



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE ALTOS NIVELES DE VITAMINA A EN  
LA EXPRESION DE LOS GENES HOX<sub>a5</sub> Y RAR $\alpha$ ,  
EN EL DESARROLLO INICIAL  
DE  
*Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae)**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

**C h r i s t i a n L i ñ á n R i v e r a**

La Paz, B.C.S. Agosto de 2008

# ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 18 del Mes de Agosto del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Efecto de altos niveles de vitamina A en la expresión de los genes Hoxa5 y RAR $\alpha$  en el desarrollo inicial de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae)**

Presentada por el alumno:

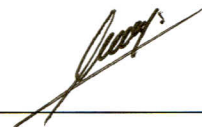
**Christian Liñan Rivera**

---

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

---

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.




Dr. Dariel Tovar Ramirez  
DIRECTOR DE TESIS

LA COMISION REVISORA



Dr. Roberto Civera Cerecedo  
CO-TUTOR



Dr. Vicente Gracia López  
CO-TUTOR



**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,**  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

DIRECTOR: DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ (CIBNOR)

CO-TUTOR: DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO (CIBNOR)

CO-TUTOR: DR. VICENTE GRACIA LÓPEZ (CIBNOR)

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO

DR. VICENTE GRACIA LÓPEZ

## **JURADO DE EXAMEN**

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO

DR. VICENTE GRACIA LÓPEZ

DRA. MINERVA CONCEPCIÓN MALDONADO GARCÍA

DRA. DANITZIA ADRIANA GUERRERO TORTOLERO

## RESUMEN

La vitamina A (VA) es un nombre genérico que describe a todos los compuestos químicos que presentan la misma actividad biológica que el retinol. La entrada de la VA al núcleo celular esta regulada por la acción de los Receptores del Acido Retinoico (RAR's). El RA actúa como inductor en la expresión de más de 500 genes, incluidos los genes de la familia Hox. Los factores transcripcionales de los genes Hox son los principales reguladores que controlan el desarrollo embrionario. Particularmente, los genes Hoxa5 regulan la dirección antero-posterior de la región intestinal en vertebrados. Estudios recientes han demostrado que un balance inadecuado de VA puede causar malformaciones en larvas de peces marinos, lo cual impacta en la rentabilidad de los cultivos, debido a las altas tasas de mortalidad y la disminución en la calidad del producto. Dichas malformaciones se cree están asociadas con cambios en la expresión normal de genes implicados en el desarrollo embrionario y en las rutas retinoicas. Por lo que en este estudio se planteó como objetivo general observar los efectos que causan altos niveles de VA en el alimento sobre la expresión de los genes RAR $\alpha$  y Hoxa5, implicados en el control del desarrollo inicial de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Para ello, se realizó un cultivo larvario en un sistema de circulación cerrada ubicado en la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) del CICIMAR-IPN. En dicho sistema se utilizaron 6 tanques para llevar a cabo los desarrollos larvarios correspondientes a este trabajo. De los cuales, 3 tanques se utilizaron como controles positivos (sin enriquecimiento del alimento con VA) y 3 tanques se utilizaron para el tratamiento de enriquecimiento del alimento vivo con VA. La alimentación exógena inició a partir de los dos días después de la eclosión (DDE), que es cuando concluye la absorción del saco vitelino en la cabrilla arenera. Las larvas fueron alimentadas a saciedad aparente tres veces al día (08:00, 14:00 y 18:00) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) durante los primeros 15 días. Los siguientes 10 días se alimentaron con nauplios de dos días de Artemia (*Artemia* sp. Microfeast Artemia Cyst, Burns Philp Foods Inc., Oklahoma, USA). Para culminar alimentándolas con juveniles de Artemia de 5 días hasta los 30 DDE. El alimento vivo fue enriquecido con una emulsión comercial (Super SELCO 3000<sup>®</sup>). Para el tratamiento con vitamina A, se preparó una solución con 0.6 g de vitamina A (Acetato de Vitamina A, 20,000 UI/g) por cada 500 g de SELCO. Se realizaron análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución para detectar los niveles de inclusión de la VA en el alimento vivo y en las larvas. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión genética mediante PCR en tiempo real, utilizando la bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> en un equipo ABI PRYSM 7000 SDS (Applied Biosystems). Se obtuvieron las secuencias parciales específicas de la cabrilla arenera para los genes RAR $\alpha$  (384pb. Número de acceso 1088219 NCBI) y Hoxa5 (147 pb. Número de acceso 1088190 NCBI). Los resultados que se obtuvieron en los análisis cromatográficos fueron cualitativos debido muy probablemente a que el nivel de vitamina utilizado resultó ser mucho mas bajo en la práctica que el valor teórico calculado. Asimismo, aunque sí se logró incorporar un poco de vitamina en las presas vivas, es muy probable que cierta cantidad se perdiera mediante desnaturalización por fuentes luminosas y otra cantidad importante por lixiviación dentro de los tanques de cultivo. Por este motivo no fue posible encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento, así como tampoco entre los patrones de expresión de los genes Hoxa5 y RAR $\alpha$ , de los individuos sometidos a los tratamientos. Independientemente de no haber encontrado diferencias entre los tratamientos, si fue posible cuantificar exitosamente los patrones de expresión de los genes. En este sentido, para el caso del gen RAR $\alpha$ , se encontró que a los 5 DDE existe una sobre expresión del orden de los 2x que continúa en aumento hasta alcanzar un valor aproximado de 2.5x a los 15 DDE. A partir del día 20, se observa un claro decremento en la expresión llegando a valores estables cercanos al 1.5x hasta los 30 DDE. Posterior a este intervalo de tiempo, a partir de los 20 DDE, se observó un decremento en los valores de la expresión del gen. Los valores de transcripción de los RAR $\alpha$  coincidieron en buena medida con los valores de expresión del gen Hoxa5 (2x a los 5 DDE; 2.5x a los 15 DDE; 1.5x a los 20 DDE; 1x a los 25 y 30 DDE) y dado que los genes Hox se activan en ventanas de tiempo y espacio muy específicas, es posible concluir que la ventana de expresión del Hoxa5 en la cabrilla arenera se encuentra entre los 5 y los 20 DDE. Finalmente, al observar los individuos que presentaron malformaciones, en la mayoría de los casos, éstas se encontraron en la región mandibular. Con estas observaciones, se puede decir que toda perturbación de las vías metabólicas de la vitamina A, afectan la expresión de genes que ésta controla, provocando una alteración en el desarrollo del organismo

**Palabras clave:** Vitamina A, genes Hox, desarrollo inicial, larvas de peces, *Paralabrax maculatofasciatus*.

## ABSTRACT

Vitamin A (VA) is a generic name that describes all chemical compounds that present the same biological activity as retinol. The entrance of VA to the cellular nucleus is regulated by the action of the Retinoic Acid Receptors (RAR's). The retinoic acid acts as an inducer of the expression of more than 500 genes including the members of the Hox family. The transcriptional factors of Hox genes are the main responsible in regulating the embryonic development. Specifically, Hoxa5 gene regulates the antero-posterior differentiation in the vertebrate intestinal region. Recent studies have demonstrated that an inadequate balance of VA can induce malformations in marine fish larvae. This impacting directly on the cost benefits of the activity, because of high mortality rates and low quality of the product. Malformations are known to be associated with abnormal expression of genes implicated in the early development and in the retinoic pathway in mammals and fish larvae. The present study is aimed to observe the effects of high rates of VA in the expression of RAR $\alpha$  and Hoxa5 genes in *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. For this purpose, a larvae culture was carried out in the Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) located at CICIMAR-IPN. Larvae were fed from 2 days after hatching (DAH) with live preys (rotifers and Artemia) enriched with a commercial emulsion (Super SELCO 3000<sup>®</sup>). For VA treatment a solution was prepared with 0.6 g VA (Vitamin A acetate, 20,000 UI/g, ICN – catalog number 160079) for each 500 g of SELCO. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed in order to detect retinol in live preys and larvae. A relative quantification of the gene expression was done by real time PCR using the chemistry SYBR-GREEN<sup>®</sup> in an ABI PRYSM 7000 SDS (Applied Biosystems) equipment. The partial sequences of 384pb. RAR $\alpha$  (NCBI Accession number 1088219) and 147 pb. Hoxa5 (NCBI Accession number 1088190) were obtained for *P. maculatofasciatus*. The data obtained from HPLC analyses were only qualitative because of problems concerning the enrichment protocol. For the reason of this, it was not possible to detect statistical differences between the treatments. But it was possible to describe the gene expression patterns of RAR $\alpha$  and Hoxa5. For RAR $\alpha$  an over expression was found at 5 DAH of 2x (respect to the calibrator) that increased up to 2.5x at 15 DAH. A down regulation was found at 20 DAH dropping to 1.5x on 30 DAH. A similar phenomenon has been observed in studies with European sea bass larvae, which some authors attribute to the importance of this receptors in cell differentiation during particular stages in development, and particular regions of the organism. For the spotted sand bass it has been demonstrated that during 5 to 15 DAH a mayor synthesis of proteins is occurring owed to drastic morpho physiological changes. This translates in a demand for the expression of the receptors needed for its regulation. The down regulation observed after 20 DAH probably reflected that the mayor changes in the development process were about to finish (between 16 and 20 DAH), so the receptor levels returned to 1x. The levels of expression for RAR $\alpha$  resembled in good manner the ones for Hoxa5 (2x at 5 DAH; 2.5x at 15 DAH; 1.5x at 20 DAH; 1x at 25 and 30 DAH). This could be explained in the same way as for RAR $\alpha$ , because Hoxa5 gene is the responsible for the regulation of cell differentiation processes in the abdominal region, so the great demand of new cells between 5 and 20 DAH was being reflected in the levels of expression of the gen. Hox genes are regulated during very specific windows of time, so for *P. maculatofasciatus* the window for Hoxa5 was found to be between 5 and 20 DAH. Finally, when observations of the malformed larva were performed, almost all cases were found to present malformations in the mandible region.

**Key words:** Vitamina A, Hox genes, fish larvae, *Paralabrax maculatofasciatus*.

## **DEDICATORIA**

A mi mama, con tu ejemplo, amor y dedicación me enseñaste lo valioso que es el trabajo y la disciplina. Gracias por apoyarme siempre y en todo!

A mi hermano, gracias por estar conmigo siempre, en las buenas y en las peores.

A la memoria de mi Padre.

A Brenda Arrellano, la mujer que da sentido a todo lo que hago, quien me entiende y comprende, a quien todo mi esfuerzo entrego. A ti, mi vida,

Te amo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente al CIBNOR por haberme dado la oportunidad de cursar este posgrado y facilitar sus instalaciones para poder realizar este trabajo de tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada para poder llevar a cabo mi estancia y mis estudios en el CIBNOR. (Becario num. 200968)

Al proyecto SAGARPA-CONACYT (num. 044) por haber solventado todos los gastos implicados en este trabajo de tesis.

Al CICIMAR-IPN, por facilitar sus instalaciones para poder llevar a cabo la crianza larvaria.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez, por toda su paciencia, asesoría, apoyo y conocimiento brindados durante todo este tiempo.

Al Dr. Roberto Civera Cerecedo, por su tiempo y su valiosa asesoría en la corrección de este trabajo y por toda su experiencia compartida, tanto fuera como dentro del salón de clases.

Al Dr. Vicente Gracia López, por sus valiosos comentarios, por su comprensión y paciencia, Gracias por todo tu apoyo.

Al M. en C. Jesús Neftalí Gutiérrez por todo su apoyo en la parte del análisis molecular.

A Patricia Hinojosa por todo su tiempo y paciencia en el laboratorio. A Ernesto Goytortua, por su apoyo en los cálculos de la vitamina A

Al M. en C. Martín Rosales Velásquez, por la compañía en el sistema de crianza, por toda su experiencia compartida y por todo el apoyo a la hora de las alimentaciones nocturnas. Gracias Martín.

Al M. en C. Tanos Grayeb del Alamo por su apoyo en la elaboración del alimento vivo y el enriquecimiento de la emulsión.

Al M. en C. Víctor Carrasco por toda su experiencia en el control de la calidad del agua, por todo su tiempo invertido en mejorar el SCC-18 y por tantas y tantas experiencias compartidas.

A todo el personal de control escolar y la oficina de posgrado, quienes siempre con buen humor y eficiencia me apoyaron en todos los trámites

Especialmente, al Maestro José Luis Ortiz Galindo. Quien siempre me ha apoyado, cultivado y enriquecido. Por compartirme su pasión por la Biología y la acuicultura.

Tú eres un verdadero formador de personas. Gracias amigo!

## INDICE DE CONTENIDO

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>1. Introducción</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Piscicultura marina   | 1         |
| 1.2. Malformaciones y genes Hox  | 2         |
| <b>2. Antecedentes</b>   | <b>6</b>  |
| 2.1. Nutrición de la cabrilla  | 6         |
| 2.2. Vitaminas   | 7         |
| 2.3. Vitamina A  | 8         |
| 2.4. Uso de retinoles en larvas de peces marinos   | 11        |
| 2.5. Técnicas de cuantificación de expresión genética<br>reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real                      | 14        |
| <b>3. Justificación</b>  | <b>16</b> |
| <b>4. Hipótesis</b>  | <b>17</b> |
| <b>5. Objetivo general</b>   | <b>17</b> |
| 5.1. Objetivos particulares  | 17        |
| <b>6. Materiales y métodos</b>   | <b>18</b> |
| 6.1. Crianza larvaria  | 18        |
| 6.1.1. Lote de reproductores   | 18        |
| 6.1.2. Siembra de los eleuteroembriones  | 18        |
| 6.1.3. Protocolo de alimentación y enriquecimiento   | 19        |
| 6.1.4. Evaluación del crecimiento y supervivencia  | 21        |
| 6.2. Cuantificación de la vitamina A por cromatografía   | 22        |
| 6.3. Análisis molecular  | 23        |
| 6.3.1. Extracción de RNA   | 23        |
| 6.3.2. Transcripción inversa del RNA   | 24        |
| 6.3.3. Clonación y secuenciación   | 24        |
| 6.3.4. Cuantificación en tiempo real de la expresión de los<br>genes <i>rarα</i> y <i>hoxa5</i>                                  | 25        |
| 6.4. Análisis estadísticos   | 29        |
| <b>7. Resultados</b>   | <b>30</b> |
| 7.1.1. Crianza larvaria  | 30        |
| 7.1.2. Crecimiento   | 31        |
| 7.2. Cuantificación de vitamina A por cromatografía  | 32        |
| 7.3. Cuantificación de la expresión de los genes <i>RARα</i> y <i>Hoxa5</i><br>de la cabrilla arenera durante la etapa larvaria. | 39        |
| 7.3.1. Secuenciación   | 39        |
| 7.3.2. Obtención y validación del cDNA   | 40        |
| 7.3.3. Curvas estándar   | 42        |
| 7.3.4. Cuantificación de la expresión de los genes <i>rarα</i> y <i>hoxa5</i>  | 44        |
| <b>8. Discusión</b>  | <b>47</b> |
| 8.1. Crianza larvaria  | 47        |
| 8.2. Crecimiento   | 47        |
| 8.3. Evaluación de la incorporación de vitamina a en el<br>alimento vivo y en las larvas   | 48        |
| 8.4. Cuantificación en tiempo real de la expresión de los<br>genes <i>rarα</i> y <i>hoxa5</i>                                    | 55        |
| <b>9. Conclusiones</b>   | <b>61</b> |
| 10. Recomendaciones para trabajos futuros  | 62        |
| 11. Bibliografía citada  | 63        |
| 12. Anexo  | 72        |



## INDICE DE TABLAS

| Tabla |   | Página |
|-------|---|--------|
| I.    | Vitaminas liposolubles. Función fisiológica y efectos negativos por bajas concentraciones o deficiencia en la administración en peces   | 8      |
| II    | Oligonucleótidos utilizados para la búsqueda del gen Hoxa5 y RAR $\alpha$ en la cabrilla arenera  | 25     |
| III   | Oligonucleótidos (OLIGOS) utilizados para la cuantificación mediante PCR en tiempo real con bioquímica SYBR-GREEN del gen Hoxa5, RAR $\alpha$ y GAPDH de la cabrilla arenera          | 26     |
| IV    | Concentración de los reactivos utilizados para la reacción de PCR en tiempo real con bioquímica SYBR-GREEN para la cuantificación del gen Hoxa5 y RAR $\alpha$ en la cabrilla arenera | 26     |
| V     | Factores ambientales monitoreados diariamente a lo largo de la crianza larvaria   | 30     |
| VI    | Secuencias específicas de los genes Hoxa5 y RAR $\alpha$ para la cabrilla arenera obtenidas en este trabajo   | 40     |

## INDICE DE FIGURAS

| Figura |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Fórmulas y nomenclatura de los retinoides y carotenoides mas comunes: A retinol <i>all-trans</i> ; B, retinal <i>all-trans</i> ; C, ácido retinoico <i>all-trans</i> ; D, 3-dehidroretinol (Vit A2); E <i>11-cis</i> retinal; F, 4-oxo ácido retinoico; G retinil palmitato; H, Retinil fosfato; I, retinol 3-glucuronida; J, retinotaurina; K, trimetilina thoxifenil /análogo de etil retinoato; M, <i>all-trans</i> β-caroteno; N, α-carotene (tomado de Olson, 1993) | 9      |
| 2      | Fotografía del sistema de crianza larvaria de circulación cerrada (SCC-18) instalado en la UPIMA del CICIMAR-IPN   | 19     |
| 3      | Casos de malformaciones encontrados en larvas cultivadas en los tanques bajo el tratamiento con vitamina A. Fotografía A.- Larva de 15 DDE con lordosis; B.- Larva de 10 DDE con malformación en mandíbula inferior; C.- Juvenil de 20 DDE con malformación en mandíbula inferior; D.- Juvenil de 30 DDE con malformación en mandíbula inferior  | 31     |
| 4      | Crecimiento observado durante la cría larvaria de la cabrilla arenera. DDE días después de la eclosión. Cada punto representa el promedio de cuatro individuos. Las barras representan su desviación estándar  | 32     |
| 5      | Cromatograma de la estandarización de la técnica con leche comercial fortificada con vitamina A. Leche normal = sin filtrar. Leche con limpieza = filtrada con malla con 0.22 μm de luz  | 33     |
| 6      | Cromatograma HPLC de una muestra de 80 mg de larvas de cabrilla del control sin VA   | 34     |
| 7      | Cromatograma HPLC de la inyección de una muestra de 68.7 mg de larvas de cabrilla de los tanques del tratamiento VA  | 34     |
| 8      | Cromatograma HPLC de rotíferos enriquecidos con vitamina A (lote 3, 1.682 g) y de Artemia enriquecida con vitamina A (lote 4, 0.727 g).  | 35     |
| 9      | Cromatograma HPLC de larvas del testigo de los 5 a los 15 DDE (Lote 5. 0.345 g) y larvas testigo de los 20 a los 30 DDE (Lote 6.1.0124 g)  | 36     |
| 10     | Cromatograma HPLC de larvas del tratamiento de los 5 a los 15 DDE (Lote 7. 1.682 g) y de larvas del tratamiento de los 20 a los 30 DDE (Lote 8. 0.727 g)   | 37     |
| 11     | Cromatograma HPLC de muestras de leche comercial fortificada con vitamina A de 25 y 50 μl respectivamente  | 38     |
| 12     | Electroforesis en gel de agarosa al 2% de una PCR para Oligonucleótidos de Hoxa 5 (A) y RARα (B) con cDNA de intestino de cabrilla. (Escalera molecular de 50 pbs)   | 39     |
| 13     | Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del cDNA de larvas de cabrilla arenera, utilizando los Oligonucleótidos comerciales para el gen 18s (Applied Biosystems). Escalera molecular de 50 pbs (carriles del 1 al 36 cDNA proveniente de larvas de los tanques con tratamiento y tanques control). Gel utilizado para analizar ausencia o presencia de producto   | 41     |
| 14     | Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen Hox a5 mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10. concentración inicial 50 ng/μL). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas  | 43     |

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 15     | Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen RAR $\alpha$ mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas   | 43     |
| 16     | Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen GAPDH mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas  | 44     |
| 17     | Cuantificación relativa de la expresión del gen Hoxa5 normalizado con el gen GAPDH. (Cada columna representa el valor promedio de 4 réplicas y las barras representan su desviación estándar. (Los valores en la Figura están normalizados con logaritmo base 10)   | 45     |
| 18     | Cuantificación relativa de la expresión del gen RAR $\alpha$ normalizado con el gen GAPDH. (Cada columna representa el valor promedio de 4 réplicas y las barras representan su desviación estándar. (Los valores en la Figura están normalizados con logaritmo base 10)  | 46     |
| 19-A   | Malformaciones inducidas en el cráneo de larvas de 40 DDE de <i>D. labrax</i> . (1.-a) larva normal, (1.-b) larva deforme. (se indican las estructuras anormales). Individuos teñidos con rojo de Alizarin para revelar estructuras calcificadas. Abreviaturas: <i>a</i> , angular; <i>bbr</i> , radios branquiales; <i>bo</i> , basioccipital ; <i>d</i> , dentario; <i>eo</i> , exoccipital ; <i>f</i> , frontal; <i>hm</i> , hyomandibular ; <i>io</i> , íter opérculo; <i>mx</i> , maxila; <i>o</i> , opérculo <i>pasph</i> , parasfenoides; <i>pcbr</i> , lamina paracerebralis; <i>pmx</i> , premaxila; <i>po</i> , preopérculo; <i>ptbr</i> , proceso pterigoideo; <i>so</i> , subopérculo. (tomada de Villeneuve <i>et al</i> , 2006) | 59     |
| 19-B   | Juvenil de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> de 30 DDE con malformación en mandíbula inferior (generada en este estudio)  | 59     |
| 20     | Curvas de disociación para el gen de la GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)  | 72     |
| 21     | Curvas de disociación para el gen Hoxa5. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)  | 72     |
| 22     | Curvas de disociación para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)  | 73     |
| 23     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)   | 73     |
| 24     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)   | 74     |
| 25     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen Hoxa5. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)   | 74     |
| 26     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen Hoxa5. Generado en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)   | 75     |
| 27     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems)   | 75     |

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 29     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems) | 76     |
| 30     | Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN <sup>®</sup> (Applied Biosystems) | 77     |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PISCICULTURA MARINA

En la piscicultura marina, la nutrición juega un papel fundamental para lograr una tasa de supervivencia elevada y por tanto una producción comercialmente rentable. En la actualidad, la alimentación larvaria de la mayoría de los peces marinos, aún depende exclusivamente de la producción de cultivos de apoyo con los que se proporcionan organismos vivos como único alimento a las larvas (Cheng-Sheng, 2003). Es en este periodo donde se concentran los mayores problemas tanto logísticos como operacionales y donde recae aproximadamente el ~50% del costo total de la producción (Álvarez-González, 2001). Los cultivos de apoyo constan de la producción de microalgas, rotíferos (*Brachionus* spp.) y Artemia (*Artemia* sp.) que demandan una infraestructura especializada en donde los volúmenes de los tanques de cultivo triplican los de las propias larvas, aumentando considerablemente los costos. Por tanto, la tendencia de la industria en general es disminuir en tiempo y cantidad el uso de alimento vivo. Esto es posible lograrlo con la elaboración de alimentos inertes que satisfagan los requerimientos nutricionales de los peces. En este sentido, es fundamental conocer también los efectos del alimento sobre los niveles de expresión de los genes involucrados en el control del desarrollo embrionario de las larvas (Gatesoupe, 1999; Cahu *et al.*, 2003), ya que un balance inadecuado de algunos nutrimentos como las vitaminas, puede causar malformaciones en aproximadamente el 10% de los individuos cultivados, lo que impacta en la rentabilidad de la actividad debido a las altas tasas de mortalidad y la disminución en la calidad del producto (Zambonino-Infante, *et al.* 2005).

## 1.2. MALFORMACIONES Y GENES HOX

Los factores que pueden causar malformaciones en los peces de cultivo son diversos y de manera general se pueden clasificar en tres tipos: físicos (hidrodinámica, temperatura, salinidad e intensidad lumínica inadecuadas), químicos (pH inadecuado y alimentos mal formulados) y biológicos (genéticos, densidad de siembra elevada y competencia), (Zambonino-Infante *et al.*, 2005).

En un sistema de crianza, algunas de las malformaciones más comúnmente observadas son: malformaciones esqueléticas de la espina dorsal (escoliosis, lordosis, variación en el número de vértebras); reducción del número de radios y espinas en aletas y malformaciones del aparato mandibular (Peddie, 2004). El mayor riesgo de estos problemas se presenta durante el periodo embrionario y larvario. Esto se debe a que las larvas de peces marinos experimentan cambios muy drásticos tanto morfológicos como funcionales durante las fases iniciales del desarrollo (Cahu *et al.*, 2003).

Al momento de la eclosión, los embriones son bastante frágiles y son muy vulnerables a los factores ambientales, tales como temperatura, dinámica del agua, entre otros. Así como también a los factores nutricionales. A nivel del aparato digestivo, presentan un sistema compuesto solamente de un tubo recto, indiferenciado histológica y funcionalmente. Al finalizar la absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite, dicho tubo se segmenta y desarrolla válvulas musculares, bucofaringe y se diferencia en las porciones anterior, media y posterior (Govoni, 1980). Aunque el hígado y el páncreas están presentes desde el momento de la eclosión, no es sino hasta la finalización del periodo larvario (18-20 DDE

dependiendo de la especie) cuando adquieren toda su complejidad morfológica y funcional (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Es hasta entonces cuando el organismo adquiere toda su capacidad digestiva.

Además de los cambios drásticos en la fisiología digestiva, ocurren a la par cambios osteológicos muy importantes. Particularmente en la región del neurocráneo, el aparato mandibular, la espina dorsal y los elementos óseos de las aletas pares e impares (Villeneuve *et al.*, 2006).

A nivel celular, algunos de los reguladores moleculares que controlan todos estos cambios se encuentran los factores transcripcionales de los genes de la familia *Hox* (Charité *et al.*, 1998). Los genes *Hox* se organizan en complejos geonómicos denominados “clusters” y codifican una gran gama de factores transcripcionales (esto es, los *Hox* son genes que controlan la expresión de otros genes a través de la expresión de dichos factores). Esta expresión, se encuentra sincronizada en espacio y tiempo. Durante el desarrollo embrionario, los genes *Hox* en los clusters más anteriores se expresan más temprano y en regiones más anteriores del embrión. Mientras que los genes mas posteriores se expresan mas tarde y en regiones mas distales del embrión (Mayr, 2001).

En la actualidad, es bien reconocido que la complejidad en los patrones corporales de los organismos durante el proceso evolutivo está directamente relacionada con la complejidad de los clusters de genes *Hox* que presente. Los invertebrados presentan un solo cluster, y se piensa que el ancestro de todos los cordados, muy probablemente poseía un solo cluster con 13 genes (Mayr, 2001). En vertebrados se han identificado 40 genes *Hox* organizados en 4

clusters: *A*, *B*, *C* y *D*. Cada cluster se encuentra en cromosomas diferentes y coordina la organización celular y el desarrollo de una región específica del embrión. Particularmente, los genes del cluster *A* se han descrito como los encargados de la regulación antero-posterior de la región intestinal (Sordino *et al.*, 1996).

En embriones de peces marinos y en vertebrados en general, durante la organogénesis, el sistema gastrointestinal se desarrolla por la organización progresiva de células del endodermo visceral en asociación con las del mesodermo esplácnico (Kardon, 2001). En esta región específicamente, el gen *Hoxa5* perteneciente a la familia caudal del complejo *HoxA*, es uno de los responsables en controlar la organización celular antero-posterior del intestino (Freund *et al.*, 1998).

En el larvicultivo intensivo de peces marinos uno de los mayores problemas es la falta de dietas adecuadas ya que esto repercute directamente en la calidad del producto, lo que causa bajos rendimientos, malformaciones y altas tasas de mortalidad (Kolkovski, 2005). Es por esto que en los últimos años la gran mayoría de los proyectos de investigación han sido encaminados hacia el mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales de algunos de los componentes más importantes en las dietas, tales como: ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, vitaminas, inmunoestimulantes, probióticos y prebióticos.

En la piscicultura marina un producto de calidad se define como un individuo con una conformación corporal normal y que posee la aptitud de continuar su desarrollo hasta la fase adulta (Cahu *et al.*, 2003). Desafortunadamente, en la actualidad en todos los cultivos intensivos se siguen observando un gran número de larvas de baja calidad, en donde los



casos de malformaciones siguen siendo la principal causa de muerte (Boglione *et al.*, 2001 citado por Cahu *et al.*, 2003).

Diversos factores pueden producir malformaciones en las larvas. Sin embargo, la gran mayoría de la evidencia científica indica que un alimento mal formulado proporcionado en las fases iniciales del desarrollo, es el principal factor. En este sentido, diversos estudios se han enfocado en el rol de las vitaminas y se ha descubierto que las concentraciones utilizadas tienen una gran responsabilidad en el desarrollo osteológico (Takeuchi *et al.*, 1998). Debido a esto, la descripción de los efectos biológicos de las vitaminas y el entendimiento de los mecanismos moleculares en los que actúan, son muy valiosos para incrementar la calidad en la producción. Es por esta razón que en este trabajo de tesis se planteo como objetivo general evaluar el efecto del alimento vivo enriquecido con altos niveles de VA sobre la expresión de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$*  en el desarrollo inicial de la cabrilla arenera. Ya que como se ha venido mencionando, algunas de las malformaciones observadas en larvas de peces son inducidas por altas concentraciones de vitaminas en la elaboración de los alimentos y dichas malformaciones se cree están asociadas con cambios en la expresión normal de genes implicados en el desarrollo embrionario.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. NUTRICION DE LA CABRILLA

En cuanto a los estudios de nutrición de la cabrilla arenera, Anguas-Vélez *et al.* (2000) realizaron el primer intento para sustituir el alimento vivo por dietas inertes, encontrando mejores tasas de supervivencia a los 30 días después de la eclosión. Posteriormente, Álvarez-González *et al.* (2001a) determinaron los niveles óptimos de proteína en la elaboración de alimentos inertes para alimentar juveniles y Álvarez-González (2003) estudió la ontogenia enzimática hasta el periodo juvenil y realizó la optimización de dietas inertes para la nutrición de la cabrilla arenera. Civera *et al.* en el 2002 publicaron una compilación de toda la información generada hasta ese momento en los avances sobre la nutrición de la cabrilla arenera.

En el 2003 Peña y colaboradores, realizaron los primeros estudios histológicos e histoquímicos para describir el desarrollo del tracto digestivo de la cabrilla, encontrando que al momento de la eclosión, el tracto se encontraba indiferenciado en un tubo recto. A los 2 DDE, el saco vitelino se había agotado casi por completo y observaron la abertura de la boca y el ano. Al día 5 DDE el tracto digestivo se encontraba completamente diferenciado en bucofaringe, esófago, estomago, intestino anterior, posterior y recto. Histoquímicamente, pocos días después de la primera alimentación el hígado mostró una constante acumulación de glicógeno. A los 4 DDE encontraron un gran número de vacuolas supranucleares positivas NS (Ninhydrin-Shiff). Para los 16 DDE las glándulas digestivas y ciegos pilóricos estaban presentes. Concluyendo con esto, según los autores, con la maduración morfológica del tracto digestivo.

Guzmán-Villanueva (2008), alimentó a larvas de cabrilla arenera, con una dieta microparticulada y enriquecida con levaduras productoras de poliaminas, desde los 22 a los 32 días después de la eclosión y logró obtener los mejores niveles de supervivencia reportados hasta el momento (13.0%).

## **2.2. VITAMINAS**

Las vitaminas son sustancias orgánicas esenciales requeridas en bajas dosis para el crecimiento, reproducción y mantenimiento celular. De manera general, las vitaminas pueden ser clasificadas en dos grupos: liposolubles e hidrosolubles. En el grupo de las hidrosolubles se encuentra la biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico (B3), riboflavina (B2), tiamina (B1), piridoxina (B6) cianocobalamina (B12) y ácido ascórbico (C). En el grupo de las liposolubles están las vitaminas A, D, E y K (Tabla I) (Wolf, 2002). Las vitaminas liposolubles son absorbidas en el intestino e hígado junto con los lípidos y pueden ser almacenadas como reservas. Por tanto, el exceso en la administración de estas vitaminas puede tener repercusiones negativas y acarrear problemas fisiológicos (Cahu, *et al.*, 2003).

Tabla I. Vitaminas liposolubles. Función fisiológica y efectos negativos por bajas concentraciones o deficiencia en la administración en peces

| <b>VITAMINA</b> | <b>FUNCIÓN</b>  | <b>EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN SU ADMINISTRACIÓN</b>       |
|-----------------|---|--|
| Retinoles (A)   | Visión<br>Crecimiento celular<br>Resistencia a infecciones<br>Maduración del tracto digestivo | Perdida de visión,<br>malformaciones óseas,<br>hemorragias |
| Vitamina D      | Controla los niveles de calcio en sangre  | Desconocidas   |
| Vitamina E      | Antioxidante, respiración celular y muscular  | Anemia, crecimiento reducido                               |

(Moyle y Cech, 1982; Olson, 1993 ; Cahu *et al.*, 2003.)

### 2.3. VITAMINA A

La vitamina A (VA) es un nombre genérico que describe a todos los compuestos químicos que presentan la misma actividad biológica que el retinol (Giménez *et al.*, 2007). Es esencial para diversas funciones tales como: visión, crecimiento, reproducción, roles hormonales y tiene implicaciones importantes en la morfogénesis y la diferenciación celular en vertebrados (Ross *et al.*, 2000; Von Linting y Vog, 2000). La VA es un compuesto incoloro liposoluble que puede existir en diversas formas (Figura 1): alcohol VA, aldehído VA y ácido de VA. El alcohol es la forma más común y es conocida como retinol (ReOH). El aldehído es conocido como retinal y el ácido se denomina ácido retinoico (RA). La vitamina A2 (dehidroretinol) difiere del retinol en que tiene un doble enlace extra y tiene solo el 40% de actividad biológica (Olson, 1993). El RA es el derivado más activo biológicamente y puede existir en dos formas: RA 9-*cis* y RA all-*trans*

(Webster, 2000). Los vertebrados en general, son incapaces de sintetizar la VA *de novo*, el retinol y todos sus derivados son C<sub>20</sub> isoprenoides que se derivan metabólicamente de la oxidación de los carotenoides (Olson, 1993; Krinsky, 1994).

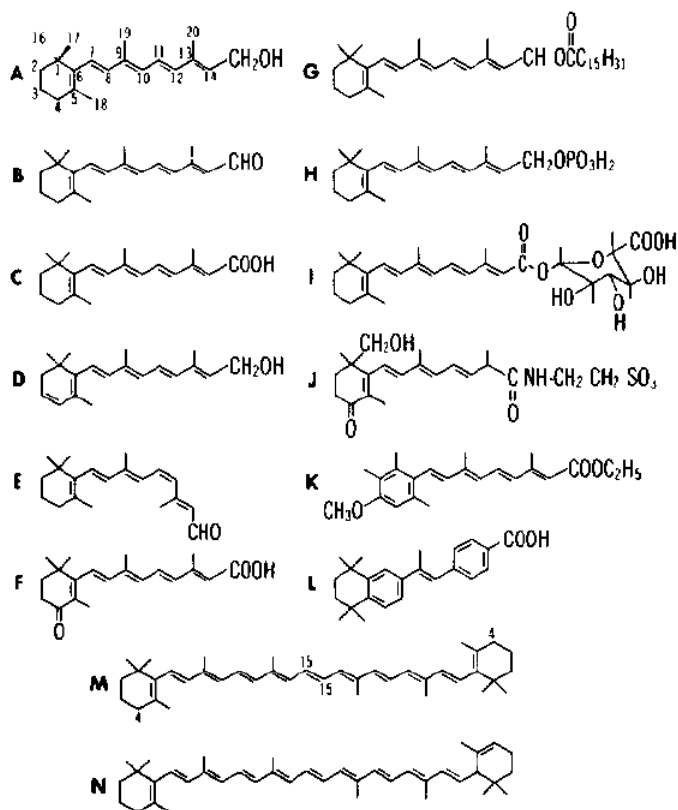


Figura 1. Fórmulas y nomenclatura de los retinoides y carotenoides mas comunes: A retinol *all-trans*; B, retinal *all-trans*; C, ácido retinoico *all-trans*; D, 3-dehidroretinol (Vit A2); E 11-*cis* retinal; F, 4-oxo ácido retinoico; G retinil palmitato; H, Retinil fosfato; I, retinol 3-glucuronida; J, retinotaurina; K, trimetilina thoxifenil /análogo de etil retinoato; M, *all-trans* β-caroteno; N, α-carotene (tomado de Olson, 1993).

La VA es transportada y almacenada en el hígado principalmente como palmitato de VA (VAp). El VAp es hidrolizado a Retinol y transportado a la célula objetivo, el cual posteriormente es oxidado a RA dentro de la célula por diversas aldehído-deshidrogenasas (Nagao y Olson, 1994). Dichas enzimas, se pueden encontrar en el citoplasma, mitocondrias y retículo endoplásmico. Comprenden una familia extensa y heterogénea de

proteínas que participan en el metabolismo de esteroides, prostaglandinas, alcoholes alifáticos y xenobióticos, además de los ya mencionados retinoles (Liden y Ericsson, 2005). La entrada del RA al núcleo de la célula esta regulada mediante la acción de distintos receptores de membrana, los RAR's (Retinoic Acid Receptor), los cuales son miembros de la súper familia de receptores nucleares NR (Nuclear Receptors). Existen tres tipos distintos de RARs, el RAR $\alpha$  (NR1B1), el RAR $\beta$  (NR1B2) y el RAR $\gamma$  (NR1B3) (Guillespie, *et al.*, 2007). Los tres reconocen el RA 9-*cis* y el RA all-*trans* (Nagao y Olson, 1994).

El RA y sus análogos metabólicos actúan como inductores de genes involucrados en el desarrollo, la diferenciación celular y la expresión de proteasas de matriz e integrinas de la membrana basal, ambas responsables de la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal (Ross *et al.*, 2000), así como en la regulación de la expresión de mas de 500 genes, incluidos los genes de la familia Hox (Ross *et al.*, 2000). La expresión de los genes Hox mediante el RA es activada con la unión del RA con los RAR y finalmente con los elementos de respuesta (ER) al RA en el gen diana. Formando los heterodímeros conocidos como RARE (**R**etinoic **A**cid **R**esponse **E**lements) (Guillespie *et al.*, 2007).

Las diferencias en la concentración de RA son cruciales para el desarrollo embrionario normal ya que los genes Hox difieren en la sensibilidad que presentan al RA. La posición del gen en el cluster esta correlacionada con su respuesta al RA. Los genes que se encuentran en la región 3' del cluster presentan una sensibilidad mayor al RA que los que se encuentran en regiones 5' (Cañestro y Postlethwait, 2007).

El RA que en el plasma se encuentra en concentraciones inferiores a  $1\mu\text{M}$  (Accordi, 2006), es un importante regulador en las funciones de reproducción y crecimiento celular. Sin embargo, en altas concentraciones puede ser citotóxico causando supresión del crecimiento, teratogénesis y/o apoptosis. Particularmente, en peces marinos Teleósteos, la deficiencia de retinoles genera retardos en el crecimiento, mala visión, anorexia, anemia y muerte (Haga *et al.*, 2006). Por otro lado, el exceso induce anormalidades en el desarrollo de embriones, hemorragias y deformidades óseas, así como malformación o incluso pérdida de la región cefálica (Haga *et al.*, 2002).

#### **2.4. USO DE RETINOLES EN LARVAS DE PECES MARINOS**

En 1995 Dedi *et al.* citado en Cahu *et al.*(2003) experimentaron con *Paralichthys olivaceus* alimentándolos con 6 concentraciones distintas de vitamina A (1, 45, 416, 585, 840, 1280 IU/g de materia seca), encontrando que con concentraciones elevadas se presentan elevados porcentajes de deformidades en embriones y larvas y particularmente la incidencia de malformaciones en la columna vertebral, así como en la fusión y compresión de vértebras.

En el 2002, Haga y colaboradores, investigaron los efectos del ácido retinoico *all-trans* (al-AR) sobre los patrones de pigmentación y formación osteológica en larvas de distintos periodos de desarrollo del lenguado *Paralichthys olivaceus*. Las larvas fueron alimentadas con presas vivas enriquecidas con 0.5 ml de aceite de ácido docosahexaenoico (DHA) que contenía además 100 mg (por cada 10 l de medio de cultivo) de *all-trans*-RA. Las larvas que fueron alimentadas con RA durante los primeros estadios de vida, presentaron albinismo y defectos en mandíbulas y vértebras caudales (albinismo 75.7%, defectos en

mandíbulas 75%, defectos caudales 100%). Las larvas que fueron alimentadas con la misma dosis de AR, pero durante periodos mas tardíos, presentaron los mismos defectos, mas sin embargo, no fueron tan evidentes (porcentajes menores en todos los casos). Por tanto, estos autores concluyen que el efecto del AR es dependiente del estadio de desarrollo y que dicho efecto es inducido por la acumulación del AR en las presas vivas (en rotíferos 13mg/g y en Artemia 1.6 mg/g) durante el enriquecimiento.

En el 2005, Villeneuve y colaboradores, alimentaron larvas de *Dicentrarchus labrax* desde el día 7 hasta el día 42 después de la eclosión con distintos niveles de vitamina A. Evaluaron los efectos sobre el crecimiento, morfología y desarrollo osteológico en larvas alimentadas con dietas isoproteicas e isolipídicas enriquecidas con distintos niveles de retinil acetato (0, 10, 50, 250 y 1000 mg/kg base seca) equivalentes a la incorporación de 12, 13, 31, 62 y 196 mg de retinol *all-trans* (mg/kg base seca) respectivamente. Las larvas que fueron alimentadas con los niveles mas altos de RA, presentaron pesos menores (27% menos) en comparación al grupo control. Además de que el 78% de ellas presentaron malformaciones severas en el cráneo, páncreas e intestino. En este trabajo los autores determinaron que la dosis óptima de vitamina A se encuentra cerca de los 31 mg/ kg para esta especie y que existe una correlación lineal entre el nivel de vitamina A y el porcentaje de malformaciones de las larvas.

Villeneuve *et al.* (2006) demostraron que en *Dicentrarchus labrax* la hipervitaminosis A y elevadas concentraciones de distintos retinoles son los causantes de malformaciones en organismos entre los 8 y 13 días después de la eclosión. Estos autores atribuyen dichas malformaciones a una sobre regulación de los genes codificantes de los receptores de



membrana RAR (Retinoic Acid Receptor) y RXR (Retinoid X Receptor) los cuales están implicados en la entrada de los retinoles al núcleo celular.

En el 2007, Giménez y colaboradores, evaluaron la acumulación de vitamina **A** durante el enriquecimiento de presas vivas (*Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia*) utilizando como vehículo para la vitamina una emulsión comercial (SELCO). En este trabajo, utilizaron 124, 138, 151, 165, 178, 192, 226, 259 y 327 µg totales de vitamina **A** para la emulsión proporcionada a los rotíferos y en el caso de la *Artemia* utilizaron 494, 548, 602, 629, 710, 764, 899, 1034 y 1334 µg de vitamina **A**. Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) determinaron que la incorporación de la vitamina **A** en rotíferos es constante hasta llegar a una asíntota entre los 226 y los 327 µg (806 ng de vitamina en rotíferos enriquecidos con 327 µg de vitamina). Asimismo para nauplios de *Artemia* (4.0 ng en nauplios enriquecidos con la emulsión con 1334 µg de vitamina). De esta forma, los autores determinaron que los niveles de incorporación de vitamina **A** en rotíferos y *Artemia* no es dependiente de la concentración en la emulsión y esto lo atribuyen a que las presas vivas son capaces, en cierta manera, de absorber y metabolizar la vitamina **A** durante el proceso de enriquecimiento.

Dobbs-McAuliffe *et al.* (2004) documentaron la regulación del metabolismo de RA en embriones de *Danio rerio* (zebrafish) estudiando la expresión de dos enzimas involucradas en el metabolismo de RA (**raldhs** enzimas que producen RA desde el retinal y **cyp26s** enzimas que inactivan el RA). Encontraron que el patrón de disponibilidad del RA en el embrión es muy dinámico y las concentraciones de RA varían en diferentes tejidos y en diferentes tipos de células a lo largo del desarrollo.

## **2.5. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE EXPRESION GENÉTICA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL**

Para realizar análisis detallados de la expresión genética, es necesario contar con herramientas básicas de biología molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por medio de esta técnica, es posible obtener una gran cantidad del material genético deseado y con el diseño de oligonucleótidos específicos es posible detectar y amplificar un gran número de veces un fragmento de interés, con lo que es posible llevar a cabo el análisis de la expresión de uno o varios genes en particular con la máxima exactitud.

Muchos de los procesos celulares involucrados en la diferenciación, crecimiento y supervivencia se ven reflejados en los patrones de expresión genética (Bustin, 2000). Por esta razón, la habilidad de cuantificar los niveles de expresión ha sido central en la nutrición (Kendall y Latchman, 1996). Los estudios de la regulación de la expresión genética dependen de técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de mRNA que codifica para dichas proteínas. En la actualidad existen diversos métodos que se han desarrollado con este propósito (Reue, 1998) y de manera general se pueden catalogar dentro de dos tipos: los métodos semi-cuantitativos y los de cuantificación absoluta.

Cuando se realizan métodos semi-cuantitativos es común cometer errores debido a que es difícil determinar con precisión la concentración inicial de la muestra. Además resulta arriesgado hacer inferencias cuando las muestras provienen de diferentes organismos (Reue, 1998). Actualmente, el método de semi-cuantificación más aceptado consiste en amplificar simultáneamente con la muestra problema, un gen que se exprese

constantemente en un nivel basal en diferentes tejidos, en todos los periodos del desarrollo y que no se vea afectado por el tratamiento del experimento (los mas comunes son  $\beta$ -actina, GAPDH, ARNr 18s e histona H3). Esto se realiza con el fin de tener una referencia de expresión basal para poder calcular una tasa relativa de expresión diferencial del gen de interés (Bustin, 2000).

Por otro lado, los métodos de cuantificación absoluta de productos de PCR fueron posibles solo hasta la invención de la PCR en tiempo real (Heid *et al.*, 1996). Esta técnica consiste en una reacción de PCR a la que se adiciona una molécula que emite fluorescencia cuando se asocia a una doble hebra de DNA. De esta manera, en la síntesis de productos al transcurso de la PCR, la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad del gen amplificado (Heid *et al.*, 1996).

En el mercado existen muchos instrumentos con lo que se pueden realizar reacciones de PCR en tiempo real. Uno de ellos es el ABI Prism 7000<sup>®</sup> de la compañía Applied Biosystems, el cual consta de un termociclador con 96 pozos y una lámpara de tungsteno que detecta fluorescencia entre los 500 y 600 nm. La fluorescencia es detectada a lo largo de la PCR al emitir luz LASER a los 96 pozos. La emisión de fluorescencia es detectada en tiempo real mediante una cámara denominada Charged Copled Divise (CCD), la cual transmite la información a una computadora (Bustin, 2000).

Además de que la PCR en tiempo real permite cuantificar de manera absoluta los productos, con esta técnica, ya no es necesaria la utilización de geles de agarosa, con lo que se reducen los pasos para llegar a los resultados. Además, se eliminan los riesgos de contaminación, ya que no es necesario el uso de compuestos cancerígenos como el bromuro de etidio.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, en los lugares donde se realiza la piscicultura marina intensiva a nivel comercial es común observar un gran número de larvas de baja calidad (Zambonino-Infante, *et al.* 2005), en donde los casos de malformaciones representan cerca del 10 % (Boglione *et al.*, 2001, citado por Cahu *et al.*, 2003; Peddie, 2004). Estudios recientes han demostrado que muchas de las malformaciones observadas en larvas de peces son inducidas por altas concentraciones de vitaminas en la elaboración de alimentos inertes (Cahu *et al.*, 2003). Dichas malformaciones se cree están asociadas con cambios en la expresión normal de genes implicados en el desarrollo embrionario y en las rutas retinoicas (Villeneuve *et al.*, 2005). Por lo que en este estudio se pretende observar los efectos que causan altos niveles de Vitamina A, en la expresión de dos de los genes implicados en el control del desarrollo inicial de la cabrilla arenera. Dado que es una especie con gran potencial de cultivo en México.

#### **4. HIPÓTESIS**

El enriquecimiento del alimento vivo con una alta concentración de vitamina A provocará un aumento significativo en la expresión de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$* , durante el desarrollo inicial de la cabrilla arenera.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del uso de alimento vivo enriquecido con una alta concentración de vitamina A sobre la expresión de los genes *Hoxa5*, y *RAR $\alpha$*  durante el desarrollo inicial de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

##### **5.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Medir la incorporación de vitamina A, por enriquecimiento, en el alimento vivo, así como en las larvas de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.
2. Cuantificar los niveles de expresión del RNA mensajero de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$* , en larvas de cabrilla arenera alimentadas con presas vivas enriquecidas con una alta concentración de vitamina A, y sin enriquecer.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. CRIANZA LARVARIA**

#### **6.1.1 LOTE DE REPRODUCTORES**

Se capturaron peces adultos de campo en las inmediaciones de la Bahía de La Paz, los cuales se mantuvieron en observación y bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), salinidad (35 ppm) y fotoperíodo hasta lograr su aclimatación. Siguiendo la metodología propuesta por Rosales-Velásquez (1997) se obtuvo un desove espontáneo en el laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN.

#### **6.1.2 SIEMBRA DE LOS ELEUTEROEMBRIONES**

Del lote de reproductores, se obtuvo un desove de 80 ml, el cual se sembró en el sistema de circulación cerrada (SCC-18) dentro de tanques de fibra de vidrio con un volumen de 120 l (Figura 2), que se encuentra ubicado en la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) del CICIMAR-IPN. Cada tanque se llenó con 100 litros de agua de mar. Se contabilizaron volumétricamente 6000 eleuteroembriones de acuerdo al método propuesto por Rosales-Velásquez (1997). Los eleuteroembriones fueron depositados en los tanques para obtener una densidad de siembra de 50 individuos por litro estimando una tasa de eclosión del 95 % (Álvarez-González, 2001a). En dicho sistema se utilizaron 6 tanques para llevar a cabo los desarrollos larvarios correspondientes a este trabajo. De los cuales, 3 tanques se utilizaron como controles positivos (sin enriquecimiento del alimento con VA) y 3 tanques se utilizaron para el tratamiento de enriquecimiento del alimento vivo con VA.



Figura 2. Fotografía del sistema de crianza larvaria de circulación cerrada (SCC-18) instalado en la UPIMA del CICIMAR-IPN

### 6.1.3 PROTOCOLO DE ALIMENTACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO

La alimentación exógena inició a partir de los dos días después de la eclosión (DDE), que es cuando concluye la absorción del saco vitelino en la cabrilla arenera (Álvarez-González *et al.*, 2001a). Las larvas fueron alimentadas a saciedad aparente tres veces al día (08:00, 14:00 y 18:00) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) durante los primeros 15 días. Los siguientes 10 días se alimentaron con nauplios de dos días de Artemia (*Artemia* sp. Microfeast Artemia Cyst, Burns Philp Foods Inc., Oklahoma, USA). Para culminar alimentándolas con juveniles de Artemia de 5 días hasta los 30 DDE. El alimento vivo proporcionado a las larvas fue enriquecido con una emulsión comercial (Super Selco 3000 INVE Aquaculture Inc.) a razón de 0.1 g de Selco por cada millón de Rotíferos y 0.1 g de Selco por cada 300,000 nauplios de Artemia, según la dosis recomendada por el fabricante. Durante el experimento, el alimento vivo se cosechó todos los días y se puso en contacto con el enriquecedor 3 horas antes de ser proporcionado a las larvas. Para el tratamiento con

vitamina A, se preparó diariamente una solución en completa oscuridad, diluyendo 0.6 g de vitamina A (Acetato de Vitamina A, 20,000 UI/g, ICN - Numero de catalogo 160079 EUA) por cada 500 g de SELCO. La cual posteriormente se colocaba en botellas de vidrio ambar, se adicionaban los organismos y se mantenía con aireación constante y a una temperatura constante de 23°C. Posterior al periodo de enriquecimiento, los organismos enriquecidos fueron vertidos directamente a los tanques del cultivo larvario sin un enjuague previo.

Todos los días antes de la primera alimentación (08:00 horas) se realizaba el monitoreo de los siguientes factores ambientales: salinidad, temperatura, oxígeno disuelto y pH. Asimismo, se cuantificaron los niveles de amonio y nitrito siguiendo el método de Strickland y Parsons (1967). La toma de muestras de las larvas se realizó a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 DDE. Las muestras se tomaron por la mañana antes de la rutina de limpieza de los tanques y antes de la primera alimentación. En cada muestreo se tomaron 70 individuos para el análisis molecular y 20 individuos para el análisis con la técnica de cromatografía. Los especímenes destinados al análisis molecular se incluyeron inmediatamente en la solución comercial RNA Later® (Ambion Applied Biosystems, EUA), la cual es un buffer que permite conservar el RNA por periodos prolongados de tiempo. Las muestras destinadas para la técnica de cromatografía se protegieron con papel aluminio para evitar la degradación de los retinoles por fuentes luminosas y se congelaron a -20 °C, siguiendo las recomendaciones de Zambonino-Infante (comunicación personal).



#### 6.1.4. EVALUACION DEL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Durante cada día de muestreo (5, 10, 15, 20, 25 y 30 DDE) se tomaron 4 organismos de cada tanque para evaluar el crecimiento. Cada individuo fue sacrificado con anestésico (MS-222) para posteriormente capturar una imagen digital con un digitalizador de imágenes (Hitachi KP-D50 Tokio, Japón) acoplado a un microscopio estereoscópico (Olympus optics, modelo SZST California, EUA). Ambos conectados a una computadora. Los individuos se midieron utilizando el programa de computación Image Pro® plus versión 4.0. Se tomó como referencia de crecimiento el aumento en la longitud notocordal (LN).

Por otro lado, diariamente se registró el número de organismos muertos en cada tanque y se registró también el número total de individuos muestreados para todos los análisis. Para así poder calcular la supervivencia total (ST) mediante la siguiente fórmula:

Fórmula 1:

$$ST = [(LCF - LM) / EI] * 100$$

Donde:

LCF = Larvas cosechadas al final del experimento

LM = Larvas muestreadas

EI = Eleuteroembriones sembrados al inicio

## 6.2. CUANTIFICACIÓN DE LA VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA

Las muestras destinadas para la detección de los niveles de VA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se enviaron al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Los retinoles fueron extraídos de las muestras siguiendo el método propuesto por Thaller y Eichele (1986), el cual se realizó de la siguiente manera:

A 500  $\mu$ l de muestra se le agregaron 300  $\mu$ l de KOH y 800  $\mu$ l de etanol. Posteriormente se calentó a 80 °C durante 30 min, para después dejarlo enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías, se les extrajo el retinol con 800  $\mu$ l de éter y se filtraron a través de una malla con 0.22  $\mu$ m de luz. Finalmente se inyectaron en el equipo, previamente estandarizado.

El equipo se estandarizó haciendo una corrida con dos muestras con leche comercial fortificada con vitamina A (las cuales fueron sometidas al mismo protocolo de extracción de retinoles mencionado anteriormente). Esto con el objeto de verificar que la técnica fuera capaz de detectar niveles bajos de retinol. Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: fase móvil Metanol-acetonitrilo-agua 68:28:4 (v/v/v), temperatura de la columna 36 °C flujo de la fase móvil 1.4 ml /min y la detección se realizó con un espectrofotómetro de diodos a 325 nm de longitud de onda.

## **6.3. ANÁLISIS MOLECULAR**

### **6.3.1 EXTRACCIÓN DE RNA**

La extracción se realizó de acuerdo al protocolo comercial TRIZOL® (GIBCO Life Sciences). El cual consiste en agregar a la muestra 600 µl de solución Trizol, para posteriormente realizar una homogenización de las células mediante un rotor mecánico. Una vez homogenizada, la muestra se deja incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó cloroformo (0.2 ml/ml de trizol) se sacudió manualmente y se dejó incubar por 3 minutos a temperatura ambiente. Para después ser centrifugadas a 12,000 g durante 15 minutos a 4 °C. De este paso se recuperó el sobrenadante superior (ya que se forman tres fases 1° RNA, 2° proteínas, 3° DNA).

El RNA fue transferido a un tubo Eppendorf nuevo y se le agregó alcohol isopropílico (500 µl/ml de trizol) mas 5 µg de glucógeno. Se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12,000 g durante 10 minutos a 4 °C. De esta centrifugación se decantó el sobrenadante. El precipitado fue enjuagado con etanol grado molecular al 75 % y con una solución de DEPC (di-etil piro-carbonato) para después centrifugarlo a 7,500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar, para después ser resuspendido en 500 µl de agua con DEPC. Por último se calentó a 60 °C para dejarse enfriar y ser cuantificado en un biofotómetro marca Eppendorf.

### 6.3.2 TRASCRIPTIÓN INVERSA DEL RNA

El RNA fue reversotranscrito a DNA complementario (cDNA) utilizando la Transcriptasa inversa del virus de la leucemia Murina-Maloney (MMLV) siguiendo el protocolo del kit comercial Ready to go (Life Sciences).

### 6.3.3. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Se consultó la base de datos pública en Internet de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para obtener las secuencias de los genes Hoxa5 de todas las especies disponibles. En esas fechas se encontraron publicadas las secuencias del humano (*Homo sapiens sapiens* HoxA5 mRNA, número de acceso DQ893761) y del ratón (*Mus musculus* Hoxa5 mRNA número de acceso NM\_010453). Con las cuales después de un análisis de alineación y homología con el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se obtuvieron las regiones más conservadas para la posible construcción de los oligonucleótidos (OLIGOS). Posteriormente se realizó un análisis de estabilidad con el programa público RNAFOLD (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) y se escogieron las siguientes secuencias para los OLIGOS (Ver Tabla II).

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la búsqueda del gen Hoxa5 y RAR $\alpha$  en la cabrilla arenera.

| Nombre del gen                | OLIGONUCLEOTIDO DIRECCIONAL 5'-- 3' | OLIGONUCLEOTIDO REVERSA 5'-- 3' | Número de bases del producto esperado |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Hoxa5</b>                  | GARTTCCAATTCAACCGYTA                | CATRCTCATGCTTTTCAGCTT           | 106                                   |
| <b>RAR<math>\alpha</math></b> | CGCTAAACCGAACCCAGA                  | CTTCTCGGCCTGTTCCTAA             | 170                                   |

Con estos OLIGOS se realizó una PCR de punto final para posteriormente realizar un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados de dicha reacción para los genes RAR $\alpha$  y Hoxa5, fueron extraídos del gel y purificados mediante el kit comercial Gene Clean (MP Biomedicals EUA) y posteriormente clonados siguiendo la metodología del kit comercial TOPO TA cloning kit (Invitrogen California EUA). Una vez clonados los fragmentos, se secuenciaron (Macrogen©, Korea) y se obtuvieron las secuencias de los genes específicas de la cabrilla arenera, las cuales se muestran en el apartado de resultados (ver Resultados, Tabla VI).

#### 6.3.4 CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES RAR $\alpha$ y Hoxa5

La cuantificación relativa de la expresión genética se realizó mediante PCR en tiempo real, utilizando la bioquímica SYBR-GREEN<sup>©</sup> (Applied Biosystems, California, EUA) en un equipo ABI PRYSM 7000 SDS usando el software versión 1.6 de Applied Biosystems (California, EUA). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 minutos de activación a 95 °C, 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de alineación y extensión a 60 °C. Este último paso se repitió por 55 ciclos. Para la amplificación del cDNA se utilizaron los OLIGOS que se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Oligonucleótidos (OLIGOS) utilizados para la cuantificación mediante PCR en tiempo real con bioquímica SYBR-GREEN del gen Hoxa5, RAR $\alpha$  y GAPDH de la cabrilla arenera.

| Nombre del gen                | OLIGO direccional (5' - 3') | OLIGO reversa (5' - 3') | Número de bases del producto esperado |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| <b>HOXa5</b>                  | GCCCATGCCCTCTGCC            | GACAACAAGCTG            | 84 pb                                 |
| <b>RAR<math>\alpha</math></b> | GGGTTTCGGTTTAGCGTGAGTC      | GGAGTATCAGGATGTCCAGA    | 92 pb                                 |
| <b>GAPDH</b>                  | GCCATCAATGACCCCTT           | GGTGCAGGATGCATTGC       | 82 PB                                 |

En la Tabla IV se muestran las concentraciones de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR que se prepararon para cada ensayo. En todos los casos, para cada uno de los genes se realizaron reacciones por cuadruplicado, además de una reacción como control negativo que consistió en la mezcla de todos los reactivos exceptuando el cDNA.

Tabla IV. Concentración de los reactivos utilizados para la reacción de PCR en tiempo real con bioquímica SYBR-GREEN para la cuantificación del gen Hoxa5 y RAR $\alpha$  en la cabrilla arenera.

| Nombre del reactivo                  | Volumen por muestra $\mu$ l         |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Mezcla maestra SYBR-GREEN</b>     | <b>12.5</b>                         |
| <b>Oligonucleotido direccional.</b>  | <b>0.3</b>                          |
| <b>Oligonucleótido reversa.</b>      | <b>0.3</b>                          |
| <b>cDNA</b>                          | <b>1 (800 ng/<math>\mu</math>l)</b> |
| <b>Agua grado molecular con DEPC</b> | <b>10.9</b>                         |
|                                      |                                     |
| <b>Total</b>                         | <b>25</b>                           |

En este trabajo se llevó a cabo una cuantificación relativa, ya que se utilizó el método de normalización mediante la construcción de curvas estándar de acuerdo al User Bulletin #2 ABI PRYSM 7000 SDS (1997). La preparación de las curvas estándar se hizo con el fin de poder comparar los niveles de expresión (umbrales de detección en el equipo o **cTs**) de la

muestra problema con los cTs de un calibrador (que es distinto al gen endógeno). Esto es, la cantidad de expresión de la muestra se determinó por la curva estándar (ver Fórmula 1) y se dividió por la cantidad de la expresión del calibrador. Por tanto el calibrador se convierte en  $I_x$  y las demás cantidades se expresan en órdenes de magnitud  $n-x$ , relativas al calibrador (User Bulletin #2 ABI PRYSM 7000 SDS, 1997).

Para poder llevar a cabo este método es necesario también contar con los niveles de expresión un gen endógeno. Es decir, uno que su expresión sea constante durante la activación y la proliferación celular (Gause & Adamovicz, 1994). Por tanto, en este trabajo se decidió utilizar al gen de la GAPDH debido a que es un gen usado ampliamente y así permite realizar comparaciones con otros trabajos (Gause & Adamovicz, 1994). De esta manera, también se construyó una curva estándar con los valores de cT del gen endógeno y el valor de cada muestra problema se dividió entre el valor del cT del gen endógeno para obtener el valor normalizado de la expresión de cada muestra problema.

Finalmente, arbitrariamente se eligió el valor de una de las muestras problema (la que presentó el valor mas bajo) la cual se convirtió en el calibrador ó  $I_x$  y cada una de las muestras normalizadas con el gen endógeno se dividieron entre el calibrador para así obtener el nivel relativo de expresión de cada uno de los genes problema.

Para la obtención del valor de cT de cada gen se utilizó la siguiente fórmula:

**Fórmula 2.**

$$\text{Curva Est.} = ([\text{Valor de } cT \text{ de la muestra problema}] - b) / m$$

Donde:

b = intercepto de y de la curva estándar

m = pendiente de la curva

La desviación estándar de la expresión relativa de cada gen se calculó utilizando la siguiente fórmula:

**Fórmula 3.**

$$Cv = \sqrt{cv_1^2 + cv_2^2}$$

Donde:

Cv = desviación estándar de las réplicas / el promedio de las réplicas

cv1 = valor de cT del gen problema

cv2 = valor de cT del gen endógeno

(User Bulletin #2 ABI PRYSM 7000 SDS, 1997)

La construcción de las curvas se realizó mediante la lectura en el equipo de los cts de la amplificación de DNA plasmídico (DNAP) obtenido de células clonadas siguiendo el protocolo del kit comercial TOPO TA (Invitrogen). Elaboradas específicamente para este propósito para cada uno de los genes de interés. En cada curva se utilizaron 7 diluciones seriales 1-10 comenzando con una concentración de 50 ng/μl (cuantificada con un biofotómetro). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 minutos de activación a 95 °C, 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de alineación y extensión a 60 °C. Este último paso se repitió por 55 ciclos. Las concentraciones de los reactivos utilizados fueron las mismas a las descritas en la Tabla IV. Los OLIGOS utilizados se muestran en la Tabla III. Se realizaron 5 réplicas para cada reacción de PCR.



#### **6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para todos los datos. Al cumplir estos postulados se les aplicó el análisis de varianza de una vía. En el caso de no cumplirlos se les realizó la prueba no paramétrica por rangos de Mann-Whitney. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico Sigma Stat, versión 3.5. Se utilizó el valor de  $\alpha = 0.05$  como nivel de confianza.

## 7. RESULTADOS

### 7.1.1. CRIANZA LARVARIA

La crianza larvaria se realizó con éxito y sin ningún contratiempo que lamentar. A continuación en la Tabla V se muestran los valores obtenidos de los factores ambientales monitoreados diariamente a lo largo de la crianza.

Tabla V. Factores ambientales monitoreados diariamente a lo largo de la crianza larvaria.

| <b>Factor ambiental</b> | <b>Valor promedio con desviación estándar</b> |
|-------------------------|---|
| <b>Temperatura</b>      | $23.46 \pm 0.31^{\circ} \text{C}$             |
| <b>Salinidad</b>        | $35.79 \pm 0.83 \text{‰}$                     |
| <b>Oxígeno disuelto</b> | $5.85 \pm 0.75 \text{ mg O}_2/\text{L}$       |
| <b>Amonio Total</b>     | $0.31 \pm 0.13 \text{ mg/NH}_4/\text{L}$      |

Como se puede observar en la Tabla V cada uno de los factores ambientales se comportó de forma estable y dentro de los intervalos recomendados en la literatura (Tucker, 1998). En este experimento el porcentaje de supervivencia se encontró en el orden del 10%.

En cada toma de muestras se realizaron también observaciones cualitativas para detectar la presencia de organismos con malformaciones. No se realizaron conteos o toma de muestras específicos para determinar el número de individuos malformados debido a que se contaba con muy pocos especímenes. Los casos de malformaciones más comunes fueron: malformaciones en el aparato mandibular y malformaciones en la columna vertebral (Figura 3).

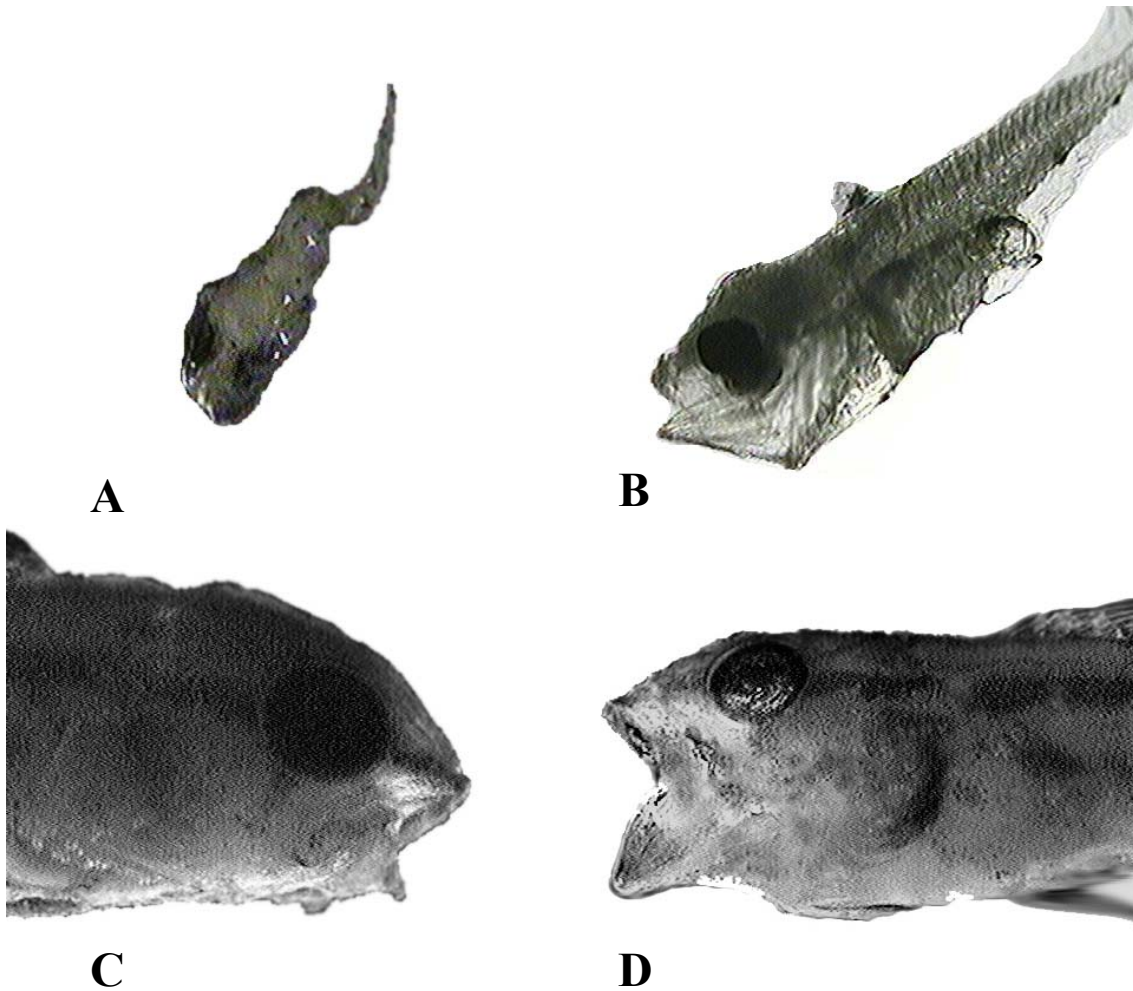


Figura 3. Casos de malformaciones encontrados en larvas cultivadas en los tanques bajo el tratamiento con vitamina A. Fotografía A.- Larva de 15 DDE con lordosis; B.- Larva de 10 DDE con malformación en mandíbula inferior; C.- Juvenil de 20 DDE con malformación en mandíbula inferior; D.- Juvenil de 30 DDE con malformación en mandíbula inferior.

### 7.1.2 CRECIMIENTO

No se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.464$ ) entre el crecimiento de las larvas sometidas al tratamiento con VA y las larvas utilizadas como control. En ambos casos se puede observar un crecimiento muy semejante culminando en los  $11.2 \pm 1.8$  mm para los

individuos del tratamiento con VA y los  $13.1 \pm 3.8$  mm para los individuos de los tanques control.

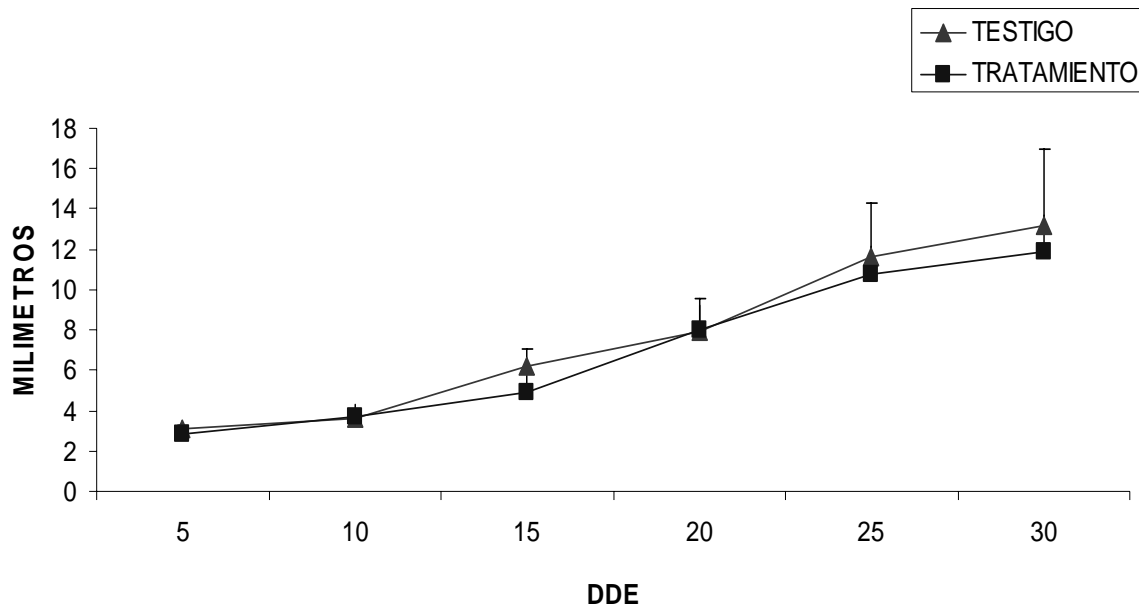


Figura 4. Crecimiento observado durante la cría larvaria de la cabrilla arenera. DDE días después de la eclosión. Cada punto representa el promedio de cuatro individuos. Las barras representan su desviación estándar.

## 7.2. CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA

Las muestras analizadas en el CIAD tuvieron que ser agrupadas en 8 lotes. Esto se debió a que como se verá a continuación en las primeras Figuras, el volumen de muestra era demasiado pequeño para ser cuantificado bajo las condiciones en las que la técnica estaba estandarizada en el equipo.

Los resultados que se obtuvieron fueron cualitativos, debido a diversos problemas logísticos que no se pudieron resolver por cuestiones de tiempo, tanto para la

estandarización de la técnica, como por las cantidades de biomasa que pudimos obtener de la corrida larvaria para realizar la técnica.

En la Figura 5 se muestra el cromatograma del acondicionamiento de la técnica con una leche comercial fortificada con vitamina A (con la cual la técnica fue estandarizada).

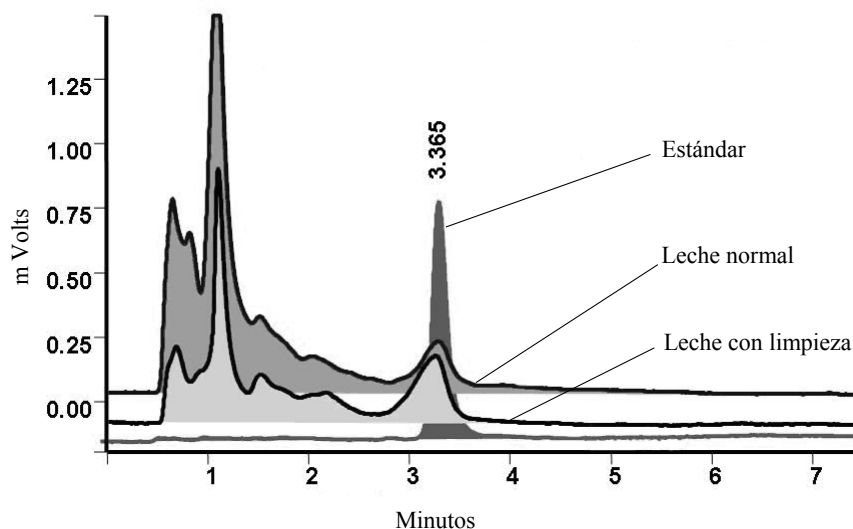


Figura 5. Cromatograma de la estandarización de la técnica con leche comercial fortificada con vitamina A. Leche normal = sin filtrar. Leche con limpieza = filtrada con malla con  $0.22 \mu\text{m}$  de luz

Se puede observar que el estándar aparece en el minuto 3.365 y que en ambos casos (con leche normal y con limpieza) se puede detectar la presencia de retinol. Lo cual es congruente con la técnica original.

La Figura 6 muestra el cromatograma HPLC de una muestra de 80 mg de larvas de los tanques testigo.

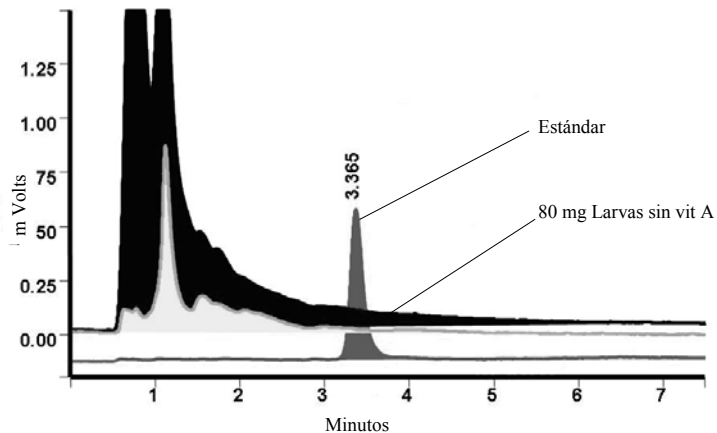


Figura 6. Cromatograma HPLC de una muestra de 80 mg de larvas de cabrilla del control sin VA.

Como se puede observar en la Figura 6 no fue posible detectar retinol en la muestra, y pensando que las larvas no estuvieron bajo tratamiento, se procedió a extraer una con tratamiento. (Figura 7) para lo cual se utilizó una muestra de 68.7 g de larvas provenientes de los tanques del tratamiento con VA.

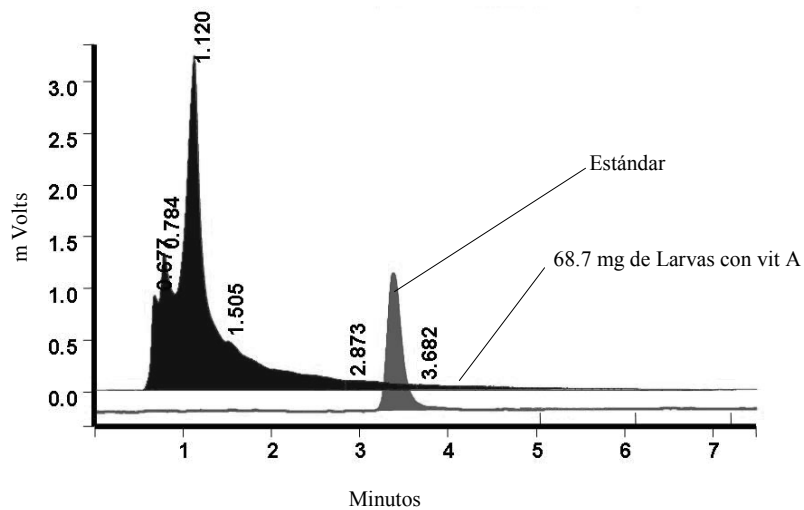


Figura 7. Cromatograma HPLC de la inyección de una muestra de 68.7 mg de larvas de cabrilla de los tanques del tratamiento VA.

Dado que tampoco se pudieron detectar niveles de retinol se procedió a agrupar las muestras con el fin de obtener mayor cantidad en peso. Los grupos para el análisis fueron los siguientes:

- Lote 1.- Rotíferos testigo
- Lote 2.- Artemia testigo
- Lote 3.- Rotíferos tratamiento
- Lote 4.- Artemia tratamiento
- Lote 5.- Larvas testigo de los 5 a los 15 DDE
- Lote 6.- Larvas testigo de los 20 a los 30 DDE
- Lote 7.- Larvas tratamiento de los 5 a los 15 DDE
- Lote 8.- Larvas tratamiento de los 20 a los 30 DDE

Los cromatogramas obtenidos de los análisis de los lotes se muestran a continuación, con excepción de las muestras de los lotes 1 y 2, que se perdieron durante la extracción del retinol (por cuestiones de tiempo fue imposible recuperar estas muestras o generar una nuevas para poder realizarles el análisis). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 8, no sería necesario, ya que tampoco se pudo detectar la presencia de retinol en las muestras de alimento vivo sometidas al enriquecimiento con vitamina A

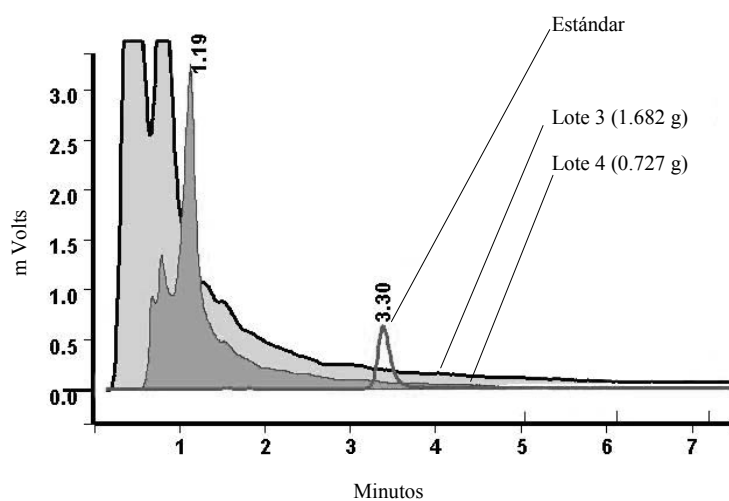


Figura 8. Cromatograma HPLC de rotíferos enriquecidos con vitamina A (Lote 3, 1.682 g) y de Artemia enriquecida con vitamina A (Lote 4, 0.727 g).

Posteriormente se inyectó en el equipo la extracción de las muestras de los lotes 5 y 6. En la que tampoco se pudo detectar retinol (Figura 9).

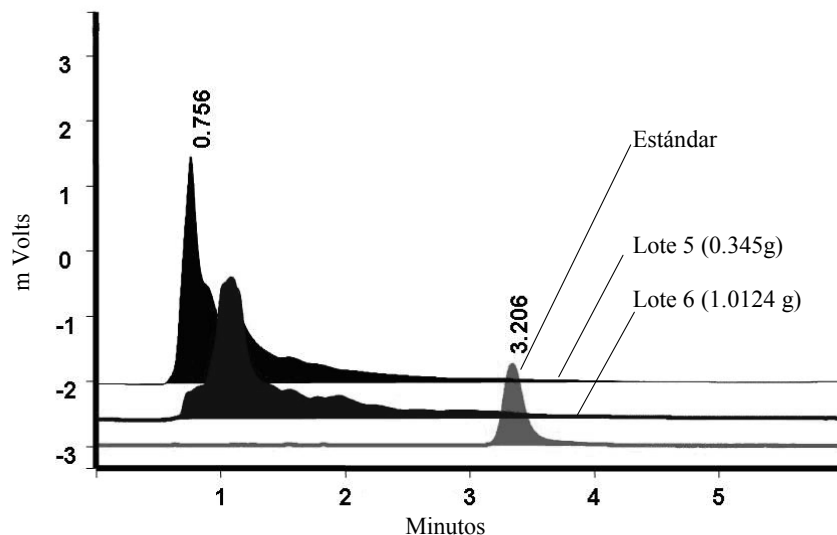


Figura 9. Cromatograma HPLC de larvas del testigo de los 5 a los 15 DDE (Lote 5, 0.345 g) y larvas testigo de los 20 a los 30 DDE (Lote 6, 1.0124 g).

Finalmente, se inyectaron en equipo las dos últimas extracciones provenientes de los lotes 7 y 8 (Figura 10). En este caso, sí fue posible detectar retinol en las muestras aunque en cantidades imposibles de cuantificar por la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, es un buen indicador, ya que como se puede observar, el retinol es detectado cerca del minuto 3, muy cercano al estándar. Lo cual indica que el estándar que se utilizó fue el correcto, que la técnica estaba bien estandarizada y que el tiempo de corrimiento en la columna del equipo era suficiente para poder detectar retinoles en nuestras muestras.



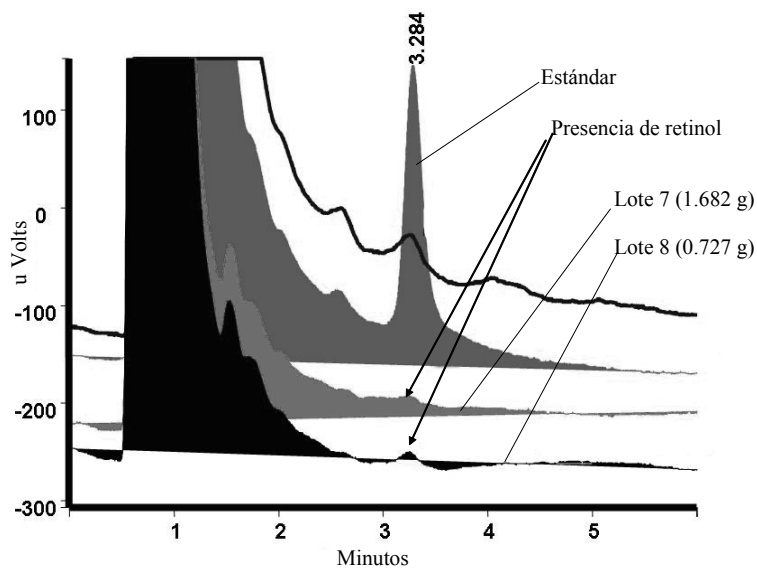


Figura 10. Cromatograma HPLC de larvas del tratamiento de los 5 a los 15 DDE (Lote 7, 1.682 g) y de larvas del tratamiento de los 20 a los 30 DDE (Lote 8, 0.727 g).

Una vez que se logró detectar la presencia de retinol en las muestras se realizó una última inyección en el equipo con el fin de corroborar que el método podía detectar cantidades pequeñas de retinol. Para este propósito se disminuyó el volumen de muestra a 25 y 50  $\mu\text{l}$ , y se utilizó nuevamente leche fortificada con vitamina A como control positivo (Figura 11).

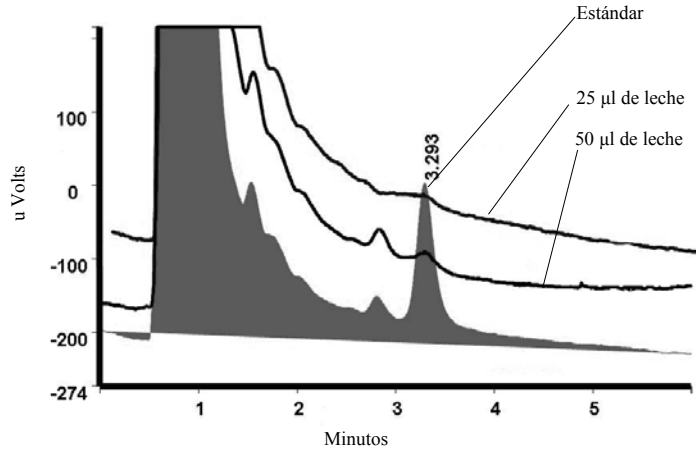


Figura 11. Cromatograma HPLC de muestras de leche comercial fortificada con vitamina A de 25 y 50  $\mu$ l respectivamente.

En la Figura 11 se puede observar que aún con cantidades muy pequeños de muestra, la técnica fue capaz de detectar niveles de retinol. Estos resultados muestran una semejanza (en el tamaño del pico) entre la muestra de leche fortificada (50  $\mu$ l) y las muestras de los lotes 7 y 8.

Cabe señalar que al realizar los análisis mencionados anteriormente, fue necesario utilizar todos los individuos de la crianza destinados para este propósito en el diseño experimental (20 individuos por cada toma de muestra). Ya que originalmente las muestras serían cuantificadas mediante un protocolo distinto al descrito anteriormente (serían inyectadas en un equipo del CIBNOR). Sin embargo, por limitaciones de tiempo, se tomó la decisión de enviar las muestras al CIAD donde se contaba con un equipo estandarizado. Aunque a diferencia de la técnica propuesta en el diseño experimental original, la técnica que se utilizó finalmente en el CIAD requería al menos 1 g de muestra para poder obtener datos cuantitativos. Por lo tanto, para obtener tal cantidad de muestra hubiera sido necesario realizar otra crianza larvaria. Lo cual era logísticamente imposible en ese momento.

### 7.3. CUANTIFICACION DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES RAR $\alpha$ y HOXa5 DE LA CABRILLA ARENERA DURANTE LA ETAPA LARVARIA.

#### 7.3.1 SECUENCIACIÓN

Con los OLIGOS que se presentaron en la Tabla II de la sección de material y métodos se realizó una PCR preliminar con cDNA de intestino de cabrilla arenera con la que se obtuvo el siguiente gel electroforético (Figura 12):

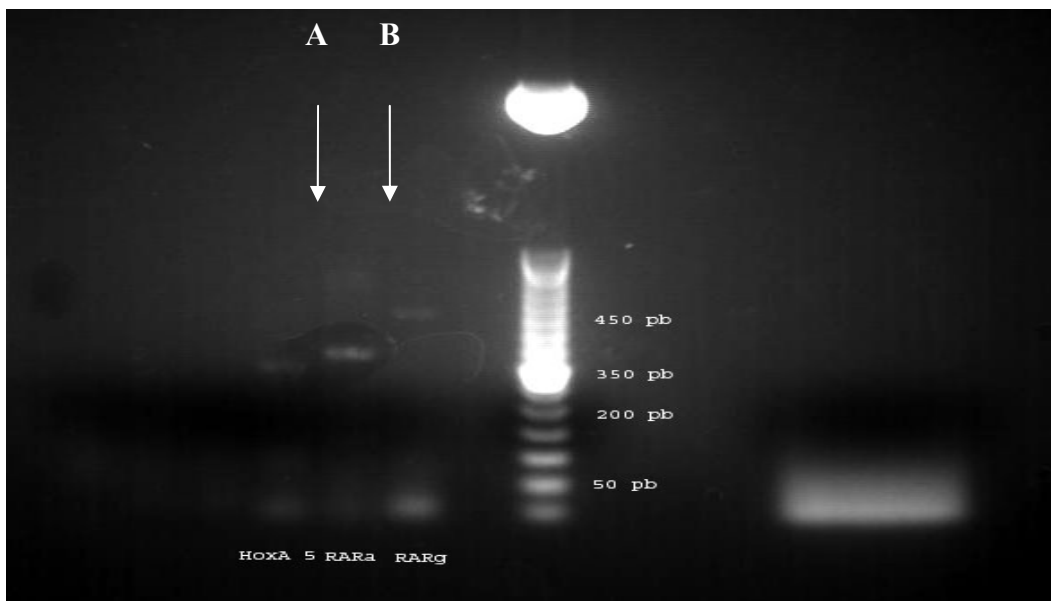


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de una PCR para Oligonucleótidos de Hoxa 5 (A) y RAR $\alpha$  (B) con cDNA de intestino de cabrilla. (Escala molecular de 50 pbs)

Una vez obtenidos los fragmentos de los genes de interés amplificados en cDNA de cabrilla arenera, se procedió a cortarlos y a extraerlos del gel para posteriormente clonarlos y secuenciarlos. Al recibir las secuencias, se realizó un análisis de homología con la base de datos de Genbank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) para verificar que el proceso de obtención se hubiera realizado correctamente. Encontrando que el gen RAR $\alpha$  y Hoxa5 presentaron un alto grado de homología (93% y 94% respectivamente) con respecto a los mismos genes de

*Dicentrarchus labrax*, lo cual es un buen indicador que todo el proceso se realizó satisfactoriamente (ver Tabla VI).

Tabla VI. Secuencias específicas de los genes Hoxa5 y RAR $\alpha$  para la cabrilla arenera obtenidas en este trabajo.

| Nombre del gen        | Numero de registro en la base de datos de la NCBI (obtenido en este trabajo) | Secuencia obtenida  | Porcentaje de homología con la especie analizada   |
|-----------------------|--|---|--|
| RAR $\alpha$<br>384pb | 1088219  | ATCTTGGGGAACATGTGCGGTT<br>TGTGGGGCCTCCTCCTTAC<br>GTAATCTTCAACGCCTCCAAG<br>AGCGGCTCCTGCAGGACGTCCA<br>CCTTCTGCCTGCTCCAAGTC<br>CTGACGATCTCCACACAACAAA<br>CAGATGGCGCTGAGCAGCCCC<br>GTTTCTGCGTCATCCATCTCCA<br>GAGGAAGGAGCTGGTTGGCGA<br>AGGCAAAAACCAGGTCGGTGA<br>GGGGACCGAAGCCTGCGTTGT<br>GCATCTGGGTTTCGGTTTAGCGT<br>GAGTCCATCTGAGAAGGTCATG<br>GTGTCTTGCTCTGGCGTGTAGC<br>GTGTGCAGATCCGGAGTATCAG<br>GATGTCCAGACACGCAGCTTTG<br>AGCAGAGTGATCTGGTCAGCG<br>ATGGTGAGCGTGGTA | <i>Dicentrarchus labrax</i><br>AJ496189.1<br>(93%) |
| Hoxa5<br>147 pb       | 1088190  | GAATTCCACTTCAACCGCTACC<br>TGACCCGCAGGCGACGGATCG<br>AGATCGCCCATGCCCTCTGCCT<br>CTCAGAGAGACAGATCAAAAT<br>CTGGTTTCAGAACCGAAGGATG<br>AAGTGGAAGAAAGACAACAAG<br>CTGAAAAGCATGAGCATG   | <i>Dicentrarchus labrax</i><br>DQ984667.1<br>(94%) |

### 7.3.2 OBTENCION Y VALIDACION DEL cDNA

Después de realizar la transcripción inversa del RNA total, extraído de las larvas, se procedió a validar la integridad del cDNA obtenido. Para lo cual se llevó a cabo una PCR de punto final utilizando los OLIGOs comerciales del gen 18s (Applied Biosystems) con el simple objeto de observar una presencia o ausencia de producto amplificado en el gel (Figura 13).

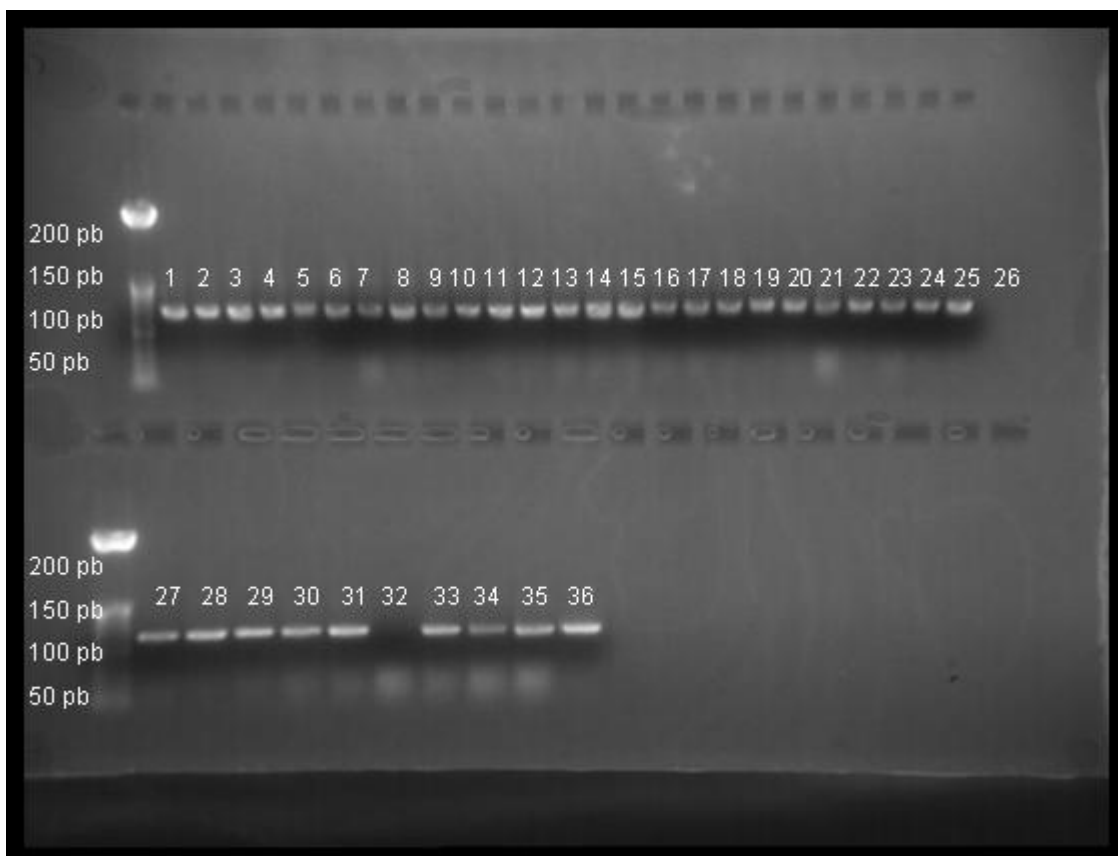


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del cDNA de larvas de cabrilla arenera, utilizando los Oligonucleótidos comerciales para el gen 18s (Applied Biosystems). Escalera molecular de 50 pbs (carriles del 1 al 36 cDNA proveniente de larvas de los tanques con tratamiento y tanques control). Gel utilizado para analizar ausencia o presencia de producto.

Obtenido el gel de la Figura 13, se pudo verificar que el RNA había sido extraído y reversotranscrito a cDNA correctamente y que éste se encontraba en buen estado para poder continuar con la metodología. Posteriormente todo el cDNA fue cuantificado con un bio-espectrofotómetro y ajustado a una concentración cercana a 800 ng / $\mu$ l. Esto con el objeto de estandarizar todas las muestras y evitar así posibles interferencias en la cuantificación de la expresión.

### 7.3.3 CURVAS ESTANDAR

Una vez obtenido el DNA plasmídico para cada gen. Se procedió a cuantificarlo en un biofotómetro para posteriormente ajustar su concentración a 50 ng/μL. Ajustadas las concentraciones de todos los plasmidos se realizaron 7 diluciones seriales (1-10). Con cada dilución del DNAP se realizó una PCR en tiempo real. Con los valores de los cT's obtenidos se calcularon los promedios de todas las réplicas y se eligieron los 5 valores que se ajustaran mejor a una recta para la construcción de cada curva estándar correspondiente para cada gen.

Las curvas estándar generadas para los genes Hoxa5, RARα y GAPDH se muestran en las Figuras 14, 15 y 16. En todos los casos se puede observar que los índices de correlación son muy cercanos a 1 ( $r^2 = 0.997$ ;  $0.9998$ ;  $0.9976$ . respectivamente) y las pendientes cercanas a -3 ( $y = -2.9927$ ;  $-3.334$ ;  $-3.2233$  respectivamente), siendo ambos requisitos para poder llevar a cabo una cuantificación confiable (User Bulletin #2 ABI PRYSM 7000 SDS, 1997).

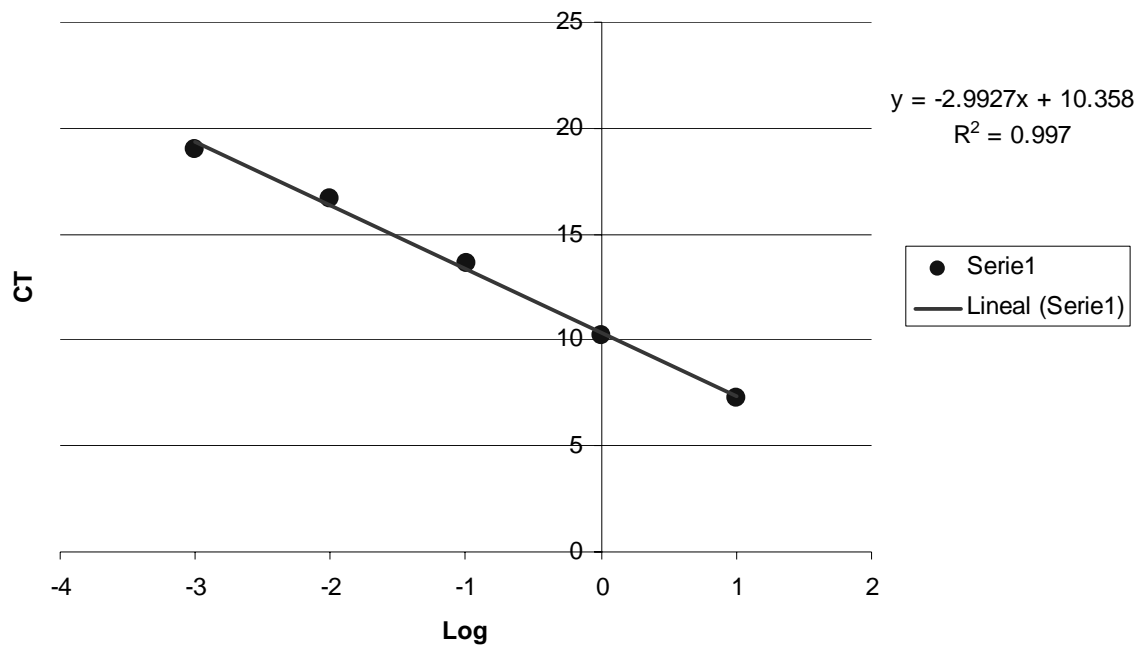


Figura 14. Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen Hox a5 mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10. concentración inicial 50 ng/ $\mu$ L). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas.

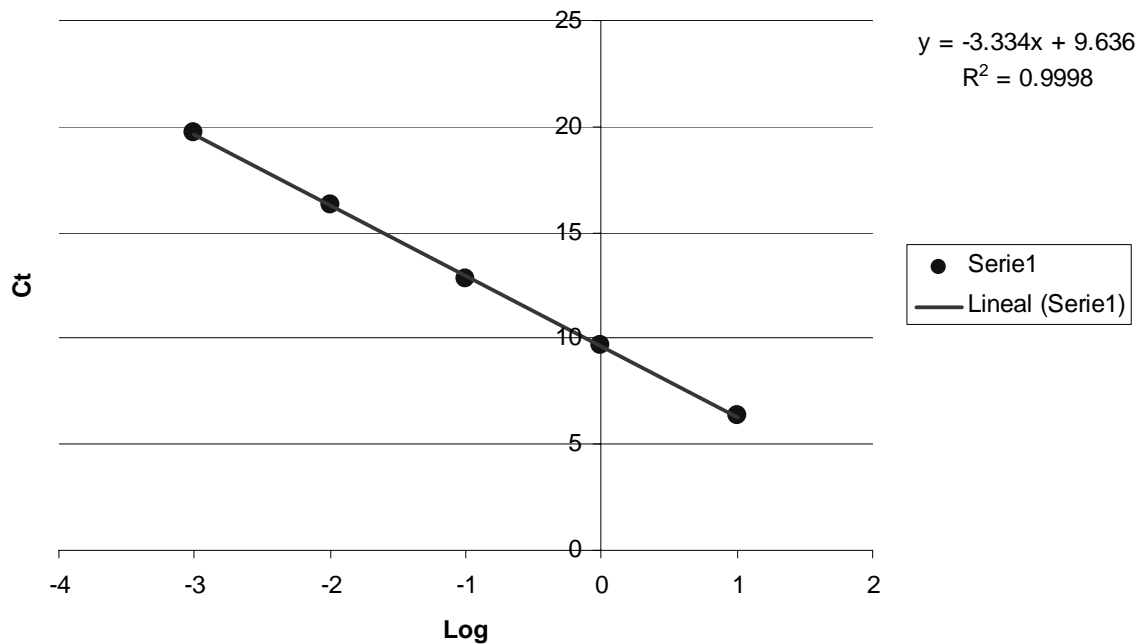


Figura 15. Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen RAR $\alpha$  mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas.

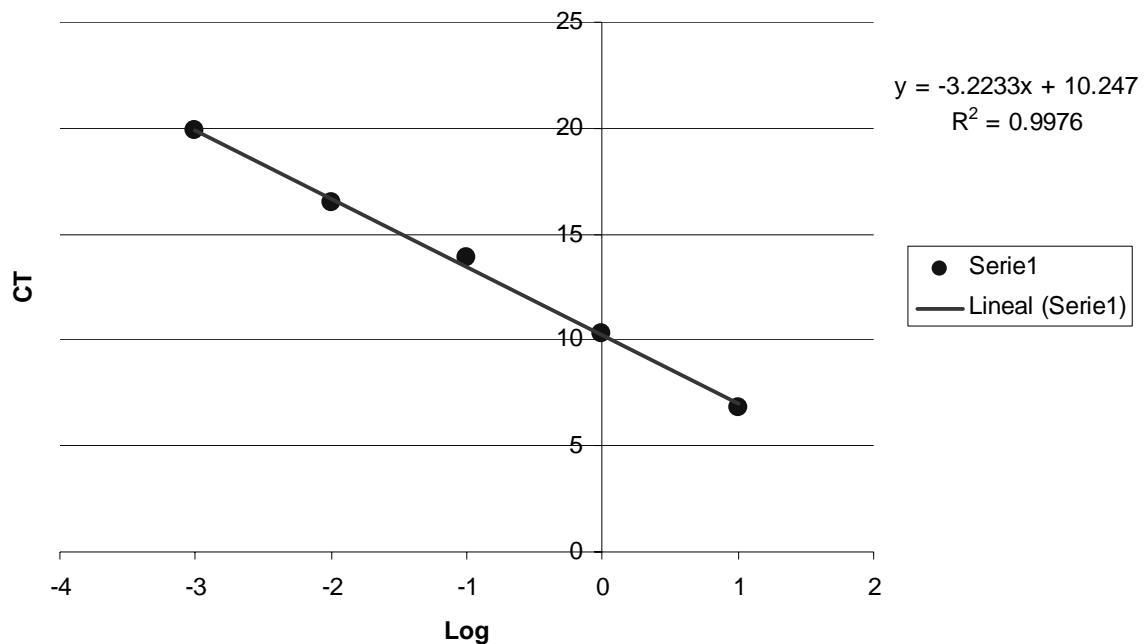


Figura 16. Curva estándar construida a partir de la amplificación de plásmidos del gen GAPDH mediante PCR en tiempo real. (A partir de 7 diluciones seriales 1-10). Cada punto representa el promedio de 4 réplicas.

#### 7.3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *RAR $\alpha$* y *Hoxa5*

Finalmente, una vez obtenidos los valores de los *cT*s para cada uno de los genes se procedió a realizar los cálculos mediante las fórmulas 2 y 3 mencionadas en el apartado de materiales y métodos. Las Figuras que se presentan a continuación representan la cuantificación relativa de la expresión de los genes a lo largo de la crianza larvaria.



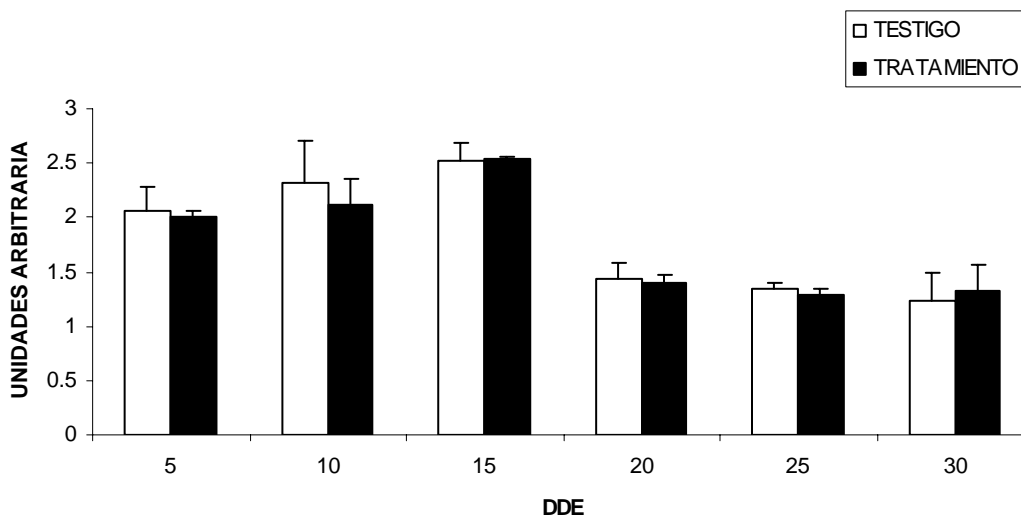


Figura 17. Cuantificación relativa de la expresión del gen *Hoxa5* normalizado con el gen *GAPDH*. (Cada columna representa el valor promedio de 4 réplicas y las barras representan su desviación estándar. (Los valores en la Figura están normalizados con logaritmo base 10)

En la Figura 17 se puede observar que el gen *Hoxa5* comienza con una sobre expresión de dos órdenes de magnitud ó  $2x$  (con respecto al calibrador) a los 5 DDE, para continuar en aumento hasta alcanzar los  $2.5x$  a los 15 DDE. A partir del día 20 se observa un decremento drástico en la expresión llegando a  $1.5x$ , para posteriormente seguir en decremento hasta llegar a valores cercanos al  $1x$  a los 25 y 30 DDE. Estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.979$ ) entre los valores de expresión de los individuos sometidos al tratamiento con respecto a los individuos utilizados como control.

Los resultados encontrados para la expresión del gen *RAR $\alpha$*  (Figura 18) son muy semejantes a los encontrados para el gen *Hoxa5*. Encontrando que a los 5 DDE existe una sobre expresión del  $2x$  que continua en aumento hasta alcanzar un máximo valor cercano a  $2.5x$  a los 15 DDE. A partir del día 20, se observa también un claro decremento en la expresión llegando a valores cercanos al  $1.5x$ . Para el caso de los valores de la expresión

del gen  $RAR\alpha$ , tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0.983$ ) entre los individuos sometidos al tratamiento con respecto a los individuos utilizados como control.

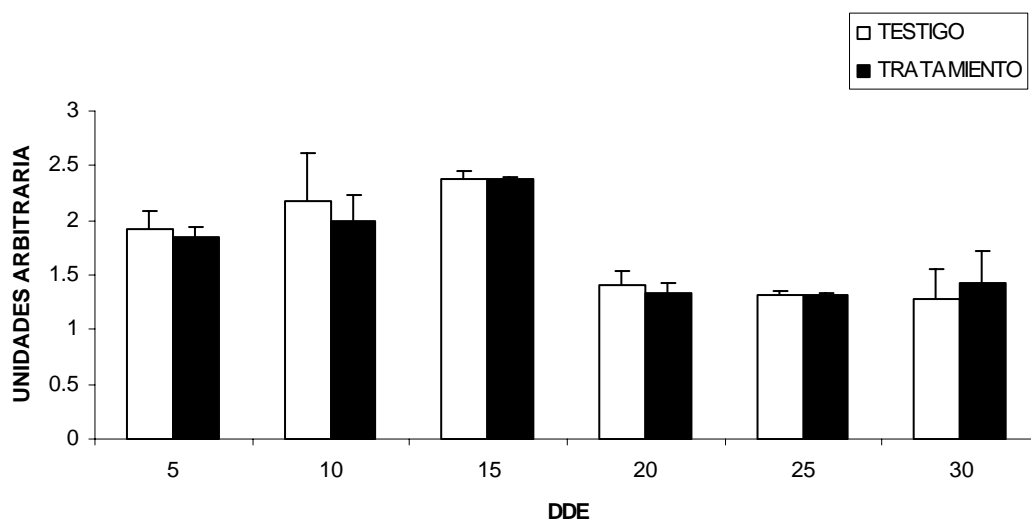


Figura 18. Cuantificación relativa de la expresión del gen  $RAR\alpha$  normalizado con el gen GAPDH. (Cada columna representa el valor promedio de 4 réplicas y las barras representan su desviación estándar. (Los valores en la Figura están normalizados con logaritmo base 10)

## **8. DISCUSION**

### **8.1. CRIANZA LARVARIA**

Durante la crianza larvaria todos los factores ambientales monitoreados (Tabla V) se mantuvieron dentro de los intervalos recomendados (Tucker, 1998) y son congruentes con lo reportado en trabajos anteriores realizados en el mismo sistema de crianza SCC-18 (Alvarez-González, 2001; Alvarez-González, 2003; Olalde-Rodríguez, 2005; García-Gómez, 2006). Por lo que podemos asumir que la calidad del agua no fue un factor que pudiera interferir en los análisis de este estudio.

### **8.2. CRECIMIENTO**

Como se pudo observar en el apartado de resultados (Figura 4), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0.464$ ) en el crecimiento entre las larvas sometidas al tratamiento y las utilizadas como control. Algo muy semejante se reporta en un estudio realizado por Villeneuve *et al.* (2005), donde a larvas de *Dicentrarchus labrax* les proporcionaron alimentos microparticulados conteniendo 0, 10, 50, 250 y 1000 mg de RA/kg (RA; 500,000 USP U/g; Sigma-Aldrich), en el cual tampoco encuentran diferencias en el crecimiento entre los tratamientos sino hasta después de los 37 DDE. Después de este día, encuentran que los individuos que presentaron un mayor crecimiento fueron los sometidos a los tratamientos con 0, 10, y 50 mg de RA/kg. En este estudio encuentran diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de los organismos hasta los 42 DDE, mientras que en otro estudio realizado por Villeneuve *et al.* (2006), donde utilizaron 0.08 y 32 g/kg de vitamina A (Sigma R3250, 500000 UI/g) para alimentar a larvas de *D.*

*labrax*, encontraron que los individuos alimentados con 0.08 g/Kg de vitamina A, presentan un mejor crecimiento con respecto al otro tratamiento, pero no es sino hasta los 25 DDE que encuentran diferencias en el crecimiento. En nuestro caso, el hecho de no haber encontrado diferencias significativas muy probablemente se puede atribuir a que como se observó en la sección de resultados del análisis mediante HPLC, no fue posible detectar niveles altos de retinol ni en el alimento vivo suministrado, ni en las larvas. Por tanto, muy probablemente no existió ninguna influencia por parte del tratamiento en el crecimiento de las larvas, ya que el método de enriquecimiento no fue exitoso.

### **8.3. EVALUACION DE LA INCORPORACION DE VITAMINA A EN EL ALIMENTO VIVO Y EN LAS LARVAS**

Dentro de las técnicas que existen para determinar los niveles de vitamina A en muestras biológicas, la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) es una de las más sensibles y confiables (López- Cervantes *et al.*, 2006). En la sección de resultados se demostró que la técnica utilizada en este trabajo fue capaz de detectar niveles basales de retinol en una muestra de 50 µl de leche fortificada con vitamina A (Figura 11). Aunque no se obtuvo un dato cuantitativo, este resultado puede considerarse como un nivel de sensibilidad aceptable, ya que comparado con la dosis usada para el enriquecimiento de las presas vivas para alimentar a las larvas (0.6 g de vitamina A por cada 500 g de SELCO), la cantidad de retinol en una muestra de 50 µl de leche fortificada es mucho mas bajo. Sin embargo, aún así no fue posible detectar la presencia de retinol en ningún otro caso del análisis. Existen diversas razones por las cuales esto pudo haber sucedido: 1) el protocolo de enriquecimiento no fue el adecuado; 2) la vitamina A se desnaturalizó por la luz antes de ser asimilada por las larvas; 3) probablemente la vitamina se lixivió al momento de verter el

alimento vivo en los tanques de cultivo, y 4) los niveles reales de incorporación de vitamina en el alimento fueron mucho más bajos que los niveles esperados por los cálculos teóricos realizados.

En el presente trabajo de tesis se tomó como referencia el trabajo de Haga *et al.* (2002) para elaborar el protocolo de enriquecimiento del alimento vivo. Se utilizó un vehículo (SELCO) rico en lípidos y ácidos grasos para incorporar la vitamina al alimento vivo y el método de enriquecimiento fue muy semejante al utilizado por estos autores (descrito a detalle mas adelante en este apartado de discusión). La principal diferencia es que el enriquecimiento en el presente trabajo duró 3 horas, y la dosis de vitamina utilizada era de 0.6 g de vitamina A por cada 500 g de SELCO. Lo cual es una dosis mucho más elevada que la usada en el trabajo de Haga *et al.* (2002). Estos autores realizaron un experimento en el que alimentaron larvas de *Paralichthys olivaceus* con rotíferos (*B. rotundiformis*) desde los 3 hasta los 19 DDE y con nauplios de Artemia desde los 10 hasta los 35 DDE, ambos enriquecidos con una solución de 100 mg de RA (Sigma Chemicals) en una solución comercial denominada 38G-DHA (Sigma Chemicals) para obtener una concentración final de 100 mg RA / 0.5 ml 38G-DHA. Esta solución la utilizan para enriquecer a las presas vivas en completa oscuridad por más de 16 horas antes de ser suministrados a las larvas. En el caso de rotíferos, colocan  $1,000 \pm 500$  individuos /ml en 0.5 ml de la solución enriquecedora. Para el caso de Artemia, colocan 400 individuos por cada mililitro de solución. Para detectar los niveles de inclusión realizan ensayos de HPLC en los que determinan que aún con el tiempo prolongado de enriquecimiento, los niveles reales de inclusión en el alimento vivo son muy bajos, encontrando solo 12.69 mg/g para rotíferos y 15.89 mg/g para Artemia de los 100 mg utilizados en ambos casos. Aún así con los niveles

tan bajos detectados de vitamina, encuentran diferencias significativas en el crecimiento y en la supervivencia entre los tratamientos. Además que encontraron que con esas dosis es posible inducir malformaciones en un gran número de individuos. Esto indica que las larvas de *P. olivaceus* son mucho más sensibles a los efectos inducidos por la vitamina A que las larvas de la cabrilla arenera. Otra situación importante fue que al momento de enriquecer el alimento vivo y ser suministrado a las larvas, existió una gran pérdida de vitamina en el proceso. Pudiendo ser ésta una posible explicación de por qué no se pudo detectar el retinol en nuestras muestras.

Analizando la segunda explicación, relacionada a la desnaturalización de la VA por fuentes luminosas al momento de proporcionársela a las larvas, Haga *et al.*, en el (2006), argumentaron que no es suficiente el proteger a la vitamina A al momento del enriquecimiento, sino que también es necesario hacerlo al momento de alimentar a las larvas. Esto lo concluyeron cuando estudiaron el efecto de dos condiciones de iluminación, 2000 lx y 1 lx, sobre la dinámica de la vitamina A utilizada para enriquecer rotíferos y Artemia. Utilizan 1L de medio de cultivo con o sin 10 mg de palmitato de vitamina A (pVA) para enriquecer a las presas durante 24 horas. Posteriormente, por medio de HPLC analizaron los contenidos de retinol, retinal, y RA a las 0, 3, 6, 12, 18 y 24 horas de enriquecimiento, encontrando en rotíferos que los niveles de retinol siempre fueron más elevados en las condiciones de oscuridad que en la de luz. En el caso del pVA encontraron dos picos máximos, uno a las 3 y otro a las 18 horas. En el caso del RA, este se incrementó solo después de las 24 horas en oscuridad. En Artemia, el pVA, el RA y el retinol siempre mostraron niveles más elevados bajo la oscuridad. Sin embargo, para Artemia no encontraron diferencias significativas entre el tratamiento bajo condiciones de luz y de

oscuridad. Los resultados de estos autores sugieren dos posibles hipótesis: es muy probable que la luz y las condiciones de oxidación presentes en los tanques desnaturalizaron rápidamente el retinol en la vitamina A, y por lo tanto, no fue posible detectarlo. La segunda hipótesis, sería que la vitamina haya sido incorporada al sistema digestivo del rotífero y posteriormente metabolizada y oxidada a RA, ya que es solo este compuesto el que es posible detectar después de 24 horas en condiciones de luz. Este caso en particular resultaría difícil de comprobar, ya que no se conocen estudios del metabolismo de vitamina A en rotíferos (Haga *et al.*, 2006). Por tanto, no se conoce si el rotífero posee la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo dicha reacción.

Por otro lado, en el caso de la Artemia, dado que la luz aparentemente no afecta la estabilidad de la vitamina (ya que es posible detectar retinol, pVA y RA) en ambos tratamientos, sugiere que, a diferencia del rotífero, la Artemia parece tener mecanismos para estabilizar la VA (Haga *et al.*, 2006), lo cual la hace un vehículo más eficiente. Este argumento explica porque fue posible detectar retinoides en las muestras de los lotes 7 y 8 (Figura 10) principalmente en las del Lote 8, ya que en este lote se agruparon las larvas de los 20 a los 30 DDE, sometidas al tratamiento con VA, las cuales fueron alimentadas exclusivamente con nauplios de Artemia. Además, que estos individuos son los que estuvieron sometidos al tratamiento durante el mayor número de días.

La tercera posible explicación es que la vitamina se hubiera perdido cuando las presas vivas entran en contacto con el agua de los tanques. Esto es muy probable, ya que los individuos antes de ser suministrados a las larvas, se encuentran inmersos en la solución de enriquecimiento y en altas densidades. Al momento de la alimentación, la solución y los

organismos se vierten a los tanques en los que se encuentran 100 litros de agua limpia, lo cual reduce inmediatamente la concentración de la vitamina que no fue incorporada por las presas durante el enriquecimiento. Aunque esta tercera opción aparentemente no explica el por qué no fue posible detectar retinol en las presas vivas (Figura 8), ya que las muestras de los individuos se tomaban directamente del medio de enriquecimiento. Sin embargo, la causa de la no detección también se pudo deber a que el valor teórico calculado para la dosis de vitamina, resultó ser mas bajo en la práctica (por una posible subestimación del valor teórico). Esto debido al nivel real de la inclusión de la vitamina al alimento. En este sentido, Villeneuve, *et al.*, en el 2005 realizaron un experimento en el que elaboraron alimentos microparticulados que contenían 0, 10, 50, 250 y 1,000 mg de RA para ser suministrados a larvas de *D. labrax* con el objeto de detectar los niveles reales de inclusión de la vitamina. Por medio de HPLC determinaron que los niveles reales de inclusión del RA suministrado a las larvas analizadas eran mas bajos (12, 13, 31, 62 y 196 mg/kg, respectivamente). Aunado a este trabajo, y como se mencionó anteriormente, Haga *et al.*, (2006) determinaron que los niveles reales de inclusión en el alimento vivo son muy bajos (comparados con el uso de alimentos microparticulados), dado que al utilizar 100 mg RA /g lograron cuantificar solo 12.69 mg/g en rotíferos y 15.89 mg/g en Artemia. Con lo cual se puede asumir que existe un importante factor de lixiviación de la vitamina A.

Finalmente, se puede considerar que la causa de la no detección del retinol en las muestras se debió a que el nivel de vitamina utilizado resultó ser mucho mas bajo en la práctica que el valor teórico calculado. Probablemente, aunque sí se logró incorporar un poco de vitamina en las presas vivas, cierta cantidad se perdió mediante la desnaturalización por



fuentes luminosas y otra cantidad importante se perdió por lixiviación dentro de los tanques de cultivo.

Algunos meses después de haber realizado el protocolo de enriquecimiento de este trabajo de tesis, Giménez *et al.*, (2007) publicaron un estudio donde evaluaron la acumulación de los niveles de vitamina A en presas vivas (*Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia*) enriquecidos con la emulsión comercial Easy-Selco® (INVE).

En este experimento agregaron a la emulsión 124, 138, 151, 165, 178, 192, 226, 259 y 327 µg totales de *all-trans* retinil acetato (1'500,000 UI/g; Acros Organics; 1 UI; VA = 0.34 µg retinil acetato) para rotíferos y 494, 548, 602, 629, 710, 764, 899, 1,034 y 1,334 µg de *all-trans* retinil acetato para *Artemia*. Para los rotíferos colocaron 230 individuos / ml en un recipiente de 30 l que contenía 0.15 g/l de la emulsión enriquecida, el proceso de enriquecimiento duró 2 horas a 20 °C utilizando aireación e iluminación continuas. Para la *Artemia*, colocaron 200 nauplios en un recipiente de 10 l con 0.6 g/l de la emulsión, durante 24 h a 20 °C utilizando aireación e iluminación continuas. Analizaron los retinoides mediante HPLC siguiendo el método propuesto por Takeuchi *et al.* (1998). Realizaron una extracción de lípidos totales con cloroformo:metanol, siguiendo el protocolo de Folch (Folch *et al.*, 1957). Las muestras las guardaron a -20 °C. Para posteriormente inyectarlas en un equipo acoplado a un detector U.V.-luz visible, ajustado a 325 nm. El flujo que utilizaron fue de 1.5 ml /min y el tiempo de elusión fue de 25 min.

Estos autores encontraron que el nivel de incorporación de vitamina para rotíferos es constante hasta alcanzar un umbral entre los 226 y los 327 µg sobre el cual la incorporación de vitamina es máxima. Determinaron que los rotíferos son capaces de acumular como

máximo 806 ng / mg de VA (peso seco) del tratamiento en el que utilizaron 327 ug de VA. En Artemia, la VA se incrementa desde 4.0 ng/mg (peso seco) hasta un máximo de 52 ng/mg (peso seco) en nauplios enriquecidos con la emulsión que contenía 1,334 µg. Con este trabajo Giménez *et al.*, (2007) concluyeron que la acumulación de retinoides aumenta a medida que aumenta la concentración de VA en la emulsión de enriquecimiento, sin embargo esto no sucede de manera proporcional, además que existe una concentración máxima de VA la cual el organismo de la presa viva puede acumular. Esto lo asumen debido a que las concentraciones teóricas se incrementaron de 1 a 4.5 veces para rotíferos y de 1 a 13 veces para Artemia. Sin embargo, los análisis revelaron que solo se incrementaron en 1.6 veces para rotíferos y 2.7 para nauplios de Artemia.

Finalmente, a manera de hipótesis, los autores mencionan que tanto los rotíferos como los nauplios de Artemia muy probablemente son capaces de absorber y metabolizar la VA, debido a la presencia de RA en los análisis.

Como se pudo observar en el trabajo citado anteriormente, el método de enriquecimiento es muy semejante al que se utilizó en este trabajo de tesis. En ambos trabajos se utilizó una emulsión comercial rica en ácidos grasos y lípidos, para disolver la VA e incorporarla al alimento vivo. Asimismo, las densidades de los individuos y las condiciones fisicoquímicas para realizar el enriquecimiento fueron muy similares. Así como las técnicas de extracción y detección. Además que en ambos trabajos se utilizó el mismo estándar para la identificación del retinol. Por lo tanto, aunque el trabajo de Giménez *et al.*, (2007) no se tomó como referencia desde un inicio, es posible concluir que el protocolo de enriquecimiento y el de detección del retinol utilizado en este trabajo de tesis y el realizado

por Haga *et al.* en el 2002, se apegaron a prácticas que siguen siendo reconocidas actualmente por su eficiencia en la inclusión de la VA en el alimento vivo.

#### **8.4. CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *RAR $\alpha$* y *Hoxa5***

En el presente trabajo de tesis no fue posible cuantificar los niveles de retinol incluidos en las larvas de la cabrilla, sin embargo, no significa que la VA estuviera ausente en el alimento, pues la dieta control y la experimental contenían niveles estándar del enriquecedor comercial. De otra manera, hubiera sido determinante para inhibir el desarrollo y supervivencia de la larva como se muestran las consecuencias en la Tabla I. El hecho de no haber encontrado retinol en exceso en las muestras experimentales, explica la razón por la cual no existieron diferencias significativas entre los valores de la expresión de los genes seleccionados entre el control y la dieta experimental. Por lo tanto, al no encontrar diferencias estadísticamente significativas, no es posible aceptar la hipótesis planteada en este trabajo de tesis. Sin embargo, el desarrollo de la técnica de cuantificación mediante PCR en tiempo real se llevó a cabo con éxito y proporcionó datos interesantes que valen la pena resaltar y discutir, ya que los patrones de expresión a lo largo del desarrollo de larvas de peces marinos han sido escasamente descritos para especies de importancia comercial.

En la Figura 18 se observan los patrones de expresión obtenidos para el gen que codifica el *RAR $\alpha$* . En la que se puede observar que a los 5 DDE existe una sobre expresión del orden de los  $2x$  (con respecto al calibrador) que continua en aumento hasta alcanzar un valor aproximado de  $2.5x$  en el día 15 DDE. A partir del día 20, se observa un claro decremento

en la expresión llegando a valores estables hasta el día 30 cercanos al 1.5x. Villeneuve *et al.* (2004) reportaron un comportamiento semejante, en donde determinaron un incremento general en la expresión de los RAR $\alpha$  durante el periodo larvario (13 DDE 2.77x; 18 DDE; 2.88x; 23 DDE 1.96x.). Además encontraron un decremento importante entre los días 20 y 25. En este sentido, es muy probable que el comportamiento observado por Villeneuve *et al.* (2004) para la lubina europea y el de la cabrilla arenera, sean el producto de la importancia de dichos receptores durante los períodos de altas tasas de diferenciación celular y maduración de una región en particular, que en este caso sería la región abdominal. Peña *et al.* (2003) establecen que en la cabrilla arenera la maduración del tracto digestivo culmina a los 16 DDE. Aunado a esto, si tomamos en consideración que la maduración del tracto digestivo determina el final del periodo larvario y el comienzo del periodo juvenil (Sarasquete *et al.* 1995), significa también que se han concluido la mayoría de los cambios morfológicos característicos de esta etapa, como son la completa formación de la placa hipúrica y todos los elementos de las aletas pares e impares, lo que igualmente define el inicio del periodo juvenil (Hubbs, 1958 modificado por Ortiz-Galindo, 1991). En este mismo contexto, en estudios de la actividad enzimática en fases iniciales de la cabrilla, Álvarez-González (2003) demostró cómo la mayoría de las enzimas digestivas características del periodo larvario (amilasas, proteasas alcalinas, esterases no específicas, entre otras), incrementaron fuertemente su actividad de los 2 a los 12 DDE, para luego disminuir a los 15-25 DDE, y posteriormente mantener un nivel máximo estable después de los 25 DDE.

Todos estos antecedentes indican que entre los 5 y 15 DDE existe un aumento en la síntesis proteica, por consiguiente exceso de mRNA en diversas regiones del individuo, lo cual directamente incrementa la demanda de los receptores nucleares involucrados en la

regulación de dicha síntesis. Esto explica los altos valores de expresión encontrados para el RAR $\alpha$  desde los 5 a los 15 DDE. Posterior a este intervalo de tiempo, a partir del día 20 DDE, se observa un decremento (Figura 18) en los valores de la expresión del gen, lo cual muy probablemente se deba a que la mayoría de los cambios morfológicos y fisiológicos del periodo larvario culminaron o están por culminar entre los 16 y 20 DDE. Por lo tanto, la demanda de receptores vuelve a niveles de expresión muy cercanos al  $1x$  (con respecto al calibrador). Esto indica que la expresión del receptor vuelve a niveles basales, con respecto a la expresión del gen endógeno (GAPDH) y sugiere que el receptor está siendo utilizado para satisfacer únicamente las necesidades de crecimiento y del recambio celular en esta etapa temprana del desarrollo de pez. Es muy probable que si se analizara la expresión del RAR $\alpha$  en la cabrilla durante un intervalo de tiempo en el que se incluyera el final de la fase juvenil y el comienzo de la fase adulta, se encontraría otro incremento en la expresión de los receptores.

Al comparar las Figuras 17 y 18, es interesante notar que los valores de transcripción de los RAR $\alpha$  coinciden en buena medida con los valores de expresión del gen Hoxa5 ( $2x$  a los 5 DDE;  $2.5x$  a los 15 DDE;  $1.5x$  a los 20 DDE;  $1x$  a los 25 y 30 DDE). Como se mencionó anteriormente el gen Hoxa5 actúa regulando la expresión genética para la diferenciación celular en la región abdominal, particularmente en la región del tracto digestivo. Por lo tanto, se puede asumir que el patrón encontrado en la expresión del gen Hoxa5 responde a la misma demanda de regulación genética originada por la gran cantidad de células que se encuentran diferenciándose en la región abdominal durante los 5 y 20 DDE, y dado que los genes Hox se activan en ventanas de tiempo y espacio muy específicas (Mayr, 2001; Maves y Kimmel, 2005) se puede asumir que la ventana de expresión del Hoxa5 en la cabrilla arenera se encuentra entre los 5 y los 20 DDE.

Otro aspecto interesante, es que al realizar las observaciones en los individuos que presentaron malformaciones, casi todos los casos se encontraron en la región mandibular (Figura 3). Villeneuve *et al.*, (2006) reportaron que en *D. labrax*, el 8% de las larvas a los 40 DDE alimentadas con altos niveles de retinol, presentaron malformaciones en la región cefálica, particularmente en el opérculo, premaxilar, maxilar, dentario y el neurocráneo (Figura 22-A), lo cual coincide con algunos de los casos encontrados en este estudio, representados en la Figura 22-B.

Haga *et al.* (2002) observaron defectos craneofaciales en *Paralichthys olivaceus* sometidos a un tratamiento con altos niveles de VA durante las primeras 40 h después de la eclosión. Atribuyeron las malformaciones a la posible desorganización en la expresión de genes del desarrollo (no realizan ensayos de expresión genética). El aspecto importante en este estudio, es que encontraron que transcurridas las 40 h es imposible inducir malformaciones en la misma región, debido a que la susceptibilidad al RA desaparece gradualmente durante el desarrollo, argumentando que después de las 40 h la región mandibular no se ve afectada por el tratamiento mediante RA suponiendo que las células ya se encuentran diferenciadas. Ésta hipótesis sería confirmada por Takio *et al.* (2007) quienes estudiando el desarrollo de los rombomeros en *Brachidanio rerio* encontraron que el RA es necesario para la activación de la expresión de los genes Hox, pero no para el mantenimiento, lo que significa que probablemente una vez que la célula se ha diferenciado, o la ventana de expresión del gen Hox a transcurrido, la presencia de RA no tiene ninguna influencia en esa región en particular. Además, se debe considerar que la posición del gen en el cluster está correlacionada con su respuesta al RA. Esto es, los genes que se encuentran en la región 3' del cluster presentan una sensibilidad menor al RA que los que se encuentran en la región

5'. Por ejemplo, en ratones y en el anfibio *Xaenopus laevis*, los rombomeros mas posteriores requieren mayores concentraciones de RA para la activación de la expresión de los Hox (Cañestro y Postlethwait, 2007).

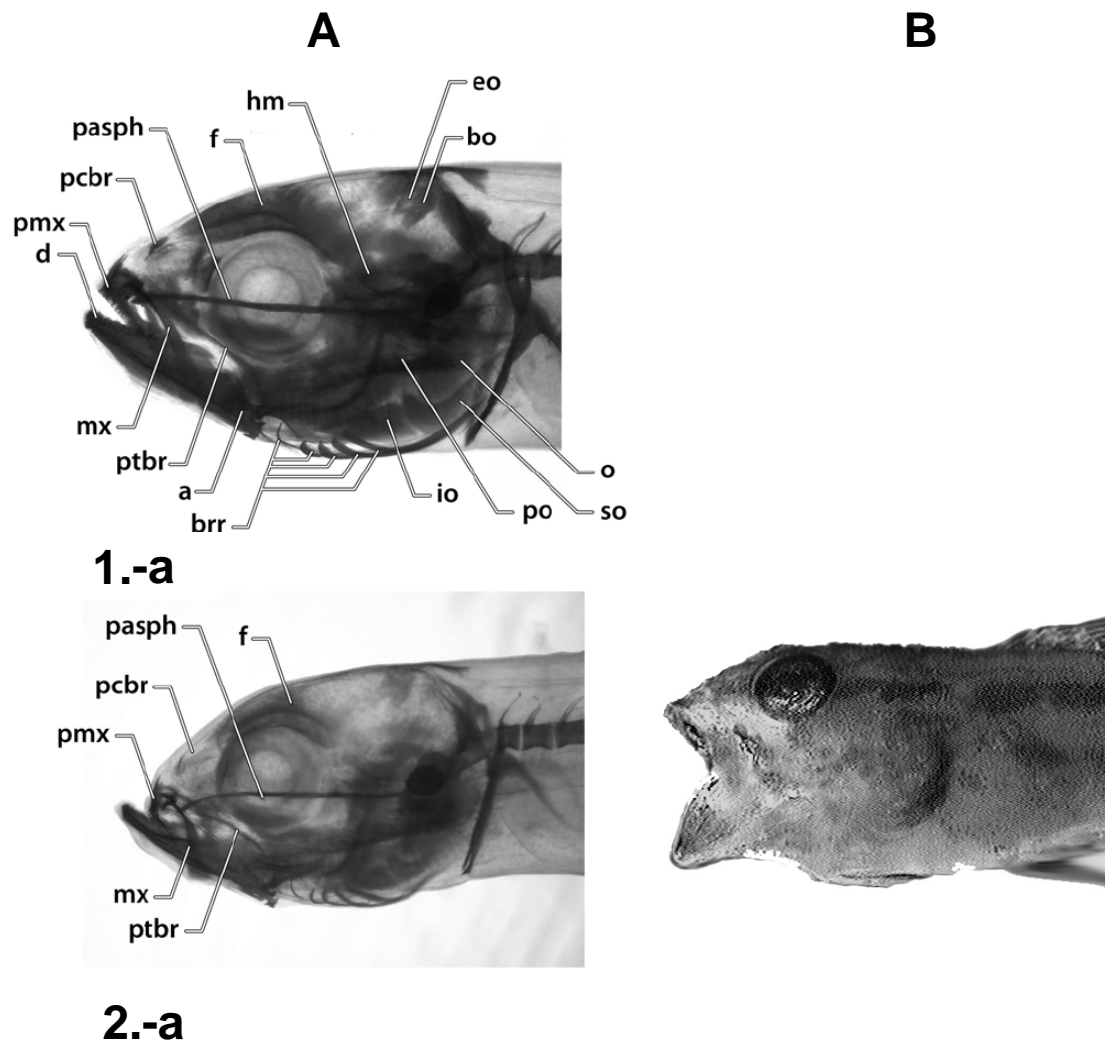


Figura 19-A Malformaciones inducidas en el cráneo de larvas de 40 DDE de *D. labrax*. (1.-a) larva normal, (1.-b) larva deforme. (se indican las estructuras anormales). Individuos teñidos con rojo de Alizarin para revelar estructuras calcificadas. Abreviaturas: *a*, angular; *bbr*, radios branquiales; *bo*, basioccipital; *d*, dentario; *eo*, exoccipital; *f*, frontal; *hm*, hyomandibular; *io*, íter opérculo; *mx*, maxila; *o*, opérculo; *pasph*, parasfenoides; *pcbr*, lamina paracerebralis; *pmx*, premaxila; *po*, preopérculo; *ptbr*, proceso pterigoideo; *so*, subopérculo. (tomada de Villeneuve *et al*, 2006).

Figura 19-B. Juvenil de *Paralabrax maculatofasciatus* de 30 DDE con malformación en mandíbula inferior (generada en este estudio).

Por lo tanto, tomando como referencia los trabajos citados anteriormente, los resultados obtenidos sobre la incidencia de malformaciones en las larvas permiten suponer que durante el tiempo en el que se proporcionó el alimento y a la concentración suministrada, y la combinación de ambos factores, muy probablemente interfirió en el desarrollo normal de la región cefálica, particularmente en la región mandibular. Aunado a esto, resulta muy probable que la ventana de expresión de los genes Hox que regulan el desarrollo de la región mandibular para la cabrilla arenera se encuentre entre los 25 y 30 DDE a diferencia de los genes Hoxa5 que, como se mencionó anteriormente, se encuentra entre los 5 y los 20 DDE.



## 9. CONCLUSIONES

Aunque sí se logró incorporar un poco de vitamina A en las presas vivas, es muy probable que cierta cantidad se perdiera mediante desnaturalización por fuentes luminosas y otra cantidad importante por lixiviación dentro de los tanques de cultivo, implicando que el nivel de vitamina utilizado haya sido más bajo en la práctica que el valor teórico calculado, lo cual trajo como consecuencias que: a) el análisis por HPLC no detectara con precisión la concentración de vitamina, y por tanto, los resultados fueron únicamente cualitativos, b) no fue posible encontrar diferencias significativas en el crecimiento de las larvas, así como tampoco entre los patrones de expresión de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$*  de los individuos sometidos a los tratamientos.

Se obtuvieron las secuencias parciales de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$*  específicas de *Paralabrax maculatofasciatus* y se cuantificaron exitosamente los patrones de expresión de los genes durante el desarrollo inicial de las larvas. En el caso del gen *RAR*, se encontró que a los 5 DDE existe una sobre expresión del orden de los  $2x$ , que continúa en aumento hasta alcanzar un valor aproximado de  $2.5x$  a los 15 DDE. A partir del día 20, se observa un claro decremento en la expresión llegando a valores estables cercanos al  $1.5x$  hasta los 30 DDE.

Los valores de transcripción de los *RAR $\alpha$*  coincidieron en buena medida con los valores de expresión del gen *Hoxa5*, y dado que los genes *Hox* se activan en ventanas de tiempo y espacio muy específicas, es posible concluir que la ventana de expresión del *Hoxa5* en la cabrilla arenera se encuentra entre los 5 y los 20 DDE.

## 10. RECOMEDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Con la experiencia lograda en el presente trabajo de tesis, para trabajos futuros en este tema se recomienda:

1. Determinar el nivel de dosis óptima de vitamina A en la cabrilla arenera donde se abatan las posibles malformaciones y se logre una mejor calidad larvaria.
2. Evaluar los niveles de inclusión de distintas concentraciones de VA al enriquecer el alimento vivo, con el objeto de determinar la capacidad de absorción de VA de estos organismos.
3. Determinar la ventana de expresión de los genes Hox que regulan la diferenciación celular en la región mandibular.
4. Complementar la información generada de los datos moleculares con estudios histológicos o histoquímicos de la región intestinal y cefálica.
5. Correlacionar los efectos de la incorporación de altas dosis de VA, con la actividad y expresión de enzimas digestivas intestinales de la cabrilla (p.e. aminopeptidasa, maltasa, fosfatasa alcalina y leucin alanin peptidasa).

## 11. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Accordi, A. y C. Clementi .2003. Retinol-induced apoptosis in larval pancreas of *Bufo bufo*  
F. J. Anat 202 , pp309-314
- Alvarez-González, C.A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M., Y Grayeb-Del Alamo, T. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* fed practical diets. Aquaculture 194 (1-2): 151-159.
- Alvarez Gonzáles, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis doctoral. CICIMAR-IPN La Paz. B.C.S. México.
- Anguas Vélez, B. 2001: Estudio sobre los requerimientos en proteína y energía de juveniles de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Stein,1868) (Osteichthyes:Serranidae). Tesis de doctorado, CICIMARIPN.
- Cahu, C. Zambonino-Infante, J. Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture 227:245-258
- Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays Journal of Molecular Endocrinology 25:169-193.

- Cahu, C. Zambonino-Infante, J. Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227:245-258
- Cañestro, C. y Postlethwait, J. 2007. Development of a chordate anterior–posterior axis without classical retinoic acid signaling. *Developmental Biology* 305: 522–538
- Cervantes-López, J. Sanchez-Machado, D. , Rios-Vazquez, N. 2006. Hig-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, a-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A*. 1105:135-139
- Charité, J. De Graaff, W. Consten, D. Reijnen, M., Korving, J. y Deschamps, J. 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125: 4349-4358.
- Cheng-Sheng L. 2003. Biotechnological advances in finfish hatchery production: a review *Aquaculture* 227 439–458
- Civera, R., Ortiz, J. L., Dumas, S., Nolasco, H., Alvarez, A., Anguas, B., Peña, R., Rosales, M., Carrasco, V., García, R., Goytortúa, E. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). pp 352-406. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.

- Dedi J, Takeuchi T, Seikai T, Watanabe T. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 133, 135-146.
- Dobbs-McAuliffe, B. Zhao, Q. Linney, E. 2004. Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*. 121:339-350.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Freund, J. Domon-Dell, C. Kedinger, M. y Duluc, I. 1998. The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cel boil.* 76:957-969
- García-Gómez, R. 2006. Uso de dietas microencapsuladas para la alimentación de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría CICIMAR-IPN BCS. 63 pp.
- Gatesoupe F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gause W. y Adamovicz J. (1994). The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* 3, 123-135.

- Giménez, G., Kotzamanis, Y. Hontoria, F. Estevez, A. y Gisbert, E. 2007. Modelling retinoid content in live prey: A tool for evaluating the nutritional requirements and development studies in fish larvae. *Aquaculture* 267, 76:82.
- Govoni, J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.* 39, 69-80.
- Gillespie, R. y Gudas, L. 2007. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARb y Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *Journal of Molecular Biology*. 372, 298:316
- Haga, T. Takeuchi, Y. Tadahisa, S. 2002 Influence of all-*trans* retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder *Fisheries Science*; 68: 560–570
- Haga, T. Ohta, K. Shima Y. y Takeuchi, T. 2006. Effect of light irradiation on dynamics of vitamin A compounds in rotifers and *Artemia* *Fisheries Science*; 72: 1020–1026
- Heid, C. Stevens, J. Livak, K. y Williams, M. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*. 987-994.

Kardong, K. 2002. Vertebrates, Comparative anatomy, function, evolution. McGraw-Hill.  
E.U.A. 762 pp.

Kendall G, y Latchman, D. 1996. Polymerase Chain Reaction for RNA analysis. Methods:  
Companion to Methods in Enzimology.10:279-282.

Kolkovski, S. 2005. Progress in fish larval nutrition Live-feed Enrichments and Broodstock  
Additives - 'Tailor-made' to Requirements. Aqua Feeds: Formulation & Beyond, 2 :1.

Krinsky, N. 1994. The biological properties of carotenoids. Pure and applied Chemistry.  
Vol 66-5 1003:1010.

Lidén, M. y Ericsson, U. 2005. Development of a versatile reporter assay for studies of  
retinol uptake and metabolism in vivo. Experimental Cell Research 310 401 – 408

Mayr, E. 2001. What evolution is. Basic Books. E.U.A. 318 p.

Maves, L., Kimmel, C. 2005. Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior  
hindbrain by retinoic acid. Developmental Biology 285:593-605.

Moyle, P.B. y J. Cech Jr. 1982. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall, Inc.  
EUA. 342pp.

- Nagao, A. During, A. Hoshino, C. Terao, J. y Olson, J. (1996) Stoichiometric conversion of all-*trans* *b*-carotene to retinal by pig intestinal extract. Arch. Biochem. Biophys. 328: 57–63.
- Olalde Rodríguez, A.M. 2005. Efecto de la espermina en la expresión del gen de la amilasa e inmunoglobulina M durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría CIBNOR A.C. BCS México. 106 pp.
- Olson J.A.1993. Vitamin A, retinoids and carotenoids In Shils ME, Olson JA, Shike M, eds Modern nutrition in health and disease 8th ed Philadelphia Lea & Febiger 287—307.
- Ortíz-Galindo, J.L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Peddie, S. 2004. Spinal deformities in fish with particular reference to aquaculture. World Aquaculture 35:4 13-14.
- Peña, R. S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte, J. L. Ortíz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture. 219. 1-42 633:644
- Reue, K. 1998. mRNA Quantitation techniques: Consideration for experimental design and application. J. Nutr. 128:2038-2044.



- Rosales-Velásquez, M.O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 62 pp.
- Ross, S. McCaffery, P. Drager, U. y Deluca, L. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 80 1021:1054.
- Sarasquete, M. A. Polo y González de Canales, M. 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata* L. *Histochem. J.* 24, 337-344.
- Sordino, P. Duboule, D. Kondo, T. 1996. Zebrafish *Hoxa* and *Evx-2* genes: cloning, developmental expression and implications for the functional evolution of posterior *Hox* genes. *M. Develp.* 59:165-175.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. 309 pp.
- Takeuchi, T. Dedi, J. Haga, Y. Seikai, T. Watanabe, T. 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169, 155–165.
- Takio Y. Kuraku S. Murakami, Y. Pasqualetti, M. Rijli, F. Narita, D. Kuratani, S. Kusakabe, R. 2007. Hox gene expression patterns in *Lethenteron japonicum*

embryos—Insights into the evolution of the vertebrate Hox code. *Developmental Biology*. 308:606-620.

Thaller C, Eichele G. 2003. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 1987;327: 625–628. *J. Anat.*

Tucker, J. 1998. *Marine fish culture*. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. 750 pp.

User Bulletin #2. 1997. ABI PRISM 7700 Sequence detection system. U.S.A.

Villeneuve, L. Gisbert, E. Cahu, C. Le Gall, M. y Zambonino-Infante, J. 2004. Expression and localization of some retinoid receptors during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 242, 537-551.

Villeneuve, L. Gisbert, E. Moriceau, J. Cahu, C. Zambonino-Infante, J. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition*, 95 - 4, 677:687

Villeneuve, L. Gisbert, E. Delliou, H. Cahu, C. Zambonino-Infante, J.L. 2005. Dietary levels of all-*trans* retinol affects nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *British Journal of Nutrition*. 93, 791:801.

Von Linting, J. y Vog, K. 2000. Filling the gap in vitamin A research. *Journal of Biological Chemistry*. 275-16: 11915:11920.

Wolf, G. (1984). Multiple functions of vitamin A. *Physiological reviews* 64 (3), 873-937.

Zambonino Infante J. y Cahu C. (1999) High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr*. 129, 1195–1200.

Zambonino, J. Cahu, C. Villeneuve, L. Gisbert, E. 2005. Nutrition, development and morphogenesis in fish larvae: some recent developments. *Aquafeeds: Formulation and Beyond*. 2: 15-20.

## 12. ANEXO

Curvas obtenidas como producto de la amplificación de los genes *Hoxa5* y *RAR $\alpha$*  usando la bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> en un equipo ABI PRYSM 7000 SDS (Applied Biosystems).

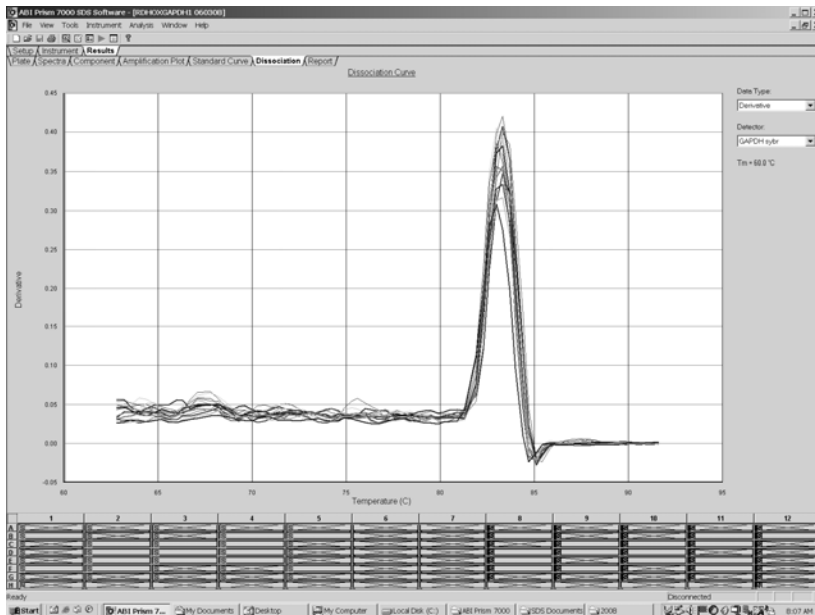


Figura 20. Curvas de disociación para el gen de la GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

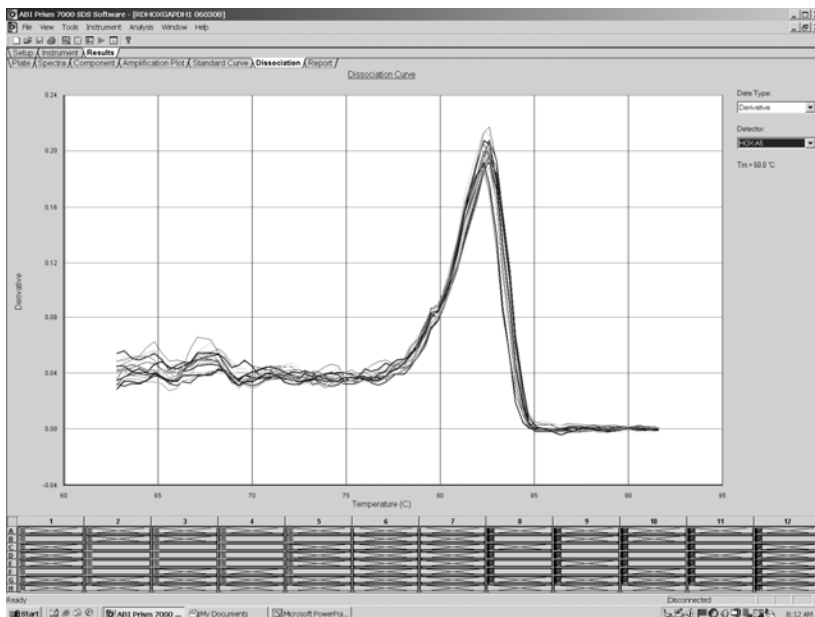


Figura 21. Curvas de disociación para el gen *Hoxa5*. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

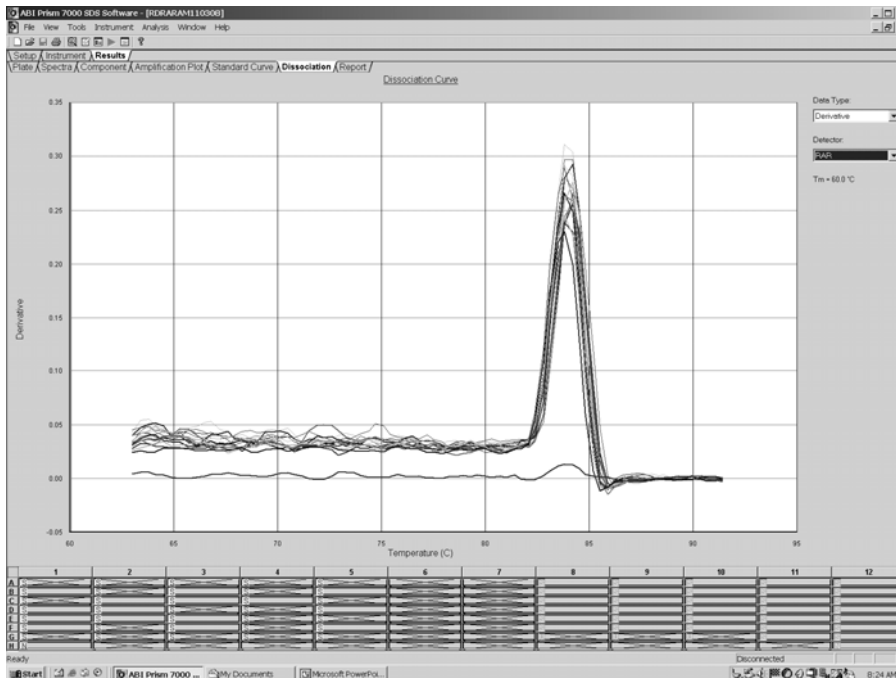


Figura 22. Curvas de disociación para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

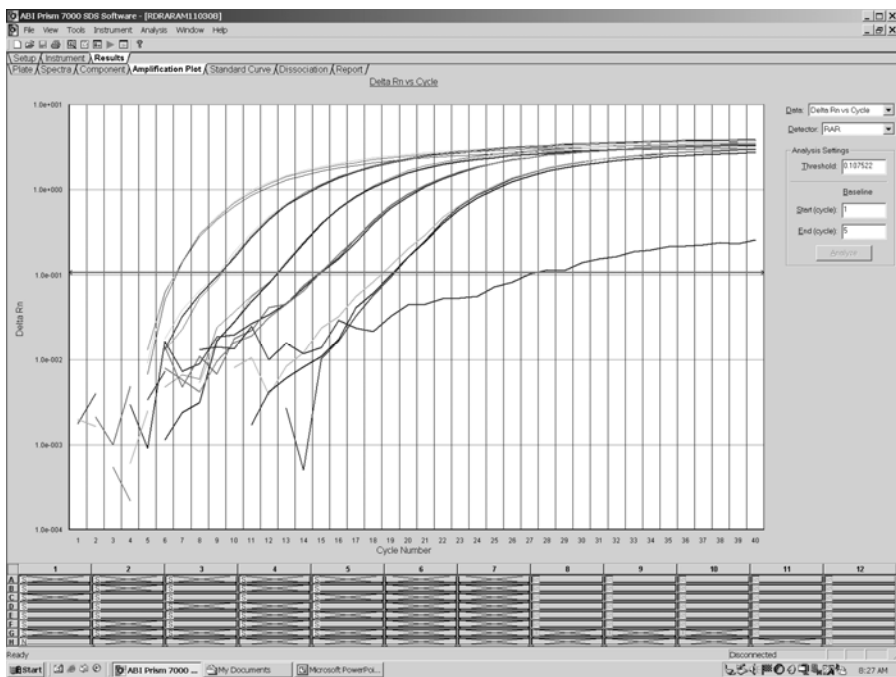


Figura 23. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

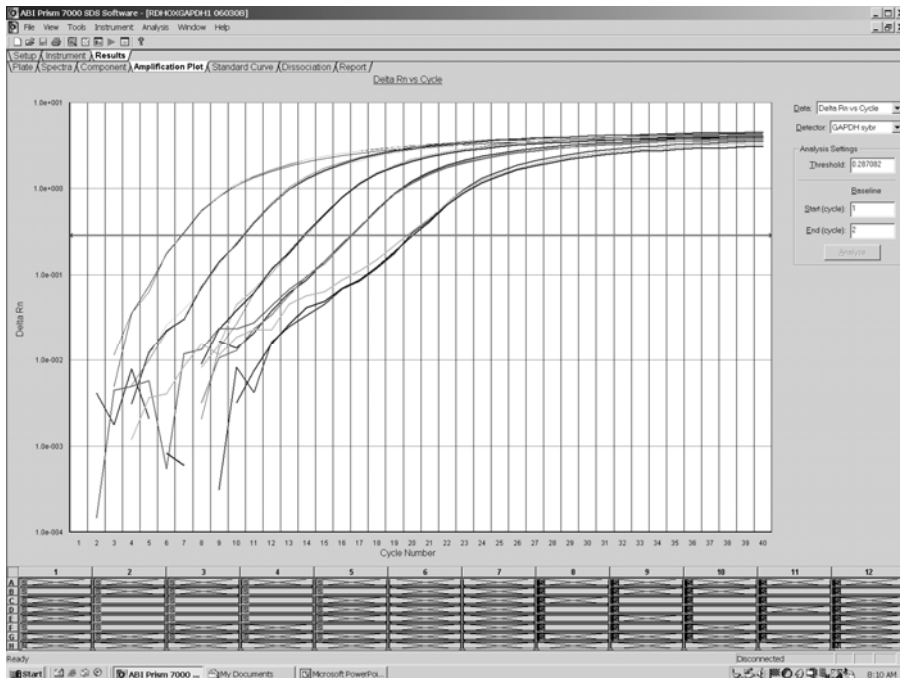


Figura 24. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

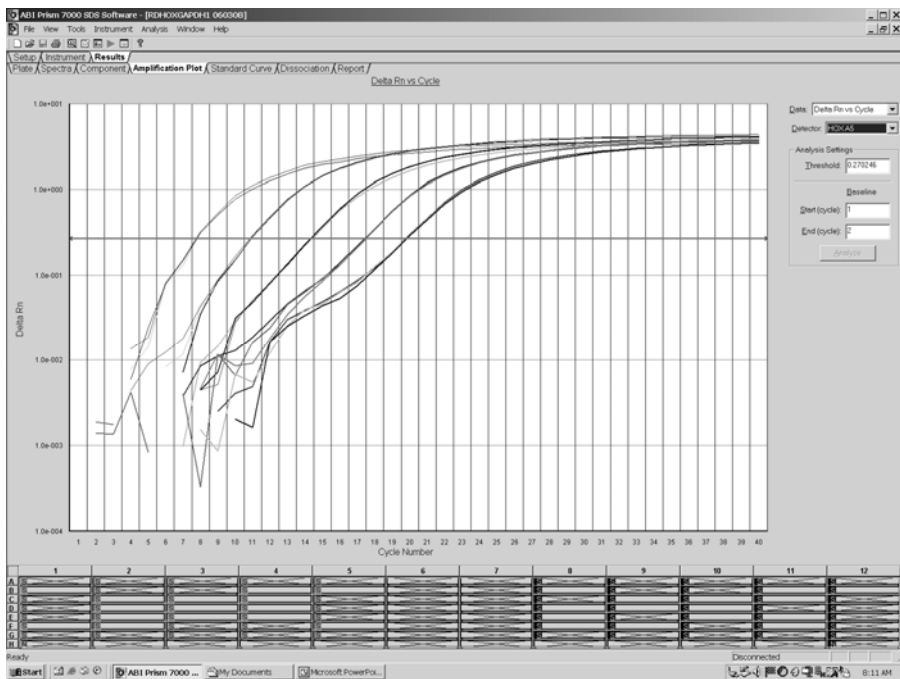


Figura 25. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen Hoxa5. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

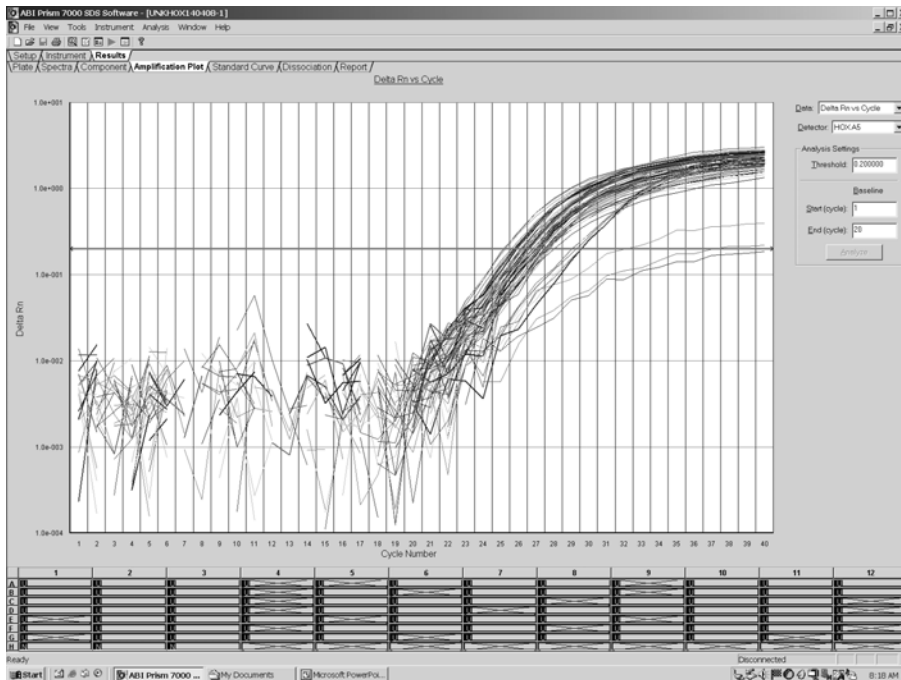


Figura 26. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen Hoxa5. Generado en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

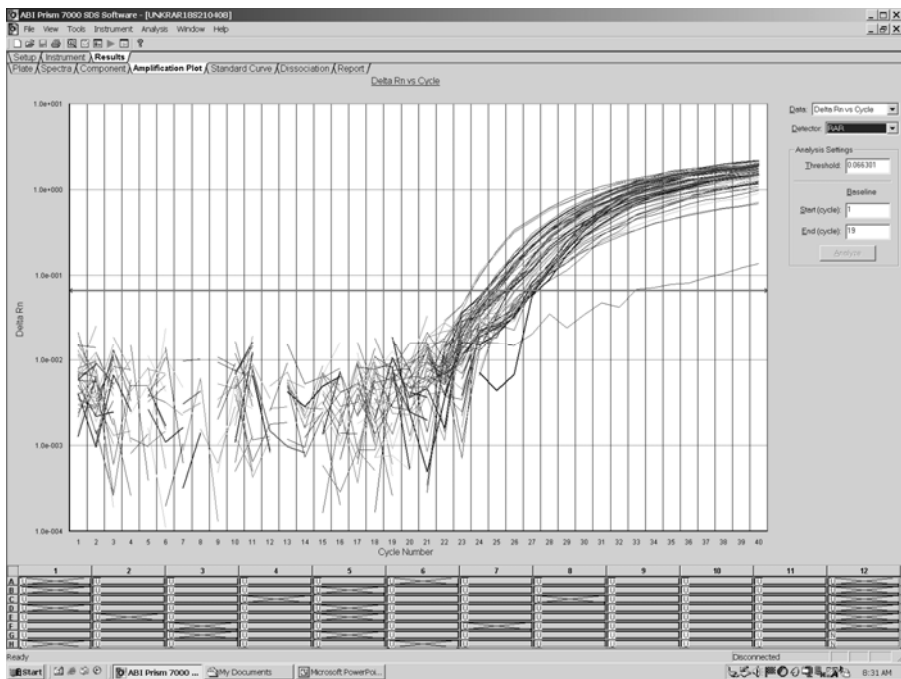


Figura 27. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen RARα. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

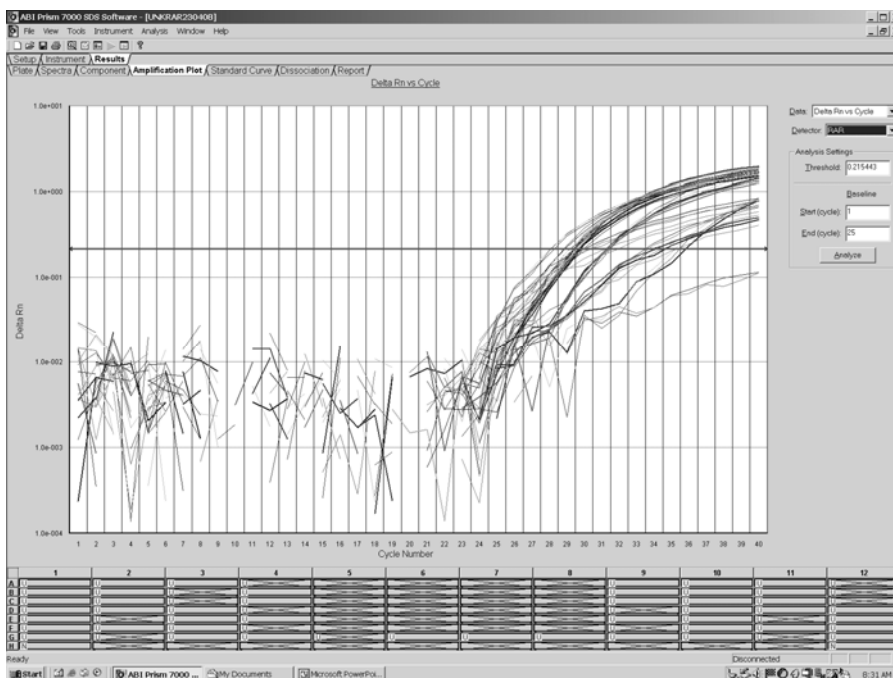


Figura 28. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen RAR $\alpha$ . Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

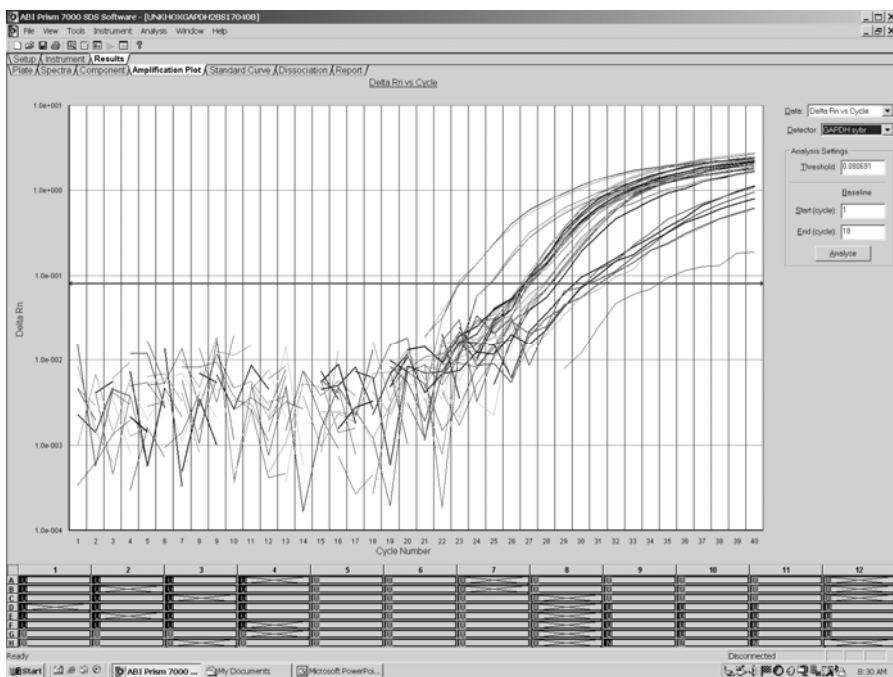


Figura 29. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).



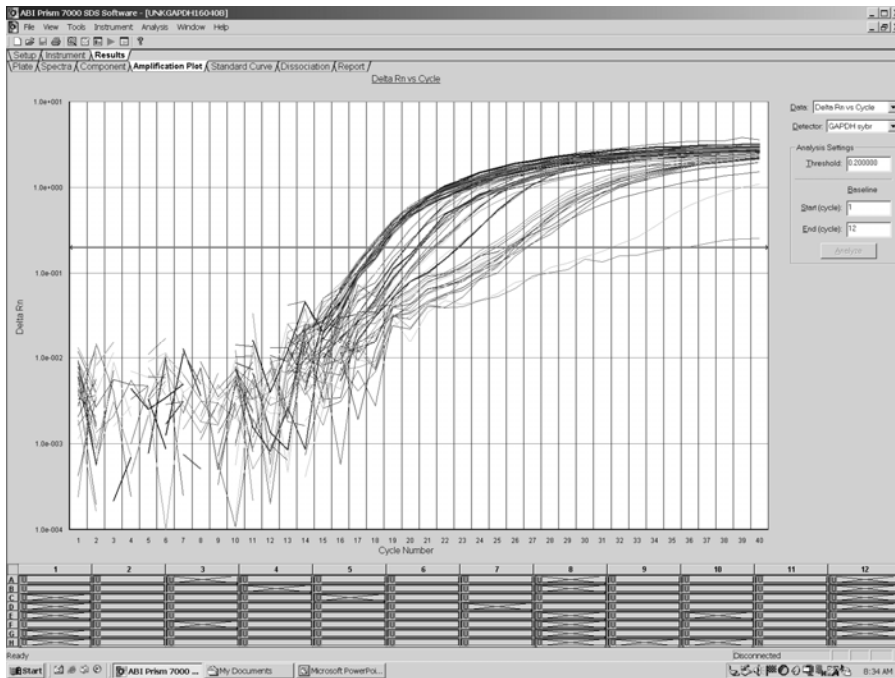


Figura 30. Curvas de amplificación en tiempo real para el gen GAPDH. Generada en el equipo ABI PRYSM 7000 SDS utilizando bioquímica SYBR-GREEN<sup>®</sup> (Applied Biosystems).