>, Rosario Jara Montañez <sup>1</sup>, Mario A. Galaviz-Espinoza <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Marine Sciences, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carretera Transpeninsular Ensenada - Tijuana No. 3917, Col. Playitas, 22860, México.

<sup>2</sup>Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), 24346 Vega de Infanzones, León, Spain.

Corresponding authors (equal contribution): Mario A. Galaviz-Espinoza (mgalaviz@uabc.edu.mx); Ignacio Fernández Monzón (Ignacio.fernandez@csic.es)

**1.- Abstract**

Research efforts in aquaculture nutrition have been directed to determine the conditions that will increase survival conditions that increase survival, growth and quality in organisms cultured in the laboratory cultured organisms during their larval stage. The incidence of deformities can be considerably reduced by a diet adjusted according to the nutritional requirements of each species. Vitamin K (VK) is a fat-soluble vitamin that exists in two natural forms (phylloquinone (VK1) and menaquinone (VK2)). Its inclusion in feed is of great importance since it is an essential cofactor for different proteins such as bone and coagulation proteins. The main objective of this work was to evaluate the effect of different enrichment levels of VK1 and VK2 incorporated in live food such as rotifers and artemia and their effect on growth, survival and larval quality in *Totoaba macdonaldi*. In this study, four treatments (each in triplicate) resulting from the enrichment of live food (rotifers and Artemia) with different concentrations of VK1 and VK2 were carried out. No enrichment (Control): 0 mg kg<sup>-1</sup>; supplementing VK1 at 250 mg kg<sup>-1</sup> (VK1); supplementing VK1 at 250 mg kg<sup>-1</sup> my VK2 at 125 mg kg<sup>-1</sup> (VK1+2B); and supplementing VK2 at 125 mg kg<sup>-1</sup> (VK2B). The treatments with VK2B and VK1+2B tended to improve the larval quality of *Totoaba macdonaldi* in the survival parameter, being significantly different with respect to the Control treatment.

The highest expression rate of the vitamin K like 1 epoxide reductase complex subunit 1 (*vkorc111*) gene occurred in the Control and VK2B treatment ( $4.67 \pm 5.31$  and  $5.68 \pm 3.58$  fold, respectively). The  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (*ggcx*) gene showed higher expression rate in the Control and VK2B group ( $0.88 \pm 0.32$  and  $1.26 \pm 0.32$ -fold, respectively). For the bone morphogenetic protein 2 (*bmp2*) gene, no significant differences were found between treatments. The osteocalcin gene (*oc*) also showed no significant differences. The use of vitamin K in its different forms (VK1 and VK2) contributes to modulate different genes such as *vkorc1* and *vkorc111* being good biomarkers for the elaboration of optimum feeding protocols for a better development and larval survival in *Totoaba macdonaldi*.

## 2.- Resumen

Los esfuerzos de investigación en nutrición acuícola se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen supervivencia, crecimiento y calidad en organismos cultivados en laboratorio durante su estadio larvario. La incidencia de deformaciones puede reducirse considerablemente mediante una dieta ajustada de acuerdo con los requerimientos nutricionales de cada especie. La vitamina K (VK) es una vitamina liposoluble que existe en dos formas naturales (filoquinona (VK1) y menaquinona (VK2)). Su inclusión en el alimento es de gran importancia ya que es un cofactor esencial para distintas proteínas como proteínas óseas y de coagulación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos niveles de enriquecimiento de VK1 y VK2 incorporada en el alimento vivo como rotíferos y artemia y su efecto en el crecimiento, sobrevivencia y calidad larvaria en *Totoaba macdonaldi*. En este estudio se realizaron cuatro tratamientos (cada uno por triplicado) resultantes del enriqueciendo del alimento vivo (rotíferos y Artemia) con diferentes concentraciones de VK1 y VK2. Sin enriquecimiento (Control):  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ ; suplementando VK1 en  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  (VK1); suplementando VK1 en  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  y VK2 en  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  (VK1+2B); y suplementando VK2 en  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  (VK2B). Los tratamientos con VK2B y VK1+2B fueron los que tendieron a mejorar la calidad larvaria de *Totoaba macdonaldi* en el parámetro de la supervivencia, siendo diferentes de manera significativa con respecto al tratamiento Control. La mayor tasa de expresión del gen *subunidad 1 del complejo epóxido reductasa de vitamina K like 1 (vkorc111)* se presentó en el tratamiento Control y VK2B ( $4.67 \pm 5.31$  y  $5.68 \pm 3.58$  veces, respectivamente). El gen  *$\gamma$ -glutamyl-carboxilasa (ggcx)* mostró mayor tasa de expresión en el grupo Control y VK2B ( $0.88 \pm 0.32$  y  $1.26 \pm 0.32$  veces, respectivamente). Para el gen *proteína*

*morfogenética ósea 2 (bmp2)* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El gen *osteocalcina (oc)*, tampoco presentó diferencias significativas. El uso de la vitamina K en sus distintas formas (VK1 y VK2) contribuyen a modular distintos genes como *vkorc1* y *vkorc111* siendo buenos biomarcadores para la elaboración de alimento formulado con contenido óptimo en dichas vitaminas para un mejor desarrollo y supervivencia larval en la *Totoaba macdonaldi*.

**Keywords:** Totoaba, Larvae, Vitamin K, Gene expression, Deformities.

### 3. Introducción

El conocimiento sobre las etapas tempranas de la vida en los peces (huevos, larvas y alevines) es un punto crítico en las áreas de alta prioridad en la investigación acuícola. La experiencia ha demostrado que los principales cuellos de botella en la acuicultura se producen en las primeras etapas de la vida, lo que detiene los esfuerzos por comercializar nuevas especies de producción. En este caso, los esfuerzos de investigación se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia, crecimiento y calidad de las larvas. Estos esfuerzos incluyen estudios de fisiología digestiva con el propósito de planificar mejor las estrategias de alimentación. De esta manera, los requisitos en términos de nutrición deben de cumplirse para garantizar una tasa alta de supervivencia y un desarrollo adecuado durante las primeras etapas de la vida. Un alimento de mala calidad puede derivar en deficiencias nutricionales en las larvas, que, a su vez pueden originar crecimiento deficiente y un desarrollo anormal de tejidos importantes como el digestivo y el esquelético. Por ello, las malformaciones permanentes a menudo se presentan en las primeras etapas de desarrollo, deteriorando el bienestar de los peces y el rendimiento en la producción (Helvik *et al.*, 2009).

Las malformaciones esqueléticas craneales y del eje vertebral en casi todas las especies de peces de cultivo se presentan en etapas tempranas con una incidencia y severidad variada (Boglione *et al.*, 2013). Las malformaciones esqueléticas tienden a desarrollarse por deficiencias nutricionales en el cultivo de peces marinos, por ejemplo, exceso o deficiencia de proteína, lípidos, micro y macronutrientes. Sin embargo, también es importante resaltar otros tipos de factores como densidades de cultivo, condiciones abióticas desfavorables, enfermedades y factores genéticos (Hernández *et al.*, 2013). Una de las malformaciones más comunes son las del cráneo que conllevan un impacto en el correcto desarrollo de los organismos, ya que no se desarrollan de manera correcta sus órganos de los sentidos y tienden a ser susceptibles a enfermedades. Algunas otras malformaciones identificadas están relacionadas a un desarrollo anormal en la vejiga natatoria, aletas, pigmentación, distribución de escamas, la forma del cuerpo, desviaciones de la columna vertebral (lordosis, escoliosis, cifosis) y otras del cráneo que están relacionadas con la formación anormal del arco hioideo y ausencia o reducción de opérculos. Por ende, las malformaciones craneales como la formación anormal de estructuras como el opérculo representan un impacto negativo para la producción de organismos marinos ya que son estructuras que cumplen una función vital en la respiración y alimentación.

La incidencia de larvas con deformaciones puede reducirse considerablemente mediante el desarrollo de una dieta ajustada a los requerimientos nutricionales de la especie según el estadio de desarrollo particular (Gisbert *et al.*, 2008). En este caso, los organismos utilizados para la primera alimentación de larvas de peces marinos en cautiverio constan principalmente de rotíferos (*Brachionus* sp.) y Artemia (*Artemia* sp.) por su tamaño ideal pero no por su contenido nutricional (Conceição *et al.*, 2010). Las concentraciones de vitaminas en rotíferos de cultivo varían según las concentraciones de vitaminas en las dietas y el enriquecimiento. Si los niveles de vitaminas en el alimento vivo son insuficientes, los rotíferos pueden contener niveles muy bajos, incluso niveles indetectables de vitaminas A, C, y E, entre otras. La Artemia por otra parte, no posee vitamina A y las concentraciones de vitamina C y E son bajas. Debido a esto, es ampliamente conocido que se debe de enriquecer con macronutrientes y micronutrientes a las presas vivas utilizadas en la alimentación de larvas marinas (Holt, 2011).

La vitamina K (VK), es una vitamina liposoluble que existe en dos formas naturales: filoquinona (VK1) y menaquinona (VK2). La VK1 es sintetizada por las plantas. En el caso de la VK2, presente en carne y quesos, se caracteriza por tener varios rangos de formas que tienen por nombre menaquinonas (MK-n), donde (n) es el número de unidades moleculares de tipo isopreno se encuentran unidas a la cola carbonada. Estas menaquinonas abarcan desde MK-4 a la MK-10 y son producidas por bacterias. En el caso de la MK-4, es producida por medio de una conversión endógena de filoquinonas endógenas y/o de las MK-7, -8, o -9. Como tercera forma de VK, se encuentra la VK3 (menadiona) que es una sal sintética soluble en agua sin cadena lateral y necesita metabolizarse para ser funcional (provitamina) (Beato *et al.*, 2020). Además, se sabe que la VK es un cofactor esencial para distintas proteínas, entre ellas las proteínas de coagulación, anticoagulantes y proteínas óseas como lo son la osteocalcina o proteína Gla del hueso (Oc) y la proteína Gla de la matriz (Mgp). En el caso de la Oc no se conoce bien su rol, pero se deduce que puede participar como un regulador de la formación y maduración mineral ósea. En el caso de la Mgp, actúa como un inhibidor de la mineralización vascular además de tener una alta afinidad por iones de calcio participando en la organización del tejido óseo. De esta manera, el rol que ejerce la VK en la carboxilación es la cesión de electrones para modificar un aminoácido necesario para que las proteínas conocidas como proteínas dependientes de VK puedan hacer su función. Por otra parte, ciertas mutaciones de genes específicos están relacionadas con la fragilidad ósea (ej. *col1a1* y *col1a2*), relacionados

a su vez con el colágeno, proteína que forma parte del hueso y otras estructuras. Otros marcadores ontogénicos importantes son la fosfatasa alcalina (Alp) necesaria para la mineralización, la cual interviene en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas, o la Oc, proteína que contiene ácido  $\gamma$ -carboxil glutámico, aminoácido que liga el calcio, y que necesita VK para su modificación post-transduccional (Pavón *et al.*, 2016; Argüello-Guevara *et al.*, 2014).

*Totoaba macdonaldi* es un pez marino endémico del Golfo de California México, que llega a medir más de 1.30 m de longitud total y pesar hasta 100 kg. Esta especie tiene un alto valor comercial y aceptación como en el mercado, lo que genera que se considere como una especie de importancia para la acuicultura de México. Las totoabas son peces carnívoros y en su hábitat natural se alimentan de pequeños crustáceos y peces (Escudero, 2018). Sin embargo, para el desarrollo de su cultivo, la Universidad Autónoma de Baja California y otras instituciones están llevando a cabo diferentes investigaciones en torno a la determinación de los niveles óptimos de nutrientes mediante el uso de presas vivas (rotíferos y Artemia) para esta especie, particularmente durante la fase larvaria, y determinar así las implicaciones de una mala nutrición durante esta fase.

Debido a su importancia, los requerimientos de la VK deben ser establecidos, ya que distintos factores como la nutrición, genética y el entorno conllevan a alteraciones esqueléticas, y a pesar de que la vitamina D y el calcio son las principales sustancias para la salud ósea, la VK también puede ser esencial en el metabolismo óseo. Es por ello, que en el presente estudio se evaluó el uso de las VK1 y VK2 con distintas concentraciones y mezclas administradas en el alimento vivo como rotíferos y artemia con un enriquecedor como vehículo, y su efecto sobre el crecimiento, supervivencia y la expresión de genes relacionados con el reciclaje de la VK y la formación ósea, lo que permitirá determinar las concentraciones y mezcla óptima en la etapa larvaria de totoaba, mejorando su calidad en esta etapa de cultivo.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Obtención de organismos**

Huevos y larvas de *T. macdonaldi* fueron obtenidos de reproductores mantenidos en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada. Se utilizó la inducción hormonal

a base de hormonas liberadoras de gonadotropinas (LHRHa) también llamada hormona liberadora de hormona luteinizante. El implante se aplicó en el seno dorsal justo debajo de la aleta. Esta hormona tiene efecto tanto en hembras como en machos ya que estimula la producción normal de las gonadotropinas, que son las hormonas naturales que controlan el proceso de la reproducción. En el caso de los machos induce a una mayor producción de semen e hidratación del mismo (semen más fluido), mientras que a las hembras las estimula a entrar en la fase final de maduración en la cual el ovocito sale de su arresto y procede a hidratarse y a la ovulación final. Se seleccionaron dos machos y cuatro hembras a las que se les implantó LHRHa. Posteriormente, se pasaron a un tanque con control de temperatura y fotoperiodo (24 °C y 14:10 h luz: oscuridad).

La reproducción ocurrió a las 24 - 36 horas. La recolecta de huevos se realizó mediante drenado del tanque para lo cual se conectó el drenaje a un depósito de compensación donde se instaló un recolector para huevos con una malla de 300 µm. Los huevos con flotación neutra se recolectaron en el depósito de compensación entre 5 y 6 horas después del desove. Los huevos fueron recolectados con una malla de 300 µm y puestos en un contenedor con agua marina previamente filtrada. Posteriormente, recibieron un baño con formol al 0.026% durante 20 min para eliminar las bacterias y protozoarios que pueden traer adheridos al corion. Este procedimiento se realizó en cubetas con aireación suficiente para que los huevos permanecieran en suspensión. Después de recibir el tratamiento, los huevos fueron lavados con agua de mar previamente filtrada y pasada por rayos ultravioleta con el fin de evitar presencia de agentes patógenos antes de la siembra. Los huevos se colocaron en probetas para separar los viables (con flotabilidad neutra) de los no viables (se precipitan al fondo). Para facilitar la separación se incrementó la densidad del agua de mar. Para estimar la cantidad de huevos viables se tomaron varias muestras de un mililitro y se cuantificaron bajo un microscopio estereoscópico, de la misma manera se evaluaron los huevos no viables (Kjørsvik *et al.*, 1990).

## **4.2. Alimentación**

La alimentación de las larvas se realizó de acuerdo con el protocolo de Galaviz *et al.* (2015), alimentándose 3 veces al día. El inicio de la primera alimentación exógena se llevó a cabo una vez que el saco vitelino y la gota de aceite fueron consumidos por completo que fue entre el 3

y 4 día post eclosión (dpe). Durante el cultivo experimental el flujo de agua incrementó a 4 L min<sup>-1</sup> cuando se inició la alimentación a base de rotíferos y al iniciar la alimentación con nauplios de Artemia. La alimentación fue del 4-12 dpe a base de rotíferos enriquecidos con ácidos grasos, mientras que la alimentación a base de rotíferos y nauplios de Artemia enriquecida se llevó a cabo entre 10 al 16 dpe y del 16 al 24 dpe con nauplios de Artemia y microdieta (Otohime B 250-360 Mm).

### 4.3. Diseño experimental

El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos (cada uno por triplicado) resultantes del enriqueciendo del alimento vivo (rotíferos y Artemia) con diferentes concentraciones de VK1 y VK2 (Tabla 1). Para ello, los tratamientos se designaron de forma aleatoria en tanques de 100 L donde se sembraron a una densidad de 150 larvas L<sup>-1</sup> (con un número de 15.000 larvas por tanque).

Tabla 1: Suplementaciones de vitamina K1 y K2 en las emulsiones de enriquecimiento del alimento vivo.

Tratamiento	Dosis
Control	0
VK1	VK1 250 mg kg <sup>-1</sup>
VK1+2B	VK1 250 mg kg <sup>-1</sup> + VK2 125 mg kg <sup>-1</sup>
VK2B	VK2 125 mg kg <sup>-1</sup>

### 4.4. Colecta de las larvas

Larvas de *T. macdonaldi* fueron muestreadas de manera aleatoria extraídas de los tanques de cultivo experimental, usando una malla de 300 µm. Las muestras fueron colectadas una hora antes de la primera alimentación (08:00 am) con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas a los 4, 14 y 20 dpe. Después de haber muestreado las larvas, estas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), y lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales. Muestras (n=10-30) fueron tomadas para registrar datos de talla en longitud total y peso

húmedo durante los 4, 14 y 20 dpe. La longitud total promedio (mm) fue obtenida mediante la medición de una muestra de larvas (10 larvas) utilizando una regla. El peso húmedo individual de las larvas (mg) fue calculado pesando tres submuestras de larvas (n=30) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Germany; precisión  $1 \times 10^{-4}$  g) por triplicado en cada uno de los tratamientos. Entre los parámetros biológicos analizados se encuentra la supervivencia, representado por la siguiente ecuación:

$$S (\%) = \left[ \frac{TPC}{TPS} \times 100 \right]$$

S= Porcentaje de supervivencia

TPC= Número total de peces cosechados

TPS=Número total de peces sembrados

#### **4.5. Toma de muestras para biología molecular**

Una vez terminado el periodo de experimentación se tomaron de cada tratamiento 10 muestras con un máximo de 10 larvas de cada una de las réplicas experimentales. Estas larvas se colocaron en tubos de 1.5 ml con 1 ml de RNAlater (Thermo Fisher) y se preservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de ARN total. Para la extracción de ARN se pesaron 50 mg de muestra biológica (de 2 a 4 larvas por muestra compuesta dependiendo de los tamaños) y se colocaron en un tubo nuevo. Para la lisis celular se utilizó 500  $\mu\text{l}$  de Tri Reagent (SIGMA-AMBION) y se homogenizaron las muestras con un pistilo previamente esterilizado. Para la extracción de ARN se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Para la precipitación del ARN se utilizaron 700  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, y se realizaron dos lavados con 750  $\mu\text{l}$  de etanol al 75%. El pellet de ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La integridad del ARN se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos con lectura de absorbancia a 260/280nm y 260/230 en un en Nanodrop (Nanodrop Lite Spectrophotometer). Se realizó limpieza en 6  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  de cada muestra para eliminar ADN genómico (gDNA) a través de una digestión con DNasa (RQ1 DNase, Promega) y posteriormente se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) con 2  $\mu\text{g}$  de ARN total en cada muestra usando un kit ImProm-IITM (Promega®, Madison, WI, USA). Se procedió al

diseño de primers para cuantificar específicamente distintos genes relacionados con el ciclo de la VK y el desarrollo óseo (Tabla 2).

Tabla 2: Primers sintetizados para analizar los niveles de expresión de genes involucrados en el ciclo de la vitamina K y en deformidades esqueléticas.

	GENE	PRIMER	SEQUENCE	SIZE (NT)	PRODUCT SIZE (BP)
<b>TARGET GENE</b>	BMP2_toto	Left	CCCTAGCAGACCACCTCAAT	20	186
		Right	CACATCCCTCCACCACCATA	20	
	OSTC2_toto	Left	TCTTCATCGGAGTCAGCCAG	20	182
		Right	GTTTCAGCCATCTCGTCGC	19	
	GGCX_toto	Left	ACCTGGTGTATGTGGTGATGT	21	193
		Right	CAGTATCTGTTGCCGTCCATG	21	
	VKORC1I_toto	Left	GAACCAACCCAACAGTGTCT	20	145
		Right	GAGGATGTAGCCCAGGTAGA	20	
	VKORC1_toto	Left	GGAGAGACAAACCCGCATAT	20	189
		Right	ACAAAGAACTGGACCAAGCC	20	
<b>HOUSE-KEEPING</b>	EF1A_toto	Left	CAACTTCAACGCTCAGGTCAT	21	163
		Right	AGACTTGACGAATTTGGGTGC	21	
	18S	Left	GGTCCGAAGCGTCTACTTTG	21	177
		Right	ACCTCTAGCCGCACAATACG	21	
	NDHA	Left	CGGCTACAGTTGTGGATGTA	20	113
		Right	ATGTCGCTGAAGGGAGAAC	19	

Los primers utilizados en el presente estudio fueron utilizados a una concentración de 10µM.

Las reacciones de PCR para confirmar la especificidad de las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador BIO-RAD C1000TOUCH con el siguiente programa: 95°C durante 3 min, 34 ciclos (95°C durante 30 s, Gradiente (60-50°C) durante 30 s,) 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 5 min. Una vez terminado el programa se realizó una electroforesis de las muestras seleccionadas para determinar la temperatura de alineación más eficiente. Las curvas de eficiencia de cada gen utilizado para qPCR se realizó por triplicado con sus respectivos controles negativos y positivos en cada reacción. Para ello, se realizaron 8 diluciones seriadas de un pool de ADNc (1:5) y se realizaron las curvas de eficiencia con las diluciones 3-7 en un termociclador CFX96 (Bio-rad).

Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando placas de 96 pocillos que contenían: 10 µL del kit Eva green, 0.2 µL de cebadores directos e inversos (Tabla 2), 7 µL de agua libre de DNasa/RNasa y 2 µL de la dilución correspondiente del ADNc (1:10). Para fines

de calibración, se procesó una muestra específica en cada placa de qPCR (Derveaux *et al.*, 2010). La amplificación de los fragmentos se obtuvo con la siguiente reacción: 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C y 20 s a 65°C. Siempre se realizó una curva de fusión con 95°C por 15 s, 70°C por 1 min y 15 s con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar 95°C. Los niveles de expresión génica se determinaron según Pfaffl (2001). La evaluación de genes de referencia se realizó mediante los programas geNorm, NormFinder y BestKeeper.

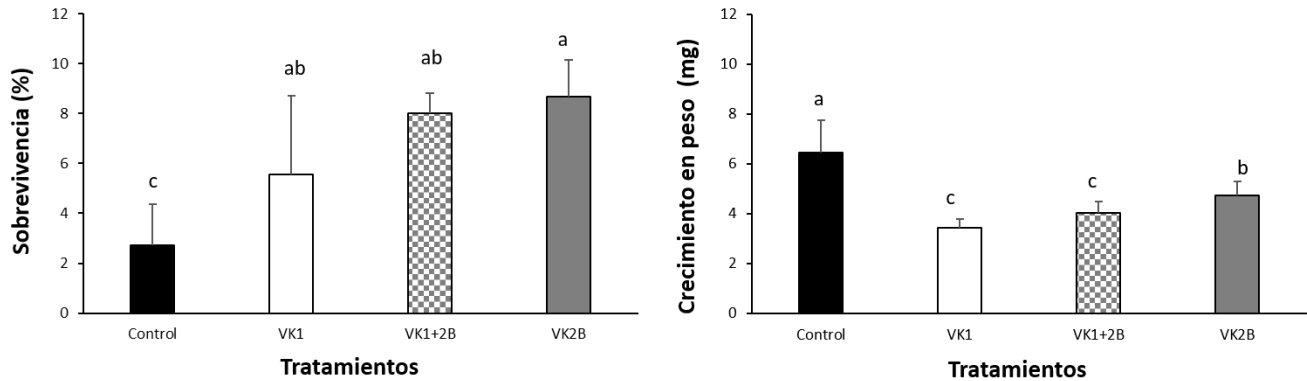
#### **4.6. Análisis estadístico**

Los distintos parámetros biológicos fueron expresados como media y desviación estándar (media  $\pm$  D.E). La normalidad y homogeneidad de varianzas en los datos fue previamente analizada. Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de dos vías (ANOVA), identificando las diferencias con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (significancia de  $\alpha = 0.05$ ). Todos los análisis estadísticos se realizarán utilizando el programa StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (versión 8.0). Los análisis se realizaron en Rstudio (v4.3.1) usando los paquetes rstatix (v0.72), corrplot (v0.92), dplyr (v1.1.4) y ggplot (v3.5.1).

### **5. Resultados**

#### **5.1. Supervivencia y crecimiento**

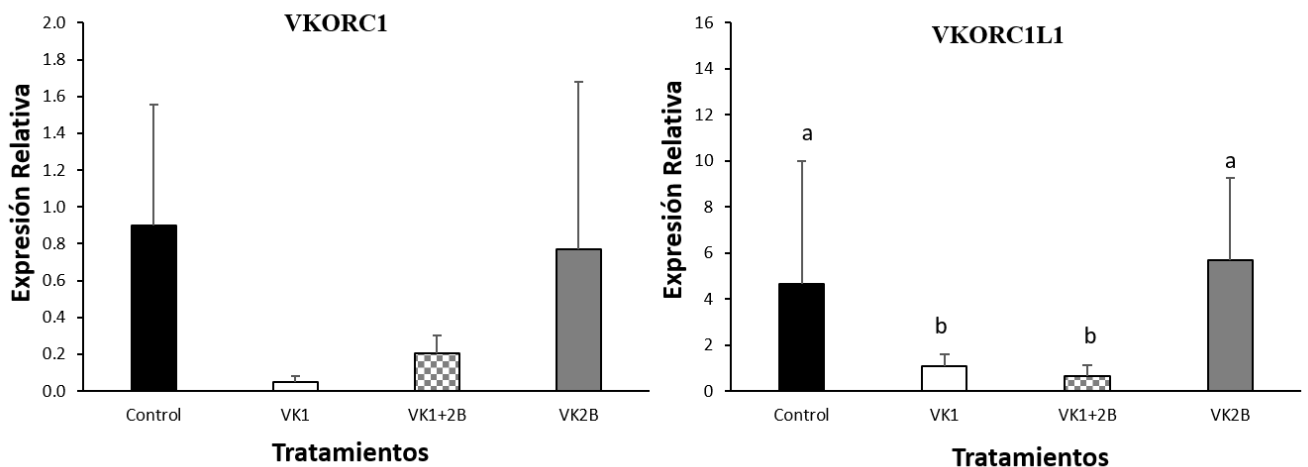
Los valores de supervivencia (%) y crecimiento (mg) se presentan en la Figura 2. Se observa una tendencia a obtener mayor supervivencia en las larvas alimentadas con el tratamiento de VK2B ( $8.67 \pm 1.47\%$ ), seguido por el tratamiento VK1+2B ( $8.01 \pm 0.80\%$ ), siendo diferentes de manera significativa ( $P < 0.05$ ) respecto al control, que presentó una supervivencia de ( $2.70 \pm 1.67\%$ ). Todos los tratamientos suplementados con VK presentaron menor crecimiento comparado con el tratamiento control (6.44 mg). En los tratamientos VK1 y VK1+2B (3.42 y 4.03 mg, respectivamente) el crecimiento fue aún menor que en el VK2B (3.42 mg).



**Figura 2.** sobrevivencia en % (a) y peso en mg (b) de larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con alimento vivo enriquecido con diferentes niveles de vitamina K1 y K2.

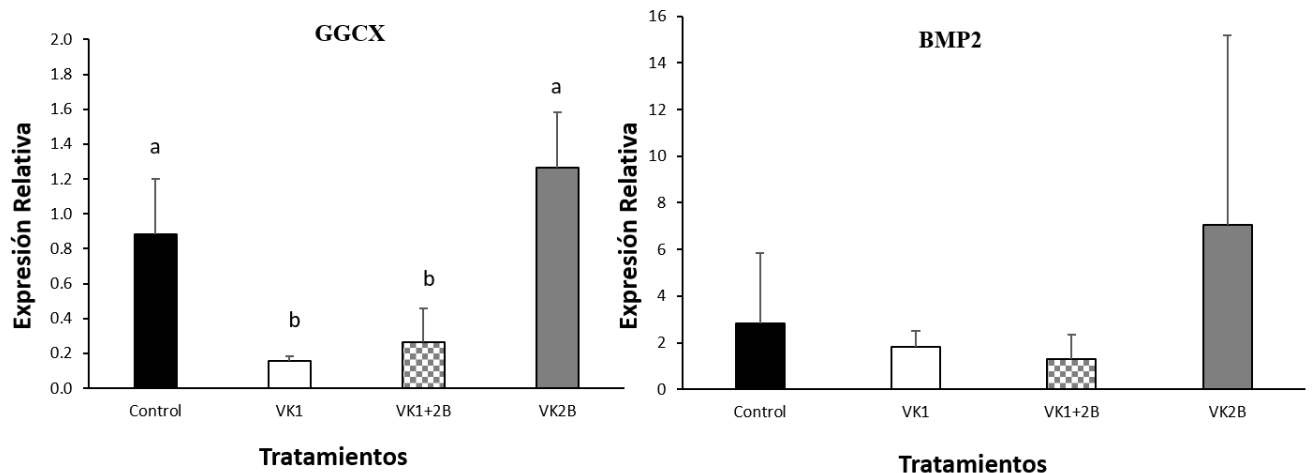
## 5.2. Expresión génica de genes involucrados con el ciclo de la vitamina K y el desarrollo óseo

Para el gen *vkorc1* no se observaron diferencias significativas en su expresión dentro de cada grupo experimental (Figura 3). Sin embargo, la expresión del gen *vkorc1l1* se vio alterado por los niveles de VK (Figura 3B) con mayores niveles de expresión en las larvas cultivadas, alimentadas, adicionadas con VK2B ( $4.67 \pm 5.31$  y  $5.68 \pm 3.58$ , respectivamente) y menor nivel de expresión en VK1+2B y VK1 ( $1.08 \pm 0.52$  y  $0.66 \pm 0.45$ , respectivamente).



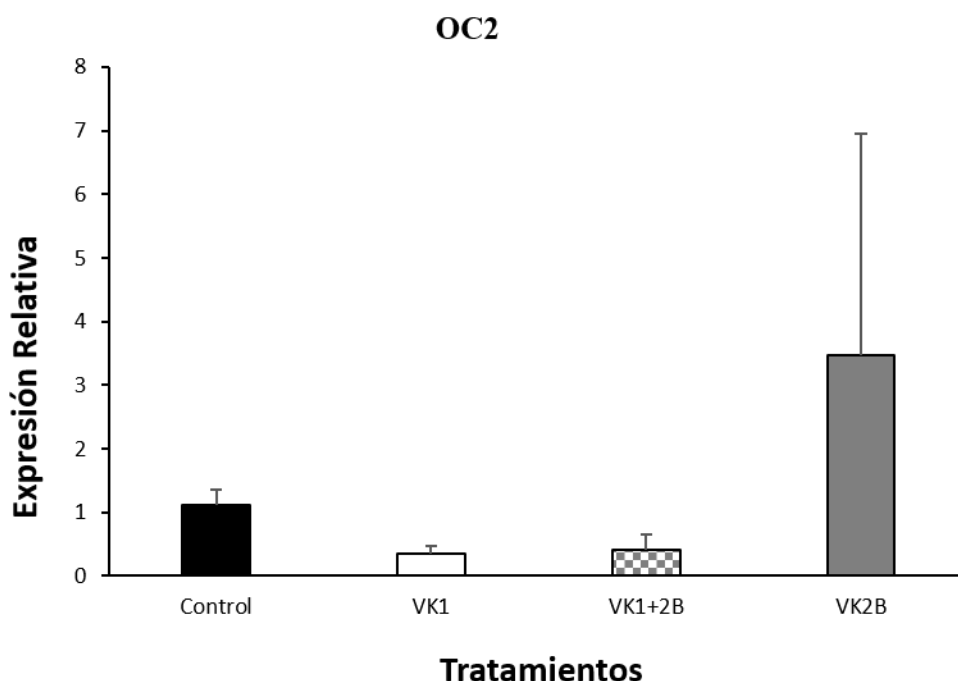
**Figura 3.** Expresión génica relativa de la subunidad 1 del complejo epóxido reductasa de vitamina K (*vkorc1*) (a) y de la *vkorc1 like 1* (*vkorc1l1*) (b) en larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2.

El gen *gpcx* mostró significativamente menor expresión en el tratamiento VK1 y VK1+2B ( $0.16 \pm 0.03$  y  $0.26 \pm 0.19$ , respectivamente) con respecto a los otros dos tratamientos, Control y VK2B ( $0.88 \pm 0.32$  y  $1.26 \pm 0.32$ , respectivamente; Figura 4A). Para el gen *bmp2* no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4B), tendiendo a ser mayor para los grupos Control y VK2B ( $2.83 \pm 3.01$  y  $7.06 \pm 8.11$   $\mu$ unidad??, respectivamente), on respecto a los grupos VK1 y VK1+2B ( $1.82 \pm 0.69$  y  $1.32 \pm 1.03$   $\mu$ unidad??, respectivamente).



**Figura 2.** Expresión génica relativa del gen  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa (*gpcx*) (a) y proteína morfogenética ósea 2 (Figura 3B) (*bmp2*) (b) en larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2.

El gen *osteocalcina* no presentó diferencias significativas en su expresión (Figura 5). La tasa de expresión del grupo VK2B ( $3.48 \pm 3.47$   $\mu$ unidad??,) tendió a ser superior que la del Control, VK1 y VK1+2B ( $1.11 \pm 0.25$ ,  $0.35 \pm 0.12$  y  $0.40 \pm 0.25$   $\mu$ unidad??, respectivamente).



**Figura 3.** Expresión génica relativa del gen *osteocalcina* (*oc*) en larvas de *Totoaba macdonaldi* alimentadas con diferentes concentraciones de VK1 y VK2.

## 6. Discusión

La VK es una vitamina liposoluble contenida en los tejidos de reserva lipídica y guardan una íntima relación ya que las diferentes formas de VK son transportadas a través de las lipoproteínas. Dichas lipoproteínas presentan afinidades distintas según la isoforma de VK, así, por ejemplo, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con una composición mayoritariamente de triglicéridos transportan la VK1, y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportaran la VK2 (Tan y Li, 2024). Otro componente dietario importante es el colesterol, el cual afecta a ambas isoformas en su absorción intestinal ya que comparten un mismo transportador transmembranal, el Cassete de transportación asociada a ATP A1 (ABCA1; Tan y Li 2024), por lo que es un nutriente a considerar si se pretende aumentar las concentraciones tisulares de dicha vitamina. Una vez absorbida y distribuida en distintos tejidos, la vitamina K es utilizada como cofactor para la activación de diferentes proteínas mediante un proceso de carboxilación (modificación postraducciona) que se lleva a cabo por la enzima gamma glutamil carboxilasa (Ggcx). Algunas de estas proteínas son factores de coagulación, anticoagulantes endógenos, proteínas involucradas en mineralización del hueso como la osteocalcina, la proteína de la

matriz (Mgp) y la proteína rica en Gla (Grp) asociada a la matriz del cartílago. En este sentido, el proceso de carboxilación es esencial para la regulación del calcio de las distintas proteínas dependientes de VK (Beato *et al.*, 2020). Es por ello que en el presente estudio se analizaron los efectos de la inclusión de diferentes proporciones de VK1 y VK2 sobre el porcentaje de sobrevivencia, crecimiento en peso y niveles de expresión de los genes *vkorc1*, *vkorc1l1*, *ggcx*, *bmp2* y *oc* en larvas de *T. macdonaldi*, los cuales son genes clave en el ciclo de la VK y en el desarrollo óseo.

Distintos factores pueden intervenir en el buen funcionamiento de la VK, como un mal funcionamiento del hígado, una dieta baja en grasas, uso de antibióticos y enfermedades gastrointestinales, los cuales interfieren con la absorción de esta vitamina (Acosta *et al.*, 2021). Schwalfenberg (2017) menciona que el uso de la VK es indispensable como molécula auxiliar para la producción de proteínas involucradas en la homeostasis del calcio y la coagulación. La VK1 parece ser que es la que tiene como función principal participar en la coagulación de la sangre, mientras que la VK2 participa en la regulación de la disponibilidad del calcio, evitando que este se acumule en los vasos sanguíneos y mejorando la densidad ósea. Por otro lado, Udagawa (2000) menciona la importancia de la VK en las dietas para peces ya que la deficiencia de esta induce problemas de coagulación, anemia, así como problemas durante la etapa de desove y mortalidad en la progenie. Pese a que se sabe que la VK es un nutriente esencial en vertebrados, en el caso de organismos acuáticos a un no se tiene claro las cantidades adecuadas para su vital desarrollo. En este sentido, Richard *et al.* (2014) investigaron los efectos de suplementación de VK en larvas de *Solea senegalensis*, enriqueciendo alimento vivo con cantidades de VK1 (0. 50 y 250 mg kg<sup>-1</sup>) y evaluar la supervivencia, crecimiento, contenido de VK, contenido de calcio y la incidencia de deformidades esqueléticas. Las formas de VK acumuladas fueron menaquinonas de tipo MK-4, siendo similar en todos los tratamientos (14 ± 2 µg kg<sup>-1</sup>), y VK1 (filoquinona), que aumentó su concentración conforme se incrementaba el contenido de suplementación en las dietas con VK (1.3 ± 0.6 µg kg<sup>-1</sup> en el grupo Control, 25 ± 4 µg kg<sup>-1</sup> en larvas alimentadas con la dieta conteniendo 50 mg kg<sup>-1</sup> de VK, y 45 ± 3 µg kg<sup>-1</sup> en las alimentadas con la dieta suplementada con 250 mg kg<sup>-1</sup>). En el estudio de Richard *et al.* (2014) la supervivencia en los dos tratamientos y grupo control fue similar 95.6 y 97.8%, sin verse afectada por la suplementación de VK1. En cuanto al crecimiento, se vio un aumento conforme la cantidad de VK1 suplementada (0.35 ± 0.12 mg en larvas Control, 0.62 ± 0.13 mg en larvas alimentadas con la dieta conteniendo 50

mg kg<sup>-1</sup> de VK, y 0.64 ± 0.24 mg en las alimentadas con la dieta suplementada con 250 mg kg<sup>-1</sup>). Esto parece indicar que el contenido de VK1 aumentó el crecimiento en larvas de *S. senegalensis*. Más aún, la dieta suplementada con filoquinona parece que disminuyó las deformidades esqueléticas en larvas de *S. senegalensis*.

En el presente estudio se suplementó el alimento vivo para larvas de totoaba con 0 mg VK1 y VK2 como grupo Control, 250 mg VK1 como tratamiento 2 (grupo VK1), 250 mg de VK1 y 125 mg de VK2 como tratamiento 3 (grupo VK1+2B) y 125 mg de VK2 como tratamiento 4 (VK2B). Las larvas alimentadas con altos niveles de la VK1 (250 mg kg<sup>-1</sup>) y K2 presentaron una mayor sobrevivencia respecto al control, además, no se observaron diferencias entre las dos fuentes de VK, similar a lo reportado por Richard *et al.* (2014), mejorando la supervivencia. Los resultados del presente estudio sugieren que la suplementación de VK mejora la supervivencia de larvas de *T. macdonaldi* en sus dos formas como filoquinona y menaquinona, por lo que se recomienda suplementar con 250 mg kg<sup>-1</sup> de la emulsión para una buena eficiencia en el cultivo larvario de peces como totoaba.

Por otro lado, el grupo VK2B el cual fue enriquecido solamente con vitamina K2 (125 mg kg) generó un aumento significativo en peso respecto a los tanques suplementados con VK1 aunque con valores inferiores al Control. Esta menor ganancia de peso en las dietas suplementadas con VK podría explicarse por la distribución de presa viva por volumen de cultivo, y no por número de larvas en cada tanque de cultivo. Por ello, el mayor crecimiento en el grupo Control podría ser debido a que las larvas disponían de mayor número de presas por cada una que en el caso de los grupos con suplementación con VK en el enriquecedor.

Richard *et al.* (2014) también realizaron un análisis de expresión de distintos genes en larvas de *S. senegalensis* alimentadas con filoquinona, donde observaron que la tasa de expresión del gen *ggcx* fue similar comparada con las larvas alimentadas con dieta suplementada con 50 mg kg<sup>-1</sup> y el grupo Control (0 mg kg<sup>-1</sup>). Los resultados para el gen *vkorc111* en larvas de *S. senegalensis* no se vio alterada significativamente, pero si para *vkorc1*, donde se mostró el mismo comportamiento que *ggcx*, con mayor expresión en la dieta 50. Por otro lado, Beato (2020 a) y colaboradores evaluaron la expresión de los genes *vkorc1* y *vkorc111* del *S. senegalensis* a lo largo de desarrollo larvario en donde se observó una tasa de expresión similar de estos genes mostrando un aumento durante pre y pro-metamorfosis para posteriormente mantenerse constantes durante la post-metamorfosis. Además, Beato evaluó el nivel de expresión por tejido donde *vkorc1* mostró alta expresión en el hígado esto

se debe a que VK1 es almacenada en el hígado para la carboxilación de los factores de coagulación (Koolman, 2005), mientras que fue más baja en los demás tejidos como corazón, músculo, intestino, ovarios, ojos, piel, cerebro, riñón, bazo, testículo, y branquias. En el caso de *vkorc1/1*, su nivel de expresión alto se mostró en cerebro y testículos, siendo más homogéneos en los demás tejidos. Por otro lado, Beato et al. (2020 a) estudiaron como diferentes condiciones fisiológicas modularon la expresión de *vkorc1/1* y *vkorc1*. Condiciones de ayuno redujeron la expresión de *vkorc1* ( $1.2 \pm 0.2$  veces) en comparación cuando se retoma la alimentación después de dejarlos en ayuno ( $2.2 \pm 0.03$  veces). En el caso de *vkorc1/1*, se observó un incremento cuando están en ayuno ( $4.8 \pm 0.9$  veces) durante dos días. Richard et al. (2014) sugieren que un incremento de VK ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en la emulsión utilizada para enriquecer el alimento vivo ofrece una mejor calidad larvaria, teniendo una menor incidencia de deformidades esqueléticas en la aleta caudal. Además, estos autores consideraron que en el caso de VK1, su suplementación no alteró los niveles de expresión de *vkorc1*, pero sí aumentó la expresión de *vkorc1/1*. En nuestro caso, de forma similar a lo descrito por Richard y colaboradores, la suplementación con VK1 no alteró la expresión de *vkorc1*, aunque se observa una tendencia a su disminución con la suplementación de esta vitamina y una menor expresión de *vkorc1/1* y *ggcx* con mayor contenido en VK1. Estos resultados están de acuerdo con los resultados presentados por Richard et al., (2014), sugiriendo que a mayor contenido en VK1 en la dieta, menor necesidad de reciclaje de VK. Por otro lado, la mayor expresión de proteínas relacionadas con la función biológica de la vitamina K podría sugerir una diferencia en la distribución tisular de las dos isoformas de la vitamina K relacionada al tipo de lipoproteínas presentes en este estadio de desarrollo específico. Sin embargo, existe poca información sobre los efectos reguladores de la vitamina K y sus isoformas sobre la expresión de las proteínas relacionadas con su metabolismo y su función biológica como cofactor. Con respecto a dicha relación, un trabajo realizado en una línea celular de pez cebra ZFB1 se logró observar una relación inversamente proporcional entre el estatus tisular de Vitamina K1 y la expresión de genes como *ggcx*, *vkorc1/1* y *vkorc1*, sugiriendo que dichos genes pueden utilizarse como marcadores del estatus tisular de la vitamina K (Fernández et al., 2015).

Por otro lado, los resultados de mayor nivel transcripcional de *bmp2* y *oc* en el grupo VK2 sugiere las larvas de dicho tratamiento presentan un mejor y/o avanzado estado de mineralización/formación ósea. El gen *osteocalcina* se ha sugerido como un buen marcador de la formación de hueso en diferentes animales (Beato et al., 2020). Si bien se podrían esperar

diferencias en la expresión de la *oc* por la suplementación de VK, no se ha descrito algún mecanismo de la regulación de este gen mediado directamente por la VK. Sin embargo, la VK si puede ejercer un efecto sobre la expresión de otros factores asociados a la osteogénesis, como el efecto regulador sobre la expresión del factor de transcripción *runx2*, que promueve la diferenciación de los osteoblastos (Aaseth et al., 2024), por lo que su efecto en el desarrollo óseo de larvas de *Totoaba macdonaldi* no se descarta.

Teniendo en cuenta los resultados en global, tanto de supervivencia y peso, un enriquecimiento de solo VK2 podría ser beneficioso, aunque si consideramos la expresión génica un enriquecimiento de presa viva tanto con VK1 como VK2 podría solventar la necesidad de alto reciclaje de VK1 en dichos grupos experimentales.

## **7. Conclusiones**

Las concentraciones de los tratamientos con la vitamina K añadida en la dieta para larvas de *Totoaba macdonaldi* tiene un efecto positivo sobre la supervivencia. Más aún, para evitar un efecto negativo sobre el peso final, se recomienda realizar alimentación por densidad de larvas y no por volumen de tanque. El uso de la VK en sus distintas formas (VK1 y VK2) contribuyen a modular distintos genes, principalmente *ggcx*, *vkorc1* y *vkorc111*, siendo buenos biomarcadores para el desarrollo de enriquecedores de presas vivas con contenido nutricional en VK balanceado y optimizado, y asegurar una buena supervivencia y calidad larvaria. La realización de análisis histológicos y/o de doble tinción del esqueleto es necesaria en futuros estudios para confirmar al efecto de dichas vitaminas sobre el desarrollo del hueso y cartílago de las larvas.

## **8. Agradecimientos**

Este Proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada, México, Consejo Nacional de Ciencias, Humanidades y Tecnología (CONACHYT) (SADER-CONACYT No. 247698 and INFRA-316812) y la beca de posgrado no. 1141570 (Lizeth Adarely Vez Blandón). Un agradecimiento especial al Dr. Conal David True, responsable de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la UABC por la donación de larvas de totoaba para el desarrollo del presente estudio. Este trabajo fue en colaboración entre investigadores de la

Red Iberoamericana LARVAplus “Strategies for the development and improvement of fish larvae production in Ibero-America” (117RT0521) CYTED España.

## **9. Conflicto de interés**

Todos los autores declaran que no tienen conflicto de interés por la información reportada en el presente manuscrito.

## 10. Referencias

- Acosta –Fernández M.I. 2021. Modulación de la microbiota intestinal del lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) bajo un esquema de alimentación suplementado con vitamina K1 (Filoquinona). Tesis de Maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., México. 71pp.
- Argüello-Guevara W., Bohórquez-Cruz M. y Silva A. 2014. Malformaciones craneales en larvas y juveniles de peces cultivados. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(5), 950-962.
- Beato, S., Marques, C., Laizé, V., Gavaia P.J and Fernández I. 2020. "New Insights on Vitamin K Metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Based on Ontogenetic and Tissue-Specific Vitamin K Epoxide Reductase Molecular Data" *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 10: 3489.
- Beato, S., Toledo-Solís, F.J and Fernández, I. 2020. "Vitamin K in Vertebrates' Reproduction: Further Puzzling Pieces of Evidence from Teleost Fish Species" *Biomolecules* 10, no. 9: 1303.
- Bonglione C., Gavaia P., Koumoundouros G., Gisbert E., Moren M., Fontagne S., Witten P.E. 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes.
- Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S. and Dinis, M.T. (2010), Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41: 613-640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Derveaux, S., Vandesompele, J., Hellemans, J., 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50 (4), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
- Diaz-Curiel M. 2015. Acción de la vitamina K sobre la salud ósea. *Osteoporosis Metabolism* 7;1:33-38.
- El Kertaoui N., Lund Ivar., Assogba H., Domínguez D., Izquierdo M. S., Baekelandt Sébastien., Cornet V., Mandiki S. N. M., Montero Daniel., Kestemont Patrick. 2019. Key nutritional factors and interactions during larval development of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Scientific Reports*. 9, 7074.
- FAO. 2022. Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul.

- Fernández I, Gavaia PJ, Darias MJ, Gisbert E. Fat-soluble vitamins in fish: A transcriptional tissue-specific crosstalk that remains to be unveiled and characterized. Emerging research in larval fish physiology and fry production. Yúfera M [Eds]. Springer Nature 2018. ISBN: 978-3-319-73243-5.
- Fernández I., Darias M., Andree K., Mazurais D., Zambonino-Infante J., Gisbert E. 2011. Coordinated gene expression during gilthead sea bream skeletogenesis and its disruption by nutritional hypervitaminosis A. BMC developmental biology. 86, 1471-213
- Fernández I., Ortiz-Delgado J. B., Darias M J., Hontoria F., Andree K B., Manchado M., Sarasquete C., Gisbert E. 2017. Vitamin A Affects Flatfish Development in a Thyroid Hormone Signaling and Metamorphic Stage Dependent Manner. Frontiers in Physiology. 8:458-478.
- Fernández I., Santos A., Cancela I., Laizé V., Paulo J. Gavaia P J. 2014. Warfarin, a potential pollutant in aquatic environment acting through Pxr signaling pathway and  $\gamma$ -glutamyl carboxylation of vitamin K-dependent proteins, Environmental Pollution, Volume 194, Pages 86-95.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E. 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture, 283, 102-115.
- Fernández, MS Pimentel, JB Ortiz-Delgado, F. Hontoria, C. Sarasquete, A. Estévez, JL Zambonino-Infante, E. Gisbert. 2009. Efecto de la vitamina A en la dieta sobre la esqueletogénesis y la calidad de las larvas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) Acuicultura, 295, págs. 250 – 265.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, Isabel, Alobera Gracia, Miguel Angel, Canto Pingarrón, Mariano del, & Blanco Jerez, Luis. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet), 11(1), 47-51.
- Schwalfenberg, Gerry Kurt. 2017. Vitamins K1 and K2: The Emerging Group of Vitamins Required for Human Health. Journal of Nutrition and Metabolism, vol. 2017, Article ID 6254836, 6 p.
- Gisbert E., Fernández I., y Estévez A. 2008. Nutrición y Morfogénesis: Efecto de la Dieta sobre la Calidad Larvaria en Peces. 46-78 pp. Editores: Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-López M. G., Villarreal-Cavazos D. A., Pablo-Lazo J., y Viana

- M. T. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Haga Y. Shao-Jun D., Shuichi S., Tomonari K., Hiroshi F., and Toshio T. 2010. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bonedeformity model. *Aquaculture Research*. 315 (1-2), 26-27.
- Hernández D. R, Santinón J. J., Sánchez S., y Domitrovie H. A. 2013. Crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones óseas en distintos biotipos de *Rhamdia quelen* durante la larvicultura. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(5): 877-887.
- Holt G. J. 2011. Larval Fish Nutrition. First edition. John Wiley & Sons, Inc. USA. 435p.
- Koolman, Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition © 2005 Thieme
- Kraul S. 1989. Production of live prey for marine fish larvae. *J. World Aquac. Soc.* 9: 595-607p.
- Krossoy, C, Waagbo R y Ornsrud R. 2011. Vitamin K in fish nutrition. *Aquaculture Nutrition* 17; 585-594.
- Mata-Sotres J. M., Tinajero-Chavez A., Barreto-Curiel F., Pares-Sierra, Oscar G., del Rio-Zaragoza O. B., Teresa-Viana M. T., Rombenso A N. 2018. DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in Totoaba macdonaldi fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow. *Aquaculture*. 497.
- Pavón de Paz, I., Gil Fournier, B., Navea Aguilera, C., Ramiro León, M.S., Modroño Móstoles, N., & Guijarro de Armas, G. (2016). Osteogénesis imperfecta forma clásica no deformante: comunicación de una nueva mutación en el gen COL1A1 en dos casos de la misma familia. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8(1), 36-39.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Udagawa M. 2006. Studies on the Distribution and Physiological Function of Vitamin K in Fish. National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan.
- Udagawa M. 2000. Physiological role of vitamin K in fish. *Institute of Fisheries Science* ,34(4), Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-284 Japan.
- Vallés-Bueno R. 2013. Reproducción en cautividad y cultivo de la Corvina (*Argyrosomus regius*). Universidad de Barcelona. 149p.

## **11. Ethics statement**

Fish were handled and treated following the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals issued in the Official Mexican Standards (NOM-062-ZOO-1999) and according to the Research Ethics Committee (CEI-UABC-GU2010) of the Universidad Autónoma de Baja California at Ensenada, Mexico based on international guidelines. In addition, all procedures and experimentation conducted with organisms produced at the marine finfish hatchery (Registration Number: DGVS-CR-IN-1084-B.C./09) are reported and evaluated by the DGVS Dirección General de Vida Silvestre (in English, General Management for Wildlife) in an annual basis.

## **12. Credit authorship contribution statement**

Lizeth Adarely Vez Blandon: conceptualization, methodology, formal analysis, visualization, writing the original draft. Ignacio Fernandez Monzon: conceptualization, supervision, formal analysis, review & editing, Lus M. López formal analysis, review & editing and funding acquisition. Ernesto Larios Soriano formal analysis, review & editing, Rosario Jara Montañez: review & editing and Mario A Galaviz: conceptualization, supervision, formal analysis, review, funding acquisition & editing the manuscript, project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

## **ANEXOS.**

### **APÉNDICE 1: Protocolos**

#### Protocolo de extracción de ARN

##### **Homogenización del tejido:**

Se agregarán 500 µl de Tri Reagent (SIGMA-AMBION) en tubos eppendorf de 1 ml, añadiendo de 50 mg de tejido de la muestra de interés. Se homogenizará con un pistilo previamente esterilizado, dejando la muestra lo más fino posible, realizando el proceso en hielo siempre. Se incubará a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se pasará a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Una vez terminado la centrifugación, se transferirá el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

##### **Extracción de RNA:**

Al sobrenadante obtenido anteriormente en la extracción se le adicionarán 100 µl de cloroformo por 500 µl de Tri Reagent utilizado, se homogenizará por 15 segundos e incubar a 5 minutos a temperatura ambiente. Se proseguirá con un centrifugado a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

##### **Precipitación y lavado de ARN:**

Se añadirá a esta fase acuosa 250 µl de etanol al 95 % o absoluto por cada 500 µl de Tri Reagent utilizado y agitar cuidadosamente de 5 a 10 segundos. Se incubará durante 20 minutos a -80°C o toda la noche a -20°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugará a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se descartará con cuidado el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar el pellet. Una vez obtenido se le adicionará 1 ml de etanol al 75% y se re suspenderá el pellet y se centrifugará a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, retirando el sobrenadante por decantación y dejando secar el pellet (el pellet se lavará dos veces, así como su centrifugación). Se re suspenderá el pellet de ARN en agua libre de nucleasas y se almacenará a -80 °C, realizando alícuotas de 10 µl para la cuantificación en Nanodrop (con un radio de lectura de 260/280nm y 260/230) y electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Uno de los resultados importantes de la cuantificación son la relación 260/280 y 260/230 que corresponden a la fracción de la absorbancia de ácidos nucleicos (ADN/ARN) y proteínas.

### **Integridad del ARN:**

Se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se añadió 40 ml de TAE 1X y se pesó 0.48 g de agarosa al 1.2% vertiendo todo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml colocándolo en el microondas por 30 sg aproximadamente hasta disolverse completamente la agarosa, posteriormente ya tibio el medio se vertió en la cámara de electroforesis colocando los peines los cuales harán la función de formar un pozo al momento de retirar los peines del gel de agarosa solidificado (realizarlo en la cámara y con medio TAE para no arruinar el gel). se cargó cada pozo con buffer de carga 3  $\mu$ L y 5  $\mu$ L de muestra y para la escalera (1kb) 3  $\mu$ L. La fuente de poder fue configurada 95 volts por 45 min. Posteriormente se el tiempo finalizado se coloca en una cámara UV para identificar las intensidades de las bandas deseadas (ARN ribosómico 28S y 18S).

### **Purificación de ARN:**

Digestión con DNasa En esta etapa, la solución de ARN serán tratados con DNasa (RQ1 DNase, Promega) para eliminar cualquier tipo de contaminación por ADN genómico (ADNg). Se prepararon tubos para cada muestra de ARN extraída previamente y etiquetados adecuadamente En los tubos se agregó un mix de reactivos del Kit RQ1 Rnase Free-DNase (Promega) para el tratamiento con DNasa, que correspondía de (Tabla 2).

**Tabla 3. Preparación de purificación de ARN para larvas de peces (*Totoaba macdonaldi*)**

<b>Reactivos</b>	<b>1RX</b>
<b>ARN</b>	(deseada en $\mu$ l)
<b>RQ1 DNasa</b>	1u/ $\mu$ g RNA
<b>RQ1 Buffer 10x</b>	1 $\mu$ L/10 vol. final
<b>H2O</b>	variable
<b>Volumen final</b>	variable

Nota: Para obtener la cantidad de H2O se suma el ARN, DNasa, Buffer restando el volumen final con el que se pretenda trabajar en este caso fue de 30  $\mu$ l.

Para cada muestra se realizó un cálculo con los datos de las concentraciones encontrados en Nanodrop para determinar cuánto sería usado de ARN extraído. Como ejemplo:

1µg ----- 1000 ng

6µg ----- X = 6000 ng

Muestra x cuantificada (Nanodrop)

2005.4 ng µl<sup>-1</sup>

---

6000 ng = 3 µl RNA

2005 ng µl<sup>-1</sup>

Todos los tubos fueron etiquetados respectivamente para preparar la reacción una vez esto se incubaron a 37°C por 30 min en un termociclador de BIO-RAD, terminado la incubación se centrifugaron a 30 segundos colocándolos en frío, añadiendo solución STOP para detener a la enzima para que ya no haga digestión (la solución STOP fue proporcional µg/RNA limpiados, posteriormente se volvió a incubar a 65° C /10 min después se centrifugo y se colocó en hielo. Para la precipitación y purificación ARN por último se adiciono ACETATO DE SODIO (Ayuda a la precipitación) Vol. 1/10 (teniendo un volumen de 36 µl) agregando por ende 3.6 µl de Acetato de sodio. Se añadió además etanol absoluto 3 Vol. (108 µl), agitando cuidadosamente dejando precipitar por 1 hora a -80 °C. Posteriormente se centrifugo a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, una vez terminado este paso se retiró el sobrenadante con micropipeta para asegurar eliminar toda la solución, lavando el pellet con 200 µl de etanol al 75%, se volvió a centrifugar 7500 rpm x 10 minutos a 40°C. El etanol se retiró con una micropipeta y se dejó secar el pellet hasta que no tuviera o se evapore el alcohol una vez esto se re suspendió en agua libre de nucleasas con una relación 1:2, por último, se realiza cuantificación en Nanodrop y se realiza una electroforesis.

### **Transcripción reversa (Síntesis de ADNc)**

En esta etapa del análisis que es la síntesis de ADNc, se utilizó el ARN total de calidad, libre de contaminación por ADN genómico, con el objetivo de generar ADNc de primera hebra para

la amplificación rápida 3' y 5' de extremos de ADNc, usando un kit ImProm-IITM, Promega®, Madison, WI, EE.

### **Combinación de primer con ARN blanco y desnaturalización:**

De las muestras purificadas se obtuvo la cantidad de la cuantificación de cada una de las muestras para obtener la cantidad de RNA experimental (1.0µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas para un volumen de 5 µl. Se incubo a 70°C X 5 minutos

### **Transcriptasa reversa:**

En un tubo nuevo y debidamente etiquetado, se preparó el Mix Improm II para cada muestra experimental. Se añadieron los 15µl de los Mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20µl para la reacción experimental. Posteriormente, se incubó las reacciones en un termociclador con el siguiente programa:

Tabla 4. Preparación de transcriptasa reversa para larvas de peces (*Totoaba macdonaldi*).

<b>REACCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>1RX</b>
<b>H2O LIBRE DE NUCLEASAS</b>	5.3µl
<b>IMPRO II 5X RX BUFFER</b>	4.0µl
<b>MGCL2</b>	3.2µl
<b>DNTP MIX</b>	1.0µl
<b>RNASIN RECOMBINANTE</b>	0.5µl
<b>IMPRO II TRANSCRIPTASA REVERSA</b>	1.0µl
<b>VOLUMEN FINAL</b>	15µl

Posteriormente, se incubó las reacciones en un termociclador con el siguiente programa:

- Alineamiento: 25°C durante 5 minutos.
- Extensión: 42°C durante 1 hora.
- Inactivación de transcriptasa reversa: 70°C durante 15 minutos.

### **Verificación ADNc mediante PCR y gel:**

Se verificó mediante PCR punto final programado en un termociclador de la marca BIO-RAD tomado muestras aleatorias. Incubando las reacciones con el siguiente programa.

- Desnaturalización: 94°C DURANTE 1 minuto  
94°C durante 0.45 segundos
- Alineamiento :54 °C durante 1 minuto
- GOTTO 2 :72°C durante 1.30 segundos (35x)
- Extensión :72°C durante 4 minutos
- ∞ :12°C

Tabla 5. Preparación de la mezcla de la reacción de PCR a punto final para larvas de *Totoaba macdonaldi*

<b>MIX PARA PCR PUNTO FINAL</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>1 rx <math>\mu</math>l</b>
<b>H2O</b>	<b>12.33</b>
<b>Gut Buffer</b>	<b>5.0</b>
<b>Mg Cl<sub>2</sub></b>	<b>4.0</b>
<b>DNTPs</b>	<b>0.5</b>
<b>Primer Forward</b>	<b>0.5</b>
<b>Primer Reverse</b>	<b>0.5</b>
<b>Got Pol</b>	<b>0.175</b>
<b>Total</b>	<b>23</b>
<b>ADNc</b>	<b>1.5</b>
<b>Vol. Final</b>	<b>24.5</b>

#### **Estandarización de Primers:**

Los primers se mandaron a sintetizar en ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV. Cada primer se re suspendió en agua libre de nucleasas correspondiente a la cantidad descrita encada vial a una concentración de 100  $\mu$ M, posteriormente se dejó a una concentración de 10 $\mu$ M (Adicionar en un tubo eppendorf una cantidad de 5 $\mu$ l del primer a concentración 100 $\mu$ M y colocar 45  $\mu$ l de agua libre de nucleasas). A cada par de primer se le calculo un gradiente de temperatura el cual se calculó con cada TEMPERATURA DE FUSION (TM) de cada primer sumando cada TM de los primers y dividiéndolos entre 2 posteriormente se resta a este promedio -5°C teniendo como base esta Temperatura para desglosar nuestro gradiente.

Ejemplo: PRIMER EF1 $\alpha$

Forward: 59.5 °C

Reverse: 58.6 °C

---

PROMEDIO:  $59.05 - 5^{\circ}\text{C} = 54.0^{\circ}\text{C}$

---

GRADIENTE T°C

58

56

**54**

52

50

---

Una vez realizado este paso se prepara un Mix PCR desglosado anteriormente en la tabla X, se coloca los tubos eppendorf en BIO-RAD C1000TOUCH THERMALCYCLER, acomodando por gradiente de temperatura cada tubo en la placa del termociclador. Incubando las reacciones con el siguiente programa

- 95°C durante 3 minutos
- 95°C DURANTE 0.30 SEGUNDOS
- Gradiente (60-50 °C) DURANTE 0.30 segundos
- 72°C durante 1 minuto
- GOTTO 34 X
- 72°C durante 5 minutos
- 12°C ∞

Una vez terminado el programa se realiza una electroforesis de las muestras seleccionadas para determinar en qué temperatura está amplificando mejor nuestras muestras y proseguir con el análisis de eficiencia de nuestros primers.

### **Protocolo PCR tiempo real para realizar curvas de eficiencia:**

Se procede con un diseño de placa del programa BIO-RAD para cargar nuestra placa con las rx correspondientes en cada pozo.

Se realizó una corrida para determinar el Cq de todos nuestros primers y determinar si se trabajaba con cDNA o producto de PCR. Se metieron todos los primer por triplicado con sus respectivos controles (una vez terminado el programa se juntaron las reacciones de cada gen para juntar todo el producto de PCR, posteriormente se realizó alícuotas de 1:50 para trabajar con este producto para las respectivas diluciones a realizar para nuestras curvas estándar)

Se realizaron diluciones seriadas 1:5 las cuales trabajando con 7 diluciones en total tomando 2µL de producto de PCR con 10 µl de agua libre de nucleasas para realizar nuestra primera dilución. Las curvas de eficiencia se realizaron con la dilución 3-7. Una vez preparadas las diluciones y el Mix se adiciono en la placa 7 µl de Mix y 3µl de la dilución. Se trabajó por triplicado para cada dilución. Después de montada, la placa fue sellada con el microsello autoadherible específico para las placas, teniendo siempre cuidado de no tocar la superficie de este. Se colocó la placa en el termociclador CFX96 (Bio-rad). El equipo generara una gráfica con curvas donde cada una nos representa las diluciones que se hacen, donde la primera es la más concentrada y la ultima la más diluida. Una vez teniendo las curvas el equipo calcula una regresión línea de los valores de Cq y acomodara los datos para poder observar la curva estándar, la cual calcula una pendiente y el logaritmo de la concentración

Tabla 6. Productos utilizados para preparación la mezcla de la reacción de PCR de tiempo real.

<b>Productos Mix Eva Green</b>	<b>µl</b>
Eva Green	5
Primer Reverse	0.2
Primer Forward	0.2
H2o libre nucleasas	1.6

### **Evaluación genes de referencia:**

#### GeNorm

Mediante el método de evaluación en el programa geNorm nos calcula la estabilidad de la expresión génica (M)

#### NormFinder

Mediante el método de evaluación mediante NormFinder. Este programa está basado en la estimación de la varianza calculando los valores de la estabilidad de la expresión para nuestros genes de referencia.

## BestKeeper

De acuerdo con el método de BestKeeper, este calcula la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) basándose en los valores de los ciclos de cuantificación (Cq) de nuestros tres genes de referencia.