



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**Transcriptoma de *Totoaba macdonaldi* para identificar marcadores
nutricionales durante la ontogenia.**

Tema de tesis de maestría que presenta:

Álvaro Hernán Hernández Montiel

Director:

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California

Co-Director:

Dr. Raúl Llera Herrera
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán
Universidad Nacional Autónoma de México

Sinodales:

Dra. Ivone Giffard Mena
Dr. Samuel Sánchez Serrano
Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California

Junio 2021

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**TRANSCRIPTOMA DE *Totoaba macdonaldi*, PARA IDENTIFICAR
MARCADORES NUTRICIONALES durante la ontogenia.**

T E S I S

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ÁLVARO HERNÁN HERNÁNDEZ MONTIEL.

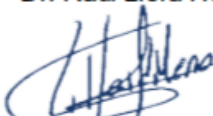
Aprobada por:



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Dr. Raúl Llera Herrera.



Dr. Raúl Llera Herrera.
Có-Director de tesis



Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



Dr. Samuel Sánchez Serrano
Sinodal

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California por su gran trabajo educativo, en la formación de los profesionistas que en sus aulas y laboratorios, encontraron su camino.

A la Facultad de Ciencias Marinas por brindar una educación de calidad, permitiéndonos una inclusión homogénea con el presente y el porvenir. A través de sus especialidades como el programa de Ecología Molecular y Biotecnología, donde tuve la dicha de ser aceptado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por concederme la beca (CVU-933793) que me permitió realizar mi maestría, así como a los proyectos de Ampliación de UMA de reproducción y crianza de Totoaba “DGVS-CR-IN_1084-B.C./09”, para dar inicio al programa de repoblación y desarrollo acuícola regional. Y al proyecto de Innovaciones tecnológicas para la conservación y reproducción de peces marinos con énfasis en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Fondo de SADER-CONACYT No. 247698.

Le agradezco a los docentes encargados de impartir el posgrado; Dra. Lus López, Dra. Yolanda Schramm, Dra. Amelia Portillo, Dra. Alicia Abadía y al Dr. Luis Enriquez director del posgrado, por sus clases y valiosos consejos para este trabajo.

Al personal administrativo, principalmente a la secretaria del posgrado Angélica Arce, por su imprescindible ayuda durante el posgrado.

Al Dr. Conal True y su equipo de trabajo de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura FCM-UABC, por sus instalaciones y las larvas usadas para este estudio.

A mis estimados sinodales, la Dra. Ivone Giffard por su clase y valiosa contribución en las correcciones y sugerencias en la redacción del trabajo. Al igual que al Dr. Samuel Sánchez, por su indispensable apoyo en el proceso histológico, así como en las correcciones y sugerencias.

A mi co-director de tesis, el Dr. Raúl Llera por su tiempo y brindarme su invaluable ayuda, durante mi estancia en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, con sede en Mazatlán, Sinaloa. Donde me enseñó a procesar los datos secuenciados para ensamblar el transcriptoma, así como el proceso de análisis de expresión diferencial para lograr el objetivo principal de este trabajo.

Finalmente le agradezco a mi director, el Dr. Mario Galaviz por su apreciada confianza, e invitarme a trabajar en este proyecto, donde aprendí mucho gracias a sus precisas observaciones, valiosos consejos y ayuda en todas las etapas del posgrado y del trabajo realizado. Sin duda esta colaboración ha sido un gran aporte a mi desarrollo académico y profesional.

Dedicatoria

A mi familia que tanto amo.

Un haz de luz atravesó la oscuridad directo a la pupila, y un mundo de fantasmas cobró vida.

Para Karla por su amor y apoyo incondicional, y mi sirena por recordarme como soñar el futuro, las amo.

Tabla de Contenido

Introducción general.....	10
Justificación.....	11
Hipótesis.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Abstract.....	13
Resumen.....	15
1. Introducción.....	16
2. Método y materiales.....	18
2.1 Recolección de muestras.....	18
2.2 Proceso de histología.....	18
2.3 Extracción total de ARN y secuenciación.....	19
2.4 Calidad, limpieza, ensamblaje y anotación de transcriptoma de novo.....	19
2.5 Estimación de abundancia y expresión diferencial.....	20
2.6 Selección de genes relacionados con organogénesis y marcadores nutrigenéticos....	21
3. Resultados.....	21
3.1 Histología.....	21
3.2 Secuenciación y ensamblaje de transcriptoma.....	22
3.3 Abundancia y expresión diferencial de los transcritos.....	23
3.4 Genes relacionados con organogénesis.....	24
3.5 Marcadores nutricionales.....	25
4. Discusión.....	25
4.1 Secuenciación y ensamblaje del transcriptoma de novo.....	25
4.2 Desarrollo morfológico y funcional del sistema digestivo.....	26
4.3 Biosíntesis de lípidos en hígado durante la deshabitación.....	32
4.4 Respuesta inmune en intestino durante la deshabitación.....	37
5. Conclusiones.....	38
6. Bibliografía.....	40

Tabla de Figuras

Figura 1. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de larva de 16 días post eclosión. a) se observa a 10X, la cavidad buco-faringe (BP), esófago (e), el estómago cardíaco (cs), intestino anterior (AI), intestino medio (Mg), intestino posterior (PI), hígado (L), páncreas (p), riñón (K), tejido músculo (M) y arco branquial (GA). b) Corte de esófago a 100X, marcado con asterisco está la célula caliciforme. c) corte de intestino medio a 100X, se aprecian enterocitos (E), borde de cepillo (bb), con asterisco se marca un leucocito y células de tejido liso (sc). d) corte del páncreas e hígado a 100X, islote de Langerhans (Li), acinos serosos (sa) y conducto intercalar (id).....64

Figura 2. Cortes histológicos de larva de totoaba de 20 dpe, teñido con hematoxilina-eosina, en la imagen a) se observa el esófago (e), estómago (S), el intestino anterior (AI), intestino posterior (PI), hígado (L) y páncreas (p) en un aumento de 10X. En la imagen b) a 40X, marcado con asterisco está la glándula gástrica, acinos serosos del páncreas (sa), islote de Langerhans (Li), entre el páncreas e intestino se observa tejido conectivo laxo. En la imagen c) a 100X, se observa vellosidades del intestino anterior (AI), enterocitos (E), células caliciformes marcadas con asterisco y el borde de cepillo (bb). En la imagen d) a 100X se observa vellosidades del colon, con presencia de células caliciformes (GC), en el área de la lámina propia (LP) se aprecian leucocitos marcados con asterisco y vacuolas supranucleares (SV).....65

Figura 3. Cortes histológicos de larvas de 28 dpe. a) a 10X, se observa el esófago (e), las glándulas gástricas (GG), el estómago (S), páncreas (p), hígado (L), intestino anterior (AI), intestino posterior (PI) y el intestino medio (Mg). En la imagen b) a 100 X marcadas con asterisco están las glándulas gástricas, marcadas con flecha, células parietales. En la imagen c) a 40X se aprecian vellosidades del intestino posterior, vacuolas supranucleares (SV), células caliciformes (GC), lámina propia (LP), borde de cepillo (bb) y en la flecha la presencia de leucocitos.....66

Figura 4. Cortes histológicos de hígado de los días 16, 20 y 28. Se observa el corte de hígado (L) y páncreas (p) de las muestras del día 16 (a), día 20 (b) y día 28 (c). se puede observar un aumento en el tamaño de los hepatocitos y la migración del núcleo a la periferia, por vacuolización hepática como posible señal de esteatosis.....67

Figura 5. Gráficos MA realizados con edgeR. Se observan recuento promedios transformados logarítmicamente a conteos por millón (CPM), contra el coeficiente estimado sobre los cambios significativos de expresión, en base a su intensidad logarítmica (log2) en la escala de M (eje y) y la intensidad logarítmica del valor promedio por transcrito (eje x). Marcando su expresión diferencial en rojo, como resultado de la tasa de falsos descubrimientos o FDR <0.05. Etapas temprana (E) con larvas D06 en etapa preflexión y D9 de flexión, media (M) con larvas D12 en transición de flexión a postflexión y D16 en postflexión, por ultimo la etapa tardía (L) con larvas D20 en postflexión y larvas de D28 en postlarva.....68

Figura 6. *Heatmap de expresión diferencial entre muestras*, generada a partir de los valores logarítmicos de los conteos por millón de transcritos, contra los aumentos $\log^2$ significativos de la expresión por transcrito. Etapa preflexión (G1), flexión (G2) y postflexión (G3). Observando correlación entre las muestras G1. Así como, una correlación entre las muestras del G3; marcando el salto entre G1 y G3, a partir de D16.....**69**

Figura 7. *Heatmap con los 250 transcritos con mayor expresión diferencial*. A partir de valores de log-CPM (recuentos de conteos $\log^2$ por millón) entre los aumentos $\log^2$ significativos en su expresión y diferenciados por el método de FDR para un valor P máximo de $1e-3$ entre transcritos. Observando la relación en la expresión que marca la transición entre D20 con D16, pasando de la flexión a la postflexión.....**70**

Figura 8. *Matriz de correlación para genes involucrados en el desarrollo del sistema digestivo de Totoaba*, a partir de valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar. Generando una matriz de disimilitud con el método euclidiano, y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos. Con genes del desarrollo del mesodermo y glándulas secretoras, como: RarG, RarGA, Sox2, Cdx1, Pdx1, Muc13, Muc19 y Aqp3 de D06_L1 a D12. Y genes relacionados a la diferenciación celular, maduración intestinal y homeostasis Cdk1, Aqp3, Muc5AC, Muc2, Muc2L, Aqp3, FoxA2 y Muc18.....**71**

Figura 9. *Matriz de correlación para genes usados como marcadores de la funcionalidad del sistema digestivo*. Donde se muestran los valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos. El dendrograma horizontal se separó a D06_L2 del resto (azul), unió de D06_L1 a D16 en un grupo (verde), y D20 - D28 en otro grupo, junto a los genes relacionados con la digestión ácida (rojo) Tripsina-1 (Try1), Gastrina (PepC), Pepsina A (PepA), Tripsina-6 (Try6), Tripsina (TryP). Por otra parte, Fosfatasa alcalina intestinal (Ppbi) con protección y homeostasis intestinal.....**72**

Figura 10. *Matriz de correlación con genes relacionados, en la biosíntesis de lípidos y respuesta inmune*. Observando tres grupos principales entre muestras, con D28 (rojo) y genes involucrados en la respuesta inmune, como: IL10, Tir1, C1ql3, TryT, Lep, Tir5, IL6, Myd88, IL8 e IL22 (azul). Contrastando con la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de AG PUFAs y colesterol; Elovl5, Fasd6, Srbp1, Srbp2 y Fasds2 (rojo), así como; genes asociados a biosíntesis y transporte de AG saturados y monoinsaturados; Elovl1, Elovl7, Elovl6, Scd1, ApoB, ApoB100 (verde). A partir de valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar. Generando una matriz de disimilitud con el método euclidiano, y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos.....**73**

Figura 11. Análisis de componentes principales. Realizado a partir de los recuentos por millón de transcritos. Donde el componente 1 describe el 32.88% de la variabilidad intergrupar y el componente 2 el 23.87%. Observando a D28 y D06_L2 más alejados entre sí, también a D6_L1 más cercas a D9 y D12. Por otra parte, en el componente 2 se observa como D16, D20 y D28 se agrupan, explicando la mayor similitud de D12 con G1 y D16 con G3.....74

Figura 12. Red de interacción con 14 proteínas expresadas diferencialmente entre G1 y G2, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo y síntesis de AG (Tabla 1, Figura 8). El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraducciona, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.0600 (60% de probabilidad que exista un vínculo entre 2 genes en el mismo mapa metabólico de la base de datos KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).....75

Figura 13. Red de interacción con 54 proteínas expresadas diferencialmente entre G2 y G3, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo, biosíntesis de lípidos y respuesta inmune. El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraducciona, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. El halo rojo representa expresion a la alta y el verde a la baja. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.07400 (74% de probabilidad de un vínculo entre 2 genes del mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).....76

Figura 14. Red de interacción con 80 proteínas expresadas diferencialmente entre G1 y G3, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo, biosíntesis de lípidos y respuesta inmune. El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraducciona, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. El halo rojo representa alta expresión y el verde baja. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.06800 (68% de probabilidad de un vínculo entre 2 genes del mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).....77

Figura 15. Ganancia de peso húmedo en larvas de totoaba, durante los cambios de alimento en las etapas de flexión, y las etapas temprana, media y tardía generadas con un análisis de expresión diferencial, para genes relacionados con el desarrollo del sistema digestivo.....78

Indice de Tablas

Tabla 1. *Genes expresados diferencialmente durante el desarrollo del sistema digestivo*, definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.....**85**

Tabla 2. *Genes usados como marcadores de la funcionalidad del sistema digestivo*, definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.....**86**

Tabla 3. *Genes de biosíntesis de lípidos y respuesta inmune*, como indicadores del estado de salud en intestino e hígado. Definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.....**87**

Introducción general

Con la finalidad de aumentar la sobrevivencia durante la deshabitación, se han realizado estudios para evaluar la capacidad digestiva en peces de cultivo o con potencial comercial (Goda *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2018; Eryalcin, 2018), justificados por los cambios fisiológicos ocurridos durante la morfogénesis, para desarrollar y promover la funcionalidad de los órganos que componen el sistema digestivo (Riddle *et al.*, 2018). Por otra parte, el uso de herramientas moleculares como la secuenciación masiva y el análisis transcriptómico, han permitido mejorar la comprensión del desarrollo del sistema digestivo, así como, la conexión entre el alimento y los mecanismos de regulación génica en la digestión y asimilación de nutrientes en larvas de distintas especies de interés acuícola (Jiménez-Martínez *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020), promoviendo la búsqueda de genes relacionados con la digestión y asimilación de nutrientes, como hormonas y enzimas digestivas; usadas como marcadores nutricionales en campos de estudio como la nutrigenética y nutrigenómica (Fenech *et al.*, 2011; Williams and Watts, 2019).

Además de contribuir en la nutrición, los estudios transcriptómicos son de suma importancia para evaluar el estado de salud en peces; investigando las interacciones entre las condiciones del medio y su sistema inmune (Cai *et al.*, 2018; Mittermayer *et al.*, 2019). Es por ello, que el presente estudio tiene como objetivo; Identificar posibles marcadores nutricionales a través de un análisis transcriptómico, durante el desarrollo larvario de totoaba *Totoaba macdonaldi*.

Justificación

Debido al alto porcentaje de mortalidad registrado en larvas de totoaba durante su etapa larvaria. El presente estudio tiene como propósito, generar un transcriptoma de novo con sus anotaciones, que contribuya en el estudio de la expresión génica durante el desarrollo larvario; enfocando en el proceso de deshabitación al alimento vivo, con la finalidad de identificar marcadores nutricionales, relacionados con el desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo, mediante análisis de expresión diferencial.

Hipótesis

Se espera una correlación positiva entre los niveles de expresión génica, relacionados con procesos del desarrollo morfológico y funcional del sistema digestivo, en larvas de totoabas durante el proceso de deshabitación.

Objetivo general

Identificar posibles marcadores nutricionales a través de un análisis transcriptómico, durante el desarrollo larvario de totoaba *Totoaba macdonaldi*.

Objetivos específicos

- Generar un ensamble de novo con anotaciones del transcriptoma de *Totoaba macdonaldi*; a partir de larvas de entre 6 días post eclosión, hasta los 28 DPE.
- Identificar marcadores nutricionales, que permitan sugerir medidas que mejoren el estado de salud en larvas durante el proceso de deshabitación, mediante el análisis de la expresión diferencial entre las muestras.
- Relacionar los marcadores nutricionales con el desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo, durante la deshabitación.

Transcriptome of *Totoaba macdonaldi* to identify nutritional markers during ontogeny.

Journal:	Frontiers
Manuscript ID	Draft
Journal Name	Frontiers in Physiology
Manuscript Type	Original Research
Date submitted by The Author	n/a
Complete List of Authors	Hernández-Montiel, Á. H ¹. Llera-Herrera, R ² . Giffard- Mena, I ¹. Sánchez-Serrano, S ¹. Galaviz-Espinoza, M, A ¹. ¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carretera Transpeninsular Ensenada - Tijuana No. 3917, Col. Playitas, 22860. Ensenada, Baja California, México. ² Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Joel Montes Camarena s/n, Cerro del Vigía, 82000. Mazatlán, Sin.
Key Words	Totoaba, Larvae, Dehabituation, De novo transcriptome, Ontogeny.

Transcriptome of *Totoaba macdonaldi* to identify nutritional markers during ontogeny.

Hernández-Montiel, Á. H¹, Galaviz-Espinoza, M, A^{1*}, Llera-Herrera, R^{2*}, Giffard- Mena, I ¹,
Sánchez-Serrano, S ¹.

¹Faculty of Marine Sciences, Autonomous University of Baja California (UABC),
Transpeninsular Highway Ensenada - Tijuana No. 3917, Col. Playitas, 22860.

²Institute of Marine Sciences and Limnology, Mazatlan Academic Unit, National Autonomous
University of Mexico. Joel Montes Camarena s/n, Cerro del Vigía, 82000.

*** Correspondence:**

Galaviz-Espinoza, M, A.
mgalaviz@uabc.edu.mx

Llera-Herrera, R.
raul.llera@gmail.com

Keywords: Totoaba, Larvae, Dehabituation, De novo transcriptome, Ontogeny.

Abstract

In fish farming, the use of last generation sequencing techniques has produced a large amount of information related to biological processes in cultured organisms or with culture potential, which through transcriptomics, have allowed studying in detail processes of interest in their different organic systems; mainly in gene regulation pathways involved in morphological and functional development, as well as, feeding processes and nutrient assimilation; especially during the process of dishabituation between live food and formulated food in the larval stage. With respect to *Totoaba macdonaldi*, the culture cycle has been developed; however, as is usually the case with marine fish larvae, mortalities are high. Therefore, in order to study the possible causes, the expression of genes present during the dehabituation process was analyzed, relating them to the ontogeny of the digestive system

and its immune system. For this purpose, a de novo transcriptome was assembled from the sequencing of larval groups with different post-hatching days (D) and diet, allowing grouping them into the following stages: early (D6 - D9, rotifer), middle (12D - 16D, rotifer - Artemia) and late (20D - 28D, Artemia – microdiet). Using the Illumina 1.9 / Sanger platform, 139,773 transcripts were identified, with which the de novo transcriptome was generated, of which 66,008 encode for a protein. On the other hand, by means of an analysis of single copy orthologous genes, a total of 89% of complete genes were observed, 4.1% fragmented and 6.9% lost. Among the genes expressed were those related to the morphological development of the digestive system, as well as metabolic hormones and enzymes, highlighting the increase in the expression of proteases related to acid digestion between the middle and late stages, coinciding with the onset of weaning and the presence of the first gastric glands.

Resumen

La aplicación de técnicas de secuenciación de última generación en la piscicultura, a generado una gran cantidad de información, relacionada con la ontología génica de organismos cultivados o con potencial de cultivo, que mediante análisis transcriptómicos; han permitido estudiar con detalle procesos de interés entre el desarrollo de sus diferentes sistemas orgánicos, a partir de análisis diferenciales de la regulación génica implicada en alguna función molecular, proceso biológico o como un componente celular durante su desarrollo morfológico y funcional, relacionándolos con procesos alimenticios y asimilación de nutrientes; especialmente durante el proceso de deshabitación entre alimento vivo ha formulado en la etapa larvaria. Con respecto a *Totoaba macdonaldi*, se cuenta con el ciclo de cultivo desarrollado, sin embargo, como suele suceder con larvas de peces marinos las mortalidades son altas. Por lo tanto, para estudiar las posibles causas se analizó la expresión diferencial de genes en larvas durante el proceso de deshabitación, relacionándolos con la ontogenia del sistema digestivo y el sistema inmune. Para ello se ensambló un transcriptoma de novo a partir de la secuenciación de grupos larvas con diferentes días (D) post-eclosión y dieta, permitiendo agruparlas en las siguientes etapas: temprana (D6 - D9, rotífero), media (12D - 16D, rotífero - Artemia) y tardía (20D - 28D, Artemia - microdieta). Usando la plataforma Illumina 1.9 / Sanger se identificaron 139,773 transcritos, con los que se generó el transcriptoma de novo de los cuales 66,008 codifican para alguna proteína. Por otra parte, mediante un análisis de genes ortólogos de copia única, se observó un total del 89% de genes completos, 4.1% fragmentados y 6.9% perdidos. Entre los genes expresados se ubicaron aquellos relacionados con el desarrollo morfológico del sistema digestivo, así como hormonas metabólicas y enzimas, destacando el aumento en la expresión de proteasas

relacionadas con la digestión ácida entre la etapa media y tardía, concordando con el inicio de la deshabitación y la presencia de las primeras glándulas gástricas.

1. Introducción.

El costo en la producción de alimento vivo para la etapa larvaria, representa una de las mayores inversiones en el cultivo de peces marinos, comparable con el gasto producido en la etapa de engorde, a pesar de durar menos tiempo (El-Dahhar *et al.*, 2018). En consecuencia, los productores comúnmente realizan deshabitaciones del alimento vivo anticipadas, para reducir gastos en producción de alimento vivo. Sin embargo, esta práctica puede ser perjudicial en los organismos, que no tengan la capacidad digestiva requerida para asimilar el cambio alimenticio (Stejskal *et al.*, 2018; Nieves-Rodríguez *et al.*, 2018).

Por lo anterior, se han realizado estudios para evaluar la capacidad digestiva en peces de cultivo o con potencial comercial, para aumentar la sobrevivencia durante la deshabitación (Goda *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2018; Eryalcin, 2018). Justificados en los cambios fisiológicos ocurridos durante la morfogénesis, como la presencia de células especializadas, que desarrollan y promueven la funcionalidad de los órganos que componen el sistema digestivo (Riddle *et al.*, 2018). Por otra parte, el uso de herramientas moleculares como la secuenciación masiva para análisis transcriptómicos, han permitido mejorar la comprensión del desarrollo del sistema digestivo, así como, la conexión entre el alimento y los mecanismos de regulación génica en la digestión y asimilación de nutrientes en larvas de distintas especies de interés acuícola (Jiménez-Martínez *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020). Esto ha permitido el avance en ramas de la genómica nutricional, como la nutrigenética y nutrigenómica (Fenech *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2019) al estudiar marcadores nutricionales, a partir de genes relacionados con la digestión y asimilación de nutrientes, como hormonas y enzimas digestivas.

Además de contribuir a mejorar aspectos nutrimentales para los peces, los estudios transcriptómicos son de suma importancia para evaluar su estado de salud, al estudiar la expresión génica de su sistema inmune, en respuesta a las condiciones fluctuantes del medio, debido a factores bióticos y abióticos (Cai *et al.*, 2018; Mittermayer *et al.*, 2019).

En el caso de *Totoaba macdonaldi*, se ha documentado el aumento en la expresión de tripsina y quimiotripsina entre los días 15 y 16 post eclosión, al igual que el inicio en la expresión de pepsina, coincidiendo en el inicio de la diferenciación histológica del estómago y desarrollo de glándulas gástricas, observadas desde el día 20 post eclosión (Galaviz *et al.*, 2015). Sin embargo, para totoaba no se ha reportado un perfil transcriptómico, que permita dar seguimiento a la expresión génica completa durante su etapa larvaria, para interpretar el desarrollo celular desde una perspectiva morfofuncional, mediante el análisis de expresión diferencial e histológico. Este tipo de aproximaciones ayudaría en la planeación de soluciones a problemas como las altas mortalidades, asociadas con la mala digestión de los alimentos y la presencia de deformaciones, debido a la implementación de dietas inadecuadas (López-López *et al.*, 2015); relacionándose con el proceso de deshabitación del alimento vivo a formulado, durante la etapa larval. Totoaba presenta un desarrollo ontogénico de tipo indirecto, por ello su sistema digestivo aún está en desarrollo cuando se inicia la primera alimentación exógena, por lo que requiere de una adecuada deshabitación (Mata-Sotres *et al.*, 2015) que le permita desarrollarse correctamente durante su etapa larval.

Estudios previos en Totoaba, han demostrado la presencia de tripsina y quimiotripsina a partir del primer día (D) post-eclosión (D1), con un aumento en su actividad el D6 que coincide con la apertura de la boca e inicio de la alimentación exógena (Córdova-Montejo *et al.*, 2019), así como un incremento en la actividad de pepsina en D24 (Galaviz *et al.*, 2015).

Debido a que no existen estudios a nivel transcriptoma de Totoaba, para evaluar el

desarrollo del sistema digestivo de totoaba. El presente trabajo, tiene como objetivo identificar marcadores nutricionales, mediante análisis de expresión diferencial, a partir de un transcriptoma de novo, generado con larvas presentes en el proceso de deshabitación.

2. Método y materiales.

2.1 Recolección de muestras.

Las larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) provenían del laboratorio de la unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP), de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Eclosionaron en agua de mar (35 psu) a 24 ± 1 ° C, y oxígeno disuelto > 6 mg/L-1 (True, 2012), con larvas L1 alimentadas y L2 en inanición.

Colectadas los días; D1 larvas lecitotróficas, D6_L1 (exotrófica) larvas en preflexión alimentada a saciedad con rotífero enriquecido (Algamac 3050 – 0.3 g/500 000 rotífero), D6_L2 (larva en inanición), D9 y D12 (larvas en flexión) alimentadas con rotífero enriquecido y nauplios de Artemia, D16 con larvas en postflexión alimentadas con metanauplios de Artemia enriquecidos (Algamac, 0.4 g/100 000 Artemia), D20 (inicia deshabitación) con larvas en postflexión alimentadas con metanauplios de Artemia enriquecidos y microdieta (Otohime B 250-360 Mm) y D28 (deshabitación total) con postlarvas alimentadas con microdieta (Figura 15). Se colectaron 50 organismos enteros para D1, D6 y D9; 20 para D12 y D16, 10 en D20 y 5 para D28 preservando cada muestra en 10 volúmenes de RNAlater (QIAGEN) a -80° C para la extracción de ARN.

2.2 Proceso de histología.

Larvas previamente fijadas en paraformaldehído al 4%, fueron procesadas utilizando el método descrito en el anexo 1. Colocando las muestras en una serie ascendente de etanol graduado en un procesador de tejidos Leica (modelo TP1020), para después ser embebidos

en parafina (monómero de glicol metacrilato). Posteriormente se realizaron cortes longitudinales de 4 y 5 μm de espesor con un microtomo de rotación manual Leica (modelo RM2125RTS), teñidos con tinción hematoxilina-eosina (H&E) y observados en un microscopio (ZEISS Axioscope) con la cámara (Axiocam 305 color de ZEISS); con el software para análisis de imágenes (ZEN 2.3) de ZEISS.

2.3 Extracción total de ARN y secuenciación.

Se realizó la construcción de bibliotecas y secuencia del cDNA en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática Cuernavaca Morelos, México. Usando el secuenciador NextSeq Illumina 1.9 con 2X75 ciclos, con una productividad esperada de 120-400 millones de lecturas por muestra.

2.4 Calidad, limpieza, ensamblaje y anotación de transcriptoma de novo.

Se verificó la calidad de las secuencias usando FastQC y la limpieza de lecturas se realizó con trimomatic (trinityrnaseq-v2.9.0), retirando los adaptadores (ILLUMINACLIP:TrueSeq3-PE.fa:2.30.10) mediante un escaneo de lecturas en ventanas de 4 pb, cortando aquellas con promedio menor a 15 pb (SLIDINGWINDOW:4:15) y eliminando las lecturas por debajo de 36 pb (MINLEN:36). Se generó un catálogo de K-mers usando el indexador jellyfish, obteniendo lecturas pares (P) e impares (U) por el descarte de secuencias (Bolger *et al.*, 2014).

El ensamble de novo se llevó a cabo con Trinity (trinityrnaseq-v2.9.0), que emplea tres programas independientes. Primero usa *inchworm* para ensamblar los contigs, después *chrysalis* que agrupa los contigs; construyendo gráficos de Bruijn y finalmente *butterfly*, para trazar los caminos a través del gráfico; reconstruyendo las secuencias finales de las isoformas presentes (Haas *et al.*, 2013). Posteriormente se usó Transdecoder de Trinotate (Bryant *et al.*, 2017), para extraer los marcos de lectura abiertos (ORFs) que cumplen con el

criterio mínimo de longitud (100aa), usados para generar archivos de secuencias peptídicas; mediante una retención por similitud $<1e-6$ con Uniprot y pFAM.

Con los que posteriormente, se realizó la anotación funcional por blast entre sus homólogos presentes en bases de datos, como; Uniprot, pFAM, RNAMMER, SignalP, TMHMM, Swiss-prot y KEGG incorporando los resultados en una base de datos SQLite. Finalmente se evaluó la integridad de los genes del ensamble de novo con BUSCO ortholog (BUSCO v2.0), mediante su base de datos de Actinopterygii_odb10 (Creada el 2019-11-20, número de especies: 3640).

2.5 Estimación de abundancia y expresión diferencial.

Para determinar la abundancia de k-mers se usó el programa Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/>), generando matrices de la estimación de transcritos mediante pseudo-alineamientos. Con esas matrices se realizó un análisis de expresión diferencial, aplicando una estimación empírica de Bayes basado en distribuciones binomiales negativas, modelos lineales generalizados y pruebas de verosimilitud con los paquetes DESeq2 (v1.30.0) (Love et al., 2014) limma (v3.46.0) (Ritchie et al., 2015) y edgeR (v3.32.1) (Robinson et al., 2009) del programa Bioconductor v3.11 (Huber et al., 2015) para R (v3.5). Con las matrices anteriores se realizaron MA plots; gráficos para relacionar la intensidad logarítmica (valor M), contra los promedios de intensidad logarítmica (valor A) Ritchie et al (2015), al comparar la expresión diferencial sobre el cambio logarítmico con significación estadística del valor $P < 0.001$, FDR (*false discovery rate*) < 0.05 y dispersión de 0.1 entre muestras. Posteriormente se extrajeron y agruparon las transcripciones de acuerdo con su patrón de expresión diferencial, usando el valor FDR y el valor de cambios o *fold change* más significativos (logFC), definidos por el corte del valor P para FDR de 0.001 y un límite de 2^2 para logFC, generando una matriz de correlación de expresión única, una matriz de

correlación de Pearson entre muestras y mapas calor para visualizar dicha correlación. Además de un análisis de componentes principales (Figura 11), para observar la correlación entre las muestras.

La muestra D1 se excluyó de los análisis de expresión diferencial debido a que los genes de expresión morfológica fueron muy abundantes y enmascaran la expresión asociada a nutrición u otros procesos.

2.6 Selección de genes relacionados con organogénesis y marcadores nutrigenéticos.

Los genes seleccionados para la organogenia del sistema digestivo y marcadores nutrigenéticos (enzimas y hormonas), fueron extraídos de la matriz de genes expresados diferencialmente realizada con edgeR, de genes con un valor de $P < 1e-3$ y una expresión $> 2^2$, aunada a una búsqueda semántica para genes con relación ontológica, presentes en rutas de interacción molecular de KEGG. Vinculándolos mediante clusters de redes interacción proteína- proteína con String (versión 11; Szklarczyk *et al.*, 2019).

3. Resultados.

3.1 Histología.

A continuación se describe el desarrollo del sistema digestivo de larvas en etapa media y tardía, donde se detectó la presencia de las primeras glándulas gástricas (GG) en la etapa de deshabitación al alimento vivo a partir del D20. Por otra parte la larva D16 (Figura 1), presenta células caliciformes en esófago y ensanchamiento del estómago, los enterocitos del intestino medio presentan una distribución cilíndrica simple normal, adheridos a células de tejido liso del endotelio por la parte basal y su respectivo borde de cepillo en la parte apical, también se observa el desarrollo avanzado del páncreas exocrino con presencia de células acinares y gránulos de zimógeno, mientras que en la porción endocrina se observa un islote

de Langerhans y el conducto intercalar. Por último, el tejido hepático presenta capilares sinusoides y diversos vasos sanguíneos que interactúan con los cordones hepáticos.

Al día 20 (Figura 2) de la etapa tardía se observa un crecimiento del área esofágica, con un estómago más alargado y presencia de GG en estómago. Las vellosidades del intestino anterior presentan un aumento de tamaño y una migración avanzada de células caliciformes en intestino, así como vacuolas supranucleares en recto con inflamación de lámina propia y presencia de leucocitos.

En D28 (Figura 3), el esófago presenta abundancia de células caliciformes desde la cavidad buco faríngea hasta el esófago, también se observa una proliferación de GG en el estómago y células parietales. En los pliegues intestinales del intestino medio se distinguen células caliciformes migrando a la parte apical de los enterocitos, en las vellosidades del intestino posterior proliferan células con vacuola supranucleares y además se detectó inflamación de la lámina propia con presencia de leucocitos. Por último, se observó el desarrollo del tejido hepático de las larvas D16, D20 y D28 observando un aumento del diámetro de vacuolas y el núcleo desplazado a la periferia en hepatocitos del D28 (Figura 4).

3.2 Secuenciación y ensamblaje de transcriptoma.

A partir de la secuenciación con NextSeq Illumina, se obtuvieron un total de 120,659,600 lecturas en bruto de las cuales 85,780,479 fueron ensambladas (71%), para obtener los 139,773 transcritos que componen el ensamble de novo, que codifican un aproximado de 90,952 genes totales, con contigs promedio de 943 pb en la isoforma mas larga por gen, una N50 de contigs no menores a 2066 pb para generar el 50% del genoma y un porcentaje promedio de 46.9% de GC. Con los que se identificaron a 139,981 ORFs con el criterio mínimo de longitud, y de los cuales 66,008 transcritos codifican para alguna proteína.

Mediante la evaluación cuantitativa del ensamblaje anotado contra una base de genes ortólogos de copia única se observó que; 58,747 (89%) de los genes están completos con 35,835 (61%) de copia única y 16,449 (28%) duplicados, 2,408 (4.1%) fragmentados y 4,053 (6.9%) perdidos; debido a una posible pérdida durante el ensamblaje, secuencias sin coincidencias significativas o nula coincidencia las secuencias de la base de ortólogos.

3.3 Abundancia y expresión diferencial de los transcritos.

La organización de las muestras se estableció con la ayuda de un análisis de componentes principales (Figura 5), una matriz de correlación entre muestras (Figura 6) y el análisis de tamaño del efecto para la matriz R de Pearson, mediante un T-test con significancia de $\alpha = 0.05$; presentando valores $t = 0.51$, $df = 48$ y un P-valor = 0.61 que corrobora la hipótesis alternativa, al indicar que la media verdadera no es igual a 0 entre las muestras. Clasificando las larvas en tres grupos (G): G1 con D06_L1 (larva alimentada), D06_L2 (larva en inanición) y D09; G2 con D12 - D16 y G3 con D20 - D28. En los gráficos de MA (Figura 5) se observan genes con valor < 0.05 de FDR, indicando diferencias entre G1 y G2 con 46 (0.09%) genes diferenciados, de los cuales 2 estaban sobreexpresados y 44 subexpresados; entre G2 y G3 fueron 51 (0.07%) genes con 12 sobreexpresados y 39 subexpresados, por último, entre G1 y G3 fueron 585 (0.88%) genes con 156 sobreexpresados y 428 subexpresados del total de secuencias codificables, representados en redes de interacción entre proteínas (Figura 12, 13, 14).

En G3 se sobre expresaron los genes: pepsina A (*PGA3* o *PepA*), tripsina 1 (*PRSS1* o *Try1*), tripsina 6 (*PRSS3P2* o *Try6*), gastrina (*PGC* o *PepC*), triptasa 2 (*TPSB2* o *TryT*), quitinasa ácida de mamíferos (*CHIA*), apolipoproteína M (*APOM*), mucina-2 (*Muc2*), lisozima g (*LYZ*), Lectina I-2 fijadora de lactosa (*MBL*). Por otro lado en G1 y G2 se sobre expresaron los genes: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1

(CEACAM1), cGMP 3', 5' de cono retiniano sensible a la rodopsina (PDE6H), Arrestin-C (ARR3), Opsina-1 sensible al verde (OPSG), Retinol dehydrogenase 10-A (RDH10), Queratina tipo I citoesquelética 13 (KRT13), subunidad catalítica calpaína-1 (CAPN1). Para el análisis de expresión diferencial se seleccionaron los genes con un valor $P < 1e-3$ y una expresión de al menos 2^2 (Figura 7).

3.4 Genes relacionados con organogénesis.

Además de los genes obtenidos a partir de la expresión diferencial, se realizó una búsqueda semántica de genes relacionados con el desarrollo morfológico del sistema digestivo (Tabla 1), a partir de la base de datos generada con Trinotate. Identificando algunos de los genes con mayor expresión (Figura 8) entre la etapa temprana y D12 de la etapa media (larvas postflexión-flexión): *factor de transcripción SOX-2* (Sox2), *receptor de ácido gamma retinoico* (RarG), *receptor de ácido gamma-A retinoico* (RarGA) y *proteína Homeobox CDX-1* (Cdx1). Por otra parte, el factor nuclear de hepatocitos 3-beta (FoxA2) tuvo una expresión máxima de 22.89 TPM en D28.

Con relación al desarrollo del hígado se identificó la expresión de genes relacionados con posible daño hepático (Figura 4) (Tabla 3), encontrando sobre expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios en D28, estos son: *interleucina- 6, 8, 10 y 22* (IL6, IL8, IL10, IL22); *leptina* (Lep) y una subexpresión de genes relacionados con el transporte y biosíntesis de lípidos, como: *proteína de unión al elemento regulador del estero1 1 y 2* (Srbp1 y Srbp2), *acil-CoA desaturasa 1* (Scd1), *apolipoproteína B* (ApoB) y B-100 (ApoB100).

3.5 Marcadores nutricionales.

Para seleccionar los genes relacionados con procesos metabólicos durante la deshabitación, se utilizó el análisis de expresión diferencial generado con Kallisto y edgeR (Figura 7) y una búsqueda semántica (Figura 9) (Tabla 2), genes como; *orexina* (Orex) y

colecistoquinina (CCKN) tuvieron mayor expresión antes de la primera alimentación en larvas en inanición del día 6_L2, y la *fosfatasa alcalina de tipo intestinal* (Ppbi) en todos los días a excepción de D28.

Otras endopeptidasas digestivas relacionadas con el desarrollo metabólico son: Try1, PepC, PepA, Try6, TryP y TryT, así como genes relacionados con el metabolismo de lípidos: *triacylglicerol lipasa pancreática* (Lipp) y *Apolipoproteína M* (ApoM) con altas expresiones en la etapa tardía.

4. Discusión.

4.1 Secuenciación y ensamblaje del transcriptoma de novo.

Para obtener un perfil detallado sobre procesos digestivos, absorción de nutrientes y respuestas a posibles daños nutricionales (Martin *et al.*, 2016), se evaluó el proceso de deshabitación con la técnica de RNA-seq mediante un análisis transcriptómico; con la finalidad de observar la expresión de ARNm presente en las células de diferentes tejidos, bajo determinadas condiciones físico-química del cultivo (Stahl *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 2014), permitiendo la comparación de la expresión génica en el tracto digestivo, páncreas e hígado de larvas de *T. macdonaldi*, durante el cambio alimenticio. Diversos estudios han evaluado el proceso de deshabitación, concluyendo que un adecuado desarrollo del sistema digestivo contribuye con una menor mortalidad y mayor crecimiento (Yúfera *et al.*, 2007; Ueberschär *et al.*, 2018; Laczynska *et al.*, 2020), por otra parte, una deshabitación temprana aunque promueve la expresión de enzimas digestivas, también retrasa la maduración intestinal y disminuye la tasa de crecimiento (Campoverde *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Eryalçin *et al.*, 2017), debido a que la ontogenia enzimática es inducida por factores endógenos y exógenos; reguladores de la expresión génica (Liu *et al.*, 2020).

En el caso de totoaba como en el de otros peces no modelo, no se contaba con un genoma de referencia que nos ayudará a comprender su genotipo. Ahora con la secuenciación realizada para el presente estudio, del cual se obtuvieron un total de 139,773 transcritos en el ensamblaje de novo, a partir de contigs promedios de 943 pb con valor N50 de 2066, para un total de 139,981 ORFs con el criterio mínimo de longitud, donde 66,008 transcritos codifican para alguna proteína. Estos resultados son similares a los reportados para otros Teleósteos, como el *Pagellus bogaraveo* (dorada) con 61,850 genes, *pagrus pagrus* (pargo) con 62,116 genes y más pequeño que el de *Pagellus erythrinus* (pandora) con 89,124 genes (Natsidis *et al.*, 2019).

El transcriptoma de novo se generó a partir de larvas sometidas a un proceso de deshabituación al alimento vivo, con larvas exotróficas catalogadas en etapa temprana (D06-D09), media (D12-D16) y tardía (D20-D28) con base en un análisis de expresión diferencial, entre genes relacionados con el desarrollo del sistema digestivo.

4.2 Desarrollo morfológico y funcional del sistema digestivo.

Los cambios morfológicos más notables se dieron durante la transición de la etapa media a tardía, con el desarrollo y proliferación de células de glándulas secretoras del tracto digestivo, como en el caso de las GG en D20 y su proliferación avanzada en D28; indicadoras de la maduración funcional del sistema digestivo (Cui *et al.*, 2017) que concuerda con el análisis de expresión diferencial, donde se observa la expresión de las proteasas aspárticas pepsina A y C; secretadas por células principales en GG y usadas para evaluar la funcionalidad del estómago (Feng *et al.*, 2008). Para que totoaba cumpla con la funcionalidad digestiva esperada durante la deshabituación, se requirió de la expresión de genes como Sox2; un importante marcador de células madre epiteliales gástricas, que participa en la proliferación de células epiteliales en intestino anterior y medio, al igual que en la formación de GG; junto

a Cdx1 mantienen el desarrollo y homeostasis del epitelio intestinal temprano (Gonçalves *et al.*, 2019; Holst *et al.*, 2019).

Por otra parte, Sox2 también actúa como marcador en células precursoras e inmaduras de Schwann, interactuando con sus receptores *Efrin B2* encargados de formar las bandas de Büngner; guías en la proliferación de células de Schwann. La fosforilación mediada por Cdk1 sobre el sitio de unión serina 39 de Sox2, inhibe la proliferación y promueve la diferenciación (Lim *et al.*, 2017); Cdk1 tuvo una expresión de 6 TPM en D16 y 4 TPM en D20, mientras que en D28 se desactiva; coincidiendo con el cambio de larva en postflexión a flexión, y el cambio entre proliferación a diferenciación celular en tejidos como el nervioso.

Por lo que la expresión de Sox2 y Cdk1, interviene en el desarrollo y maduración del sistema nervioso periférico, permitiendo la conexión del tubo neural con células de la cresta neural, que durante el desarrollo embrionario migran a los arcos faríngeos (Pachajoa *et al.*, 2015), relacionándose también con el cambio de etapa entre larva en post-flexión a flexión, generada por la flexión de la notorcorda. Contribuyendo a la funcionalidad digestiva del sistema nervioso parasimpático, al comunicar diferentes tejidos mediante la innervación del nervio glosofaríngeo en branquias, tejido glandular de la faringe, laringe, esófago y tráquea que en conjunto con el nervio vago; se encargan de la acción aferente que estimula la relajación de esfínteres gastrointestinales y el control de la homeostasis intestinal, con la ayuda de acuaporinas y mucinas (Kohbara *et al.*, 2001; Sundin *et al.*, 2002; Jonz *et al.*, 2008; Sudiwala *et al.*, 2019).

En larvas de totoaba $\leq$ D20 se observó un comportamiento osmorregulador estenohalino con avanzado desarrollo a eurihalino en larvas D28 (Giffard-Mena *et al.*, 2020), donde las acuaporinas facilitan la digestión y absorción de contenido gastrointestinal; transportando agua por vía trans-membranal que regula la secreción de vías gastrointestinales (Liao *et al.*,

2020). En totoaba se identificaron las acuaporinas Aqp1, Aqp2, Aqp4, Aqp8; las acuagliceroporinas Aqp3, Aqp9, Aqp10 y las acuaporinas poco ortodoxas Aqp11 y Aqp12. En teleósteos se ha identificado la presencia de Aqp3 en recto y esófago anterior, este último, involucrado en la absorción de NaCl en teleósteos marinos; relacionándose con su alta capacidad para absorber agua en intestino distal y liberación de NaCl por ionocitos branquiales (Giffard-Mena *et al.*, 2008; Takei *et al.*, 2017). Sugiriendo que Aqp3 proporciona el agua en la reacción de la anhidrasa carbónica; regulando la presión osmótica al excretar protones a través de las branquias en condiciones ácidas y de hipoxia (Ellis *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2019; Ruhr *et al.*, 2020). Por último, en riñón donde controla el flujo de líquidos en los túbulos renales (Cutler *et al.*, 2007; Finn *et al.*, 2011; Giffard-Mena *et al.*, 2011).

En totoaba se identificaron 3 transcritos para Aqp3, uno expresado entre los días D06, D09, D12 y las otras dos en D16, D20 y D28; al ser un transcriptoma completo de totoaba se deberá realizar los análisis de funcionalidad necesarios, para corroborar la participación de las Aqp3 y el resto de las acuaporinas identificadas en los diferentes órganos. Por lo anterior, el papel de la homeostasis intestinal en procesos digestivos, mediados por quimiorreceptores del sistema nervioso parasimpático, a través de las fibras peptidérgicas del nervio vago es fundamental para la secreción de gastrina; hormona polipeptídica secretada en células G que promueve la secreción de HCL en células parietales y pepsinógeno en células principales, así como su activación en PepA; enzima relacionada con la nutrición en peces gástricos (Nolasco-Soria *et al.*, 2020).

La expresión de PepC entre el D06 y D12 fue residual; menor a 1 TPM, incrementándose a partir de D16 con 3.40 TPM y un aumento a 354 TPM en D20. La expresión de PepA fue similar, con una abundancia de transcripciones menor a 1 TPM entre D6 y D12 aumentando a 57.36 TPM en D16 y 2540 TPM en D20; indicando el cambio de digestión alcalina a ácida

en larvas (Zhang *et al.*, 2015), coincidiendo con estudios realizados anteriormente ha enzimas digestivas de totoaba (Galaviz *et al.*, 2015; Córdova-Montejo *et al.*, 2019) y otros teleósteos (Galaviz *et al.*, 2012; Suzer *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2019).

Lo anterior se relaciona con el aumento de células caliciformes en el tracto digestivo a partir de D16, y coincide con la disminución en la expresión de los receptores de hormonas nucleares RarG y RarGA; involucrados en el desarrollo de los arcos faríngeos, al expresarse en células mesodérmicas de los músculos faríngeos y el endotelio (Hale *et al.*, 2006; Linville *et al.*, 2009), contribuyendo al desarrollo y funcionalidad del endodermo faríngeo junto a Sox2 y Cdx1 (Graham *et al.*, 2005). Por otra parte, en células secretoras progenitoras durante el desarrollo glandular del endodermo gastrointestinal, la expresión de Math1 permite el desarrollo de células de Paneth, al mismo tiempo la coexpresión de Math1 con Foxa2 como factor de transcripción adicional, promueven el desarrollo de células caliciformes (Gao *et al.*, 2008), aumentando la expresión de mucinas de membrana y gel.

Un estudio realizado en *Sparus aurata* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013), reveló que la expresión de mucina unida a membrana Muc13 se localiza en estómago, con una mayor abundancia en intestino anterior, medio y posterior. Por otra parte, Muc18 mantuvo una mayor presencia en estómago, branquias, piel y esófago. Con respecto a la expresión de mucinas de gel de secreción se observó a Muc19 principalmente en esófago y en menor medida en estómago, finalmente las mucinas Muc2 y Muc2L se expresaron únicamente en estómago e intestinos. En otro estudio sobre el desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo en *Argyrosomus regius*, se observó la aparición de las primeras células mucosas en esófago entre D5 y D9, distinguiéndose las primeras células mucosas en la parte posterior del bucofaringe, mientras que la aparición de células caliciformes en intestino anterior, medio y posterior se dio entre D13 y D20 (Solovyev *et al.*, 2016).

En totoaba se identificó un incremento en la expresión de mucina unida a membrana Muc18 durante D06_L2 (larva en inanición); contrastando con la expresión de Muc13 de D06_L1 (larva alimentada) que aumentó durante los D9 y D12, posiblemente por el cambio de alimento. También se identificó que la expresión de mucinas unidas a membranas es más abundante en la etapa temprana y media; durante el desarrollo y proliferación de las glándulas secretoras. En contraste la expresión de mucinas de gel de secreción como Muc2, Muc2L, Muc5A y Muc19 presentaron mayor expresión en la etapa final, relacionándose con el aumento en la expresión de enzimas digestivas como PepA y PepC en estómago, y tripsinas en duodeno e intestino (Córdova-Montejo *et al.*, 2019); debido a la protección proteolítica de mucinas secretadas como Muc2 (Godl *et al.*, 2002) sobre al epitelio intestinal, permitiendo la digestión y protección contra la microbiota y patógenos (Cornick *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2018). Relacionándose también, con la disminución de la actividad de peptidasas citosólicas en enterocitos, durante la proteólisis digestiva entre la tercera y cuarta semana después de la eclosión (Zambonino-Infante *et al.*, 2001), así como el aumento en la expresión de genes relacionados con la actividad enzimática en el borde de cepillo, como; Try1, Try6 y TryP contrastando con la expresión de genes involucrados en la proliferación celular de de tejido pancreático.

Donde la interacción de FoxA2 con Pdx1 permite la maduración y diferenciación de células B; Pdx1 se expresa en células de los islotes de Langerhans, células centroacinares y del epitelio ductal formando ramificaciones durante la ontogenia inicial de las yemas pancreáticas (Park *et al.*, 2011; Bastidas-Ponce *et al.*, 2017). Desarrollo que se observa desde D06_L2, con la expresión de Cckn antes de la primera alimentación, como en el caso de la platija japonesa *Hippoglossoides elassodon*, donde su expresión en el epitelio intestinal; estimula la secreción de enzimas pancreáticas (Kurokawa *et al.*, 2000).

Esto se puede corroborar en la Figura 8, donde por medio de un análisis lineal a los días muestreados, se observó heterocedasticidad al escalar y normalizar las abundancias génicas. En el dendograma por día se aprecian dos grupos: G1 con D16, D20 y D28; y G2 con D06_L1, D09, D12 y D06_L2 comprobando que la distancia entre D16 y D12 permite diferenciar su desarrollo morfológico basándose en la expresión de los genes seleccionados.

Por otra parte, en la correlación presentada por gen se observan dos grupos con cuatro subgrupos principales (SG): G1/SG1 con Aqp3-1, Muc19 y Muc13; relacionados con protección y homeostasis en esófago y colon, y G1/SG2 con Sox2, RARGA, RARG y Cdx1; involucrados en el desarrollo del mesodermo dorsal y ventral, contribuyendo a la maduración de las conexiones nerviosas sobre el desarrollo, proliferación y funcionalidad de células excretoras del tracto gastrointestinal, G2/SG1 con Aqp3-2, Muc5AC, Muc2, Muc2L; relacionados con procesos de digestión y homeostasis, por último G2/SG2 con Aqp3-3, FoxA2 y Muc18 presentes en células excretoras en el epitelio maduro del endodermo del estómago; intervienen en la homeostasis en esófago y branquias. Que sumado a la expresión de proteasas como: PepA, PepC, Try1, Try6, TryP y genes del desarrollo digestivo, se observa una separación en dos grupos, con G1 formado por D06_L1, D09 y D12; separándose a partir de D16 y contrastando con G2 conformado por D20 y D28, donde se identificó la mayor abundancia de proteasas.

4.3 Biosíntesis de lípidos en hígado durante la deshabituación.

Al evaluar Ppbi, se observó una relación entre la expresión y los cambios de alimento, identificando su expresión en D06_L1 alimentadas con rotífero enriquecido, pero no en D06_L2 en inanición. Durante D09 se observa un aumento en la expresión de Ppbi, que disminuye en D12; alimentadas a partir de rotífero enriquecido y nauplios de artemia, en D16 se observa una baja en la expresión; dieta a base de metanauplios de Artemia enriquecida.

Después en D20 hubo un aumento en la expresión que coincidió con la pre-deshabitación, donde se administró *Artemia* enriquecida y microdieta (Otohime B250-360 Mm, proteína 52.11%, lípidos 16.3% y ceniza 11.2%), la deshabitación completa se realizó en D28, donde Ppbi tuvo su nivel más bajo (< 0.1 TPM); Ppbi regula la absorción de ácidos grasos (AG), procesos inflamatorios y participa en la colonización del microbiota intestinal en larvas (Rader, 2017; Schroeder, 2019; Lallès, 2020).

Con respecto al proceso de deshabitación, se ha identificado una baja en la expresión de Ppbi en larvas de *Pagrus pagrus* sometidas a una deshabitación temprana. Posiblemente por la variación y disponibilidad de AG en el alimento formulado y las *Artemias* enriquecidas; aunado a la alimentación individual mayoritaria entre *Artemia* o alimento formulado por las larvas, generando variación de tallas y promoviendo el canibalismo (Andrade *et al.*, 2012). Por lo que, al igual que en *Pagrus Pagrus* y en *Lutjanus guttatus* se recomienda un proceso de deshabitación a partir de D20; durante la aparición de pepsinas, tomando en cuenta la capacidad digestiva sobre el contenido nutricional del alimento formulado (Moguel-Hernández *et al.*, 2014), por lo que también se recomienda analizar las posibles acciones inhibitoras de proteasas en alimentos comerciales (Dikena *et al.*, 2018), para descartarlo como un factor en el aumento en la absorción de lípidos y carbohidratos en tejido graso como el hígado. Lo anterior se suma al enriquecimiento de *Artemia* y su bajo aporte proteico, que podría vincularse al aumento en la disparidad de tallas, debido al efecto que tienen las dietas altas en lípidos sobre el crecimiento (Gawlicka *et al.*, 2002). Debido a la variación en la asimilación y acumulación de lípidos por enterocitos inmaduros, presentes en diferentes regiones de la mucosa intestinal de larvas (Zambonino-Infante *et al.*, 2001).

Asimismo, la disminución de Ppbi genera una mayor absorción de AG, debido a su reducción en la desintoxicación sobre LPS en dietas altas en grasa, generando aumento de

tejido adiposo e inflamación por el aumento en su absorción (Lallès, 2014). Además, en peces marinos existe una baja tasa fisiológica, sobre la ruta biosintética encargada de convertir AG poliinsaturados (PUFAs), en AG poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) (Geay *et al.*, 2012; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2013); relacionándose con la expresión de genes como: Lep, Scd1, ApoB, ApoB100, Srp1 y 2. En el caso de Lep, su expresión en peces es principalmente en hígado, participando en la activación del metabolismo basado en grasas; promoviendo la lipogénesis y la expresión de anorexigénicos, por otra parte la leptina producida en la hipófisis de peces teleosteos como el pez cebra y la medaka japonesa *Oryzias latipes*, podría tener funciones paracrinas que ayudan a mantener la homeostasis en estos peces, donde identificaron dos tipos de leptinas; Lep o LepA y LepB posiblemente debido a un proceso de duplicación (Gorissen *et al.*, 2009; Copeland *et al.*, 2011). En totoaba también se identificó a LepB, con un 49.38% de identidad con la de medaka, identificada en la ruta KEGG:ola:100301595 y relacionada con las vías de interacción citoquina- receptor de citoquina, interacción ligando-receptor neuroactivo y en la vía de señalización de adipocitoquinas. Lo que en totoaba podría atribuirse a una mayor asimilación de AG presentes en la dieta formulada y la aún inmadura capacidad proteolítica al inicio de la etapa tardía, ó al proceso en la maduración de la capacidad osmorreguladora y el aumento en la expresión de citoquinas. Por otra parte ApoB100 se produce en el hígado, generando lipoproteínas de baja densidad (Fisher, E. *et al.*, 2014); en larvas de pez cebra ApoB100 recubre los quilomicrones, que a su vez tiene la capacidad de madurar en lipoproteínas de baja densidad (LDL) aterogénicas de larga duración por el suministro de PUFAs (Schlegel, 2016), principalmente de las familias n-3 y n-6 con potencial pro-inflamatorio a través de los eicosanoides; metabolitos del ácido linoleico (18:2n-6) (Solakivi *et al.*, 2013).

La competencia del ácido linoleico y el ácido alfa linolénico (18:3n-3) por Fads6, se comprobó en trucha arcoíris (Emery *et al.*, 2013), donde la disposición de estos AG en las dietas repercute en la salud de los peces (Lenas *et al.*, 2011). En totoaba se identificó una acumulación de AG 18:2n-6 en músculo y vísceras; mayor al proporcionado en la dieta, mientras que el nivel de ácido araquidónico (20:4n-6) fue menor en comparación con el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), atribuyéndole la baja calidad de los desoves por el aumento en la acumulación de lípidos en reproductores (López *et al.*, 2006). También se observó que totoaba almacena mayor cantidad de lípidos y glucógeno en hígado, en comparación a músculo y el resto del cuerpo (Trejo *et al.*, 2017).

Un estudio epigenético en *Sparus aurata*, reveló que la hipermetilación del promotor Fads2 es independiente a los reproductores, por otra parte, Scd1 respondió a una dieta rica en ácido linolénico, transfiriendo la metilación a la descendencia con una duración de 6 meses, afectando inversamente su expresión hepática y disminuyendo la acumulación de grasas en condiciones dietéticas lipogénicas (Perera *et al.*, 2020). En totoaba se observó una variación en los niveles de Scd1, con 1 TPM en D06_L1 - L2, 31 TPM / D09, 3 TPM / D12 - D16, 5 TPM / D20 y 0.80 TPM / D28. El aumento en D09 coincide con la expresión de los genes involucrados en la invasión de glándulas secretoras, durante el desarrollo larvario; debido al aumento en la demanda de AG en la mielinización del tejido nervioso periférico (Monje, 2018). Por último, Srbp1 y Srbp2 están relacionados con el control alostático sobre la composición lipídica en membranas, regulando la expresión de desaturasas (Hagen *et al.*, 2010). En trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* y corvina amarilla grande *Larimichthys crocea* Srbp1 aumentó la actividad de Fads2, mientras que un aumento en PUFAs disminuyó la expresión de Srbp1; regulando la ruta del metabolismo de lípidos y AG. En tanto que Srbp2, regula la biosíntesis del colesterol con

mayor actividad sobre Fads2 y elongasas (Betancor *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017; Tay *et al.*, 2018).

En nuestro estudio se identificaron las desaturasas Fads2, 6 y elongasas Elovl1, 4, 5, 6 y 7; con selectividad de Elovl1, 6 y 7 por AG saturados y monoinsaturados, mientras que Elovl4 y 5 por PUFAs (Chen *et al.*, 2018; Monroig *et al.*, 2018; Deák *et al.*, 2019). Así mismo, se observaron dos grupos principales: G1 con Fads2 y 6, Elovl1, 4, 5 y 7 con mayor expresión los días D06_L2, D16 y D20, y G2 con Fads2, Elovl4 y 6 con mayor expresión los días D06_L1, D09 y D12. Durante D28 se observó una disminución en la actividad de la biosíntesis de AG, principalmente en Elovl4 y 5, además de una mayor actividad de Fads6 sobre Fads2. La ausencia de Elovl2 y 3 en peces marinos, se relaciona con la baja capacidad y en algunos casos nula, de biosintetizar LC-PUFAs a partir de AG saturados y monoinsaturados de cadenas muy largas, sugiriendo que Elovl4 compensa en parte a Elovl2 (Obloh *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2016; Obloh *et al.*, 2017).

En *Sparus aurata* se observó una expresión transcripcional regulada al alza de Elovl4, 5 y 6 en hígado, mientras que Elovl7 presento niveles de expresión bajos en hígado pero altos en cerebro (Benedito-Palos *et al.*, 2014). En nuestro estudio se observó sobre-expresión de Elovl7 en D16 y D20, coincidiendo con el avanzado desarrollo del tubo neural durante la etapa de post-flexión, su expresión disminuye la concentración de ácido palmitoleico (16:1n-7) y oleico (18:1n-9), aumentando la concentración de ácido linoleico (18:2n-6) (Naganuma *et al.*, 2011; Monroig *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2019). Por otra parte, en *Epinephelus coloides*, se observó que Elovl5 alargó los AG C18(18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6 y 18:4n-3) y C20 (20:4n-6 y C20:5n-3) pero no AG de C22; sumado a una represión de SREBP1, por una alta implementación en niveles de n-3 LC-PUFAs (Li *et al.*, 2016). En *Nibea mitsukurii* otro teleosteo marino, se identificó la acción de Elovl5 y 6 para elongar C18 en C22; con mayor

actividad sobre C18, debido a una mayor actividad de Fads2 sobre $\Delta 6$ desaturasa (Kabeya *et al.*, 2015; Garrido *et al.*, 2019).

En el presente estudio mediante un análisis de ontología génica, se relaciono a Fads2 con funciones moleculares sobre la actividad de linoleoil-CoA desaturasa; involucrada en la producción del ácido linoleico 18:2n-6 (Li *et al.*, 2008; Murzina *et al.*, 2016; Murzina *et al.*, 2019), y sobre estearoil-CoA 9 desaturasa (Scd1), con mayor afinidad al ácido palmitoleico 16:0 y el ácido esteárico 18:0, que catalizan su conversión a ácido palmitoleico 16:7n-7 y ácido oleico 18:1n-9 monoinsaturado; generando AG esenciales para la formación de ésteres de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, lisofosfatidilcolina, y esfingomielina para la formación de membranas plasmáticas; manteniendo su fluidez (Evans *et al.*, 2008; Rimoldi *et al.*, 2016). Donde la mayor expresión de Fads2, 6 y Scd1 se relacionaron con la expresión de Aqp3, Mucina 13 y 19; involucrados en el control de la homeostasis intestinal, debido a la participación de los AG en la formación de membranas y niveles en la producción de mucosa, así como en su composición bioquímica (Torrecillas *et al.*, 2015; Parolini, 2019). Sin embargo, la expresión de Elovl4, Elovl5, Fads2 y Fads6 en D28 fue mínima en comparación con los otros días, lo que podría explicar la baja conversión de AG PUFAs y su acumulación en tejido graso como el hepático.

4.4 Respuesta inmune en intestino durante la deshabitación.

Los bajos niveles de Ppbi funcionan como indicador del estado de la microbiota (Egerton *et al.*, 2018; Lallès, 2019), debido a que su disminución produce un aumento de LPS, que activan la expresión de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (Myd88); encargada de activar el movimiento de neutrófilos intestinales y reclutada por los receptores tipo Toll (Tlr) (Mhatre *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2017). En totoaba se identificaron receptores tipo Toll (Tlr1, Tlr2, Tlr3, Tlr5, Tlr7 y Tlr13); estos se relacionan con la expresión

de IL6, IL8, IL22 durante procesos inflamatorios en teleósteos (Wang *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2020), siendo Tlr5 el receptor con mayor actividad durante D28 con 285 TPM, este gen se asocia a la respuesta a infecciones bacterianas, como: *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* contribuyendo en la respuesta hepática y renal durante procesos de infección e inflamación; el aumento en la expresión de Tlr1, Tlr2 y Tlr7 también se asocia a infección por vibrios, junto a la presencia de leucocitos intraepiteliales, junto a un aumentando en la biosíntesis de PUFAs (Wang *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2017; Reyes-Becerril *et al.*, 2017; Huo *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019).

En totoaba se identificó una expresión elevada de IL10 en D28, efectuando funciones antiinflamatorias y disminuyendo la expresión de IL8 (Seppola *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2016), IL22 es otra citocina de la familia IL10 producida por células del sistema inmune y células epiteliales; IL22 genera quimiocinas, factores inflamatorios y péptidos antimicrobianos para proteger la mucosa intestinal y branquias (Corripio-Miyar *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). Por último, el aumento en la expresión de C1ql3 entre D20 y D28, se puede relacionar con el aumento de mucinas, como Muc2 por su acción protectora del epitelio. Debido a que C1ql3 participa como receptor de LPS, peptidoglicanos y vibrios; ejerciendo acción antimicrobiana (Wang *et al.*, 2017; Vestrum *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2019), vinculando la acción de C1ql3 y Muc2 con la actividad de las células dendríticas, sobre la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria en intestino (Galindo-Villegas *et al.*, 2016; Salinas *et al.*, 2017; Melo-Gonzalez *et al.*, 2018).

5. Conclusiones.

Se generó un transcriptoma de novo de *Totoaba macdonaldi*, a partir de larvas con 6, 9, 12, 16, 20 y 28 días pos-eclosión, sometidas a un proceso de deshabitación al alimento vivo, contabilizando 139,981 ORFs que codificaban para 66,008 proteínas. Además, se identificó

la mayor expresión de genes relacionados con la proliferación celular de glándulas secretoras entre D6 y D12, mientras que los genes asociados a la diferenciación y funcionalidad se observaron entre D16 y D28; durante la transición de digestión alcalina a ácida, además de un aumento en la vacuolización hepática en D28, que coincide con la disminución en la expresión de genes relacionados en la biosíntesis de AG LC-PUFA y la deshabitación total.

Por el contrario, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en respuestas proinflamatorias y antimicrobianas, así como presencia de neutrofilos en intestino posterior a partir de D20 durante la pre-deshabitación. Relacionándose con la mayor actividad en la biosíntesis de AG saturados, monoinsaturados y colesterol; sumado a un aumento en la expresión de mucinas de gel de secreción en estómago, intestino y branquias.

Con base en lo anterior, se identificaron como marcadores nutricionales del desarrollo digestivo, genes relacionados con la digestión ácida, como: PepA, PepC, Try1, Try6. Además de genes como Ppbi y Muc2 por su trabajo en la homeostasis y protección del epitelio intestinal; junto a Myd88, IL8 y C1ql3.

Por último y como recomendación, debido a que el exceso de lípidos en dieta se relacionó con la disminución de Ppbi, posiblemente influyendo de forma negativa sobre su estado de salud, se propone evaluar la capacidad enzimática sobre la asimilación proteica y lipídica entre *Artemia* y alimento formulado en larvas de totoaba, durante el proceso de deshabitación. Además, la inhibición de Ppbi, también podría asociarse a factores de inhibición en el alimento formulado; asociando ambas cuestiones con la acumulación de lípidos en hígado y tejido adiposos. Sin embargo, la relación entre estos cambios transcripcionales también puede ser ocasionado por el desarrollo de membranas y las respuestas del sistema inmune observadas durante la deshabitación, debido a la menor

expresión de genes involucrados en la biosíntesis de LC-PUFAs, y el aumento de PUFAs. Conocer la relación entre estas dos acciones, ayudaría a entender si son procesos normales durante la deshabitación, o son efectos de una deshabitación anticipada al redireccionar la biosíntesis de AG; perjudicando el desarrollo de membranas celulares de las larvas.

6. Bibliografía

- Andrade, C. A. P., Nascimento, F., Conceição, L. E. C., Linares, F., Lacuisse, M., Dinis, M. T. (2012). Red Porgy, *Pagrus pagrus*, Larvae Performance and Nutritional Condition in Response to Different Weaning Regimes. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(3), 321–334. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00574.x>
- Bastidas-Ponce, A., Roscioni, S. S., Burtscher, I., Bader, E., Sterr, M., Bakhti, M., Lickert, H. (2017). Foxa2 and Pdx1 cooperatively regulate postnatal maturation of pancreatic β -cells. *Molecular Metabolism*, 6(6), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.007>.
- Benedito-Palos, L., Ballester-Lozano, G., Pérez-Sánchez, J. (2014). Wide-gene expression analysis of lipid-relevant genes in nutritionally challenged gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gene*, 547(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.073>
- Betancor, M. B., McStay, E., Minghetti, M., Migaud, H., Tocher, D. R., Davie, A. (2014). Daily rhythms in expression of genes of hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106739>
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) “Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data,” *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T. H., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R., Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., Whited, J. L. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of

Limb Regeneration Factors. Cell Reports, 18(3), 762–776.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>

Cai, L., Li, J., Yu, L., Wei, Y., Miao, Z., Chen, M., Huang, R. (2018). De novo transcriptome assembly of the new marine fish model of goby, *Mugilogobius chulae*. Marine Genomics, 40(February), 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.02.001>

Campoverde, C., Rodriguez, C., Perez, J., Gisbert, E., Estévez, A. (2017). Early weaning in meagre *Argyrosomus regius*: Effects on growth, survival, digestion and skeletal deformities. Aquaculture Research, 48(10), 5289–5299.
<https://doi.org/10.1111/are.13342>

Carmona-Antoñanzas, G., Tocher, D. R., Taggart, J. B., Leaver, M. J. (2013). An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: Comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon. BMC Evolutionary Biology, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-85>

Castro, L. F. C., Tocher, D. R., Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. Progress in Lipid Research, 62, 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001>

Chen, H., Zhang, L., Ke, L., Chen, X., Lin, C. (2020). CpG-ODN 2007 protects zebrafish (*Danio rerio*) against *Vibrio vulnificus* infection. Aquaculture Research, August, 1–9.
<https://doi.org/10.1111/are.14944>

Chen, J., Cui, Y., Yan, J., Jiang, J., Cao, X., Gao, J. (2018). Molecular characterization of elongase of very long-chain fatty acids 6 (elovl6) genes in *Misgurnus anguillicaudatus*

and their potential roles in adaptation to cold temperature. *Gene*, 666(2017), 134–144.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.05.019>

Chu, Q., Sun, Y., Cui, J., Xu, T. (2017). Inducible microRNA-214 contributes to the suppression of NF- κ B-mediated inflammatory response via targeting myd88 gene in fish. *Journal of Biological Chemistry*, 292(13), 5282–5290.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.777078>

Copeland, D. L., Duff, R. J., Liu, Q., Prokop, J., Londraville, R. L. (2011). Leptin in teleost fishes: An argument for comparative study. *Frontiers in Physiology*, JUN(June), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00026>

Córdova-Montejo, M., Álvarez-González, C. A., López, L. M., True, C. D., Frías-Quintana, C. A., Galaviz, M. A. (2019). Changes of digestive enzymes in totoaba (*Totoaba macdonaldi* Gilbert, 1890) during early ontogeny. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1), 102–113. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue1-fulltext-11>

Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3(1), 1–2. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>

Corripio-Miyar, Y., Zou, J., Richmond, H., Secombes, C. J. (2009). Identification of interleukin-22 in gadoids and examination of its expression level in vaccinated fish. *Molecular Immunology*, 46(10), 2098–2106. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.024>

Cui, K., Cheng, D., Ma, Z., Qin, J. G., Jiang, S., Sun, D., Ma, S. (2017). Ontogenetic development of digestive enzymes in larval and juvenile crimson snapper *Lutjanus erythropterus* (Bloch 1790). *Aquaculture Research*, 48(8), 4533–4544.
<https://doi.org/10.1111/are.13278>

- Cutler, C. P., Martinez, A. S., & Cramb, G. (2007). The role of aquaporin 3 in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(1 SPEC. ISS.), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.022>
- Deák, F., Anderson, R. E., Fessler, J. L., Sherry, D. M. (2019). Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(September). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00428>
- Dikena, G., Demirb, O., Nazc, M. (2018). The inhibitory effects of different diets on the protease activities of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) larvae as a potential candidate species. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 94–99. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1263200>
- Dong, X., Tan, P., Cai, Z., Xu, H., Li, J., Ren, W., Xu, H., Zuo, R., Zhou, J., Mai, K., Ai, Q. (2017). Regulation of FADS2 transcription by SREBP-1 and PPAR- α influences LC-PUFA biosynthesis in fish. *Scientific Reports*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep40024>
- Du, X., Wang, G. hua, Yue, B., Wang, J. jing, Gu, Q. qin, Zhou, S., Zhang, M., Hu, Y. hua. (2019). A novel C1q domain containing protein in black rockfish (*Sebastes schlegelii*) serves as a pattern recognition receptor with immunoregulatory properties and possesses binding activity to heat-aggregated IgG. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(December 2018), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.004>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>

- El-Dahhar, A. A., Abdel Rahim, M. M., Shawky, W. (2018). Effect of Early Weaning on Survival and Growth of European Sea Bass, *Dicentrarchus Labrax* Larvae Using an Equal Mixture of Sea and Well Water. *Journal of The Arabian Aquaculture Society* , June, 71–80. <https://doi.org/10.12816/0042805>
- Ellis, L. V., Bollinger, R. J., Weber, H. M., Madsen, S. S., Tipsmark, C. K. (2019). Differential Expression and Localization of Branchial AQP1 and AQP3 in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Cells*. May 8;8(5):422. doi: 10.3390/cells8050422.
- V. L., Ellis, L. V, Bollinger, R. J., Weber, H. M., Madsen, S., Tipsmark, C. K. (2019). Diferential Expression and Localization of Branchial AQP1 and AQP3 in Japanese Medaka. *Cells*. 1–23. doi:10.3390/cells8050422
- Emery, J. A., Hermon, K., Hamid, N. K. A., Donald, J. A., Turchini, G. M. (2013). Δ -6 Desaturase Substrate Competition: Dietary Linoleic Acid (18:2n-6) Has Only Trivial Effects on α -Linolenic Acid (18:3n-3) Bioconversion in the Teleost Rainbow Trout. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057463>
- Eryalcin, K. M. (2018). Effects of Different Commercial Feeds and Enrichments on Biochemical Composition and Fatty Acid Profile of Rotifer (*Brachionus Plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia Franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, pp. 81–90. doi: 10.4194/1303-2712-v18.
- Eryalçin, K. M., Torrecillas, S., Caballero, M. J., Hernandez-Cruz, C. M., Sweetman, J., Izquierdo, M. (2017). Effects of dietary mannan oligosaccharides in early weaning diets on growth, survival, fatty acid composition and gut morphology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae. *Aquaculture Research*, 48(9), 5041–5052. <https://doi.org/10.1111/are.13321>

- Evans, H., De Tomaso, T., Quail, M., Rogers, J., Gracey, A. Y., Cossins, A. R., Berenbrink, M. (2008). Ancient and modern duplication events and the evolution of stearoyl-CoA desaturases in teleost fishes. *Physiological Genomics*, 35(1), 18–29. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90266.2008>
- Fan, H., Wang, L., Wen, H., Wang, K., Qi, X., Li, J., He, F., Li, Y. (2019). Genome-wide identification and characterization of toll-like receptor genes in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and their involvement in the host immune response to *Vibrio harveyi* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 92(July), 782–791. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.010>
- Fenech, M., El-Sohemy, A., Cahill, L., Ferguson, L. R., French, T. A. C., Tai, E. S., Milner, J., Koh, W. P., Xie, L., Zucker, M., Buckley, M., Cosgrove, L., Lockett, T., Fung, K. Y. C., Head, R. (2011). Nutrigenetics and nutrigenomics: Viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 4(2), 69–89. <https://doi.org/10.1159/000327772>
- Feng, S., Li, W., Lin, H. (2008). Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.09.017>
- Finn, R. N., Cerdà, J. (2011). Aquaporin evolution in fishes. *Frontiers in Physiology*, JUL(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00044>
- Fisher, E., Lake, E., McLeod, R. S. (2014). Apolipoprotein B100 quality control and the regulation of hepatic very low density lipoprotein secretion. *Journal of Biomedical Research*, 28(3), 178–193. <https://doi.org/10.7555/JBR.28.20140019>

- Galaviz, M. A., Lopez, L. M., Garcia, A., Gisbert, E., Alvarez, A., Sandoval, G., True, C. D. (2013). Avances en el Estudio de la Nutrición Larvaria , Expresión y Actividad de Enzimas Digestivas en Totoaba (*Totoaba macdonaldi* , Gilbert 1890) una Especie con Potencial de maricultivo en Baja California. February 2018, 237–260.
- Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M., Gasca, A. G. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.001>
- Galaviz, M. A., López, L. M., García Gasca, A., Álvarez González, C. A., True, C. D., Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1117–1130. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0073-6>
- Galindo-Villegas, J., Garcia-Garcia, E., Mulero, V. (2016). Role of histamine in the regulation of intestinal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.013>
- Gao, N., LeLay, J., Vatamaniuk, M. Z., Rieck, S., Friedman, J. R., Kaestner, K. H. (2008). Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes and Development*, 22(24), 3435–3448. <https://doi.org/10.1101/gad.1752608>
- Garrido, D., Kabeya, N., Betancor, M. B., Pérez, J. A., Acosta, N. G., Tocher, D. R., Rodríguez, C., Monroig, Ó. (2019). Functional diversification of teleost Fads2 fatty acyl

desaturases occurs independently of the trophic level. *Scientific Reports*, 9(1), 11199.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47709-0>

Gawlicka, A., Herold, M. A., Barrows, F. T., De la Noüe, J., Hung, S. S. O. (2002). Effects of dietary lipids on growth, fatty acid composition, intestinal absorption and hepatic storage in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* R.) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4–6), 673–681. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00371.x>

Geay, F., Zambonino-Infante, J., Reinhardt, R., Kuhl, H., Santigosa, E., Cahu, C., Mazurais, D. (2012). Characteristics of *fads2* gene expression and putative promoter in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Comparison with salmonid species and analysis of CpG methylation. In *Marine Genomics* (Vol. 5, pp. 7–13).
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2011.08.003>

Giffard-Mena I, Lorin-Nebel C, Charmantier G, Castille R, Boulo V. Adaptation of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) to fresh water: role of aquaporins and Na⁺/K⁺-ATPases. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008 Jul;150(3):332-8. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.04.004. Epub 2008 Apr 10. PMID: 18485772.

Giffard-Mena, I., Hernández-Montiel, Á. H., Pérez-Robles, J., David-True, C. (2020). Effects of salinity on survival and plasma osmolarity of *Totoaba macdonaldi* eggs, larvae, and juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 526.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2020.151339>

Goda, A. M., Omar, E. A., Srour, T. M., Kotiet, A. M., El-Haroun, E., Davies, S. J. (2018). Effect of diets supplemented with feed additives on growth, feed utilization, survival, body composition and intestinal bacterial load of early weaning European seabass,

Dicentrarchus labrax post-larvae. *Aquaculture International*, 26(1), 169–183.
<https://doi.org/10.1007/s10499-017-0200-8>

Godl, K., Johansson, M. E. V, Lidell, M. E., Mo, M., Karlsson, H., Olson, F. J., Gum, J. R., Kim, Y. S., Hansson, G. C. (2002). The N Terminus of the MUC2 Mucin Forms Trimers That Are Held Together within a Trypsin-resistant Core Fragment *. 277(49), 47248–47256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208483200>

Gonçalves, O., Freitas, R., Ferreira, P., Araújo, M., Zhang, G. J., Mazan, S., Cohn, M. J., Castro, L. F. C., Wilson, J. M. (2019). Molecular ontogeny of the stomach in the catshark *Scyliorhinus canicula*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36413-0>

Gorissen, M., Bernier, N. J., Nabuurs, S. B., Flik, G., Huising, M. O. (2009). Two different leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *Journal of Endocrinology*, 201(3), 329–339. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0034>

Graham, A., Okabe, M., Quinlan, R. (2005). The role of the endoderm in the development and evolution of the pharyngeal arches. *Journal of Anatomy*, 207(5), 479–487.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00472.x>

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. In *Nature protocols* (Vol. 8, Issue 8).
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>

- Hagen, R. M., Rodriguez-Cuenca, S., & Vidal-Puig, A. (2010). An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS Letters*, 584(12), 2689–2698. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.004>
- Hale, L. A., Tallafuss, A., Yan, Y. L., Dudley, L., Eisen, J. S., Postlethwait, J. H. (2006). Characterization of the retinoic acid receptor genes *raraa*, *rarab* and *rarg* during zebrafish development. *Gene Expression Patterns*, 6(5), 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.10.007>
- Holst, S., Wilding, J., Koprowska, K., Rombouts, Y., Wuhrer, M. (2019). N-Glycomic and Transcriptomic Changes Associated with CDX1 mRNA Expression in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells*, 8(3), 273. <https://doi.org/10.3390/cells8030273>
- Hu, J., Yang, R., Chen, X., Yang, Q., Ma, Z., Yu, G. (2017). Early weaning of yellowtail amberjack *Seriola lalandi dorsalis* (Gill 1863) larvae. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(5), 187–190. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017j7-62>
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K. D., Irizarry, R. A., Lawrence, M., Love, M. I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleš, A. K., Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 12(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Huo, R., Zhao, X., Han, J., Xu, T. (2018). Genomic organization, evolution and functional characterization of soluble toll-like receptor 5 (TLR5S) in miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.048>

- Jiménez-Martínez, L. D., Álvarez-González, C. A., De la Cruz-Hernández, E., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M. A., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R., Concha-Frías, B., Peña, E. (2018). Partial sequence characterization and ontogenetic expression of genes involved in lipid metabolism in the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Aquaculture Research*, November. <https://doi.org/10.1111/are.13879>
- Jonz, M. G., & Nurse, C. A. (2008). New developments on gill innervation: Insights from a model vertebrate. *Journal of Experimental Biology*, 211(15), 2371–2378. <https://doi.org/10.1242/jeb.010587>
- Kabeya, N., Yamamoto, Y., Cummins, S. F., Elizur, A., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Haga, Y., Satoh, S., Yoshizaki, G. (2015). Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*: Functional characterization of Fads2 desaturase and Elovl5 and Elovl4 elongases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 188, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.06.005>
- Kohbara, J., & Caprio, J. (2001). Taste responses of the facial and glossopharyngeal nerves to amino acids in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 58(4), 1062–1072. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1513>
- Kurokawa, T., T. Suzuki., T. Andoh. (2000). Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 8-16.
- Laczynska, B., Siddique, M. A. M., Ziomek, E., Shelton, W. L., Fopp-Bayat, D. (2020). Early Weaning Effects on Survival, Growth, and Histopathology of Larval Sterlet *Acipenser*

ruthenus. North American Journal of Aquaculture, 82(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1002/naaq.10141>

Lallès, J. P. (2014). Intestinal alkaline phosphatase: Novel functions and protective effects. Nutrition Reviews, 72(2), 82–94. <https://doi.org/10.1111/nure.12082>

Lallès, J. P. (2019). Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review. Fish and Shellfish Immunology, 89(March), 179–186.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.053>

Lallès, J. P. (2020). Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. Reviews in Aquaculture, 12(2), 555–581. <https://doi.org/10.1111/raq.12340>

Lenas, D., Chatziantoniou, S., Nathanailides, C., Triantafillou, D. (2011). Comparison of wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) lipid quality. Procedia Food Science, 1, 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.170>

Li, S., Yuan, Y., Wang, T., Xu, W., Li, M., Mai, K., Ai, Q. (2016). Molecular cloning, functional characterization and nutritional regulation of the putative elongase elovl5 in the orange-spotted grouper (*epinephelus coioides*). PLoS ONE, 11(3), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150544>

Li, Y. you, Hu, C. bo, Zheng, Y. jun, Xia, X. an, Xu, W. ju, Wang, S. qi, Chen, W. zhou, Sun, Z. wei, Huang, J. hui. (2008). The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, 151(2), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.013>

- Liao, S., Gan, L., Lv, L., Mei, Z. (2020). The regulatory roles of aquaporins in the digestive system. *Genes and Diseases*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.12.011>
- Linville, A., Radtke, K., Waxman, J. S., Yelon, D., Schilling, T. F. (2009). Combinatorial roles for zebrafish retinoic acid receptors in the hindbrain, limbs and pharyngeal arches. *Developmental Biology*, 325(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.022>
- Lim, S., Bhinge, A., Bragado Alonso, S., Aksoy, I., Aprea, J., Cheok, C. F., Calegari, F., Stanton, L. W., Kaldis, P. (2017). Cyclin-Dependent Kinase-Dependent Phosphorylation of Sox2 at Serine 39 Regulates Neurogenesis. *Molecular and cellular biology*, 37(16), e00201-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00201-17>
- Liu, Y., Chen, W., Li, Y., Li, J., Li, X. (2020). Growth and ontogenetic development of digestive functionality in black Amur bream (*Megalobrama terminalis*). *Aquaculture Research*, 51(9), 3593–3601. <https://doi.org/10.1111/are.14697>
- López-López, V. V., Rodríguez-Montes de Oca, G. A., Galavíz, M. A., Román-Reyes, C., Medina-Hernández, E. A., Dabrowski, K., Haws, M. C. (2015). Descripción histológica comparativa del desarrollo del sistema digestivo y visual de larvas de chame *Dormitator latifrons* (Pisces : Eleotridae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(3), 484–494. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-10>
- López. L. M., Durazo, E. A. Rodríguez-Gómez., C. D. True., M. T. Viana. (2006). Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas*, 32, pp. 303–309.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Martin, S. A. M., Dehler, C. E., Król, E. (2016). Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 103–117. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2016.03.014>
- Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P., Baron-Sevilla, B. (2015). Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.037>
- Melo-Gonzalez, F., Fenton, T. M., Forss, C., Smedley, C., Goenka, A., MacDonald, A. S., Thornton, D. J., Travis, M. A. (2018). Intestinal mucin activates human dendritic cells and IL-8 production in a glycan-specific manner. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8543–8553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789305>
- Mhatre V. Ho and Kelsey C. Martin, J.-A. L. (2012). Intestinal Alkaline Phosphatase Detoxifies Lipopolysaccharide and Prevents Inflammation in Response to the Gut Microbiota. *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.chom.2007.10.010.Intestinal.
- Mittermayer, F. H., Stiasny, M. H., Clemmesen, C., Bayer, T., Puvanendran, V., Chierici, M., Jentoft, S., Reusch, T. B. H. (2019). Transcriptome profiling reveals exposure to predicted end-of-century ocean acidification as a stealth stressor for Atlantic cod larvae. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52628-1>
- Moguel-Hernández, I., Peña, R., Nolasco-Soria, H., Dumas, S., Zavala-Leal, I. (2014). Development of digestive enzyme activity in spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 839–848. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9890-7>
- Monje, M. (2018). Myelin plasticity and nervous system function. *Annual Review of Neuroscience*, 41, 61–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061853>

- Monroig, Ó., Kabeya, N. (2018). Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fisheries Science*, 84(6), 911–928. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1254-x>
- Monroig, Ó., Navarro, J. C., Tocher, D. R. (2011). Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Fish : Recent Advances on Desaturases and Elongases Involved in Their Biosynthesis. *Avances En Nutrición Acuícola XI – Memorias Del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 257–283.
- Murzina, S. A., Nefedova, Z. A., Pekkoeva, S. N., Veselov, A. E., Efremov, D. A., Nemova, N. N. (2016). Age-specific lipid and fatty acid profiles of Atlantic salmon juveniles in the Varzuga River. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071050>
- Murzina, S. A., Nefedova, Z. A., Pekkoeva, S. N., Veselov, A. E., Efremov, D. A., Ruokolainen, T. R., Nemova, N. N. (2019). Dynamics of Lipid and Fatty Acid Content at Early Ontogenesis Stages in Pink Salmon *Oncorhynchus gorbusha* (Walbaum, 1792) in a Natural Environment (Indera River, Kola Peninsula). *Russian Journal of Developmental Biology*, 50(4), 180–188. <https://doi.org/10.1134/s1062360419040052>
- Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., Kihara, A. (2011). Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Letters*, 585(20), 3337–3341. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.024>
- Natsidis, P., Tsakogiannis, A., Pavlidis, P., Tsigenopoulos, C. S., & Manousaki, T. (2019). Phylogenomics investigation of sparids (Teleostei: Spariformes) using high-quality proteomes highlights the importance of taxon sampling. *Communications Biology*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0654-5>

- Nguyen, T. M., Mandiki, S. N. M., Salomon, J. M. A. J., Baruti, J. B., Thi, N. T. T., Nguyen, T. H., Nhu, T. Q., Kestemont, P. (2021). Pro- and anti-inflammatory responses of common carp *Cyprinus carpio* head kidney leukocytes to *E.coli* LPS as modified by different dietary plant oils. *Developmental and Comparative Immunology*, 114(August 2020), 103828. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103828>
- Nieves-Rodríguez, K., Álvarez-González, C., Peña-Marín, E., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Tovar-Ramírez, D., Guzmán-Villanueva, L., Andree, K., Gisbert, E. (2018). Effect of β -Glucans in Diets on Growth, Survival, Digestive Enzyme Activity, and Immune System and Intestinal Barrier Gene Expression for Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Juveniles. *Fishes*, 3(3), 27. <https://doi.org/10.3390/fishes3030027>
- Nolasco-Soria, H., Nolasco-Alzaga, H. R., Gisbert, E. (2020). The importance of pepsin-like acid protease quantification in aquaculture studies: a revision of available procedures and presentation of a new protocol for its assessment. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1928–1943. <https://doi.org/10.1111/raq.12417>
- Oboh, A., Betancor, M. B., Tocher, D. R., Monroig, O. (2016). Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the African catfish *Clarias gariepinus*: Molecular cloning and functional characterisation of fatty acyl desaturase (*fads2*) and elongase (*elovl2*) cDNAs. *Aquaculture*, 462, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.018>
- Oboh, A., Navarro, J. C., Tocher, D. R., Monroig, O. (2017). Elongation of very Long-Chain (>C24) Fatty Acids in *Clarias gariepinus*: Cloning, Functional Characterization and Tissue Expression of *elovl4* Elongases. *Lipids*, 52(10), 837–848. <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4289-3>

- Pachajoa, H., Moreno, F. (2015). Células de la cresta neural: Evolución, bases embrionarias y desarrollo cráneo-facial. Revisión sistemática de la literatura. Neural crest cells: Evolution, embryonic bases and craniofacial development. Systematic literature review. *Rev. Estomatol*, 23(2), 45–56.
- Pan, C. Y., Liu, Y. H., Gong, H. Y., Chen, J. Y. (2017). Transcriptome analysis of the effect of polyunsaturated fatty acids against *Vibrio vulnificus* infection in *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 62, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.018>
- Park, J. Y., Hong, S. M., Klimstra, D. S., Goggins, M. G., Maitra, A., Hruban, R. H. (2011). Pdx1 expression in pancreatic precursor lesions and neoplasms. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 19(5), 444–449. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318206d958>
- Parolini, C. (2019). Effects of fish n-3 PUFAs on intestinal microbiota and immune system. *Marine Drugs*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060374>
- Peng, Y., Cai, X., Zhang, G., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Wang, B., Xiong, X., Wu, Z., Jian, J. (2017). Molecular characterization and expression of interleukin-10 and interleukin-22 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. *Fish and Shellfish Immunology*, 65, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.019>
- Perera, E., Turkmen, S., Simó-Mirabet, P., Zamorano, M. J., Xu, H., Naya-Català, F., Izquierdo, M., Pérez-Sánchez, J. (2020). Stearoyl-CoA desaturase (*scd1a*) is epigenetically regulated by broodstock nutrition in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Epigenetics*, 15(5), 536–553. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1699982>

- Pérez-Sánchez, J., Estensoro, I., Redondo, M. J., Caldach-Giner, J. A., Kaushik, S., Sitjà-Bobadilla, A. (2013). Mucins as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in a Fish-Parasite Model: Transcriptional and Functional Analysis. *PLoS ONE*, 8(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065457>
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Zhong, G. (2014). RNA-seq technology and its application in fish transcriptomics. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 98–110. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0110>
- Rader, B. A. (2017). Alkaline phosphatase, an unconventional immune protein. *Frontiers in Immunology*, 8(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00897>
- Reyes-Becerril, M., Guluarte, C., Ceballos-Francisco, D., Angulo, C., Esteban, M. Á. (2017). Enhancing gilthead seabream immune status and protection against bacterial challenge by means of antigens derived from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 60, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.053>
- Riddle, M. R., Aspiras, A. C., Gaudenz, K., Peuß, R., Sung, J. Y., Martineau, B., Peavey, M., Box, A. C., Tabin, J. A., McGaugh, S., Borowsky, R., Tabin, C. J., & Rohner, N. (2018). Insulin resistance in cavefish as an adaptation to a nutrient-limited environment. *Nature*, 555(7698), 647–651. <https://doi.org/10.1038/nature26136>
- Rimoldi, S., Benedito-Palos, L., Terova, G., Pérez-Sánchez, J. (2016). Wide-targeted gene expression infers tissue-specific molecular signatures of lipid metabolism in fed and fasted fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 26(1), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s11160-015-9408-8>

- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Ruhr, I. M., Wood, C. M., Schauer, K. L., Wang, Y., Mager, E. M., Stanton, B., Grosell, M. (2020). Is aquaporin-3 involved in water-permeability changes in the killifish during hypoxia and normoxic recovery, in freshwater or seawater? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(7), 511–525. <https://doi.org/10.1002/jez.2393>
- Salem, A. M., Hebalah, S. M., Ibrahim, H. A. H., Ringø, E. (2018). Effect of weaning time on growth, body composition, fatty acids and digestive enzyme activities of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 22(5), 219–230. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2018.19521>
- Salinas, I., Magadán, S. (2017). Omics in fish mucosal immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 75, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.010>
- Satriyo, T. B., Galaviz, M. A., Salze, G., López, L. M. (2017). Assessment of dietary taurine essentiality on the physiological state of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture Research*, 48(11), 5677–5689. <https://doi.org/10.1111/are.13391>
- Schneider, H., Pelaseyed, T., Svensson, F., Johansson, M. E. V. (2018). Study of mucin turnover in the small intestine by in vivo labeling. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24148-x>

- Schroeder, B. O. (2019). Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report*, 7(1), 3–12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>
- Seppola, M., Larsen, A. N., Steiro, K., Robertsen, B., Jensen, I. (2008). Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Immunology*, 45(4), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.003>
- Shen, Y., He, Y., Bi, Y., Chen, J., Zhao, Z., Li, J., Chen, X. (2019). Transcriptome analysis of gill from *Lateolabrax maculatus* and *aqp3* gene expression. *Aquaculture and Fisheries*, 4(6), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.03.004>
- Shi, H., Wang, L., Luo, J., Liu, J., Loo, J. J., Liu, H. (2019). Fatty acid elongase 7 (*Elovl7*) plays a role in the synthesis of long-chain unsaturated fatty acids in goat mammary epithelial cells. *Animals*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ani9060389>
- Solakivi, T., Kunnas, T., Jaakkola, O., Renko, J., Lehtimäki, T., Nikkari, S. T. (2013). Delta-6-desaturase gene polymorphism is associated with lipoprotein oxidation in vitro. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-80>
- Solovyev, M. M., Campoverde, C., Öztürk, S., Moreira, C., Diaz, M., Moyano, F. J., Estévez, A., Gisbert, E. (2016). Morphological and functional description of the development of the digestive system in meagre (*Argyrosomus regius*): An integrative approach. *Aquaculture*, 464, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.008>

- Stahl, F., Hitzmann, B., Mutz, K., Landgrebe, D., Lübbecke, M., Kasper, C., Walter, J., & Scheper, T. (2012). Transcriptome analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 127, 1–25. https://doi.org/10.1007/10_2011_102
- Stejskal, V., Matousek, J., Prokesova, M., Podhorec, P., Sebesta, R., Drozd, B. (2018). Combined effect of weaning time and co-feeding duration on growth and survival of peled *Coregonus peled* (Gmelin) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 434–441. <https://doi.org/10.1111/anu.12575>
- Sudiwala, S., Knox, S. M. (2019). The emerging role of cranial nerves in shaping craniofacial development. *Genesis*, 57(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/dvg.23282>
- Sundin, L., Nilsson, S. (2002). Branchial innervation. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 232–248. <https://doi.org/10.1002/jez.10130>
- Suzer, C., Kamacı, H. O., Çoban, D., Yıldırım, Ş., Fırat, K., Saka, Ş. (2013). Functional changes in digestive enzyme activities of meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) during early ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(4), 967–977. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9755-5>
- Szklarczyk, D., Annika L Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, Pages D607–D613, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Takei, Y., Wong, M. K. S., Pipil, S., Ozaki, H., Suzuki, Y., Iwasaki, W., Kusakabe, M. (2017). Molecular mechanisms underlying active desalination and low water permeability in the

esophagus of eels acclimated to seawater. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 312(2), R231–R244.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00465.2016>

Tay, S. S., Kuah, M. K., Shu-Chien, A. C. (2018). Transcriptional activation of zebrafish *fads2* promoter and its transient transgene expression in yolk syncytial layer of zebrafish embryos. *Scientific Reports*, 8(1), 2–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22157-4>

Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D. (2019). Changes in digestive enzyme activities during early ontogeny of *Seriola rivoliana*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(2), 733–742. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0598-6>

Torrecillas, S., Montero, D., Caballero, M. J., Pittman, K., Campo, A., Custodio, M., Sweetman, J., Izquierdo, M. S. (2015). Dietary mannan oligosaccharides: Counteracting the side effects of soybean oil inclusion on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gut health? *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00397>

Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M. A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C. A., López, L. M. (2017). Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, 48(8), 4038–4057. <https://doi.org/10.1111/are.13225>

True, C. D. (2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis, 121.

Ueberschär, B., Navarro-Guillén, C., Gomes, A., Rønnestad, I., Rojas-Garcia, C., Hanke, I., Sommerfeld, D., Tillner, R. (2018). Variability in digestive enzyme capacity in early stages of marine fish larvae: Ontogenetic variations, biorhythms, hormonal control and

nutrient sensing mechanisms. In *Emerging Issues in Fish Larvae Research*.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-73244-2_4

Vestrum, R. I., Attramadal, K. J. K., Winge, P., Li, K., Olsen, Y., Bones, A. M., Vadstein, O., Bakke, I. (2018). Rearing water treatment induces microbial selection influencing the microbiota and pathogen associated transcripts of Cod (*Gadus morhua*) Larvae. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00851>

Wang, L., Fan, C., Xu, W., Zhang, Y., Dong, Z., Xiang, J., Chen, S. (2017). Characterization and functional analysis of a novel C1q-domain-containing protein in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 67, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.001>

Wang, Y. Da, Peng, K. C., Wu, J. L., Chen, J. Y. (2014). Transgenic expression of salmon delta-5 and delta-6 desaturase in zebrafish muscle inhibits the growth of *Vibrio alginolyticus* and affects fish immunomodulatory activity. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.021>

Wang, Y. Da, Wang, Y. H., Hui, C. F., Chen, J. Y. (2016). Transcriptome analysis of the effect of *Vibrio alginolyticus* infection on the innate immunity-related TLR5-mediated induction of cytokines in *Epinephelus lanceolatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 52, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.013>

Williams, M. B., Watts, S. A. (2019). Current basis and future directions of zebrafish nutrigenomics. *Genes and Nutrition*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0658-2>

- Yang, Y., Wang, J., Xu, J., Liu, Q., Wang, Z., Zhu, X., Ai, X., Gao, Q., Chen, X., Zou, J. (2020). Characterization of IL-22 Bioactivity and IL-22-Positive Cells in Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586889>
- Yúfera, M., Darias, M. J. (2007). The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268(1-4 SPEC. ISS.), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.050>
- Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 130(4), 477–487. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00274-5](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00274-5)
- Zhang, Y. L., Wu, Q. W., Hu, W. H., Wang, F., Zhao, Z. B., He, H., Shao, W. H., Fan, Q. X. (2015). Changes in digestive enzyme activities during larval development of Chinese loach *Paramisgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(6), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0109-y>
- Zhao, L., He, K., Luo, J., Sun, J., Liao, L., Tang, X., Liu, Q., Yang, S. (2020). Co-modulation of Liver Genes and Intestinal Microbiome of Largemouth Bass Larvae (*Micropterus salmoides*) During Weaning. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01332>
- Zou, J., Secombes, C. (2016). The Function of Fish Cytokines. *Biology*, 5(2), 23. [doi:10.3390/biology5020023](https://doi.org/10.3390/biology5020023)

Figuras

Histología larvas D16

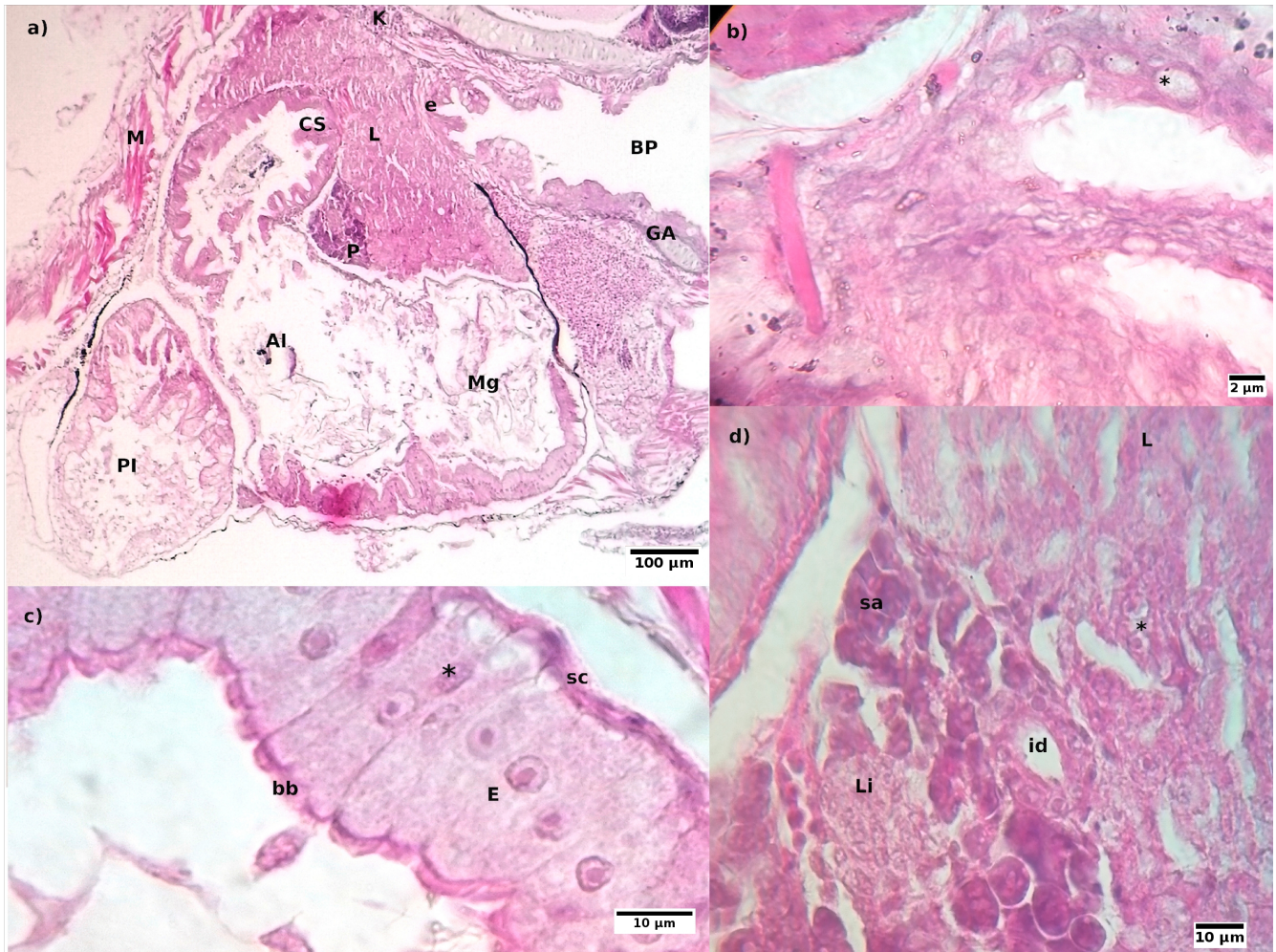


Figura 1. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de larva de 16 días post eclosión. a) se observa a 10X, la cavidad buco-faringe (BP), esófago (e), el estómago cardíaco (cs), intestino anterior (AI), intestino medio (Mg), intestino posterior (PI), hígado (L), páncreas (p), riñón (K), tejido músculo (M) y arco branquial (GA). b) Corte de esófago a 100X, marcado con asterisco está la célula caliciforme. c) corte de intestino medio a 100X, se aprecian enterocitos (E), borde de cepillo (bb), con asterisco se marca un leucocito y células de tejido liso (sc). d) corte del páncreas e hígado a 100X, islote de Langerhans (Li), acinos serosos (sa) y conducto intercalar (id).

Histología larvas D20.

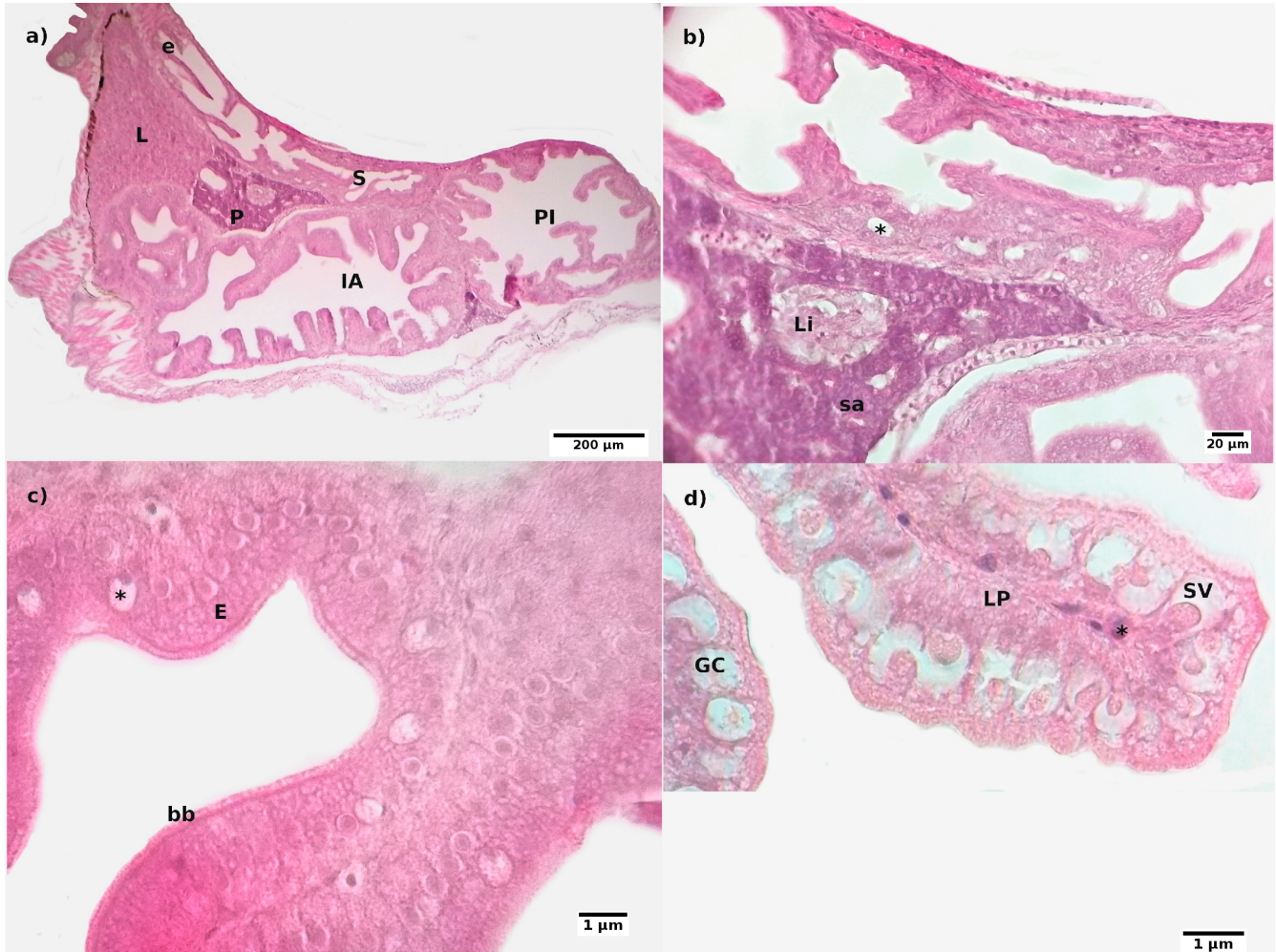


Figura 2. Cortes histológicos de larva de totoaba de 20 dpe, teñido con hematoxilina-eosina, en la imagen a) se observa el esófago (e), estómago (S), el intestino anterior (AI), intestino posterior (PI), hígado (L) y páncreas (p) en un aumento de 10X. En la imagen b) a 40X, marcado con asterisco está la glándula gástrica, acinos serosos del páncreas (sa), islote de Langerhans (Li), entre el páncreas e intestino se observa tejido conectivo laxo. En la imagen c) a 100X, se observa vellosidades del intestino anterior (AI), enterocitos (E), células caliciformes marcadas con asterisco y el borde de cepillo (bb). En la imagen d) a 100X se observa vellosidades del colon, con presencia de células caliciformes (GC), en el área de la lámina propia (LP) se aprecian leucocitos marcados con asterisco y vacuolas supranucleares (SV).

Histología larvas D28.

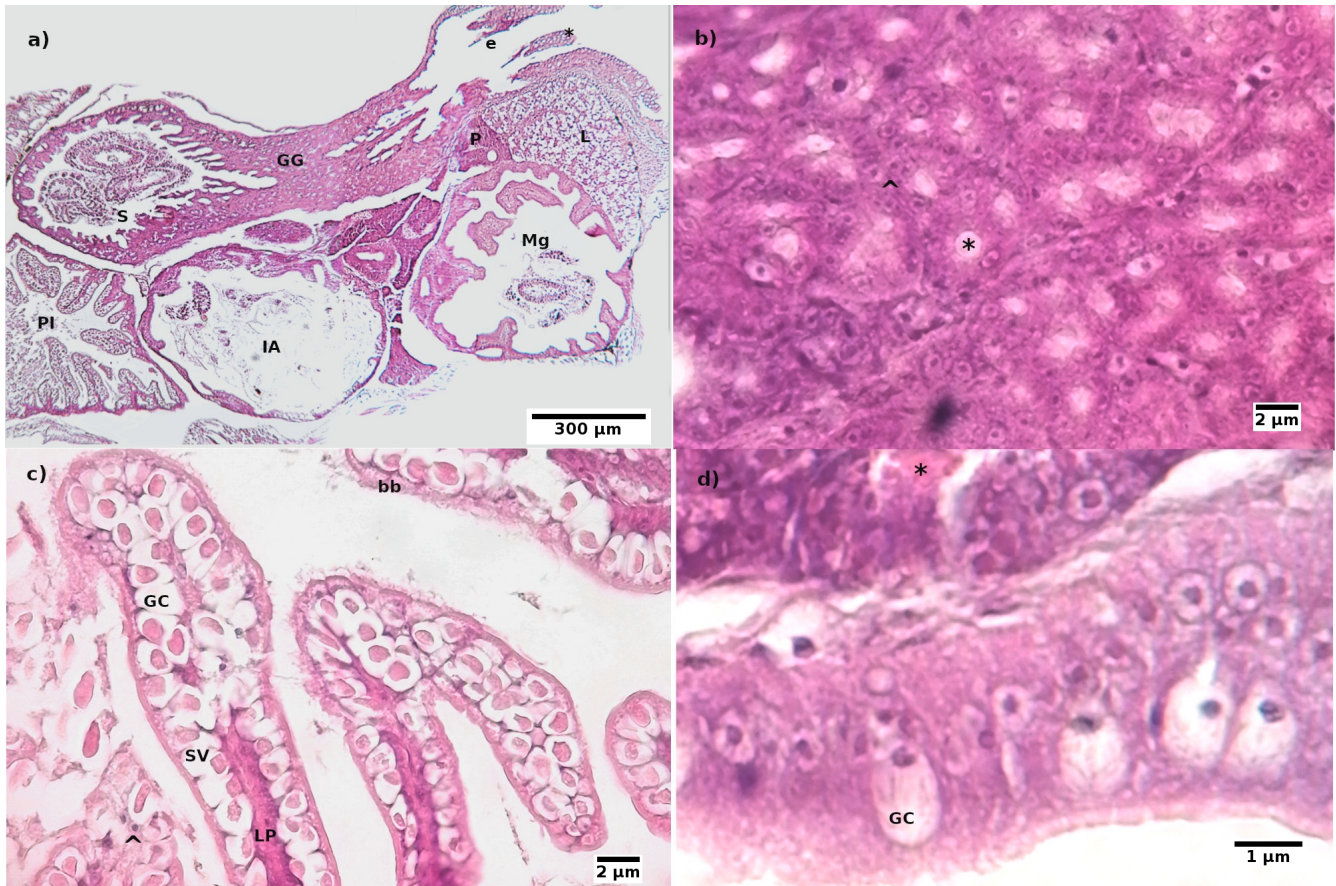


Figura 3. Cortes histológicos de larvas de 28 dpe. a) a 10X, se observa el esófago (e), las glándulas gástricas (GG), el estómago (S), páncreas (p), hígado (L), intestino anterior (AI), intestino posterior (PI) y el intestino medio (Mg). En la imagen b) a 100 X marcadas con asterisco están las glándulas gástricas, marcadas con flecha, células parietales. En la imagen c) a 40X se aprecian vellosidades del intestino posterior, vacuolas supranucleares (SV), células caliciformes (GC), lámina propia (LP), borde de cepillo (bb) y en la flecha la presencia de leucocitos.

Histología en hígado de D16, D20 y D28.

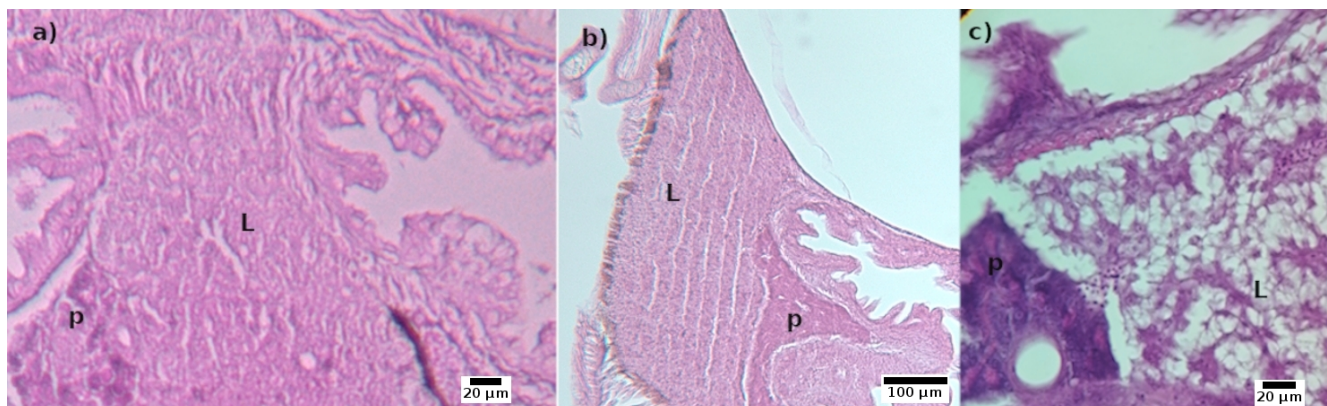


Figura 4. Cortes histológicos de hígado de los días 16, 20 y 28. Se observa el corte de hígado (L) y páncreas (p) de las muestras del día 16 (a), día 20 (b) y día 28 (c). se puede observar un aumento en el tamaño de los hepatocitos y la migración del núcleo a la periferia, por vacuolización hepática como posible señal de esteatosis.

Gráficos MA.

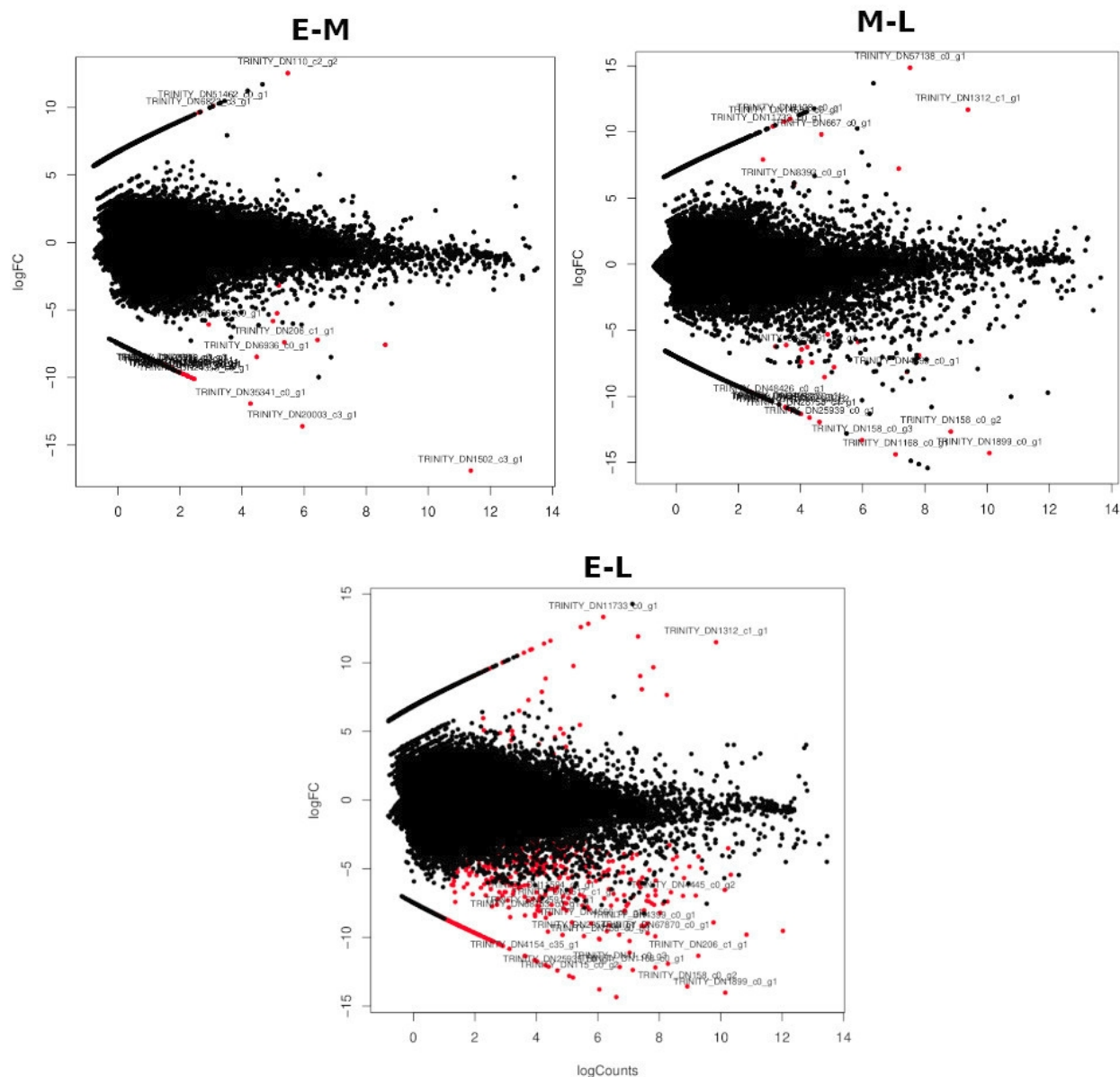


Figura 5. Gráficos MA realizados con edgeR. Se observan recuento promedios transformados logarítmicamente a conteos por millón (CPM), contra el coeficiente estimado sobre los cambios significativos de expresión, en base a su intensidad logarítmica (log2) en la escala de M (eje y) y la intensidad logarítmica del valor promedio por transcrito (eje x). Marcando su expresión diferencial en rojo, como resultado de la tasa de falsos descubrimientos o FDR <0.05 . Etapas temprana (E) con larvas D06 en etapa preflexión y D9 de flexión, media (M) con larvas D12 en transición de flexión a postflexión y D16 en postflexión, por ultimo la etapa tardía (L) con larvas D20 en postflexión y larvas de D28 en postlarva.

Heatmap de expresión diferencial por muestra.

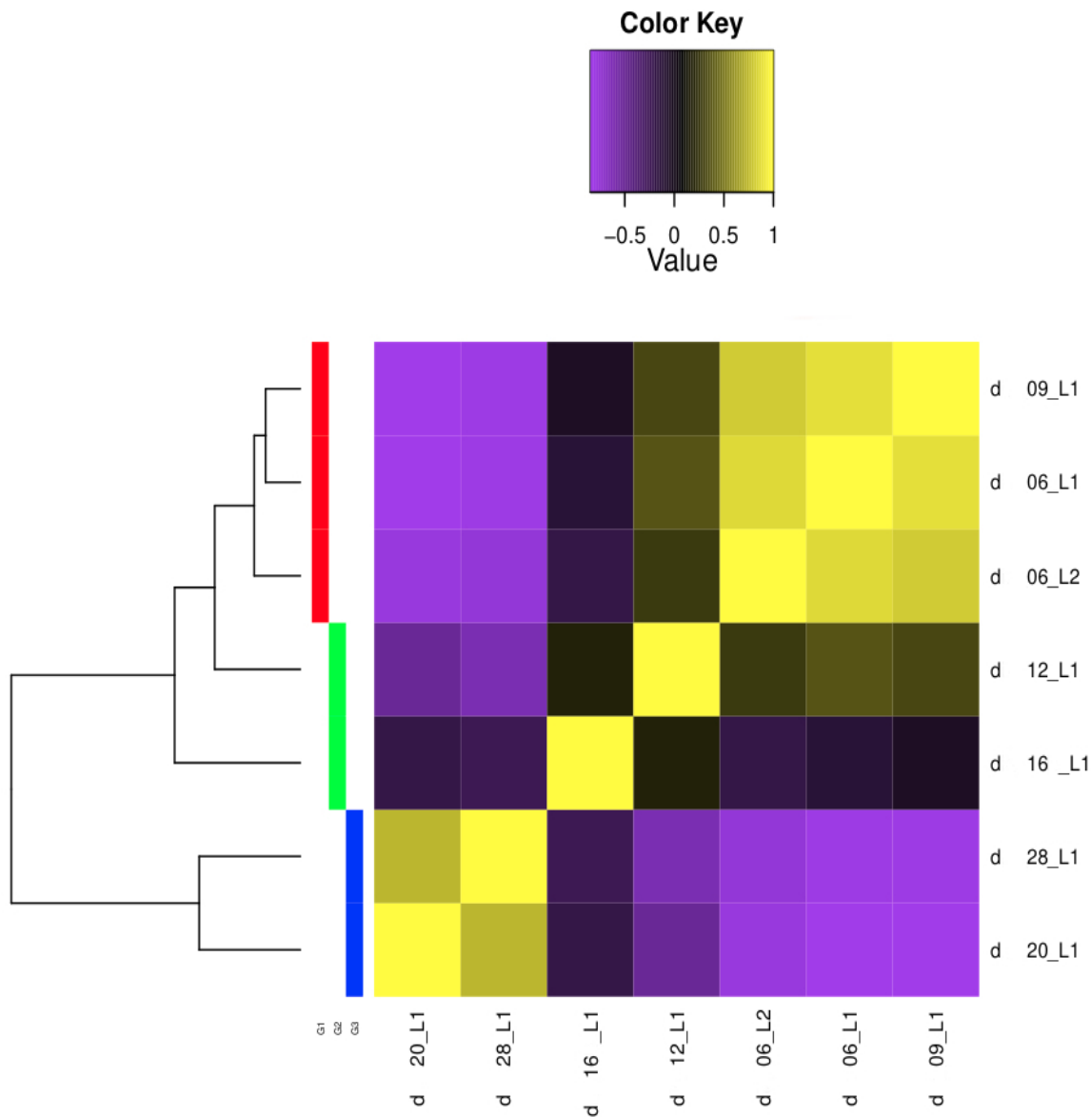


Figura 6. *Heatmap de expresión diferencial entre muestras*, generada a partir de los valores logarítmicos de los conteos por millón de transcritos, contra los aumentos $\log^2$ significativos de la expresión por transcrito. Etapa preflexión (G1), flexión (G2) y postflexión (G3). Observando correlación positiva entre las muestras G1, que disminuye en D12. Así como, una correlación entre las muestras del G3; marcando el salto entre G1 y G3, a partir de D16.

Heatmap de expresión diferencial por gen.

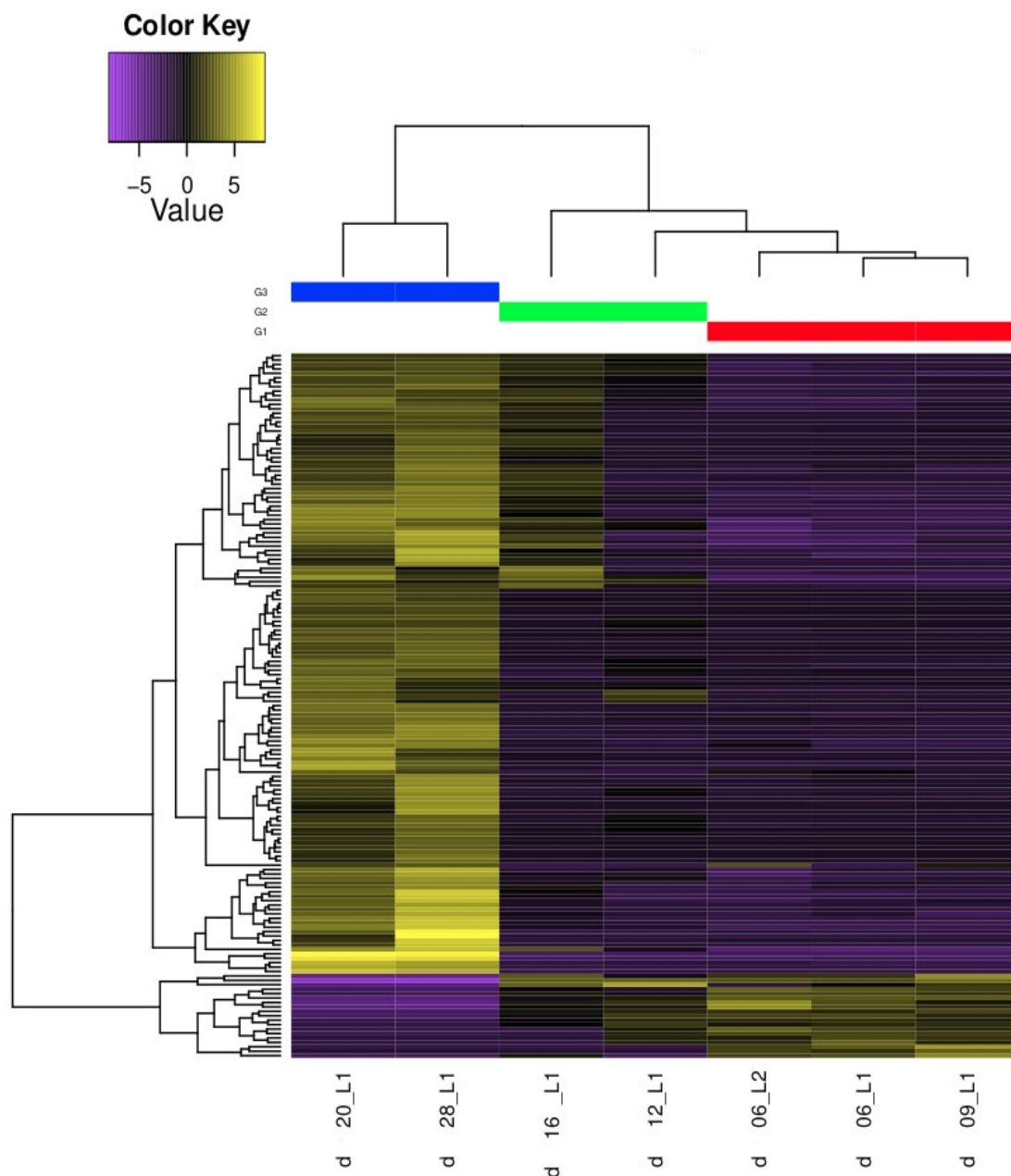


Figura 8. *Heatmap con los 250 transcritos con mayor expresión diferencial.* A partir de valores de log-CPM (recuentos de conteos $\log^2$ por millón) entre los aumentos $\log^2$ significativos en su expresión y diferenciados por el método de FDR para un valor P máximo de $1e-3$ entre transcritos. Observando la relación en la expresión que marca la transición entre D20 con D16, pasando de la flexión a la postflexión.

Matriz de correlación, desarrollo del sistema digestivo.

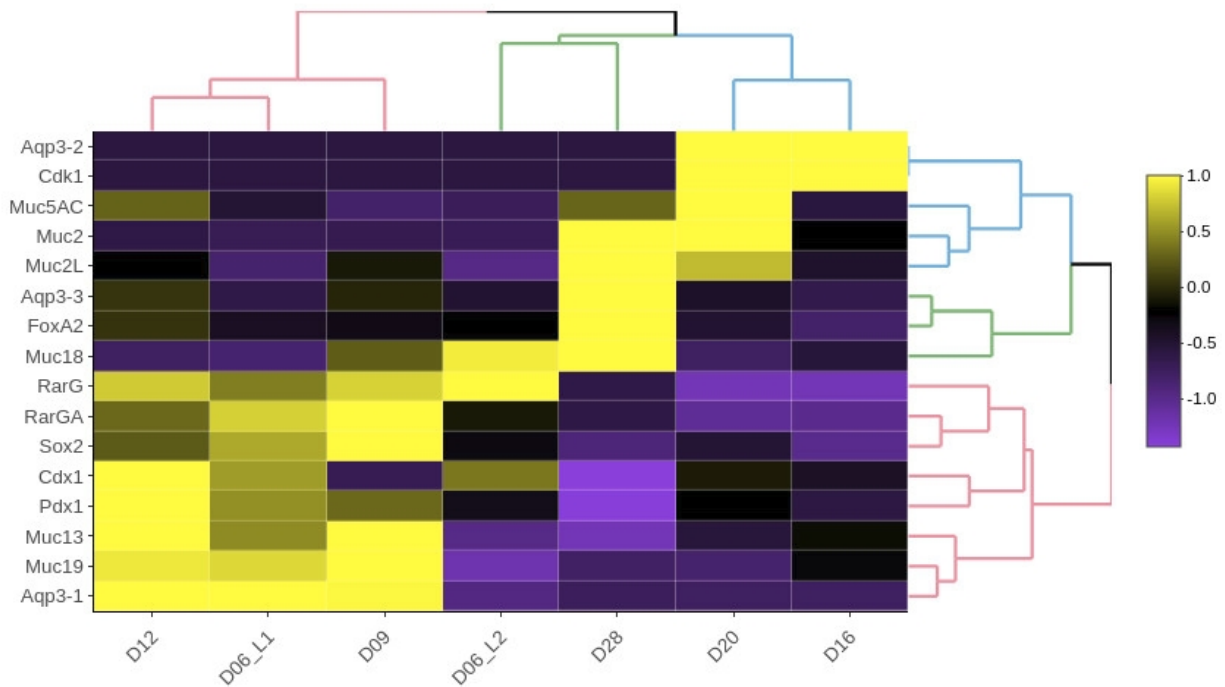


Figura 9. Matriz de correlación para genes involucrados en el desarrollo del sistema digestivo de *Totoaba*, a partir de valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar. Generando una matriz de disimilitud con el método euclidiano, y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos. Con genes del desarrollo del mesodermo y glándulas secretoras, como: RarG, RarGA, Sox2, Cdx1, Pdx1, Muc13, Muc19 y Aqp3 de D06_L1 a D12. Y genes relacionados a la diferenciación celular, maduración intestinal y homeostasis Cdk1, Aqp3, Muc5AC, Muc2, Muc2L, Aqp3, FoxA2 y Muc18.

Matriz de correlación, funcionalidad digestiva.

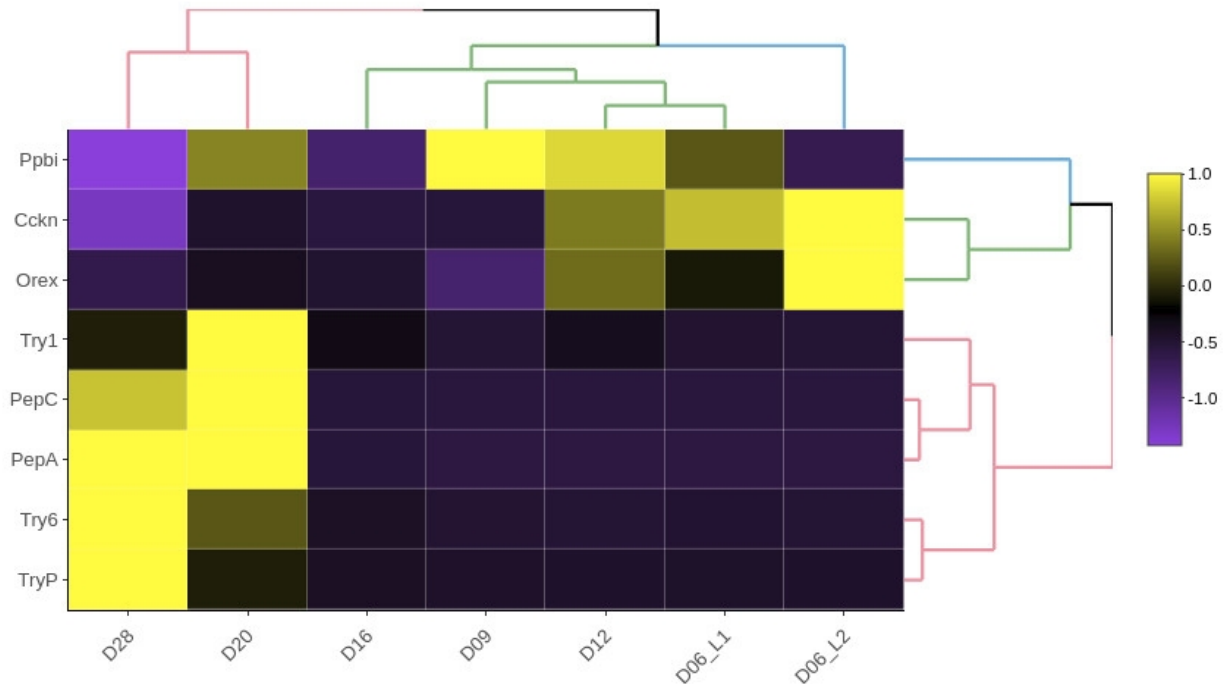


Figura 10. Matriz de correlación para genes usados como marcadores de la funcionalidad del sistema digestivo. Donde se muestran los valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos. El dendrograma horizontal se separó a D06_L2 del resto (azul), unió de D06_L1 a D16 en un grupo (verde), y D20 - D28 en otro grupo, junto a los genes relacionados con la digestión ácida (rojo) Tripsina-1 (Try1), Gastrina (PepC), Pepsina A (PepA), Tripsina-6 (Try6), Tripsina (TryP). Por otra parte, Fosfatasa alcalina intestinal (Ppbi) con protección y homeostasis intestinal.

Matriz de correlación, sistema inmune y biosíntesis de lípidos.

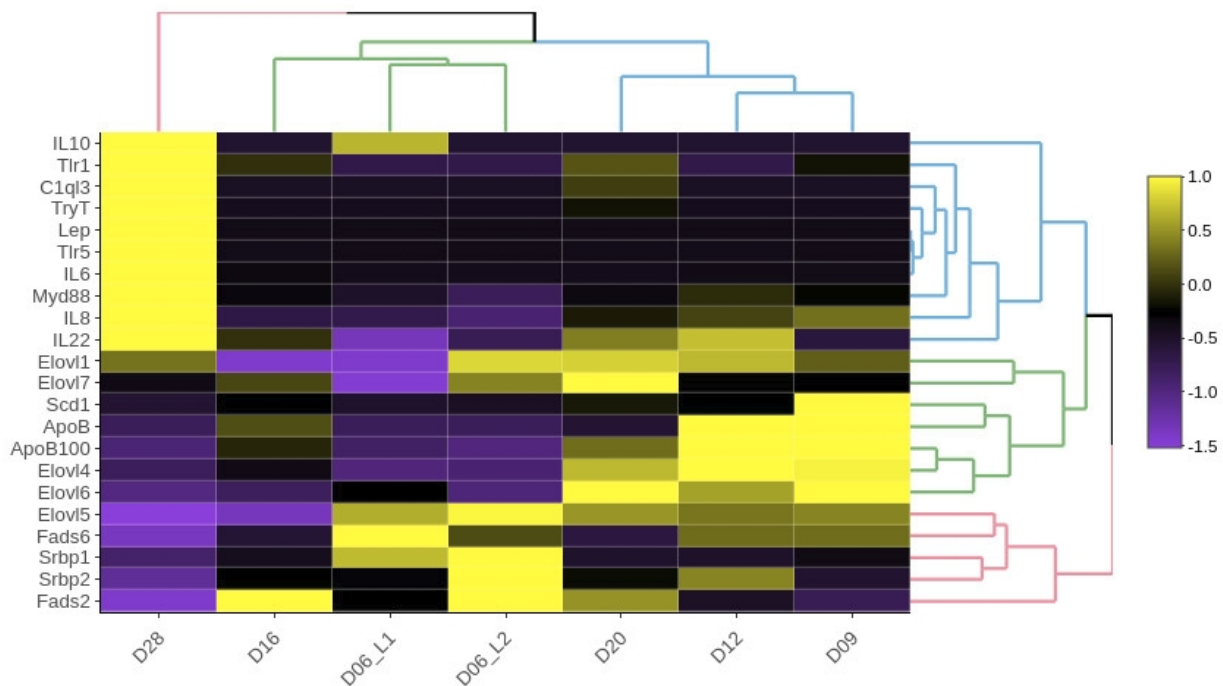


Figura 11. Matriz de correlación con genes relacionados, en la biosíntesis de lípidos y respuesta inmune. Observando tres grupos principales entre muestras, con D28 (rojo) y genes involucrados en la respuesta inmune, como: IL10, Tlr1, C1ql3, Tryt, Lep, Tlr5, IL6, Myd88, IL8 e IL22 (azul). Contrastando con la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de AG PUFAs y colesterol; Elovl5, Fads6, Srp1, Srp2 y Fads2 (rojo), así como; genes asociados a biosíntesis y transporte de AG saturados y monoinsaturados; Elovl1, Elovl7, Elovl6, Scd1, ApoB, ApoB100 (verde). A partir de valores normalizados de TPM, centrados con base en la resta de la expresión promedio por variable, escaladas mediante la división de los niveles de expresión de la variable centrada, por su desviación estándar. Generando una matriz de disimilitud con el método euclidiano, y una agrupación jerárquica de vinculación máxima por nodos.

Análisis PCA.

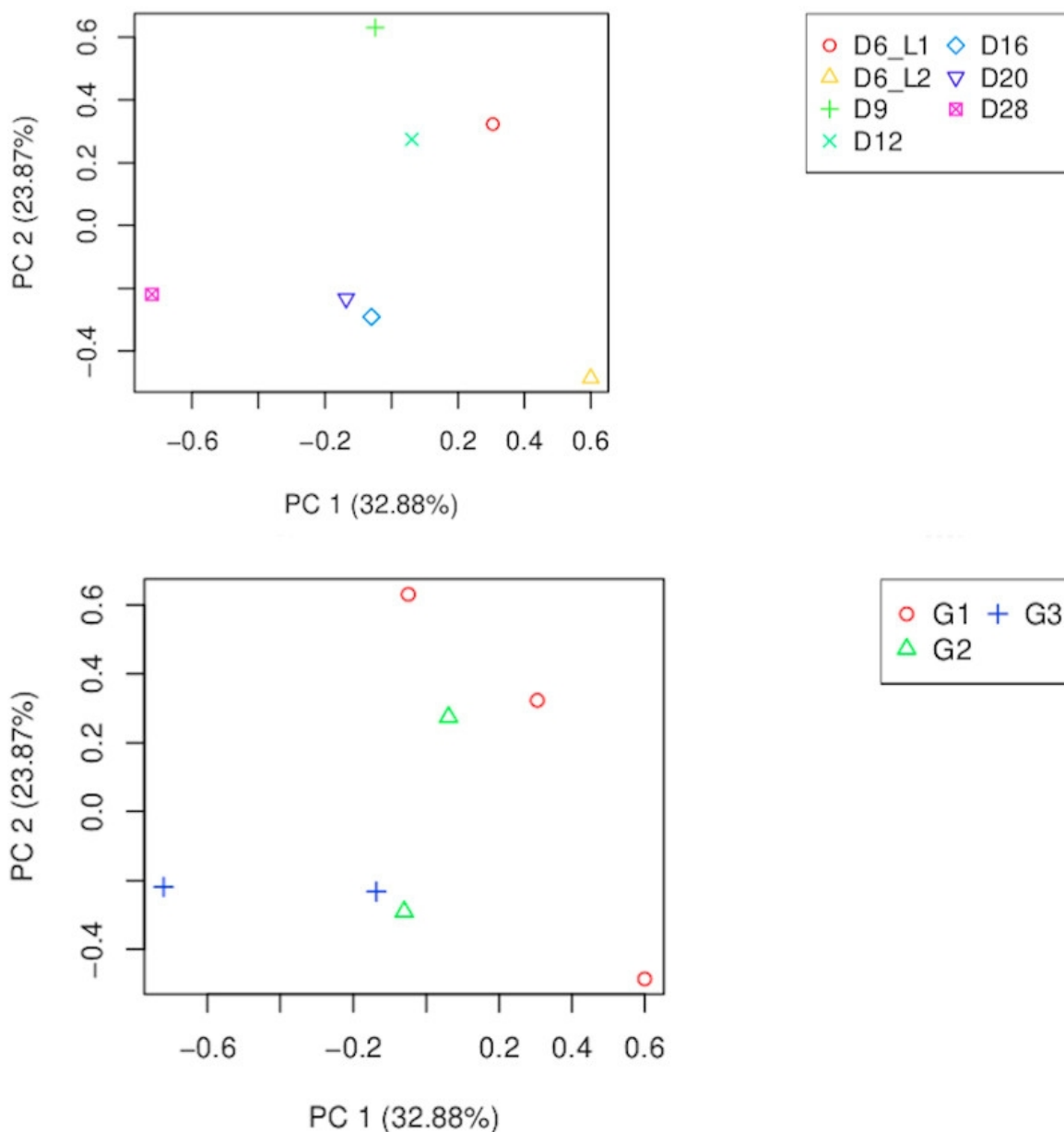


Figura 12. *Análisis de componentes principales.* Realizado a partir de los recuentos por millón de transcritos. Donde el componente 1 describe el 32.88% de la variabilidad intergrupar y el componente 2 el 23.87%. Observando a D28 y D06_L2 más alejados entre sí, también a D6_L1 más cercas a D9 y D12. Por otra parte, en el componente 2 se observa como D16, D20 y D28 se agrupan, explicando la mayor similitud de D12 con G1 y D16 con G3.

Red de interacción entre G1 y G2.

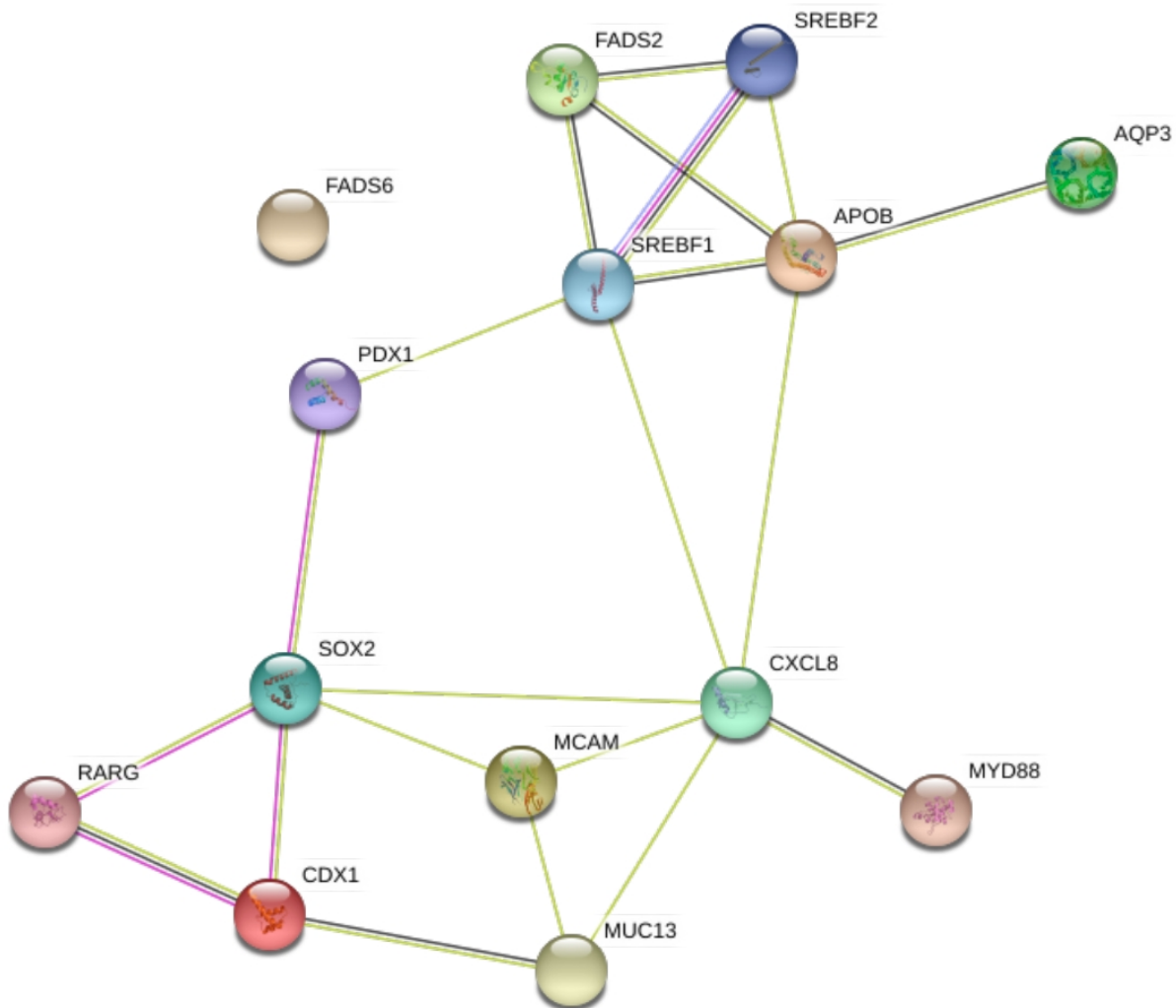


Figura 13. Red de interacción con 14 proteínas expresadas diferencialmente entre G1 y G2, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo y síntesis de AG (Tabla 1, Figura 8). El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraduccion, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.0600 (60% de probabilidad que exista un vínculo entre 2 genes en el mismo mapa metabólico de la base de datos KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Red de interacción entre G2 y G3.

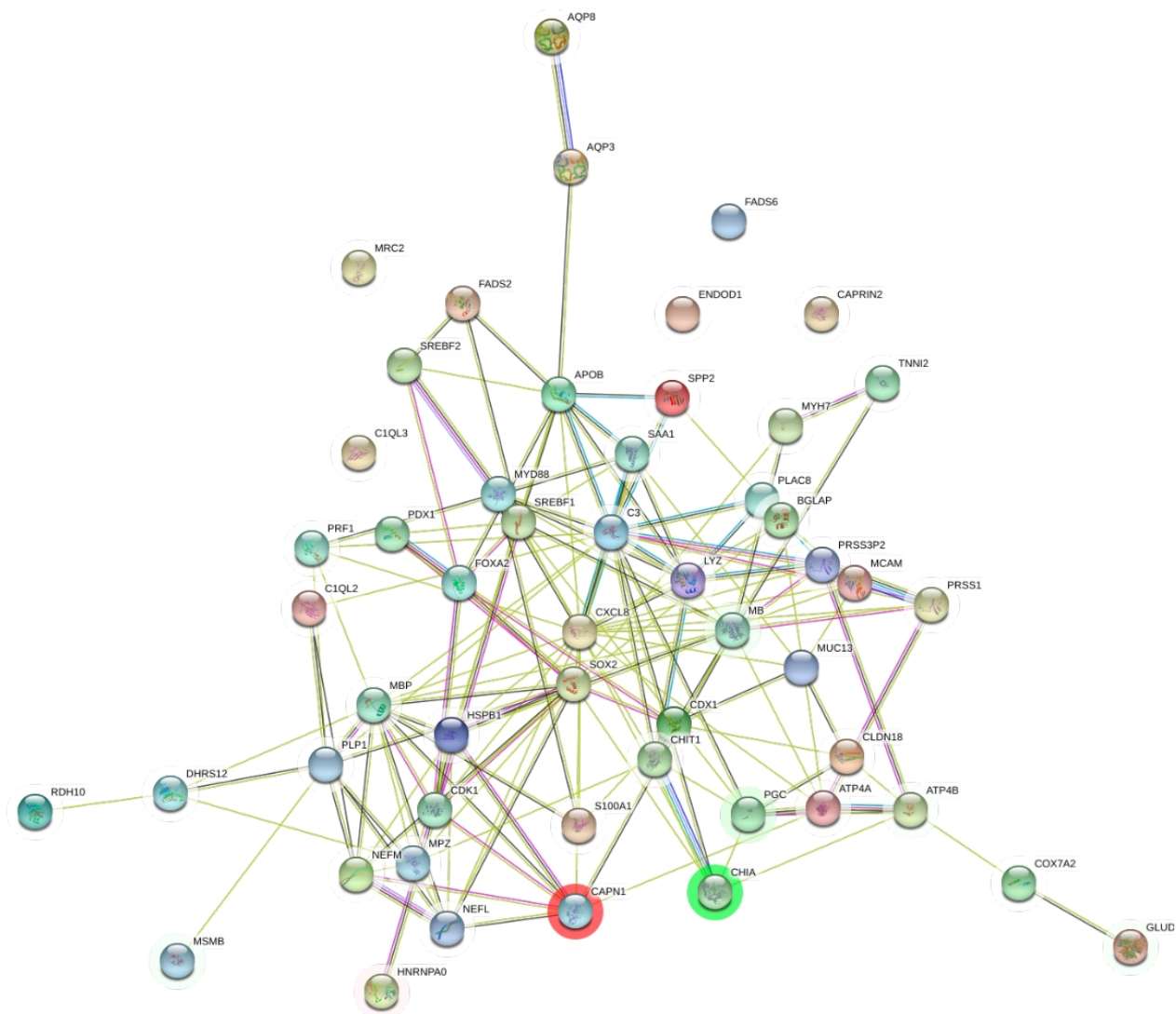


Figura 14. Red de interacción con 54 proteínas expresadas diferencialmente entre G2 y G3, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo, biosíntesis de lípidos y respuesta inmune. El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraducciona, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. El halo rojo representa expresion a la alta y el verde a la baja. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.07400 (74% de probabilidad de un vínculo entre 2 genes del mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG: [http:// www.genome.jp/kegg/pathway.html](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)).

Red de interacción entre G2 y G3.



Figura 15. Red de interacción con 80 proteínas expresadas diferencialmente entre G1 y G3, relacionadas con el desarrollo del sistema digestivo, biosíntesis de lípidos y respuesta inmune. El color de las conexiones representa diferentes tipos de asociación proteína-proteína. Verde: activación, rojo: inhibición, azul oscuro: unión, azul claro: fenotipo, violeta oscuro: catálisis, violeta claro: modificación postraduccional, negro: reacción, amarillo: regulación transcripcional. El halo rojo representa alta expresión y el verde baja. Realizada con String (versión 11; Szklarczyk et al., 2019), con un valor de confianza medio de 0.06800 (68% de probabilidad de un vínculo entre 2 genes del mismo mapa metabólico en la base de datos KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Esquema alimenticio.

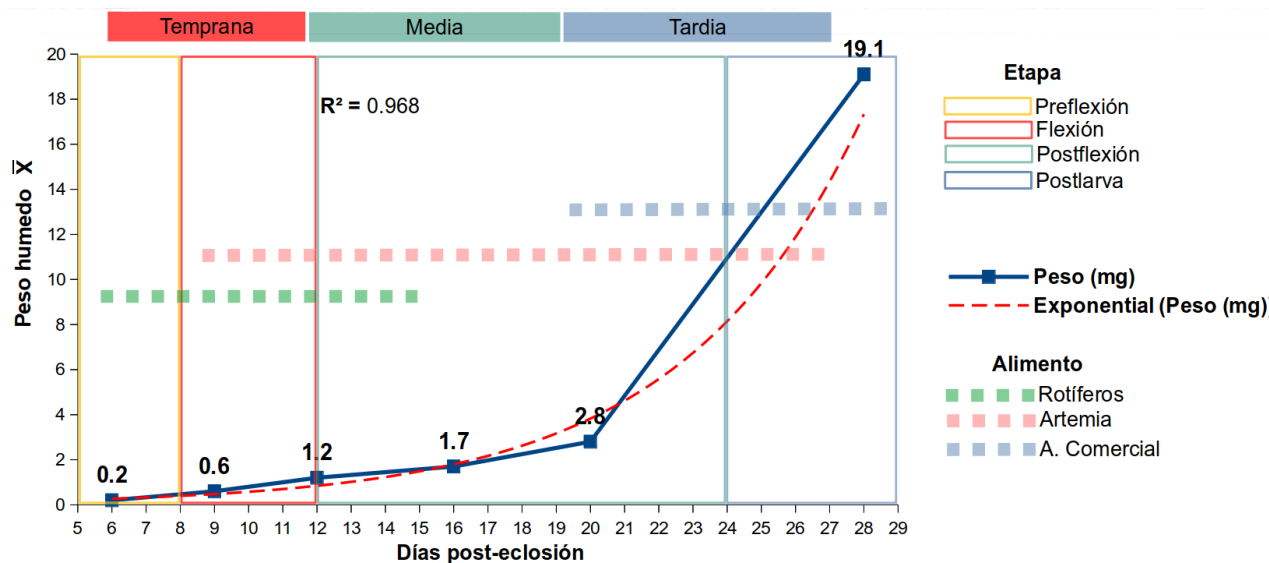


Figura 16. Ganancia de peso húmedo en larvas de totoaba, durante los cambios de alimento en las etapas de flexión, y las etapas temprana, media y tardía generadas con un análisis de expresión diferencial, para genes relacionados con el desarrollo del sistema digestivo.

Tablas

Genes expresados diferencialmente durante el desarrollo del sistema digestivo.

Proteína	Gen	Función
Acuaporina 3	Aqp3	Acuagliceroporina de membrana transportadora de agua y glicerol.
Quinasa dependiente de ciclina 1	Cdk1	Relacionada con la regulación del ciclo celular, mediante la fosforilación de diferentes sustratos.
Mucina 5AC	Muc5AC	Glicoproteína secretada por epitelio de estomago y branquias.
Mucina 2	Muc2	Glicoproteína secretada por células caliciformes de intestino delgado y colon.
Mucina 2L	Muc2L	Moco oligomérico formador de gel (cavidad bucal).
Factor nuclear de hepatocitos 3-beta	FoxA2	Factor de transcripción que participa en el desarrollo embrionario, estableciendo la expresión génica específica por tejido y regulando la expresión en tejidos diferenciados.
Mucina 18	Muc18	Glicoproteína de superficie celular, promueve la adhesión celular y cohesión de la monocapa endotelial en uniones intercelulares del tejido vascular. Posible molécula de adhesión activa en las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario.
Receptor de ácido retinoico gamma	RarG	Regulador de la expresión génica en varios procesos biológicos, requerido para el desarrollo de la yema de las extremidades, el crecimiento esquelético, la homeostasis de la matriz y la función de la placa de crecimiento.
Receptor de ácido retinoico gamma-A	RarGA	Requerido para el desarrollo del rombencéfalo y los arcos faríngeos.
Factor de transcripción Sox-2	Sox2	Componente crítico en la embriogénesis temprana, para la pluripotencia de células madres embrionarias. Mantiene las células madre indiferenciadas, suprimiendo la diferenciación neural; interruptor del desarrollo neural.
Proteína Homeobox Cdx-1	Cdx1	Regulador transcripcional en células de cáncer colorrectal y en la diferenciación terminal del intestino.
Proteína 1 Homeobox de páncreas / duodeno	Pdx1	Diferencia y especifica el epitelio pancreático temprano, promoviendo la proliferación, ramificación y posterior diferenciación. En la etapa adulta mantiene el fenotipo productor de hormonas de la célula beta.
Mucina 13	Muc13	Mucina transmembranal epitelial y hematopoyética que desempeña un papel en la vía de señalización del receptor estimulante de lectina de tipo C y en el mantenimiento del epitelio gastrointestinal.
Mucina 19	Muc19	Gel de secreción expresado en esófago, relacionado con la diferenciación celular involucrada en el desarrollo de las glándulas salivales y la regulación negativa de la respuesta inflamatoria.

Tabla 1. Genes expresados diferencialmente durante el desarrollo del sistema digestivo, definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.

Genes relacionados con la funcionalidad del sistema digestivo.

Proteína	Gen	Función
Fosfatasa alcalina de tipo intestinal	Ppbi	Participa en la defensa de la mucosa intestinal, manteniendo la homeostasis. La pérdida de su expresión genera aumento en la inflamación intestinal, disbiosis y translocación bacteriana; provocando inflamaciones sistémicas.
Colecistoquinina	Cckn	Hormona neuropéptida que estimula la secreción de ácido gástrico y produce la contracción de la vesícula biliar y la liberación de enzimas pancreáticas en el intestino.
Orexina	Orex	Neuropéptido involucrada en la regulación de la ingesta de alimentos como respuesta al hambre, el sueño -vigilia y la homeostasis de la temperatura.
Tripsina	Try1 / TryP	Proteasa con actividad endopeptidasa de tipo serina, involucrado en la digestión, desmontaje de la matriz extracelular y proteólisis.
Gastrina	Pepc	Estimula la mucosa del estómago para producir y secretar ácido clorhídrico y en el páncreas promueve la secreción de enzimas digestivas. También aumenta la secreción de agua en el estómago e intestino.
Pepsina A	PepA	Proteasa con actividad endopeptidasa de tipo aspártico, involucrado en la digestión.
Tripsina 6	Try6	Proteasa con actividad endopeptidasa de tipo serina, involucrado en la digestión, desmontaje de la matriz extracelular y la proteólisis.

Tabla 2. Genes usados como marcadores de la funcionalidad del sistema digestivo, definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.

Genes relacionados con el sistema inmune y biosíntesis de lípidos.

Proteína	Gen	Función
Interleucina 10	IL10	Citoquina inmunorreguladora que actúa sobre células del sistema inmune como: macrófagos, monocitos y granulocitos con función antiinflamatoria profunda; protegiendo el tejido inflamado.
Receptor tipo peaje 1	Tlr1	Participa en la respuesta inmune innata a los agentes microbianos, reconociendo las lipoproteínas o lipopéptidos bacterianos. Actúa a través de Myd88 provocando la secreción de citocinas en la respuesta inflamatoria.
Complemento de la proteína 3 similar a C1q	C1q3	Receptor de LPS y peptidoglicanos que estimulan la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria, mediante la actividad sináptica de las células dendríticas. También promueve la captación de glucosa en adipocitos, miotubos y hepatocitos.
Triptasa 2	TryT	Principal proteasa neutra presente en los mastocitos, secretada por la respuesta acoplada de activación-desgranulación de ese tipo de células. Participando en la inmunidad innata.
Leptina	Lep	Induce factores anorexigénicos y suprime neuropéptidos orexigénicos, regula la masa ósea, aumenta el metabolismo basal, es proangiogénico en células endoteliales y afecta la inmunidad innata y adaptativa; modulando la actividad y función de los neutrófilos, aumentando también la fagocitosis por macrófagos y mejora la secreción de mediadores proinflamatorios; promueve la producción de IL6 e IL8. En intestino reduce la absorción de glucosa por parte de los enterocitos.
Receptor de peaje 5	Tlr5	Receptor de reconocimiento de patrones ubicado en las superficies celulares involucradas en la actividad inmune y la respuesta inflamatoria, mediante el reconocimiento de flagelinas bacterianas; reclutando proteínas adaptadoras intracelulares Myd88, que promueven la secreción de citocinas en la respuesta inflamatoria. Mantiene la composición de la microbiota intestinal, controlando la interacción entre epitelio intestinal y microbiota.
Interleucina 6	IL6	Citoquina con funciones biológicas en inmunidad, regeneración de tejidos y metabolismo, es un potente inductor de la respuesta inmune en la fase aguda, sintetizada por células mieloides, como; macrófagos y células dendríticas, tras reconocer un patógeno mediante el receptor Tlr.
proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide	Myd88	Proteína adaptadora de la vía de señalización del receptor tipo Toll y del receptor IL1 en la respuesta inmune innata, también aumenta la transcripción de IL8. La señalización de células epiteliales intestinales mediada por Myd88, favorece el mantenimiento homeostático intestinal y controla la expresión de lectina antimicrobiana en intestino delgado.
Interleucina 8	IL8	Factor quimiotáctico que atrae neutrófilos, basófilos y células T, en respuesta a un estímulo inflamatorio. Con mayor afinidad a la activación de neutrófilos.
Interleucina 22	IL22	Citoquina involucrada en la regulación negativa sobre la respuesta inflamatoria.
Alargamiento de la proteína de ácidos grasos de cadena muy larga	Elov11	Cataliza la primera y reacción limitante del ciclo de elongación de los ácidos grasos de cadena larga, para su posterior uso como precursores de lípidos en membrana y mediadores lipídicos. Importante en la síntesis de esfingolípidos saturados y monoinsaturados, presentes en la esfingomielina de las vainas de Schwann.
Alargamiento de la proteína de ácidos grasos de cadena muy larga 7	Elov17	Participa en la producción de ácidos grasos de cadena muy larga saturados y poliinsaturados, especialmente acil-CoAs de C18:3 (n-3) y CoAs de C18:3 (n-6), para la formación de precursores de lípidos de membrana y mediadores lipídicos.
Acil-CoA desaturasa 1	scd1	Introduce el primer doble enlace en sustratos de acil-CoA grasos saturados, al catalizar la inserción de un doble enlace cis en la posición Delta-9 de sustratos grasos, como el palmitoil-CoA y el estearoil-CoA.
Apolipoproteína B	ApoB / ApoB100	ApoB es un componente proteico de los quilomicrones (ApoB-48), LDL y VLDL (ApoB100). ApoB100 señala el reconocimiento para la unión celular y la internalización de partículas LDL, involucrándose en varios procesos biológicos como la homeostasis del colesterol, regulación positiva de almacenamiento de colesterol y lípidos, y en la vía de señalización de los receptores de peaje.
Alargamiento de la proteína de ácidos grasos de cadena muy larga 4	Elov14	Permite la adición de 2 carbonos a la cadena de ácidos grasos de cadena larga y muy larga por ciclo, catalizando la síntesis de ácidos grasos saturados y poliinsaturados. Produciendo precursores de lípidos de membrana y mediadores lipídicos, que participan en el desarrollo temprano del cerebro y la piel.
Alargamiento de la proteína de ácidos grasos de cadena muy larga 5	Elov15	Cataliza la primera reacción en el ciclo de elongación de los ácidos grasos de cadena larga, específicamente hacia acil-CoA poliinsaturada como CoA C18:3 (n-6), para la producción de membrana y mediadores lipídicos.
Alargamiento de la proteína de ácidos grasos de cadena muy larga 6	Elov16	Enzima condensadora que alarga los ácidos grasos con 12, 14 y 16 carbonos, con mayor actividad hacia CoAs C16:0. Genera precursores de membrana y mediadores lipídicos.
Ácido graso desaturasa 6	Fads6	Proteína con actividad oxidoreductasa que participa en el metabolismo y biosíntesis de ácidos grasos y lípidos.
proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides	Srbp1	Estimula la expresión de genes lipogénicos y colestogénicos, participa en la regulación nutricional de ácidos grasos y triglicéridos en órganos lipogénicos como el hígado. Requerido en la respuesta inmune innata por macrófagos, para regular el metabolismo de lípidos.
proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides	Srbp2	Participa en procesos biológicos, como: la respuesta celular al estímulo de partículas de lipoproteínas de baja densidad, respuesta celular a la inanición, homeostasis del colesterol, proceso metabólico de colesterol y lípidos, así como, en la regulación de la vía de señalización Notch.
Acil-CoA 6-desaturasa	Fads2	Involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos altamente insaturados, a partir de precursores como el ácido linoleico (18: 2n-6) y el alfa-linoleico (18: 3n-3), catalizando la producción de ácido gamma-linoleato y estearidionato respectivamente. Así como biosíntesis de docosahexaenoato (DHA) (22: 6n-3), importante para la función del sistema nervioso.

Figura 17. Genes de biosíntesis de lípidos y respuesta inmune, como indicadores del estado de salud en intestino e hígado. Definiciones resumidas de uniprot y definiciones ontológicas generadas para cada gen en el proceso de anotación.

Anexo 1

Protocolo para fijación y almacenamiento de larvas

1. Se recolectaron larvas vivas en tubos de micro-centrifuga, como se describe en la metodología.
2. Se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, retirando el exceso de agua.
3. Se le agregó 1.5 mL de paraformaldehído al 4% a cada tubo, agitando con inversiones lentas para ayudar a la fijación.
4. Se dejaron las larvas fijadas por un lapso no mayor a 24 horas a 4 °C.
5. Se retiró el fijador mediante enjuagues con agua destilada.
6. Se suspendió la muestra en 1.5 mL de alcohol al 70 % y se almacenó hasta su proceso histológico.

Elaboración del fijador.

Reactivos:

- 4 gr de paraformaldehído.
- 25 mL tampón fosfato 0.4 M pH 7.4.
- 3 gotas de hidróxido sódico 10N.
- 75 mL de agua destilada.

Para preparar 100 mL de paraformaldehído al 4%.

- 1) Calentar 75 mL de agua destilada a 60 °C en un matraz con un agitador magnético.
- 2) Añadir 4 gr de paraformaldehído.
- 3) A los 60 °C adicionar 2 – 3 gotas de hidróxido sódico 10N (esperar a que la solución se vuelva transparente).
- 4) Filtrar.
- 5) Añadir 25 mL de tampón fosfato 0.4 M pH 7.4.
- 6) Enfriar a 4 °C.