

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**NUTRIGENÓMICA DEL CAMARÓN: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL  
DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* EN  
RESPUESTA AL CONSUMO DE *Ulva clathrata* COMO SUPLEMENTO  
ALIMENTICIO**

**POR**

**EDITH ELIZONDO REYNA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN NUTRICIÓN Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS**

**FEBRERO, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**NUTRIGENÓMICA DEL CAMARÓN: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL  
DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* EN  
RESPUESTA AL CONSUMO DE *Ulva clathrata* COMO SUPLEMENTO  
ALIMENTICIO**

**POR**

**EDITH ELIZONDO REYNA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN NUTRICIÓN Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS**

**FEBRERO, 2018**

**NUTRIGENÓMICA DEL CAMARÓN: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL  
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* EN RESPUESTA  
AL CONSUMO DE *Ulva clathrata* COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO**

**Comité de Tesis**

**DRA. MARTHA GUADALUPE NIETO LÓPEZ**  
Director de Tesis Interno

**DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**  
Director de Tesis Externo

**DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ**  
Secretario

**DR. DENIS RICQUE MARIE**  
Vocal

**DRA. MIREYA TAPIA SALAZAR**  
Vocal

**DR. JOSÉ MA. VIADER**  
Vocal

## AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

Gracias *a mis padres* que siempre han sido los mayores promotores en mi vida, gracias por su amor, por confiar y creer en mí y en mis expectativas, por su incondicional apoyo, por sus consejos y palabras que me han guiado a lo largo de mi vida. Gracias *a mis hermanos* por el cariño que siempre me han brindado, por estar en mi vida y por el apoyo para culminar mis metas.

Me siento afortunada y quiero agradecer a lo largo de este proyecto *a cada Profesor investigador y docente*, grandes personas con mucha experiencia, los cuales influyeron para el proceso integral de mi formación profesional, gracias por sus enseñanzas, consejos, tiempo, apoyo, pero sobre todo gracias por la sincera amistad. Les estoy muy agradecida por creer y confiar en la realización de esta tesis.

Agradezco a todos *los amigos y compañeros* que fueron partícipes de este proceso ya sea de manera directa o indirecta, fueron ustedes los que aportaron algo importante para que hasta hoy se vea reflejado la culminación de este proyecto tan importante en mi vida profesional y personal.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT, México) por el apoyo económico brindado; al **Programa de Maricultura** y a **Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.**, por haberme dado la oportunidad de formarme en ella. al **Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud, U.A.N.L.**, por haberme brindado la oportunidad de realizar en sus instalaciones gran parte de los procesos llevados a cabo en este proyecto de investigación.

No fue sencillo el camino, pero fue un gran reto personal y profesional, sin embargo puedo afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, de cada etapa, de experiencias memorables y de la compañía de grandes personas, así como también pude aprender de los diferentes obstáculos vividos, que fueron un gran reto.

*“El optimista ve oportunidad en cada peligro; el pesimista ve peligro en cada oportunidad.” (Winston Churchill)*

*“No importa cuántas veces te equivocas o con qué lentitud progresas, sigues estando muy por delante de los que ni lo intentan.” (Anthony Robbins)*

*"He fallado más de 9000 tiros en mi carrera. He perdido casi 300 juegos. 26 veces que me han confiado para tomar el tiro del juego ganador y he perdido. He fallado una y otra y otra vez en mi vida. Y es por eso que tengo éxito." (Michael Jordan)*

*"Los desafíos son los que hacen que la vida sea interesante y superarlos es lo que hace la vida significativa." (Joshua J. Marine)*

## DEDICATORIAS

Primeramente doy gracias a *Dios* por haberme acompañado en toda esta etapa llena de grandes experiencias, por la salud la cual me ha permitido vivir cada día y aprender a lo largo del proceso. Sin el nada soy. Gracias por la vida y por todas las bendiciones que me has brindado.

*“Tu palabra es una lámpara que guía mis pies y una luz para mi camino.” Salmo  
119:105*

*“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece” Filipenses 4:13*

Desde antes de iniciar este proyecto se lo dedique a mi hermana *Arleth* con todo mi amor, en su honor, por agradecimiento de todos los bellos momentos que pasamos juntos esos años, por las enseñanzas que me dejo durante el tiempo que Dios le permitió vivir en nuestra compañía, y por cada aprendizaje después de su triste y difícil partida. Ha sido mi ángel y mi guía todo este tiempo. Y por siempre vivirá en mi corazón y en mi mente. Q.E.P.D. Te amo

También dedico este logro al gran amor de mi vida *Mateo Leonardo*, hijo, posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Eres la razón que hace que me levante cada día a esforzarme por el presente y el mañana, eres mi principal motivación; sin planearlo llegaste cuando más te necesitaba justo a darle color a mi vida, el más bello regalo que Dios me brindo; llegaste a mi mundo para mostrarme el amor más sincero y saber que la vida es bella a pesar de las adversidades. Quiero ser cada día mejor para ti y lograr darte una vida feliz.

*“Las personas más bellas que hemos conocido son aquellos que han conocido la derrota, el sufrimiento, la lucha, la pérdida, y han encontrado su manera de salir de las profundidades. Estas personas tienen una gratitud, sensibilidad y comprensión de la vida que los llena con compasión, dulzura, y una preocupación amorosa. Las personas bellas no suceden por casualidad.” Dra. Elisabeth Kübler-Ross*

## ÍNDICE

Sección	Página
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1.- INTRODUCCION .....	1
2.- ANTECEDENTES .....	3
2.1 Cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	3
2.2 Uso de algas marinas como alimento funcional para camarón .....	4
2.3 Estudios a nivel genético del uso de algas marinas.....	6
2.4 Estudios a nivel genético en Peneidos .....	11
3. JUSTIFICACION .....	17
4. HIPOTESIS.....	18
4.1 Hipótesis general.....	18
5. OBJETIVOS .....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.1.1 Objetivos particulares.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1 Estrategia General .....	20
6.1.1 Programa Maricultura (UANL).....	21
6.1.2 Unidad de Biología molecular, Genómica y Secuenciación (UANL) .....	22
6.2 Material Biológico .....	22
6.2.1 Origen y manejo de los camarones .....	23
6.2.2 Propagación de <i>Ulva clathrata</i> y condiciones de cultivo.....	23
6.3 Formulación y elaboración del alimento.....	24
6.3.1 Determinación de estabilidad en el agua en la dieta .....	26
6.3.2 Análisis bromatológico .....	26
6.4 Bioensayo nutricional.....	27

6.4.1	Diseño del experimento.....	27
6.4.2	Parámetros zootécnicos evaluados en los camarones .....	28
6.4.3	Colecciones de muestras .....	30
6.5	Análisis transcripcional.....	31
6.5.1	Extracción y purificación de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa de camarón .....	31
6.5.2	Enriquecimiento de la fracción de mensajeros.....	31
6.5.3	Formación de POOLs equimolar de cada tratamiento (T1 y T2).....	32
6.6	Secuenciación de nueva generación (NGS) .....	32
6.6.1.1	Preparación de librerías.....	33
6.6.1.2	Piro-secuenciación masiva.....	34
6.6.1.3	Ensamblaje de secuencias usando el Newbler 454 .....	35
6.6.1.4	Mapeo de secuencias usando el software Newbler 454 .....	35
6.6.1.5	Análisis bioinformáticos .....	36
6.6.1.5.1	Anotación Funcional .....	36
6.7	Secuenciación masiva con MiSeq Illumina .....	36
6.7.1	Preparación de librerías.....	37
6.7.2	Secuenciación masiva .....	38
6.7.3	Filtrar lecturas de calidad con Trimmomatic .....	38
6.7.4	Ensamblaje de lecturas usando el software Trinity .....	38
6.7.5	Análisis bioinformáticos .....	39
6.7.5.1	Anotación Funcional .....	39
6.7.5.3	Análisis de expresión diferencial de genes usando el software edgeR .....	39
6.7.5.4	Análisis bioinformáticos de los transcritos diferencialmente expresados .....	40
6.8	Validación de la expresión diferencial.....	40
6.8.1	Selección de transcritos.....	420
6.8.2	Diseño de primers .....	421
6.8.1	PCR cuantitativa (qPCR) .....	422



6.9 Análisis estadísticos .....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Consumo de <i>Ulva clathrata</i> fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón .....	45
7.2 Extracción y purificación de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa de camarón .....	47
7.3.1 Formación de POOLs equimolar de cada tratamiento (T1 y T2).....	49
7.4 Piro-secuenciación masiva con GFLX Flex 454 y Junior de Roche.....	52
7.4.2 Secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche.....	55
7.4.4 Mapeo de transcriptomas usando el software Newbler 454.....	59
7.5 Secuenciación masiva con MiSeq Illumina .....	60
7.5.1 Preparación de librerías (TruSeq ® RNA Sample Preparation Guide v2).....	61
7.5.2 Secuenciación masiva .....	62
7.5.3 Ensamblaje de ARN de novo usando el software Trinity .....	64
7.5.4 Análisis bioinformáticos de los transcriptomas completos:.....	65
7.5.4.1 Anotación funcional.....	65
7.5.4.2 Anotación de rutas metabólicas (KEGG).....	69
7.5.5 Expresión diferencial de transcritos usando el software edgeR.....	70
7.5.6 Análisis de anotación funcional con Blast2GO y de dominio funcional (InterPro Protein) de los genes diferencialmente expresados.....	73
7.5.7 Anotación de los transcritos diferencialmente expresados en KEGG .....	73
7.5.8 Rutas metabólicas relacionadas en el metabolismo de lípidos y en la respuesta inmune en <i>L. vannamei</i> .....	75
7.5.9 Validación de la expresión diferencial por PCR cuantitativa (qPCR) .....	83
8. CONCLUSION .....	85
9. BIBLIOGRAFIA.....	87
11. RESUMEN BIBLIOGRAFICO.....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estudios de expresión de genes en diferentes modelos tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> suplementados con macroalgas y/o sus extractos. ....	7
Tabla 2 Parámetros de siembra de <i>Ulva clathrata</i> . ....	24
Tabla 3. Fórmula base utilizada para la elaboración de la dieta control. ....	25
Tabla 4 Lista de primers usados en la validación de los genes de interés diferencialmente expresados. ....	42
Tabla 5 Composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (comercial) y composición de la <i>U. clathrata</i> utilizados en el bioensayo. ....	45
Tabla 6 Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con un alimento artificial (comercial) y <i>U. clathrata</i> fresca en condiciones controladas de laboratorio, evaluados a los 18 días del bioensayo. ....	47
Tabla 7 Cantidad y calidad de los ARN total purificados con (PureZOLE) de diferentes muestras de hemolinfas (HL). ....	48
Tabla 8 Cantidad y calidad de ARN total purificados de hepatopáncreas (PureZOLE). ....	48
Tabla 9 Muestras seleccionadas de cada tratamiento para los pools. ....	50
Tabla 10 Cálculos para formación de pools (T1 y T2). ....	50
Tabla 11 Resultado de la primera secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche. ....	56
Tabla 12 Resultados de la segunda corrida de secuenciación masiva en la plataforma GFLX Flex 454 de Roche. ....	57
Tabla 13 Resultado de lecturas crudas que pasaron los filtros (Tercera y cuarta corrida). ....	57
Tabla 14 Transcritos (contigs) obtenidos de cada ensamblaje en cada corrida. ....	59
Tabla 15 Información general de la corrida con MiSeq. ....	64
Tabla 16 Información general del ensamblaje <i>de novo</i> de T1 y T2. ....	64
Tabla 17 Información general de la anotación funcional de cada transcriptoma (T1 y T2). ....	65

Tabla 18 Información de la anotación de los transcriptomas completos en la base de datos KEGG PATHWAY.....	70
Tabla 19 Los 25 transcritos mas sobre expresados diferencialmente de cada tratamiento (T1 y T2 con significancia 0.05. ....	72
Tabla 20 KEGG PATHWAY Las 15 rutas metabòlicas mas representadas de los genes diferencialmente expresados entre los dos tratamientos (T1 yT2).....	74
Tabla 21 Genes involucrados en respuesta inmune y metabolismo de lípidos de <i>L. vannamei</i> .....	81
Tabla 22 Lista de genes seleccionados para el panel de expresion genica qPCR.....	85
Tabla 23 Analisis doble delta Ct.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis.....	20
Figura 2 a) Sala de bioensayos y b) Sala de propagación de algas del programa Maricultura, FCB, UANL. ....	22
Figura 3 a) y b) Laboratorio de secuenciación Unidad de Biología molecular, Genómica y Secuenciación (UBGyS), CIDICS, UANL. ....	22
Figura 4 Propagación de <i>U. clathrata</i> en el laboratorio de Maricultura de la UANL. ....	24
Figura 5 a) y b) Empaques en maya con alga fresca. ....	28
Figura 6 Esquema simplificado de la Piro-secuenciación.....	33
Figura 7 Imagen ilustrativa de la diferencia entre ensamblaje y mapeo. ....	35
Figura 8 Esquema simplificado de la secuenciación con Illumina .....	37
Figura 9 Esquema simplificado de la electroforesis 2D SDS-PAGE .....	52
Figura 10 Electroferogramas de los pool de ARN total de hepatopáncreas ((T1 (1A) y T2 (1B)). ....	52
Figura 11 Electroferogramas de la purificación de ARNm de cada pool de hepatopáncreas (Terminator). ....	53
Figura 12 Electroferogramas de fragmentación Química 300ng de ARNm inicial con 2uL de Cloruro de Zinc. (FU=cantidad en fluorescencia, S= tamaño de pb en size, RIN=Integridad del ARNm). ....	54
Figura 13 Electroferogramas de síntesis de la 2ª cadena complementaria ADNc. (FU=cantidad en fluorescencia, bp= tamaño en pares de bases) .....	54
Figura 14 Electroferogramas de librerías a) T1 y b) T2 (FU=cantidad en fluorescencia, bp= tamaño en pares de bases).....	55
Figura 15 Procesamiento de imagen de picoplaca de la primera secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche. ....	56
Figura 16 Procesamiento de imagen de picoplaca de la segunda secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche. ....	57
Figura 17 Diagrama de círculos de poblaciones de contigs entre la condición A:T1 y condición B:T2.....	59
Figura 18 Electroferogramas de síntesis de la 2ª cadena de ADNc a) T1 y b) T2.....	61
Figura 19 Electroferogramas de librerías a) T1 y b) T2.....	62

Figura 20 Categorías de ontología de genes GO encontradas en los dos transcriptomas de camarones (T1 Dieta Control) y (T2 DC + Ulva).....	67
Figura 21 Distribución de especies de los resultados del Blast2GO de los transcriptomas (T1 y T2). .....	68
Figura 22 KEGG PATHWAY rutas metabólicas más representadas de los genes diferencialmente expresados entre los dos tratamientos (T1 y T2).....	68
Figura 23 KEGG PATHWAY Rutas del metabolismo de lípidos modificados por Ulva.	83
Figura 24 KEGG PATHWAY Rutas de respuesta inmune modificados por Ulva.....	84

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
Agua BD	agua bidestilada
Agua milliQ	agua ultrapura
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNmicro	ácido ribonucleico micro
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ATP	adenosina trifosfato
Cel	Células
CIDICS	Centro Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato
Cm	Centímetro
contig	segmentos de ADN superpuestos
DHA	ácido docosahexaenoico
D	Día
DC	dieta control
DTT	Ditiotreitol
ELN	extracto libre de nitrógeno
et al.	locución latina que significa "y otros"
EPA	ácido eicosapentaenoico
EST	etiqueta de secuencia de expresión
FA	ácido graso
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación
Fu	cantidad de fluorescencia
G	Gramo
H	hora
Ha	Hectárea
Hp	caballos de fuerza
Kcal	Kilocaloría
Kg	Kilogramo
L	Litro
Ladder	marcador de peso molecular
log <sub>2</sub>	logaritmo base 2
M	Molar
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitros
MnSOD	manganeso superóxido dismutasa

N50	medida de longitud media de un conjunto de contigs
NR	no redundantes (secuencias)
N-NH3	nitrógeno amoniacal
N-NO2	nitrógeno nitritos
N-NO3	nitrógeno nitratos
P	Probabilidad
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PD	proteína de la dieta
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto Isoeléctrico
PM	Programa Maricultura
PMS	pérdida de materia seca
PP	pérdida de proteína
ppm	partes por millón
ppt	partes por mil
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Q30	parámetro de calidad en secuenciación masiva
Rpm	revoluciones por minuto
RQI	indicador de la calidad de ARN
S	Sobrevivencia
SDS	dodecilsulfato sódico
SPF	camarones libres de patógenos específicos
T1/T2	tratamiento 1 y tratamiento 2
TBE	Tris/Borato/EDTA
TC	tasa de crecimiento
TCA	tasa de conversión alimenticia
TCE	tasa de crecimiento específico
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta
W	Peso
WSSV	virus del síndrome de la mancha blanca
°C	grados centígrados
%	partes por cien
‰	partes por mil
A	Alfa
B	Beta
Σ	Sumatoria
<	menor que
>	mayor que
≤	menor o igual que
≥	mayor o igual que
μ/μm	Micras/Micrómetro

## RESUMEN

Existen numerosos estudios que demuestran que la inclusión de *Ulva* viva y/o la harina en los alimentos para *L. vannamei* mejora el crecimiento, la tasa de conversión del alimento y la pigmentación. Sin embargo, no existen estudios que relacionan el consumo de algas con la activación o represión de genes. El objetivo de este estudio fue describir los cambios en la expresión génica de juveniles *Litopenaeus vannamei* sometidos al consumo de *Ulva clathrata* como un suplemento alimenticio, e identificar las vías metabólicas que son modificadas. En este estudio, hemos empleado la secuenciación masiva de nueva generación y técnicas bioinformáticas para observar las diferencias en el transcriptoma de camarones alimentados con una dieta control (T1) y camarones alimentados con la dieta control más *Ulva clathrata* viva como suplemento (T2). El tamaño promedio de las librerías fue 271 pb para T1 y 275 para T2. Se obtuvo un total de 7,706,527 lecturas crudas en el secuenciador MiSeq Illumina y un total de 6,591,856 lecturas después de filtrar por Q30, de las cuales 2,736,675 correspondieron al T2 y 3,855,181 al T1. El ensamblaje *de novo* usando el software *Trinity*, generó 37,078 transcritos para el T1 con una longitud promedio de 666 pb (N50 de 1007 pb) y para T2 se generaron 31,615 transcritos con una longitud promedio de 592 pb (N50 de 800 pb). Los contigs ensamblados *de novo* de cada tratamiento fueron posteriormente identificadas utilizando la herramienta bioinformática de proteínas no redundantes BLASTx del NCBI [obteniendo 15,861 (42,77%) unigenes para T1 y 14,246 (45,06%) para T2], adicionalmente se utilizó la base de datos Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas (KEGG), base de datos de ontología de genes (GO). El análisis de la expresión diferencial arrojó un total 396 genes con diferentes niveles de expresión entre los dos tratamientos y fueron categorizados en 4 grupos de acuerdo a su posible función; numerosos genes asociados a respuesta inmune, metabolismo de lípidos, proceso de oxidación-reducción, respuesta al estrés y estímulo fueron identificados. El estudio muestra una descripción sistemática del análisis del transcriptoma en *L. vannamei*, y proporciona valiosa información genética para el estudio de los mecanismos moleculares en camarones de esta especie bajo la alimentación con la macroalga *Ulva clathrata*.



## ABSTRACT

There are multiple studies that show that the inclusion of live *Ulva* and/or its flour in feeds assigned to *L. vannamei* improve growth, food conversion ratio and pigmentation. Nevertheless, there are no studies that relate the consumption of algae with the genes activation or repression. The purpose of this study was to describe the changes in the gene expression of *Litopenaeus vannamei* juveniles subjected to the consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement, and to identify the modified metabolic pathways. In this study, we have used next-generation massive sequencing and bioinformatic techniques, in order to observe the differences in the transcriptome of shrimps that were fed with a control diet (T1) and shrimps that were fed with a control diet plus live *Ulva clathrata* as a supplement (T2). The average size of the libraries was of 271 bp for T1 and 275 for T2. A total of 7,706,527 raw reads was obtained through the MiSeq- Illumina sequencer and a total of 6,591,856 reads after filtering through Q30, from which 2,736,675 corresponded to T2 and 3,855,181 to T1. The *de novo* assembly using the *Trinity* software generated 37,078 transcriptions for T1 with an average length of 666 bp (N50 of 1007 bp). On the other hand, 31,615 transcriptions were generated for T2 with an average length of 592 bp (N50 of 800 bp). The *de novo* assembled contigs of each one of the treatments were annotated using a non-redundant sequence proteins database BLASTx from NCBI [obtaining 15,861 (42.77%) unigenes for T1 and 14,246 (45.06%) for T2]. In addition, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG) as well as the Gene Ontology database (GO) were employed. The differential expression analysis generated a total of 396 genes with different expression levels between the two treatments and these were classified into 4 groups in accordance to their possible function. Among others, it was feasible identify: a great number of genes associated to the immune response, lipids metabolism, oxidation- reduction process and stress and stimulus response. The study shows a systematic description of the transcriptome analysis on *L. vannamei* and it gives valuable genetic information required for studying the molecular mechanisms of this species of shrimp under feeding on the macroalgae *Ulva clathrata*.

## 1.- INTRODUCCION

El cultivo de camarón es una industria de gran importancia económica a nivel mundial, la especie más cultivada es *Litopenaeus vannamei* cuya producción en México para el 2012 fue de 100 mil 320 toneladas, con un valor de producción total de 4 mil 750 millones de pesos (CONAPESCA 2013). La mayor parte de los costos de producción de este organismo (40-60%) es generada por el alimento, por lo que el grado de atención y control que se tenga en este rubro es determinante en la definición de márgenes de utilidad y competitividad de esta industria. Es por ello que actualmente, la investigación se ha centrado en la formulación y elaboración de alimentos más eficientes que puedan significar un ahorro en los costos de producción.

Partiendo del principio de que “la producción de alimentos de calidad comienza con la selección de ingredientes de calidad”, se hace necesaria la incorporación a las dietas de ingredientes funcionales (también llamados nutraceuticos), que además de su valor nutritivo básico necesario para el desarrollo óptimo, nos ayuden a mejorar tanto las características físicas de la dieta como la predisposición de los organismos ante diferentes necesidades (incremento en la salud, prevención y tratamiento de enfermedades, reducción del estrés, etc.) (Alvídrez-Morales *et al.* 2002; Shoji *et al.* 2004).

Las algas marinas han sido utilizadas por diferentes autores como suplementos en las dietas para camarón ya sea en forma viva, como harina o como extractos de las mismas ya que son ricas en polisacáridos sulfatados, vitaminas y minerales, y rara vez se promueven para el valor nutritivo de sus proteínas. Las algas poseen numerosos compuestos bioactivos (polifenoles, clorofila, carotenoides, ácidos grasos) y es por ello que en muchos casos, la inclusión de harina de algas en las formulaciones de alimentos de camarón mejora la calidad del pellet (mayor estabilidad en el agua, una mayor capacidad de retención de agua y la textura suave) y aumenta el consumo de alimento, mejora la eficiencia de alimentación, el rendimiento de crecimiento, la calidad del producto (mayor pigmentación, menor contenido de colesterol) y mejora la resistencia contra las enfermedades bacterianas y virales.

Por todo ello, y por tratarse de la especie acuícola más importante económicamente en México, el presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de obtener información de los mecanismos de acción a nivel molecular en *Litopenaeus vannamei* al ser sometido a una dieta con *Ulva clathrata* fresca, mediante la expresión diferencial de genes usando secuenciación masiva de última generación, probando diferentes plataformas de secuenciación.

La secuenciación masiva de los transcriptomas, permite detectar e identificar casi todas las clases de moléculas que son transcritas, desde los ARNm micro y las regiones no traducidas 5' y 3' hasta los ARNm más largos. A la fecha, en lo que respecta a camarón la secuenciación masiva se ha empleado para identificar los genes relacionados con respuesta inmune en virtud de la interacción entre el camarón y virus (Li *et al.* 2013; Chen *et al.* 2013; Sookruksawong *et al.* 2013), pero el uso de esta nueva herramienta en los estudios sobre nutrición esta aún ausente. Aunque estos estudios han contribuido en la definición del genoma funcional del camarón, la información generada en estas investigaciones es mínima y constituye un plano general, que muestra sólo puntos de interés para alguna condición dada y algún tejido u órgano específico.

El estudio muestra una descripción de genómica funcional de *L.vannamei*, y proporciona valiosa información genética para el estudio de los mecanismos moleculares bajo la alimentación con la macroalga *Ulva clathrata*.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1 Cultivo de *Litopenaeus vannamei*

La producción camaronera mundial, tanto de captura como de criadero, es de aproximadamente 6 millones de toneladas, de las cuales alrededor del 60 por ciento entra en el mercado mundial. En términos de valor, el camarón es hoy el producto pesquero comercializado internacionalmente más importante (F A O 2011). El camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei* es la especie más cultivada en el mundo en la actualidad, por lo tanto, la más importante económicamente.

México cuenta con 1,382 granjas en una superficie de 71,000, siendo los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur los mayores productores de camarón. El camarón por su volumen se encuentra posicionado en el cuarto lugar de la producción pesquera en México; y por su valor económico, lo encontramos en el primer lugar, con una producción anual de 102, 437 toneladas de peso vivo, requiriendo 204,874 toneladas de alimento consumido (CONAPESCA, 2013). Considerando que la alimentación a menudo representan más del 50% de los costos variables de una empresa acuícola, influyendo así en el rendimiento económico de las mismas (FAO, 2011), es evidente que el desarrollo de dietas nutricionalmente efectivas que generen un aumento en la producción, traerá con sigo una reducción de los costos operativos lo que las hará más competitivas a esta industria (National Research Council 2011). Actualmente, el diseño de dietas para alimentación acuícola, va encaminado no sólo a proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo, sino también a influir en los atributos de la composición de los organismos, así como a aminorar la excreción de nutrientes al medio (Burr *et al.* 2005) es por ello que recientemente la investigación se centra en el uso de ingredientes funcionales en los que su influencia se extiende no solo a la nutrición del organismo sino a la salud, la resistencia a enfermedades, la disminución del estrés y la resistencia a agentes causales de enfermedades (Peso-Echarri *et al.* 2012).

Las algas tienen una ventaja sobre muchos otros organismos, en el sentido de que pueden crecer apropiadamente para la producción de compuestos bioactivos deseables.

La búsqueda de compuestos nutraceuticos y bioactivos a partir de las algas se ha incrementado de manera estable a medida que más especies se están cultivando. Las algas marinas contienen sustancias bioactivas como polisacáridos, proteínas, lípidos y polifenoles con variada actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica, entre otras (Castro *et al.* 2006).

## **2.2 Uso de algas marinas como alimento funcional para camarón**

Varios autores han estudiado diferentes especies de algas marinas, encontrando en ellas sustancias bioactivas tales como polisacáridos sulfatados asociados con la estimulación del sistema inmunológico, a la actividad antiviral y antioxidante (Rocha de Souza *et al.* 2007); así como polifenoles que son bien conocidos por su actividad antioxidante (Bozin *et al.* 2008; Matanjun *et al.* 2008; Kumar *et al.* 2010; Trigui *et al.* 2013; Heffernan *et al.* 2014), entre otros compuestos.

Varias macroalgas (*Ulva*, *Undaria*, *Ascophyllum*, *Porphyra*, *Sargassum*, *Polycavernosa*, *Gracilaria* y *Laminaria*) han sido ampliamente utilizados en dietas para peces, algunos estudios sobre sus efectos han sido revisados por Nakagawa *et al.* (1987), así mismo algunas macroalgas han sido evaluadas en alimentos para camarón (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum sp.*, *Gracilaria heteroclada*, *Gracilaria cervicornis*, *Caulerpa sertularioides*, *Ulva clathrata*, *Enteromorpha sp.*, *Hypnea cervicornis*, *Cryptonemia crenulata* and *Chnoospora minima*) cuyos efectos se resumen en el trabajo de Cruz-Suárez *et al.*, (2009a).

En la mayoría de los estudios en los que se han utilizado algas o sus extractos, los niveles de inclusión en la dieta son bajos (menos del 10%), en muchos casos, la inclusión de las algas se ha traducido en una mejora de la calidad del pellet (mejor la estabilidad en el agua, la capacidad de retención de agua y la textura) (Briggs y Funge-Smith, 1996; Peñaflorida y Golez, 1996; Cruz-Suárez *et al.*, 2000; Marinho-Soriano *et al.*, 2007), mayor consumo de alimento, mejor tasa de conversión alimenticia, mejora en la eficiencia del alimento, mayor crecimiento (Izzati *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012; Hafezieh *et al.*, 2014) y una mayor calidad de los organismos alimentados (mayor pigmentación, reducir en el contenido de colesterol) (Durazo-Beltrán *et al.*, 2004; Casas-Valdez *et al.*, 2006; Ju

*et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2010; Mondal *et al.*, 2014), además, las macroalgas contienen algunos compuestos activos como polisacáridos, proteínas, lípidos y polifenoles con variada actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica, (Castro *et al.*, 2006), que pueden mejorar la resistencia de los animales contra las enfermedades bacterianas y virales (Hou y Chen 2005; Fu *et al.*, 2007; Ghaednia *et al.*, 2011; Selvin *et al.*, 2011; Immanuel *et al.*, 2012).

Para el caso específico de la macro alga *Ulva Clathrata*, (Cruz-Suárez *et al.*, 2009b; Cruz-Suárez *et al.*, 2010) demuestran la capacidad de esta como alimento vivo para sustituir alimento comercial en la fase de engorda temprana del camarón *L. vannamei*, mediante combinaciones de raciones parciales de alimento artificial y *Ulva clathrata* viva. Se observó una disminución del uso de alimento comercial hasta en un 45%, produciendo un crecimiento 60% mayor y aportando además otros beneficios en el producto final, ya que se encontró una mejor pigmentación como resultado de una mayor deposición de astaxantina y carotenoides totales en los camarones. Además, en camarones en cocultivo sin adición de alimento artificial, el porcentaje de EPA (C20:5n-3) y DHA (C22:6n-3) fue significativamente mayor que en los camarones alimentados solo con alimento artificial.

En un trabajo realizado por Peña-Rodríguez *et al.* 2010 se exploró la utilización de *U. clathrata* como alimento fresco complementario al alimento balanceado comúnmente utilizado en las granjas de camarón. Se encontró que después de 28 días de experimentación, en condiciones controladas de laboratorio, los camarones alimentados con una ración parcial de 75% del alimento artificial y *U. clathrata* fresca a saciedad resultaron con un crecimiento significativamente superior a camarones alimentados al 100% de ración de alimento artificial sin presencia de *Ulva*. En este trabajo se expone como alternativa viable el uso de *U. clathrata* (sin la presencia de otra fuente de producción natural) como alimento fresco complementario para camarón, capaz de mejorar la tasa de crecimiento y la utilización del alimento balanceado.

Por su parte Villarreal-Cavazos en el 2010 determinó los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca, energía, proteína cruda y aminoácidos en alga

verde (*Ulva clathrata*) en camarones juveniles ( $5.4 \pm 0.1$  gramos de peso promedio) de *L. vannamei*. Encontraron que los coeficientes de digestibilidad en este ingrediente son excepcionalmente altos: materia seca fue de 97%, energía de 99%, proteína cruda y aminoácidos de 100%. Concluye que los aminoácidos contenidos en el alga son altamente digestibles, y que el aporte de aminoácidos esenciales digestibles es cercano al 50% de los aminoácidos totales; adicionalmente es importante resaltar que la cantidad de arginina digestible que este ingrediente aporta a los camarones es muy buena (1.9%).

Por otro lado, Cruz-Suárez *et al.*, (2009a) lleva a cabo un experimento en el cual comparan tres dietas experimentales formuladas para contener 3.3% de harina *Macrocystis pyrifera* (MAC), *Ascophyllum nodosum* (ASC) o harina del alga verde *Ulva clathrata* (Ulva); y alimentan juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (1,6 g) durante 28 días. Estos autores indican que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento y la supervivencia, pero con la dieta que fue formulada con *Ulva* el peso final de los animales fue ligeramente superior (4,8 ULVA frente a 4,6 por ASC y 4,3 g de MAC). Adicionalmente indican que los camarones alimentados con la dieta con *Ulva*, presentaron un color rojo más oscuro después de la cocción. Así mismo, indican que la dieta con *Ulva* presento una pérdida de materia seca inferior, pero una pérdida de proteína superior y también mayor absorción de agua destilada, lo que indica una modificación de la calidad física de pellets (mejor estabilidad hídrica).

### **2.3 Estudios a nivel genético del uso de algas marinas**

Gracias a que en varios estudios se ha mostrado una relación directa entre el consumo de algas marinas o sus extractos en la prevención y/o tratamiento de condiciones asociadas con el estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012; Balboa *et al.*, 2013), la obesidad (Jang *et al.*, 2011; Awang *et al.*, 2013), la diabetes (Zhang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Shui *et al.*, 2012; Motshakeri *et al.*, 2013), el cáncer (Yang *et al.*, 2010; Senthilkumar *et al.*, 2013) y las infecciones tanto virales como bacterianas (Gupta y Abu-Ghannam 2011; Kanjana *et al.*, 2011), el interés en su consumo y en la administración de sus compuestos bioactivos tanto para humanos como para animales ha aumentado. Es por ello que también existen numerosos estudios en los que

se ha demostrado que la adición de estas y/o sus extractos tienen la capacidad de modificar la expresión de genes relacionados con las patologías antes mencionadas en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Tabla 1).

**Tabla 1 Estudios de expresión de genes en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* suplementados con macroalgas y/o sus extractos.**

Especie de alga	Tipo de muestra	Actividad	Organismo	Expresión de genes
<i>Porphyra tenera</i>	Extracto comestible	Antimutagenica	<i>in vitro</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	El extracto de <i>P. tenera</i> contiene B-caroteno, clorofila a y la luteína, mostró un efecto supresor sobre la expresión de genes UMC mutágeno inducida en <i>Salmonella typhimurium</i> . Okai <i>et al.</i> 1996
<i>Undaria pinnatifida</i>	Extracto cloroformo metanol (2:1, v/v).	Anti-obesidad	Rata y ratón	Reducción del tejido adiposo blanco (TAB) en los animales alimentados con el extracto de <i>Undaria pinnatifida</i> . Aumento en la expresión de la proteína de desacoplamiento mitocondrial en el TAB. Maeda <i>et al.</i> 2005
<i>Ulva rigida</i>	polisacárido soluble en agua	Inmunomoduladora	Macrófagos de murinos ( <i>in vitro</i> )	Aumenta la expresión de citoquinas, la expresión del traductor de señal IL6 y el receptor beta IL12 e induce un incremento en la expresión de COX-2 y NOS-2. Leiro <i>et al.</i> 2007
<i>Gloiopeltis furcata</i>	Extracto de methanol	Antitumoral	<i>In vitro</i> en líneas celulares de hepatocarcinoma (HepG2) humano	Los efectos anticancerígenos (disminución de viabilidad e inhibición del icelocelular) se asociaron con la baja regulación de la ciclina A, sobre regulación del inhibidor p21 de la quinasa dependiente de ciclina y gen de defosforilacion Cdc25C. Además, se encontró que disminuyó los niveles de la ARNm COX-2 y expresión de la proteína sin cambios significativos en los niveles de COX-1, que se correlaciona con una disminución de la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2). Bae <i>et al.</i> 2007
<i>Laminaria hyperborea</i> y <i>Laminaria digitata</i>	Extracto rico en laminaran y fucoidan	Cambio en microbiota, y morfología del intestino, efectos	<i>in vivo</i> en cerdo	Incremento en la expresión del ARNm interlucina 8 fue observado en el día 6 con la suplementación de la combinación del



		marginales en la respuesta inmune		extracto de <i>L. hiperborea</i> y <i>L. digitata</i> . Reilly <i>et al.</i> 2008
<b><i>Sargassum micracanthum</i></b>	Extracto etanólico particionado con 4 solventes	Anti-inflamatoria	<i>in vitro</i> en línea celular de macrófagos de murinos (RAW 264.7)	Las fracciones de cloruro de metileno y hexano provocan disminuciones dosis-dependientes en la expresión de ARNm de las proteínas iNOS y COX-2. <i>S. micracanthum</i> produjo disminuciones dependientes de la dosis en la expresión y la producción de ARNm de TNF y IL-6. Yoon <i>et al.</i> 2009
<b><i>Laminaria spp.</i></b>	Extracto de algas marinas	Antimicrobiano	<i>in vivo</i> en cerdo	La expresión del ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1a e IL-6) se aumentó en el colon de los lechones al suplementarse con aceite de pescado ( $P \leq 0.05$ ) y la suplementación de extracto de algas marinas indujo un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ ileal ( $P \leq 0.01$ ). S. G. Leonard <i>et al.</i> 2010
<b><i>Algas marinas (Algiflora-3; Shinkyō Sangyo Co., Yamaguchi, Japan)</i></b>	Dieta 0.8% algas marinas	Inmunológico	<i>In vivo</i> <i>Cerdos</i>	El tratamiento de algas marinas en los cerdos dio lugar a un nivel relativamente elevado de IL-2 ARNm en día 50, y altos niveles de IL-4 y IL-1b en día 51. Katayama <i>et al.</i> 2011
<b><i>Ascophyllum nodosum</i> y <i>Fucus serratus</i></b>	Extracción con solventes (etanol)	Anti-inflamatoria e inmunomoduladora	intestino de cerdos ( <i>ex vivo</i> )	<i>Ascophyllum</i> y <i>Fucus</i> reducen la expresión de los genes IL-8, IL-6 y factor de necrosis tumoral-alfa ( $0.99 \pm 0.53$ , $0.75 \pm 0.33$ y $1.01 \pm 0.17$ para <i>Aacophyllum</i> y $0.70 \pm 0.32$ , $0.69 \pm 0.38$ y $1.15 \pm 0.25$ para <i>Fucus</i> ). Bahar <i>et al.</i> 2012
<b><i>Ascophyllum nodosum</i></b>	Extracto acuoso (Tasco®)	Aumento de respuesta inmune en el nematodo y disminución de virulencia en la bacteria	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A una concentración de 300mg/ml induce la expresión de genes de respuesta inmune en <i>C. elegans</i> viz.: zk6.7 (Lipasas), lys-1 (Lisozima), spp-1 (Saposina), f28d1.3 (Taumatina), t20g5.7 (Matridina SK), abf-1 (proteína antibacteriana) y f38a1.5 (proteína de la familia Lectina). Además, reduce la secreción de factores de virulencia y la expresión de genes reguladores involucrados

				en el quórum de detección. Kandasamy <i>et al.</i> 2012
<b><i>Chondrus crispus</i></b>	Extracto acuoso	Aumento de respuesta inmune en el nematodo ( <i>C. elegans</i> ) y disminución de virulencia en la bacteria ( <i>P. aeruginosa</i> )	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	El extracto del alga roja, induce la expresión de genes de respuesta inmune en <i>C. elegans</i> por más de dos veces. Adicionalmente suprime la expresión de factores de virulencia y al gen PA14 QS sin afectar el crecimiento de la bacteria. Liu <i>et al.</i> 2013
<b><i>Grateloupia lanceolata</i></b>	Extracto etanólico	Inhibe acumulación de lípidos y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	<i>in vitro</i> en células 3T3-L1	Produce una reducción en los niveles de transcripción de los ARNm de los factores adipogénicos que son necesarios para inducir la adipogénesis, así mismo incrementa la transcripción de los ARNm de las enzimas de exploración del ROS incluyendo superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y catalasa. Seo <i>et al.</i> 2013
<b><i>Ulva linza</i> y <i>Lessonia trabeculata</i></b>	Suspensión del alga en Twin80: agua (1:9)	Reducción en: niveles de grasa intra-abdominal, presión arterial, resistencia a la insulina, niveles de colesterol y triglicéridos	<i>in vivo</i> en rata	Ambas algas disminuyen la expresión del gen SOD y GPx y aumentan la expresión del gen CAT en el grupo control. Ambas algas reducen la expresión del gen CAT en animales con síndrome metabólico. Ramirez-Higuera <i>et al.</i> 2014
<b><i>Alaria marginata</i></b>	Extracto fenolico	Inflamatoria y anti-obesidad	<i>in vitro</i> células RAW 264.7 de macrófagos	<i>Alaria marginata</i> reveló reducciones en los niveles de expresión de mRNA de las adipocinas inflamatorias IL - 10, MCP - 1, ICAM, y TNF - alfa por el 92,6%, 50,7%, 67,3% y 65,4%, respectivamente. Estos resultados apoyan el potencial de las algas de Alaska para reducir la inflamación y la obesidad en el tejido adiposo. Kelloggs <i>et al.</i> 2014
<b><i>Gelidium elegans</i></b>	Extracto etanólico	Anti-obesidad y anti-oxidante	<i>in vitro</i> células RAW 264.7 de macrófagos	El extracto también inhibió la expresión del ARNm de factores de transcripción adipogénicos, como peroxisoma receptor gamma activado por el proliferador y CCAAT / potenciador de la proteína de unión alfa, mientras que el aumento de la expresión de la proteína de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa 1 y 2, la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en comparación con los controles. Jeon <i>et al.</i> 2014

Como se observa en la tabla antes mencionada, los efectos se atribuyen no solo las algas enteras sino a sus extractos es decir a los compuestos bioactivos por ejemplo a nivel de expresión de genes asociado a metabolismo de lípidos (obesidad, estrés oxidativo y síndrome metabólico), Kim y colaboradores (2010), cultivaron una línea celular de adipocitos 3T3-L1 durante 8 días con un tratamiento con fucoïdan (polisacárido extraído del alga *Fucus vesiculosus*) a 50, 100, 200µg/ml y un tratamiento control sin fucoïdan, demostrando a los 2 días en todos los tratamientos con fucoïdan la inhibición de la adipogénesis ya que suprime la diferenciación de adipocitos y la expresión de factores de transcripción adipogénicos como el C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y aP2. Estudios realizados por Maeda *et al.* (2005) y Woo *et al.* (2009) demuestran que la alimentación a ratones obesos durante 6 semanas con fucoxantina extraída del alga *Undaria pinnatifida* (niveles de inclusión menor a 0.2%) redujo el peso corporal. Estos autores indican que la actividad anti-obesidad de fucoxantina se debe a la reducción de la expresión de ARNm y proteínas de las enzimas reguladoras del metabolismo de lípidos y de las proteínas desacoplantes mitocondriales en el tejido adiposo blanco, también porque disminuye la actividad de beta-oxidación de los ácidos grasos.

En lo que respecta a la expresión de genes relacionados con respuesta inmune Kim y colaboradores en el 2011, realizan un estudio *in vitro* e *in vivo* de la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos sulfatados del alga *Enteromorpha prolifera* y encuentran que dos de sus fracciones (F2 y 3, ya que se obtuvieron 3 fracciones por intercambio iónico), estimularon la proliferación de la línea celular de macrófagos, Raw 264.7, e indican que esta inducción se dio a través de una considerable sobre regulación en la expresión de los ARNm del óxido nítrico y varias citoquinas. Los resultados *in vivo* muestran que los polisacáridos sulfatados (las fracciones de crudo y F2) aumentaron significativamente la proliferación de esplenocitos inducidos por Con A (un tipo de macrófagos) y la secreción de interferón gamma e interleucina-2 (un tipo de citoquinas producidas por los linfocitos T y natural killer), lo que significa según los autores que la fracción F2, puede activar las células T mediante la sobre-regulación de la respuesta de los linfocitos Th-1.

Un estudio similar fue realizado por Karnjanapratum y colaboradores (2012), pero con los polisacáridos del alga verde *Capsosiphon fulvescens*, y observan que el extracto crudo y la fracción F2 estimularon fuertemente los macrófagos de la línea celular RAW264.7, produciendo cantidades considerables de óxido nítrico, PGE2 y aumento en la expresión de los ARNm de iNOS (sintetiza de óxido nítrico), COX-2 (ciclooxigenasa 2) y citoquinas.

#### **2.4 Estudios a nivel genético en Peneidos**

Debido a la ausencia de la secuenciación del genoma completo en todas las especies de peneidos, las investigaciones a nivel genético se han enfocado en estudios de genómica funcional, centrados en la expresión de genes relacionados con respuesta inmune en camarones expuestos a infecciones virales o bacterianas o al estudio de la expresión de genes virales (virus del síndrome de la mancha blanca [WSSV]) en lugar de los genes del huésped (Khadijah *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Lan *et al.*, 2006; Wongpanya *et al.*, 2007). Las tecnologías más utilizadas han sido tanto la obtención de colecciones de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs) como la de expresión diferencial de genes utilizando SSH (siglas en inglés de Suppression Subtractive Hybridization) y microarreglos.

Se han realizado importantes esfuerzos en la generación de ESTs para crustáceos de importancia comercial (Rojtinnakorn *et al.*, 2002; Leu *et al.*, 2007) que en conjunto han generado un total de 170,000 ESTs que están a disposición del público (GeneBank, National Center for Biotechnology Information).

El primer estudio se llevó a cabo en *P. monodon* e incluyó la secuenciación de un total de 151 ESTs a partir de 3 bibliotecas de ADNc de tejido (cefalotórax, tallo óptico, y pleopodos), la cual dio como resultado 60 genes nuevos que no habían sido identificados previamente, 49 de los cuales fueron totalmente nuevos para los crustáceos (Lehnert *et al.*, 1999). Posteriormente Supungul *et al.*, 2002 reportaron la secuenciación de 615 ESTs de una biblioteca de ADNc de hemocitos en *P. monodon* en donde varios genes inmune-

efectores fueron identificados, de los cuales 3 (2 péptidos putativos antimicrobianos y 1 de proteínas de choque térmico) fueron secuenciados completamente.

En el 2001, se publicó un estudio en donde se compararon las bibliotecas de ADNc de 2 tejidos específicos, hepatopáncreas y hemocitos, de 2 especies relacionadas de camarón, *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus setiferus* (Gross *et al.*, 2001), en él se consiguen un total de 2045 ETS y se reportan comparaciones con respecto a las diferencias funcionales entre los 2 tejidos dando énfasis en la identificación genes de función inmune y estos datos fueron los primeros en ser depositados en la base de datos de la genómica marina (McKillen *et al.*, 2005). Las secuencias de esta base de datos, combinada con las ETS generadas *de novo* a partir *L. stylirostrus* y *Trachypenaeus biridy*, se utilizaron posteriormente para generar un amplio conjunto de marcadores de secuencias simples repetidas para todas las especies (Pérez *et al.*, 2005).

En el 2002 se realizó un estudio para identificar la expresión de genes implicados en la defensa inmune en hemocitos de *Penaeus japonicus*, comparando camarones infectados con WSSV con animales sanos y se secuenciaron 635 clones de la biblioteca de hemocitos normales y 370 clones de la biblioteca de hemocitos infectados. Los genes putativos de defensa representaron el 2.7% de las EST en animales normales y el 15,7% en animales infectados por WSSV (Rojtinnakorn *et al.*, 2002).

Otro estudio realizado para identificar péptidos antimicrobianos utilizó librerías de ADNc construidas a partir de hemocitos de *P. monodon* infectados con *Vibrio harveyi* y de individuos sanos, resultando en la identificación de varios homólogos de péptidos antimicrobianos que se conservan entre los camarones (Supungul *et al.*, 2004).

En el 2006 se llevaron a cabo 2 estudios uno en *Marsupenaeus japonicus* (Yamano y Unuma, 2006) y otro en *L. vannamei* (O'Leary *et al.*, 2006) en el primero se analizó el perfil de expresión génica con especial énfasis sobre el control endocrino de la reproducción mediante el análisis de bibliotecas de ADNc del tallo óptico del langostinos y se realizó la secuenciación de 1988 EST (136 contigs y 1250 únicos) de las cuales sólo el 16,7% tenían similitud importante con genes previamente identificados, en el segundo se realizó el análisis de múltiples bibliotecas de ADNc de *L. vannamei* derivadas de varios

tejidos (hemocitos, hepatopáncreas, branquias, órgano linfoide, tallo óptico, y cordón nervioso ventral), en donde se encontraron 7896 nuevas ETS.

Los estudios más recientes han sido los realizados por Robalino *et al.*, 2007 y 2009 en *L. vannamei*, dando como resultado la secuenciación de más de 150,000 ESTs, obtenidos de bibliotecas generadas de tejidos específicos de camarones normales incluyendo hemocitos, hepatopáncreas, branquias, órgano linfoide, tallo óptico, y cordón nervioso ventral.

De las herramientas más utilizada para el análisis de expresión diferencial de genes en las distintas especies de camarón, es el microarreglo, con un número variable de clones en el chip que van desde 100 EST's (Dhar *et al.*, 2003), 2036 EST's (Pongsomboon *et al.*, 2008; Fagutao *et al.*, 2008), 2469 EST's (Robalino *et al.*, 2007), 3136 EST's (Wang *et al.*, 2006) hasta 3853 EST's (de la Vega *et al.*, 2007). Sin embargo, los microarreglos presentan una desventaja debido a que la información que se puede obtener se limita a la poca cantidad de clones en un chip.

Existen otros estudios en la expresión de genes relacionados con respuesta inmune en camarones expuestos a infecciones virales o bacterianas. Sin embargo, estos estudios están enfocados a los genes virales, en lugar a los genes del huésped que en este caso son los crustáceos (Khadijah *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Lan *et al.*, 2006; Wongpanya *et al.*, 2007).

Algunos estudios en *Penaeus monodon*, incluyen la secuenciación de un total de 151 EST's a partir de 3 bibliotecas de ADNc de tejido (cefalotórax, tallo óptico, y pleópodos). Obteniendo un resultado de 60 genes nuevos no identificados previamente (Lehnert *et al.*, 1999). Supungul y cols., en el (2002), reportaron 615 EST's de una biblioteca de ADNc de hemocitos de *Penaeus monodon* en donde varios genes inmune-efectores fueron identificados.

En *Marsupenaeus japonicus* se realizó un perfil de expresión génica sobre el control endocrino de la reproducción en hembras y machos mediante el análisis de

bibliotecas de ADNc de las gonadas, obtenido un total de 24 EST's, de los cuales 6 EST's se expresaron en ovarios y 5 EST's se expresaron en testículos (Callaghan *et al.*, 2010).

Zeng y colaboradores (2013), realizaron un estudio de expresión diferencial de genes entre camarones *Litopenaeus vannamei* (11-12 g), infectados o no con el virus del Taura usando el pirosecuenciador 454 de Roche, los animales desafiados fueron inyectados con el virus del Taura (10% de su peso corporal) en el abdomen y un grupo control estaba libres de patógenos específicos (SPF) y obtienen 1311 genes expresados diferencialmente en el camarón infectado en comparación con los controles, incluyendo 559 sobre-regulados y 752 genes sub-regulados. Entre los genes expresados diferencialmente, varios están implicados en funciones inmunes, tales como antivirales, antimicrobianos, proteasas, inhibidores de proteasa, la transducción de señales, control de la transcripción, la muerte celular y la adhesión celular (MAP quinasa de interacción serina/treonina quinasa 2-proteína, la proteína de choque térmico 70, P38 MAPK y poliubiquitina-C homología compartida para moléculas de señalización de la vía MAPK)

Guo y colaboradores (2013) realizaron dos análisis transcripcionales en el equipo HiSeq 2000 de Illumina, con la especie *Litopenaeus vannamei* (4.41±1.80 g), con un grupo control alimentado dos veces al día con una dieta comercial, y un grupo experimental alimentado de la misma manera y expuesto a una concentración de nitrito-N de 20 mg L<sup>-1</sup> durante 72 horas. La solución de nitrito se preparó añadiendo NaNO<sub>2</sub> a 5 ‰ al agua de mar hasta que se alcanzó la concentración deseada y la solución de nitrito se renovó diariamente. En todo el conjunto de datos obtenidos, se detectaron en abundancia transcritos relacionados con la inmunidad, la desintoxicación, el estrés ambiental y con la apoptosis.

A pesar de que ya existen estudios de análisis transcripcional de *Litopenaeus vannamei* como los mencionados anteriormente, actualmente no hay ninguno relacionado con Nutrigenómica. Sin embargo, el uso de este tipo de herramientas de secuenciación masiva en estudios nutrigenómicos ya ha sido demostrada en otros organismos por ejemplo en el caso de insectos hay estudios que demuestran la viabilidad de este tipo de tecnología. Tales estudios han tenido el objetivo de comprender la respuesta del

organismo en relación a los cambios nutricionales y a la calidad dietaria, en un intento de mejorar las dietas de los insectos.

Por ejemplo, un trabajo en el que se identificaron genes diferentemente expresados utilizando la técnica de supresión por hibridación sustractiva fue el realizado por Yocum y colaboradores en el 2006, quienes indican que, si los insectos se enfrentan a muchas tensiones ambientales, incluyendo la inconstante cantidad o calidad de alimento necesario para su desarrollo y reproducción, estos deben tener mecanismos para hacer frente dichas fluctuaciones y que tales mecanismos se pueden observar claramente en el nivel molecular. Estos autores alimentan ninfas de *Perillus bioculatus* durante 15 generaciones con una dieta artificial sub óptimas o con presas vivas y encuentran dos genes sobre regulados en los organismos que consumieron la dieta artificial (el gen de la tirosina-3-monooxigenasa y el gen para la proteína de unión a quitina), también encuentran diferencias en la expresión de 4 genes dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentran las ninfas e indican que el poder de la genómica nutricional en el desarrollo de dietas artificiales se encuentra en el alto grado de conservación de las vías de desarrollo y celulares.

Más adelante en el 2011 Alaux y colaboradores, analizaron 4 grupos experimentales de abejas: alimentadas con una dieta sin polen (a base de azúcar) (VP-), alimentadas con una dieta a base de polen (V-P +), alimentadas con una dieta sin polen y parasitadas con varroa (V + P-) y alimentadas con polen y parasitadas con varroa (V + P +). Obteniendo alrededor de 36,000 etiquetas únicas que coincide con alrededor de 8,000 genes (60% de los genes en el genoma de abejas). Comparando el transcriptoma de las abejas alimentadas con polen y azúcar y las abejas restringidas a una dieta de azúcar, encontramos que el polen activa la detección de nutrientes y vías metabólicas. Además, esos nutrientes tuvieron una influencia positiva en los genes que afectan la longevidad y la producción de algunos péptidos antimicrobianos. Sin embargo, el parasitismo varroa causó el desarrollo de poblaciones virales y una disminución en el metabolismo, específicamente inhibiendo el metabolismo proteico esencial para la salud de las abejas. Este efecto perjudicial no fue revertido por la ingesta de polen.



Zou y colaboradores en el 2013, realizan un estudio utilizando el insecto depredador *Arma chinensis* el cual es control biológico de plagas en numerosos cultivos, sin embargo, se ha visto que varios parámetros de su ciclo vital se ven disminuidos al utilizar para su producción alimento artificial en comparación con una fuente de alimento natural, pero los mecanismos moleculares asociados a esto no están claros. Así que estos autores utilizan la información de transcriptoma bajo ambos regímenes de alimento para entender mejor el impacto de la dieta artificial en *A. chinensis* a nivel molecular y encuentran miles de genes expresados diferencialmente entre ambos tipos de alimentación e indican que las funciones fisiológicas de los genes expresados diferencialmente permiten predecir efectos de algunos ingredientes de la dieta y posteriormente, proponer mejoras formulación para dietas artificiales.

### 3. JUSTIFICACION

En la presente propuesta, se pretende obtener información científica inédita, sobre el análisis global del perfil de expresión (transcriptoma). Así mismo, se pretende contribuir en el conocimiento sobre los perfiles de expresión de *L. vannamei* bajo suplementación con *Ulva clathrata*. En ambos casos utilizando una metodología de secuenciación masiva de última generación, la cual tiene la ventaja de ser muy sensible, más rápida y de más bajo costo que las técnicas tradicionales hasta ahora usadas.

El proyecto generará información básica en el área de genómica funcional de la especie contribuyendo al desarrollo de conocimiento sobre la fisiología metabólica de este camarón que podrá ser tomado como modelo para el estudio de expresión de genes en otros crustáceos de importancia comercial.

## 4. HIPOTESIS

### *4.1 Hipótesis general*

Los perfiles transcripcionales obtenidos de camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos al consumo de *Ulva clathrata*, tendrán una expresión diferencial y permitirán conocer globalmente las rutas metabólicas que se modifican.

## 5. OBJETIVOS

### **5.1 Objetivo general**

Contribuir al conocimiento del genoma funcional del camarón *Litopenaeus vannamei* mediante la secuenciación masiva de su transcriptoma, y el análisis de la expresión diferencial de genes y proteínas al ser sometidos al consumo de *Ulva clathrata* como suplemento alimenticio.

### **5.1.1 Objetivos particulares**

**I.** Generar el mapa funcional del genoma de *Litopenaeus vannamei*, al ser alimentados con una dieta tipo comercial, mediante la secuenciación masiva de su transcriptoma completo de su hepatopáncreas.

**II.** Generar el mapa funcional del genoma de *Litopenaeus vannamei*, al ser alimentados con una dieta tipo comercial más el consumo del alga *Ulva clathrata* viva, mediante la secuenciación masiva de su transcriptoma completo de su hepatopáncreas.

**III.** Describir los cambios en la expresión génica de *Litopenaeus vannamei* mediante la comparación de los mapas funcionales de camarones sometidos al consumo de *Ulva clathrata* como suplemento alimenticio y camarones alimentados solamente con una dieta tipo comercial, e identificar rutas metabólicas que se modifican.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Estrategia General

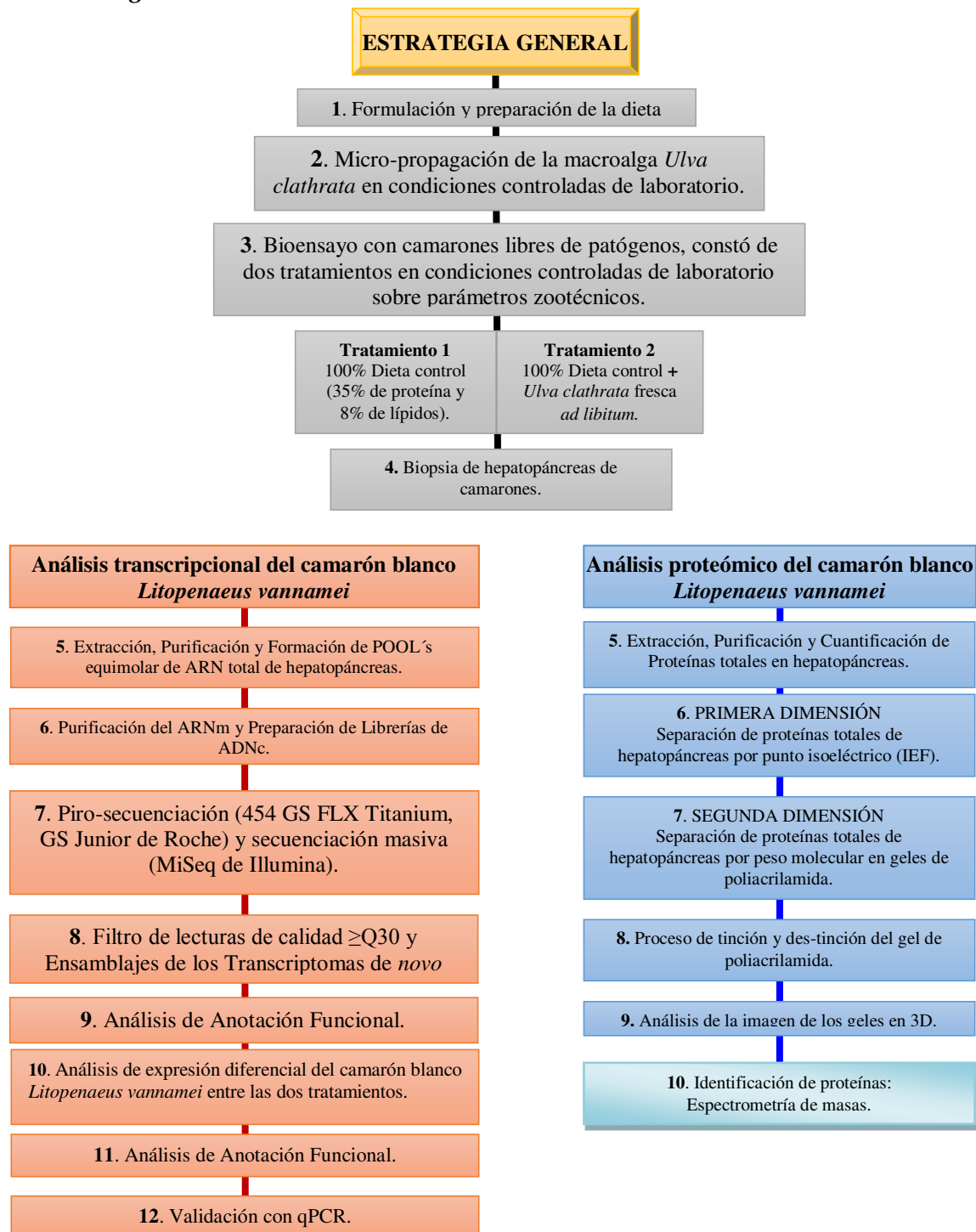


Figura 1 Estrategia general del desarrollo del trabajo de tesis.

Este proyecto se realizó en diferentes laboratorios para poder concluir los objetivos planteados y la estrategia general de trabajo en esta investigación (**Figura 1**). El lugar principal de trabajo fue en el Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (PM), seguido de la Unidad de Biología molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación de Ciencias de la Salud (UBGyS) de la UANL y en el CINVESTAV de Irapuato, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

### **6.1.1 Programa Maricultura (UANL)**

El PM cuenta con una sala para realizar bioensayos (**Figura 2**) la cual consta de un sistema de recirculación de agua marina sintética, 4 tanques de pre-engorda de 500 L, cada uno con doble fondo y sistema de recirculación, dos tanques colectores que funcionan como tanques de sedimentación de 1500 L, los cuales se encuentran en la parte inferior del sistema, un tanque de succión que se encuentra entre los dos colectores, y recibe el agua de ellos; en la parte superior del sistema se encuentran dos tanques con un sistema de regulación de temperatura por intercambio y que suministra de agua al sistema por medio de gravedad, un filtro de perlas, filtro de luz UV, filtro de carbón activado, filtros de cartucho de 50 micras, y espumadores. Las unidades experimentales para los distintos bioensayos constan de acuarios de 60 y 120 L de fibra de vidrio (tasa de recirculación de  $300\% \text{ d}^{-1}$ ), conectados al sistema de recirculación de agua marina sintética, y un sistema de recirculación interna. En todos los experimentos realizados en el laboratorio del Programa Maricultura se monitoreó la calidad del agua (FasTest, Aquarium Systems, France) manteniendo los parámetros en los siguientes rangos: temperatura  $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ , salinidad  $35\pm 2$  ppt, pH  $8.0\pm 0.5$ ,  $\text{N-NH}_3 < 0.1$  ppm,  $\text{N-NO}_2 < 0.1$  ppm y  $\text{NO}_3 < 20$  ppm. El fotoperiodo durante los experimentos en este laboratorio fue de 12:12 horas luz: oscuridad.

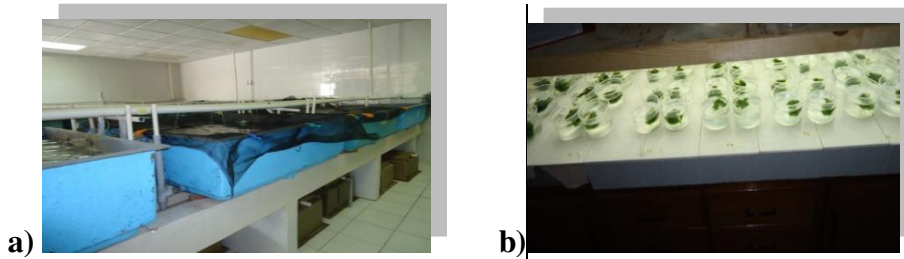


Figura 2 a) Sala de bioensayos y b) Sala de propagación de algas del programa Maricultura, FCB, UANL.

### 6.1.2 Unidad de Biología molecular, Genómica y Secuenciación (UANL)

Esta unidad cuenta con las instalaciones adecuadas y equipos necesarios para las diferentes plataformas de secuenciación y piro-secuenciación masiva, en la cual se realizan trabajos de genómica, transcriptómica y metagenómica, se cuenta con el laboratorio o el área de secuenciación masiva. Equipos para determinar la calidad e integridad de ácidos nucleicos. Tiene la plataforma AFFIMETRIX para microarreglos, TaqMan, qPCR. (Figura 3).

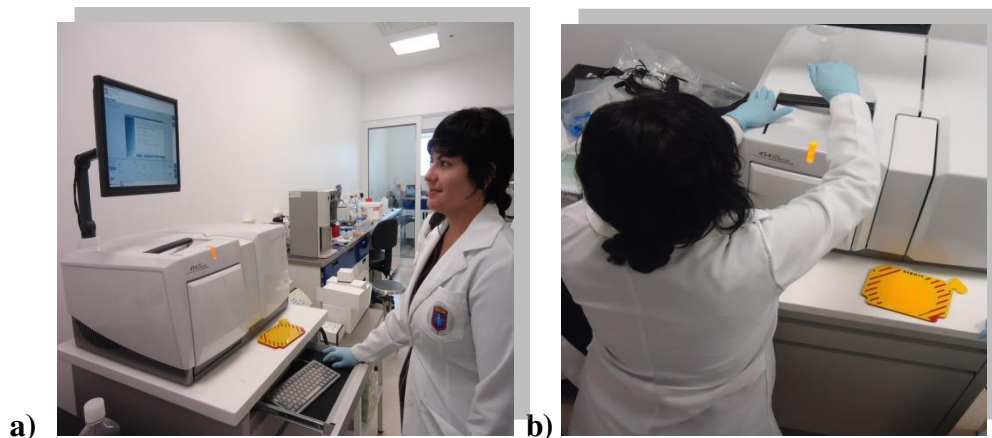


Figura 3 a) y b) Laboratorio de secuenciación Unidad de Biología molecular, Genómica y Secuenciación (UBGyS), CIDICS, UANL.

## **6.2 Material Biológico**

### **6.2.1 Origen y manejo de los camarones**

Los camarones utilizados en el experimento, fueron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* libre de patógenos específicos (SPF) obtenidos de la granja Langostinos y Camarones de Oriente S.A. de C.V., Calle Palmeras 234, Fracc. Lomas del Mar, Boca del Río Veracruz. Los camarones fueron colocados en bolsas de plástico dentro de hieleras de poli estireno y enviados vía aérea a la sala de bioensayos del PM. Dentro de las instalaciones de PM, los camarones fueron aclimatados de acuerdo a las condiciones de pH, salinidad y temperatura de la sala dentro de acuarios de fibra de vidrio de 500 Litros. Posteriormente, antes de ser utilizados en el bioensayo, los organismos se alimentaron con la dieta control artificial que se elaboró en el laboratorio de fabricación de alimento del PM (35% proteína, 8% de lípidos, 1% de fibra y 7% de cenizas) y se realizó una biometría para conocer la variación de tallas en el lote para después realizar una distribución homogénea en las unidades experimentales (acuarios).

### **6.2.2 Propagación de *Ulva clathrata* y condiciones de cultivo**

La cepa de *Ulva clathrata* utilizada para el proyecto de investigación fue proporcionada por la empresa Aonori Aquafarms Inc., ubicada en la ciudad de San Diego, California. La propagación y el cultivo se llevaron a cabo a partir de un clon diploide vegetativo (esporofito) el cual tiene una producción muy pequeña de esporas haploides.

La producción del alga *Ulva clathrata* se llevó a cabo dentro del laboratorio de Propagación de algas del PM (**Figura 8**) donde se cultivó a una densidad promedio de  $3.5\text{g } 0.5\text{ L}^{-1}$  en agua marina sintética a 35‰ de salinidad a una temperatura no mayor a 20°C, esterilizada químicamente con hipoclorito de sodio al 3% (250 µL/L durante 24 hrs) y neutralizada con tiosulfato de sodio. La fertilización fue a razón de 125 µL/L con un fertilizante comercial que contiene Nitrógeno, Fósforo y Potasio en una relación 30:15:15 además de micronutrientes. La siembra se realizó a diferentes densidades utilizando 8 charolas individuales para cada densidad (8 charolas x 7 densidades), con la finalidad de poder realizar una cosecha seriada de 48g de alga fresca diarios (**Tabla 2**).



De las charolas de propagación, se tomaron los 48 gramos de alga fresca y se dividieron en 6 porciones de 8g cada una y se colocaron en dos empaques de maya cada uno con 4g de alga fresca (**Figura 4**), para posteriormente ser colocadas dentro de los acuarios (5 acuarios experimentales y 1 control para el consumo del alga).

**Tabla 2** Parámetros de siembra de *Ulva clathrata*.

<b>Densidad de siembra g/0.5 L-1</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4.2</b>	<b>3.6</b>	<b>3.2</b>	<b>3</b>	<b>2.8</b>
<b>Días de cultivo</b>	15	16	17	18	19	20	21
<b>Gramos por acuario</b>	8	8	8	8	8	8	8
<b>Días de bioensayo</b>	1, 8, 15	2, 9, 16	3,10, 17	4, 11, 18	5, 12, 19	6, 13, 20	7, 14



**Figura 4** Propagación de *U. clathrata* en el laboratorio de Maricultura de la UANL.

### **6.3** *Formulación y elaboración del alimento*

Se formuló y elaboró una sola dieta tipo comercial (dieta control), la cual se fabricó en el laboratorio de preparación de alimentos del PM y fue formulada con el programa Nutrion 5 (**Tabla 3**), para cumplir con todos los requerimientos especificados por NRC (2011) para camarón *L. vannamei*.

**Tabla 3. Fórmula base utilizada para la elaboración de la dieta control.**

<b>Ingredientes (% proteína)</b>	<b>Origen</b>	<b>UANL control</b>
<b>PASTA DE SOYA (47%)</b>	Proteínas Naturales S.A.	<b>80</b>
<b>HARINA DE TRIGO (11.5%)</b>	Molinos San Juan	<b>454</b>
<b>HARINA DE PESCADO (67%)</b>	Omega Protein	<b>380</b>
<b>HARINA DE CAMARÓN (42%)</b>	Hirichsen (Chile)	<b>40</b>
<b>MEZCLA VITAMÍNICA</b>	CostaMar	<b>3.5</b>
<b>MEZCLA MINERAL</b>	CostaMar	<b>2.5</b>
<b>ANTIFÚNGICO</b>	CostaMar	<b>0.5</b>
<b>ANTIOXIDANTE</b>	CostaMar	<b>0.5</b>
<b>VITAMINA E</b>	CostaMar	<b>0.2</b>
<b>VITAMINA C</b>	Stay-C	<b>0.2</b>
<b>LECITINA DE SOYA</b>	Proteínas Naturales S.A.	<b>18.6</b>
<b>ACEITE DE PESCADO</b>	Tepual	<b>20</b>
<b>TOTAL, g</b>		<b>1000</b>

Para la elaboración del alimento, se molieron todos los ingredientes a un mismo tamaño de partícula (500  $\mu\text{m}$ ) en un molino Cyclotec modelo 1093, se pesaron todos los ingredientes por separado, posteriormente se pasaron los macronutrientes a la mezcladora marca Kitchen-Aid, donde se mezclaron durante 8 minutos (excepto el aceite de pescado y la lecitina de soya). Después se tomaron aproximadamente 150 g de la mezcla de los macronutrientes y se pre-mezclaron con los micronutrientes en un recipiente pequeño, se procedió a mezclar los micronutrientes con los macronutrientes durante 5 min. El aceite de pescado y la lecitina se agregaron a la mezcla anterior, mezclando por 8 minutos. En seguida se agregaron aproximadamente 350 mL de agua destilada caliente mezclando por 5 min. Para la peletización se utilizó un molino para carne marca TOR-REY equipado con un dado con orificios de 1.6mm de diámetro. Después de peletizar la dieta se secó en un horno de convección a 100°C por 8 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta obtener una humedad igual o menor a 10%, posteriormente se almacenaron en bolsas de plástico a 4°C.

### **6.3.1 Determinación de estabilidad en el agua en la dieta**

Se determinó la estabilidad en el agua de la dieta experimental en términos de porcentaje de pérdida de materia seca (PMS) y de proteína (PP); se realizaron pruebas de lixiviación de la dieta, con 3 replicados, utilizando el método de Ricque-Marie *et al.*, (2006), con un mínimo de tres replicas, pesando 3 g de alimento por replica, colocándose en un tamiz constituido de un trozo de tubo PVC 1 ½” con malla de acero inoxidable # 40 (apertura de malla 425µm). El tamiz se fijó en la boca de un frasco de 250mL con 200mL de agua marina (salinidad entre 30 y 35 g L<sup>-1</sup>), de tal manera que los pellets quedaran inmersos en el agua. El frasco se colocó en un baño-maría regulado entre 27 y 28°C, con agitación a 30 rpm. Al cabo de una hora de agitación, los tamices se pusieron a escurrir en posición inclinada en la boca del frasco, antes de secarlos a 130°C por 6 h.

Los cálculos se realizaron con las siguientes formulas (Cruz-Suárez *et al.*, 2001):

$$\% \text{ PMS} = [(\text{Peso de alimento en base seca antes de lixiviar} - \text{Peso del alimento en base seca después de lixiviar}) / \text{Peso del alimento en base seca antes de lixiviar}] * 100$$

$$\% \text{ PP} = [(\% \text{ de proteína en el alimento} * 100) - (\% \text{ de proteína en el alimento lixiviado}) * (100 - \% \text{ pérdida de materia seca en el alimento})] / \% \text{ proteína en el alimento.}$$

El porcentaje de absorción de agua (WA) de la dieta experimental fue determinado de la siguiente manera: se pesaron 5 g de alimento y se dejaron sumergidos por 1 hora en 50 ml de agua destilada. La muestra mojada se filtró en una malla 200 y se pesó. El porcentaje de absorción de agua se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ WA} = 100 * [(\text{peso de la muestra después de sumergirla en agua destilada} - \text{peso de la muestra antes de humedecer}) / \text{Peso de la muestra antes de humedecer}] * 100$$

### **6.3.2 Análisis bromatológico**

El análisis bromatológico se realizó en el laboratorio de análisis químicos del PM. Tanto el alimento experimental como una muestra de *U. clathrata* de la cepa original enviada por la empresa Aonori fueron analizadas utilizando los siguientes métodos: Kjeldhal (Tecator, 1987) y Dumas (equipo LECO) para proteína, Soxhlet (Tecator, 1983) para lípidos, AOAC 942.05 (1990) para ceniza, AOAC 962.09 (1990) para fibra, y AOAC 920.36 (1990) para humedad. El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por

diferencia. La energía bruta energía (Kcal/g) se determinó con el método de calorimetría a volumen constante en una bomba calorimétrica modelo Parr 1425 (Parr Instrument Co., Moline, IL, USA).

#### **6.4 Bioensayo nutricional**

##### **6.4.1 Diseño del experimento**

Para determinar el efecto del consumo del alga viva en comparación con el consumo de alimento artificial sobre los parámetros de rendimiento, así como para la toma de muestras necesarias para la realización de los análisis posteriores de expresión diferencial, se llevó a cabo un bioensayo con duración de 21 días en las instalaciones de la sala de zootecnia del PM, en el cual se evaluaron dos tratamientos experimentales. El primer tratamiento (T1), consistió en alimentar a los animales solo con alimento artificial utilizando la dieta tipo comercial que se preparó como se indicó anteriormente (ver el punto 6.3), y el segundo tratamiento (T2), consistió en alimentar a los organismos con la misma dieta, pero adicionando como alimento complementario o sustituto parcial del alimento artificial *Ulva clathrata* viva.

El experimento se llevó a cabo utilizando 5 acuarios replicados por tratamiento, conteniendo 10 camarones *L. vannamei* por acuario (peso promedio inicial 3g), el grupo control (T1) fue alimentado dos veces al día con la dieta artificial (09:00 y 16:00 horas) y el grupo experimental (T2) fue alimentados dos veces al día (09:00 y 16:00 horas) con la misma dieta más el consumo *ad libitum* de *Ulva clathrata* viva (siempre presente en los acuarios).

Para la preparación de la ración de algas, como se mencionó anteriormente (ver punto 6.2.2), se cosechaban diariamente 8g de alga viva, se colocaban en empaques de maya (**Figura 5**) y se colocaban en el fondo de cada acuario a las 09:00 horas y se dejaban presentes durante 24 horas, para permitir que los animales la tuvieran siempre a su disposición. Ambos tratamientos fueron alimentados durante 20 días, diariamente se registraban el resto de alimentos no consumidos, el número de mudas, los organismos

muertos y se sifoneaban los restos de alimentos y heces. Adicionalmente se colectaba el resto de algas no consumidas y se registraba el peso húmedo, posteriormente se secaba en la estufa (130° C por 2 horas) y se registraba el peso seco. Para la estimación del consumo del alga viva, adicionalmente se colocó un acuario sin camarones al que también se le colocaban diariamente las mayas con el alga viva, con la finalidad de determinar si la biomasa del alga aumentaba durante las 24 horas que era puesta en los acuarios, al finalizar las 24 horas también se tomaba el peso húmedo y seco del alga.

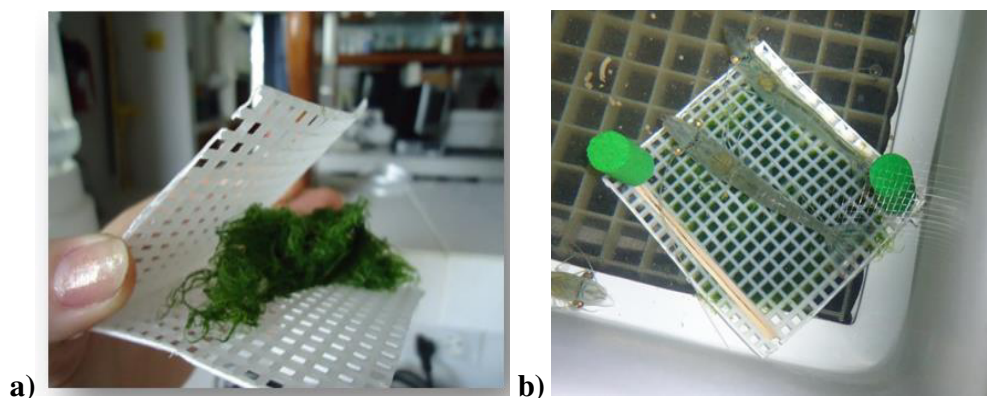


Figura 5 a) y b) Empaques en malla con alga fresca.

#### 6.4.2 Parámetros zootécnicos evaluados en los camarones

Los parámetros zootécnicos evaluados en el experimento fueron registrados a los 14 y 21 días del bioensayo.

**Peso individual (W):** los camarones fueron pesados individualmente en una balanza digital con precisión de un miligramo, después de haber sido ligeramente secados en una toalla húmeda.

**Biomasa del acuario (BA):** es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia.

**Ganancia en peso individual (GP):** es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial expresado en gramos. Esta variable se calcula para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final. Ganancia en peso individual = peso individual promedio final - peso individual promedio inicial.

**Tasa de sobrevivencia (%S):** el número final de camarones en cada acuario en porcentaje del número inicial. Tasa de sobrevivencia = (Número final / Número inicial) X 100.

**Consumo (CI):** el consumo individual se estimó cada día, a partir de la cantidad de alimento suministrado en cada acuario, del porcentaje de restos de alimento estimado al día siguiente y del número de camarones presentes ese día en el acuario. Para cada acuario el consumo reportado fue la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de los x días de bioensayo.  $CI = \sum (\text{consumo en el acuario al día } i / \text{número de camarones al día } i)$ .

**Consumo individual de alga (CA):** se estimó cuantificando el peso inicial del alga colocada dentro del acuario menos el peso final del alga al día siguiente.  $CA = \sum ((\text{peso inicial del alga colocada dentro del acuario} - \text{peso final del alga al día } i) / \text{número de camarones al día } i)$ .

**Tasa de crecimiento (TC):** es el porcentaje de crecimiento por camarón con respecto al peso promedio inicial.  $TC = (\text{ganancia en peso (g)} / \text{peso inicial promedio}) \times 100$

**Tasa de conversión alimenticia (TCA):** se determinó para los animales que solo consumieron alimento artificial, es el alimento artificial (base húmeda) consumido por unidad de peso ganado.  $TCA = \text{consumo individual estimado en un acuario} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

**Tasa de conversión alimenticia relativa al consumo de alimento artificial (pTCA):** Se determinó para los animales que consumieron tanto alimento artificial más alga viva, es igual que la TCA, pero en este caso solo se considera el consumo de alimento artificial.  $pTCA = \text{consumo individual de alimento artificial estimado en un acuario} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

**Tasa de conversión alimenticia relativa al consumo de Alga (tTCA):** Se considera el consumo de alimento artificial y el consumo de alga.  $tTCA = \text{consumo individual de alimento artificial estimado en un acuario} + \text{consumo individual de alga en base seca} / \text{incremento en peso individual promedio en este mismo acuario}$ .

### **6.4.3 Colecciones de muestras**

Al final del período de alimentación (20 días), se bajó el nivel del agua de los acuarios de forma paulatina durante toda la noche (de 120 a 60 litros) y se disminuyó la temperatura a 20°C, con la finalidad de reducir el estrés de los animales para su traslado a las instalaciones del CIDIS y posterior toma de muestras. El día 21, se seleccionaron cinco camarones por acuario que estuvieran aparentemente sanos (sin lesiones en la cutícula, sin necrosis, etc.) y aparentemente en fase de intermuda, estos fueron colocados dentro de contenedores de maya identificados con el número del acuario de procedencia y se colocaron por tratamiento dentro de hieleras para asegurar un ambiente de baja temperatura y luz durante su traslado, el cual duró aproximadamente 1 hora. La colecta de muestras de hemolinfa, hepatopáncreas y urópodos se llevó a cabo en el laboratorio de extracción de ácidos nucleicos del CIDICS.

Para iniciar el muestreo, se tomó uno de los 5 camarones de cada contenedor de malla (acuario) el cual era secado ligeramente en un paño húmedo y se registró el peso individual, su acuario y su tratamiento de procedencia, posteriormente a cada uno de los organismos seleccionados se les tomó una muestra de hemolinfa del seno ventral, utilizando una jeringa desechable hipodérmica (1 ml con aguja ultrafina de 29G x 13 mm), la cual contenía 100µl de una solución anticoagulante fría (2-8 °C) (solución isotónica para camarón, SIC-EDTA) y se registraba la cantidad exacta extraída de cada camarón, (Vargas-Albores et al., 1993). Subsecuentemente, se llevó a cabo la disección de cada organismo de manera individual para extraer su hepatopáncreas, se registró el peso del órgano, su acuario y su tratamiento de procedencia y se colocó de manera individual en tubos eppendorf que contenían 1mL de RNAlater® (Ambion® Life Technologies), para estabilizar inmediatamente el ARN de los tejidos de cada hepatopáncreas, y así poder preservar el perfil de expresión génica, posteriormente se tomó 20 mg de cada hepatopáncreas para realizar la extracción de ARN total y el resto fue almacenado a -80°C. Finalmente se tomó una muestra de los urópodos de cada camarón, cortando la región distal y se colocó en tubos eppendorf con solución salina para su posterior determinación del estadio de muda el cual se llevó a cabo por la técnica de Robertson *et al.* (1987).

## ***6.5 Análisis transcripcional***

### ***6.5.1 Extracción y purificación de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa de camarón***

Se empleó el método PureZOLE de Bio-Rad de acuerdo al protocolo del fabricante (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001481A.PDF>) para la extracción de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa de las diferentes muestras de cada tratamiento (T1 y T2).

La calidad e integridad del ARN total de cada muestra fue evaluada en el equipo Experion™ Automatized Electrophoresis System y la cuantificación se llevó a cabo con el kit de ensayo Quant-iT™ RiboGreen® RNA (Invitrogen), por medio de fluorescencia mediante el fluorómetro Qubit 2.0 de Life Technologies. La purificación de cada muestra de ARN total se efectuó por medio del kit RNeasy MiniElute Cleanup de QUIAGEN, el cual se basa en usar columnas con membrana de afinidad de ARN, de acuerdo a los protocolos del fabricante ([http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rnasampletechnologies/rna-cleanup/rneasy-minelute-clean up-kit#](http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rnasampletechnologies/rna-cleanup/rneasy-minelute-clean-up-kit#)).

### ***6.5.2 Enriquecimiento de la fracción de mensajeros***

Se emplearon diferentes métodos para el enriquecimiento de la fracción de ARN mensajeros, para definir cuál era el más apropiado de acuerdo a la plataforma de secuenciación que se utilizaría posteriormente:

1. Mediante el uso de columnas de afinidad por medio del kit Oligotex mRNA Mini de QUIAGEN, el cual permite la purificación de ARN mensajeros a partir de ARN total y al mismo tiempo la limpieza de transcritos in vitro de poli (A).
2. Mediante el uso de perlas magnéticas con afinidad a las cadenas poli (A) llamadas Agencourt AMPure XP (de Beckman Coulter) de acuerdo al protocolo de TruSeq RNA Sample de Illumina.



3. Mediante la enzima Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease de Epicentre de acuerdo al protocolo del fabricante (<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/terminator-5--phosphate--dependent-exonuclease.pdf?sfvrsn=10>).

### **6.5.3 Formación de POOLs equimolar de cada tratamiento (T1 y T2)**

Para la formación de los Pool equimolar de cada tratamiento se tomaron 11 muestras para cada pool, todas con  $RQI \geq 7$ , haciendo excepción con dos muestras del T2 con un ( $RQI=6.8$  y  $6.9$ ), considerando su buena concentración de ARN total que nos resultó de la cuantificación con Quant-iT™ RiboGreen® RNA (Invitrogen), posteriormente se efectuaron los cálculos para tomar cantidades equimolares de cada muestra y formar un pool para cada tratamiento por separado.

## **6.6 Secuenciación de nueva generación (NGS)**

La obtención de los transcriptomas de ambos tratamientos, se llevó a cabo utilizando varias plataformas de secuenciación masiva con la finalidad de elegir la que nos arrojará mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad de información de acuerdo a la literatura consultada. Para ello se utilizó la plataforma de Roche usando los secuenciadores GFLX Flex 454 y Junior y la plataforma de Illumina usando el secuenciador MiSeq.

### **6.6.1 Piro-secuenciación masiva con GFLX Flex 454 y Junior de Roche**

La piro-secuenciación para las dos plataformas de Roche (454 Flex y Junior), se llevó a cabo usando el protocolo cDNA Rapid Library Preparation Method de acuerdo al Manual de Roche ([http://454.com/downloads/my454/documentation/gsflxplus/cDNA%20Rapid%20Library%20Preparation%20Method%20Manual\\_XLPlus\\_May2011.pdf](http://454.com/downloads/my454/documentation/gsflxplus/cDNA%20Rapid%20Library%20Preparation%20Method%20Manual_XLPlus_May2011.pdf)). Se efectuaron 3 corridas en el secuenciador 454 Flex de los dos tratamientos y 1 corrida en el secuenciador Junior del T1 (**Figura 6**).

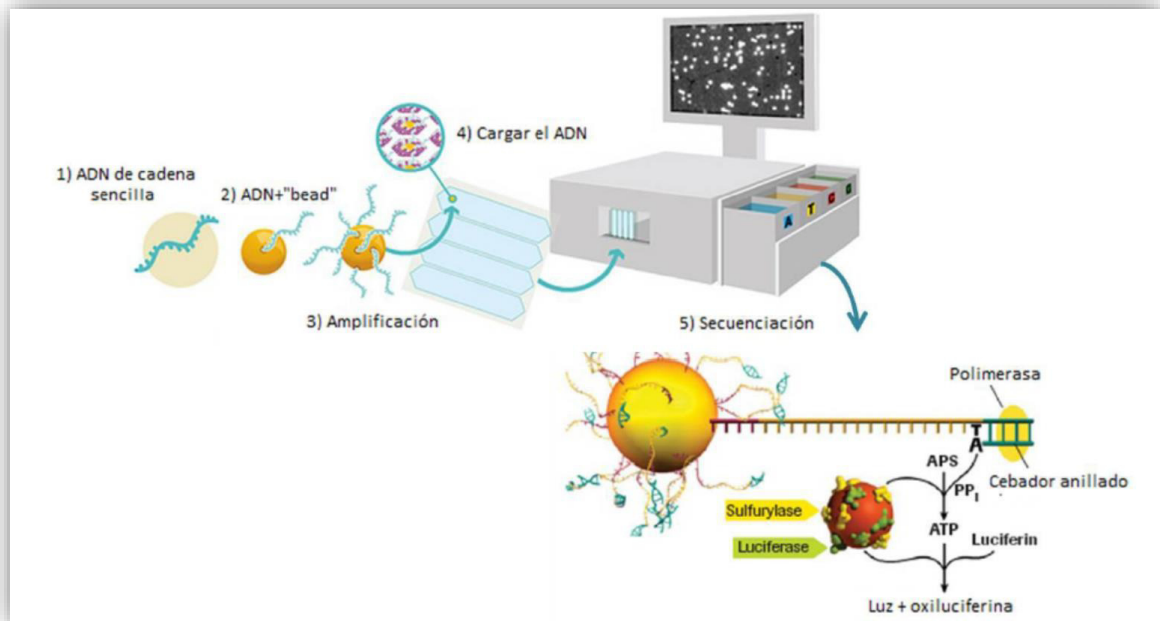


Figura 6 Esquema simplificado de la Piro-secuenciación. (Modificado de: [http:// 454.com](http://454.com) y <http://www.flickr.com/photos/got2knit/3332180118/>).

### 6.6.1.1 Preparación de librerías

La preparación de librería se inició con 300ng de ARN mensajero purificado de cada pool (T1 y T2). Inicialmente se realizó una fragmentación química del ARN mensajero de cada pool con cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ ), con la finalidad de tener fragmentos más pequeños de 200-800pb. Posteriormente se sintetizó el ADNc de doble cadena a partir del ARNm y se llevó a cabo la reparación de los extremos de cada fragmento de ADNc, a los cuales se les unió dos secuencias conocidas cortas o adaptadores (A y B) en cada extremo, que sirven para la amplificación y secuenciación de los fragmentos.

Posteriormente, se realizó una PCR en emulsión (em-PCR) de cada librería de ADNc que ya contenían sus adaptadores, este procedimiento se llevó a cabo en micro reactores formados por una emulsión de agua y aceite, a la cual se le añadió todos los reactivos necesarios para la PCR y esferas magnéticas, con la finalidad de que en cada microreactor contenga una esfera magnética unida a un ADNc por medio del extremo 3' del adaptador B. Después de varios ciclos de amplificación, se generó en cada esfera un

gran número de secuencias de doble cadena idénticas y unidas por el adaptador A. Posteriormente esas cadenas amplificadas se desnaturalizaron con la adición de altas concentraciones de NaOH, obteniendo finalmente en cada esfera un gran número de cadenas sencillas idénticas unidas por el extremo 3' adheridas a su superficie.

#### ***6.6.1.2 Piro-secuenciación masiva***

Después de la amplificación, todas las esferas de cada tratamiento fueron cargadas en un dispositivo conocido como PicoTiterPlate o conocida como “pico placa”, la cual es introducida en el secuenciador. Este dispositivo posee más de un millón de celdas de 44 micras de diámetro, en las cuales únicamente se deposita una esfera con ADNc por celda. Además de las esferas con ADNc, se introducen otro tipo de esferas que contienen las enzimas sulfúrilasa y la luciferasa necesarias para el proceso de secuenciación. La sulfúrilasa genera ATP a partir de pirofosfato liberado en la incorporación del nucleótido y la luciferasa en presencia de ATP, cataliza la reacción que genera una emisión de luz. De esta forma cada vez que el ADN polimerasa incorpora un nucleótido a la cadena creciente complementaria del ADN, se emite luz que es detectada por el equipo, captura la imagen y hace la interpretación.

La adición de los nucleótidos es un proceso automatizado por el secuenciador de forma cíclica agrega un nucleótido cada vez, de esta manera la polimerasa extiende uno o más nucleótidos dependiendo de la secuencia molde y emite luz con una intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados a la nueva cadena que se va sintetizando durante el proceso de secuenciación. Para la interpretación de las señales luminosas, el equipo consta de programas informáticos que interpretan estos patrones de luz y generan gráficas que indican si existió incorporación o no de nucleótidos y en qué cantidad (Jarvie y Harkins, 2008). Todo este proceso de la corrida en el equipo secuenciador dura aproximadamente 8 horas. Al final de la corrida el equipo arroja un total de lecturas en formato fasta, las cuales ya pasaron todos los filtros de calidad  $\leq Q20$ .

### 6.6.1.3 Ensamblaje de secuencias usando el software Newbler 454

Después de la obtención de las lecturas crudas arrojadas por el secuenciador para cada tratamiento (T1 y T2), se llevó a cabo el ensamblaje de las mismas en el software Newbler 454 utilizando los parámetros de base establecidos en el programa, (<http://www.454.com/products/analysis-software/>), el cual es un ensamblador específicamente diseñado para los datos generados por las plataformas de pirosecuenciación de la empresa Roche Diagnostics. Newbler posee la opción para proyectos transcriptómicos de ensamblaje *de novo*, por tal motivo fue usado para ensamblar nuestros transcritos *de novo* (Nederbragt, 2010).

### 6.6.1.4 Mapeo de secuencias usando el software Newbler 454

El mapeo no fue un paso obligatorio del procedimiento, sin embargo, se efectuó con la finalidad de descubrir las diferentes secuencias de cada transcriptoma (T1 y T2). El mapeo es una comparación de las secuencias totales obtenidas entre los dos tratamientos, en este caso se llevó a cabo tomando al tratamiento 1 como referencia, como lo indicaba la plataforma de Roche (**Figura 7**).

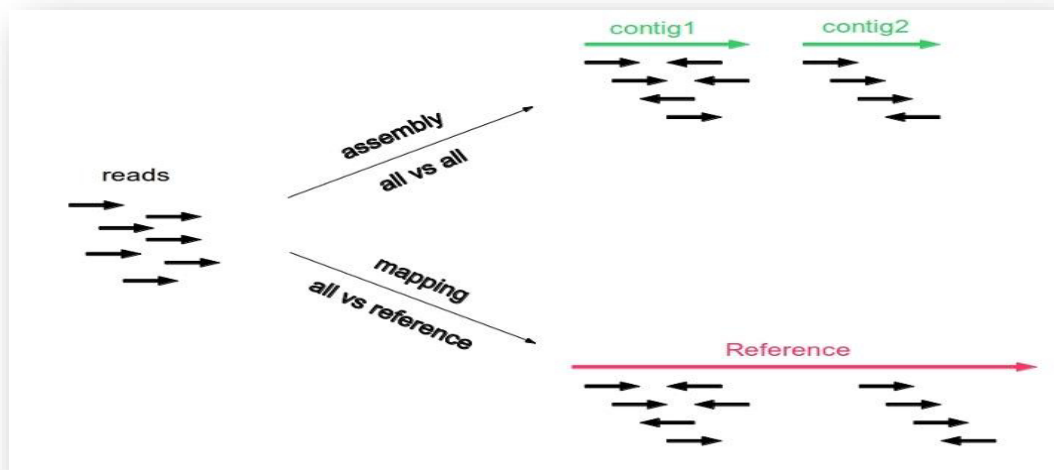


Figura 7 Imagen ilustrativa de la diferencia entre ensamblaje y mapeo.

### **6.6.1.5 Análisis bioinformático**

#### **6.6.1.5.1 Anotación Funcional**

Una vez ensambladas las lecturas arrojadas por el Newbler 454, se continuó con la anotación funcional de cada contig o transcrito generado, con la finalidad de asignarles funciones putativas usando el programa bioinformático Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2008), el cual es una herramienta catalogada como un anotador universal basado en GO (Gene Ontology) y permite categorizar a cada transcrito por función molecular, proceso biológico y componente celular y está diseñado para organismos no modelo. Además también realiza estadísticas que nos permiten por un lado valorar la anotación realizada y por otro, extraer información funcional mediante el paquete Gossip (Blüthgen *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2008).

#### **6.6.1.5.2 Identificación de rutas metabólicas**

Otra herramienta bio-informática utilizada fue la base de datos KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), es un proceso para mapear conjuntos de datos moleculares, especialmente conjuntos de datos a gran escala en genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, a los mapas de la ruta KEGG para la interpretación biológica de funciones sistémicas de más alto nivel. (Kanehisa y Goto 2000; Kanehisa *et al.*, 2008).

### **6.7 Secuenciación masiva con MiSeq Illumina**

Para la plataforma de Illumina fue usado el secuenciador MiSeq efectuando una sola corrida en una placa que contenía los pools de cada tratamiento (T1 y T2). En nuestra corrida se usó el formato de 300 ciclos (longitud de secuencia) y el protocolo a seguir fue TruSeq™ RNA Sample Preparation Guide de acuerdo al fabricante Illumina ([http://epigenome.usc.edu/docs/resources/core\\_protocols/TruSeq\\_RNA\\_SamplePrep\\_Guide\\_15008136\\_A.pdf](http://epigenome.usc.edu/docs/resources/core_protocols/TruSeq_RNA_SamplePrep_Guide_15008136_A.pdf))(**Figura 8**).

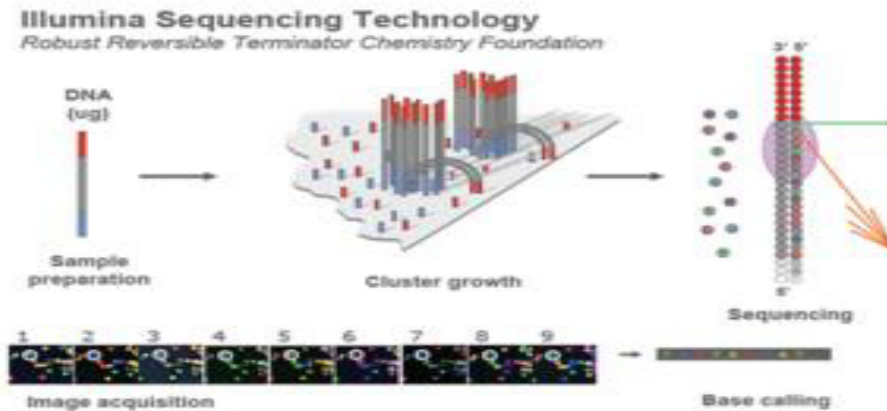


Figura 8 Esquema simplificado de la secuenciación con Illumina.  
<http://openwetware.org/wiki/BioMicroCenter:Sequencing>

### 6.7.1 Preparación de librerías

La preparación de librería se inició con 2µg de ARN total purificado de cada pool (T1 y T2), no con ARN mensajero como en las anteriores plataformas. Inicialmente se realiza la fragmentación y purificación del ARN mensajero de cada pool (T1 y T2) utilizando perlas magnéticas unidas a un oligo poli-T Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), en este proceso el ARNm es fragmentado y preparado para la síntesis de ADNc a partir de ARNm.

Posteriormente se efectuó la reparación de extremos romos de cada secuencia con una mezcla de reactivos con actividad exonucleasa de 3' a 5' (eliminando los extremos 3') y con actividad polimerasa (rellena los extremos 5'). Una vez obtenidas las secuencias con sus extremos romos, se llevó a cabo la adenilación de los extremos 3', añadiendo un solo nucleótido "A" para evitar que ligen el uno al otro durante la reacción de ligación de adaptadores. Con la finalidad de asegurar una baja tasa de formación de quimeras (templado concatenado). Después de la reparación de extremos romos, se realizó la ligación de varios adaptadores a cada extremo de los ADNc de doble cadena, preparándolos para la amplificación, con la finalidad de enriquecer selectivamente los fragmentos de ADNc que tienen moléculas de adaptador en ambos extremos y para amplificar la cantidad de ADNc en las librerías.

Con el fin de lograr la más alta calidad de los datos en la plataforma de secuenciación de Illumina, se determinó la calidad y cantidad de cada librería antes de introducirlas en el equipo MiSeq. Cada librería fue cuantificada utilizando qPCR (PCR cuantitativa) y su calidad se determinó usando el equipo 2100 Bioanalyzer en un chip específico para ADN (Agilent ADN-1000). El producto final debe ser una banda promedio de aproximadamente 260 pb, todos estos pasos de acuerdo con la guía del protocolo de Illumina.

### **6.7.2 Secuenciación masiva**

Una vez determinada la calidad y cantidad de cada librería, éstas fueron diluidas y desnaturalizadas para posteriormente tomar cantidades equimolares de cada una y cargarlas en el cartucho de reactivo en el depósito designado. El kit de reactivos fue del tamaño de 300 ciclos para el equipo MiSeq, todos los pasos de acuerdo al fabricante Illumina.

### **6.7.3 Filtrar lecturas de calidad con Trimmomatic**

Una vez concluida la secuenciación de cada librería (T1 y T2), se eliminaron los adaptadores y se extrajeron los archivos fasta, se obtuvieron los resultados totales de lecturas crudas que pasaron los filtros de cada tratamiento, y se utilizó el programa Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) para filtrar las lecturas de mejor calidad ( $Q>30$ ).

### **6.7.4 Ensamblaje de lecturas usando el software Trinity**

Una vez obtenidas las lecturas crudas de mejor calidad  $Q>30$  de cada tratamiento (T1 y T2), se efectuó el ensamblaje *de novo* de las mismas usando el software *Trinity* (<http://trinityRNAseq.sourceforge.net/>), utilizando los parámetros predeterminados en el programa, ya que es específico para ensamblar transcriptomas *de novo* (Grabherr *et al.* 2011).

## **6.7.5 Análisis bioinformáticos**

### **6.7.5.1 Anotación Funcional**

Una vez obtenidos el total de contigs o transcritos de cada transcriptoma arrojados por el Trinity, se continuó con la anotación funcional de cada contig o transcrito generado, con la finalidad de asignarles funciones putativas usando el mismo programa antes mencionados en la sección 6.6.1.5.1 (Blast2GO).

### **6.7.5.2 Identificación de rutas metabólicas**

Después de la anotación funcional completa con Blast2GO, se llevó a cabo la identificación de las rutas metabólicas de los dos transcriptomas completos (T1 y T2) en la base de datos KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), como ya se mencionó en el punto 6.6.1.5.2, indica las rutas metabólicas representadas por cada transcrito.

### **6.7.5.3 Análisis de expresión diferencial de genes usando el software edgeR**

Para los análisis de expresión diferencial de genes se utilizó el paquete estadístico *edgeR* Bioconductor ([http://trinityRNAseq.sourceforge.net/analysis/diff\\_expression\\_analysis.html](http://trinityRNAseq.sourceforge.net/analysis/diff_expression_analysis.html)) (Robinson *et al.*, 2010; Robinson y Oshlack 2010), este es ampliamente usado en el análisis de ARN-seq, ya que solo se necesita un parámetro por cada gen, por lo cual se puede aplicar a experimentos con un bajo número de réplicas. Este programa nos arrojó el nivel de expresión de cada transcrito como FPKM (fragmentos por kilobase de exón modelo por millón de lecturas mapeadas) ([http://jura.wi.mit.edu/bio/education/hot\\_topics/RNAseq/RNA\\_Seq.pdf](http://jura.wi.mit.edu/bio/education/hot_topics/RNAseq/RNA_Seq.pdf)). Con el fin de comparar los niveles de expresión de diferentes transcritos o genes a través de muestras, el programa Trinity (<http://trinityRNAseq.sourceforge.net/>) incluye el software edgeR para realizar una TMM adicional (Robinson y Oshlack 2010) (media recortada de valores M) una escala de normalización que tiene como objetivo contar diferencias en la producción de ARN total celular a través de todas las muestras (Dillies *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2013.) los cuales fueron normalizados usando el TMM, de acuerdo con las instrucciones de *Trinity*, a dos



niveles de significancia 0.001 y 0.05 con la finalidad de ver la mayor cantidad generada de transcritos expresados (Williams *et al.*, 2008).

#### **6.7.5.4 Análisis bioinformáticos de los transcritos diferencialmente expresados**

Una vez obtenidos los transcritos diferencialmente expresados en el edgeR, se les realizó nuevamente una anotación funcional con en el programa Blast2GO, esto con la finalidad de validar los resultados arrojados por el software edgeR y corroborar que los transcritos que nos arrojó como diferencialmente expresados, correspondían con los ya obtenidos en el anterior ensamblaje (Trinity) de los transcriptomas completos; además para facilitar las asignaciones de las funciones putativas, sin necesidad de ir a buscar cada secuencia en la base de secuencias de los transcriptomas completo. Así como también se usó la herramienta bio-informática base de datos KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) mencionada en la sección 6.6.1.5.1, (Kanehisa y Goto 2000; Kanehisa *et al.* 2008).

### **6.8 Validación de la expresión diferencial**

#### **6.8.1. Selección de transcritos**

Para validar el análisis bioinformático de los transcritos diferencialmente expresados se utilizó un análisis de qPCR, con la finalidad de cuantificar de forma relativa los productos de amplificación de cada transcrito de interés. Antes de efectuar el análisis de qPCR, se llevó a cabo la selección de transcritos de interés, tomando en cuenta los siguientes puntos: 1).- en base a los antecedentes, ya que se ha demostrado que el uso de algas marinas en estudios con organismos vivos y en cultivos celulares, modifican las rutas de metabolismo de lípidos y de respuesta inmune (ver **Tabla 1**); 2).- en base a los resultados obtenidos en la expresión diferencial, debido a que el mayor número de transcritos expresados entre los dos tratamientos (T1 y T2) se encontraban en las siguientes rutas metabólicas: respuesta inmune, metabolismo de lípidos, respuesta a estrés y estímulos y respuesta a procesos de óxido-reducción; 3).- usando la plataforma de InterPro para corroborar el dominio funcional o específico de los transcritos ya

seleccionados, ya que InterPro proporciona un análisis funcional de las proteínas mediante la clasificación en familias y la predicción de dominios y sitios importantes (Mulder *et al.* 2005), además nos facilitó encontrar regiones conservadas que nos ayudaron mejor en la selección de transcritos para el diseño de primers; y 4). - la verificación en la lista de los transcritos seleccionados, de ausencia de variantes de secuencia (isotigs), solo se seleccionaron los transcritos de secuencia única, para que al momento de calcular las expresiones obtenidas en el análisis de qPCR, no interfiriera ninguna variante o isotig, sino que sea solo la expresión de un transcrito.

### **6.8.2. Diseño de primers**

Existen diferentes herramientas bioinformáticas para el diseño de primers, dos de ellas se utilizaron en este trabajo, las cuales fueron el Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) es una aplicación que se encuentra libre para su uso en diferentes servidores web; permite especificar un gran número de variables y obtener primers según las indicaciones solicitadas. Además permite agregar el número de acceso de la secuencia, que se halla en las bases de datos internacionales. También permite discriminar las regiones de la secuencia que se deben incluir, las que se deben excluir y el rango de tamaños del producto. Por otra parte, el software incluye la posibilidad de especificar las características mínimas de los primers deseados, como  $T_m$ , porcentaje de GC, máxima auto-complementariedad, la longitud de secuencia, entre otros parámetros mencionados en el párrafo anterior. Otra herramienta fue el Oligo Analyzer de la página Integrated DNA Technologies, Inc (IDT) (<http://www.idtdna.com/site>), esta plataforma se encuentra para uso libre en diferentes servidores web alrededor del mundo; y en este estudio se utilizó para la comprobación de la especificidad de cada primer, para analizar sus temperaturas ( $T_m$ ) y para observar si tienen posible formación de estructuras secundarias y dímeros.

Una vez seleccionados los transcritos de interés se efectuó el diseño de primers, tomando en cuenta los siguientes parámetros en los programas bioinformáticos utilizados en el diseño de primers: 1) tamaño de secuencia entre los 18 a 30 nucleótidos de longitud; 2) la base en el extremo 3' debe ser una G o una C; 3) temperatura de fusión ( $T_m$ ) en un rango

de 50-65°C, y no debe variar tanto entre los primers seleccionados; 4) el contenido de GC debe de ser de 40-60%; 5) la auto-complementariedad debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer; y 6) debe de tener similitud para tener un 100% de apareamiento con el molde; 7) Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud pero generalmente entre: 18-30 nucleótidos de longitud. En seguida se muestra la **Tabla 4** con la lista de los transcritos de interés con su secuencia de primers ya diseñados:

**Tabla 4.** Lista de primers usados en la validación de los genes de interés diferencialmente expresados.

Gen camarón		Secuencia primer (5'-3')	TM°C
sam domain and hd domain-containing protein 1	F	5' CAGTGTTTCGAAACGGTTGTG	59.6 °C
	R	3' AGGTTTCTGAAGCAGCTTGG	60.2 °C
interleukin enhancer-binding factor 2 homolog	F	5' TTGTGGTGATCCTCAAGACG	59.7 °C
	R	3' TCATCTGGGAGCATTGTGAG	59.8 °C
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter)	F	5' ACTCTTTGCAGGGATCATGG	60.1 °C
	R	3' TCCCCATCTTCATCTTCAGC	60.2 °C
platelet-activating factor acetylhydrolase	F	5' TGCTGTAGATGGAGCGATTG	60.0 °C
	R	3' AACTGGCAAACAGGAAGTGC	60.3 °C
serine palmitoyltransferase 1	F	5' TGTTTCACTGGGCTGATGTC	59.7 °C
	R	3' TGACCTGTTGCAGAGTTGC	60.0 °C
fatty acid synthase	F	5' GTACCCATTGCCAGAGCAGT	60.1 °C
	R	3' GCAGTTCAACTCGCTCAACA	60.2 °C
elongation factor-1 alpha	F	5' GGCTGCCTGAGAATCAAAG	60.0 °C
	R	3' TTCTCCTTGCCCATGGTTAC	59.9 °C

### 6.8.3 PCR cuantitativa (qPCR)

Antes de iniciar con el análisis de validación de expresión diferencial mediante la técnica qPCR, se tomaron en cuenta dos puntos importantes: el primero, fue contar con la disponibilidad de todos los tubos que contenían cada primers de interés los cuales fueron diluidos en agua de grado de biología molecular a las concentraciones óptimas recomendadas por el fabricante, entre 100-200 mM de solución madre y 10-20 mM de soluciones de trabajo. Cabe mencionar que altas concentraciones de primer producen acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un

templado independiente llamado dímero de primer. El segundo punto importante fue llevar a cabo la síntesis de ADNc o de la cadena complementaria de los ARN total de cada tratamiento (T1 y T2), se usaron los mismos pools de la secuenciación en el MiSeq-Illumina. Para la síntesis de la primera cadena de ADNc, se inició a partir 2µg de ARN total de cada tratamiento, usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez obtenidos los ADNc sintetizados de cada pool (T1 y T2), éstos se usaron para iniciar el análisis de qPCR. Para llevar a cabo las reacciones de qPCR, se utilizó el kit Quantitech SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), con las siguientes especificaciones: se usaron (10 µL) de volumen final por reacción, el cual contenía 2 X Power SYBR Green PCR Master mix, 0.5 µL de cada primers el forward y el reverse y 2.5 µL de ADNc templado. La amplificación de la PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C por 2 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, y la extensión final a 72°C por 5 min. La adquisición y el análisis de datos se realizaron usando el equipo LightCycler® 480 System (Roche).

Para evaluar los niveles de expresión relativa de los siete genes, se empleó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen 2001); se usó como gen endógeno B-actina de camarón (Selvey *et al.* 2001; Cheng *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006). El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es utilizado para calcular la expresión relativa de los genes seleccionados, este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra calibradora y gen normalizador. Se lleva a cabo un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno.

Se obtienen los valores de  $\Delta Ct$  ( $Ct$  gen –  $Ct$  endógeno)(Livak y Schmittgen 2001):

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct (\text{trat}) = Ct (\text{gen estudio 1-tratamiento}) - Ct (\text{gen normalizador 2-tratamiento})$$

$$\Delta Ct (\text{ctrl}) = Ct (\text{gen estudio 1-control}) - Ct (\text{gen normalizador 2-control})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tratamiento}) - \Delta Ct (\text{control o muestra calibradora})$$

Los resultados se analizaron en una curva de calibración teniendo en cuenta que el valor de regresión debe estar cerca de 1 y la pendiente cerca de -3.32 (Wong y Medrano 2005). Cada reacción de qPCR se llevó a cabo por triplicado.

### **6.9 Análisis estadísticos**

En el bioensayo, los parámetros zootécnicos evaluados para cada replicado (acuario) se sometieron a un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA).

En el caso de los análisis bromatológicos de los dos tratamientos, los resultados fueron sometidos a un ANOVA.

El consumo y tasa de conversión alimenticia relativa al alimento artificial (sin contar el consumo de *U. clathrata*) para el tratamiento control (T1) y el tratamiento adicionado con *U. clathrata* (T2) fue sometido a un análisis de *t* de student.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SPSS versión 15.0. (SPSS. Inc. Chicago IL, USA).

Para la anotación funcional se llevó a cabo una evaluación estadística de anotación de referencias entre 2 conjuntos de secuencias, por medio del programa Blast2GO (Blüthgen *et al.* 2005; Götz *et al.* 2008), este paquete utiliza la prueba exacta de Fisher y corrige para múltiples pruebas. Para la validación de la expresión diferencial de genes, se usó el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen 2001).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Consumo de *Ulva clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio sobre parámetros zootécnicos del camarón

La composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (dieta control) y la composición de la *Ulva clathrata* utilizada en el bioensayo se presenta en la **Tabla 5**. La estabilidad en el agua del alimento se considera buena, con valores de PMS y PP por debajo del 10% en ambos casos, ya que como lo menciona Ricque-Marie y colaboradores en el 2006, el alimento para camarón necesita mantener su integridad física y química en el agua hasta ser consumido, ya que, si una gran cantidad de nutrientes se disuelve en los primeros minutos después de su distribución, el beneficio de una buena fórmula se puede perder. Los valores encontrados concuerdan con los reportados por estos mismos autores en dietas comerciales con un rango de variación de 3-12% para PMS y de 5.5 a 20% de PP; bajo las mismas condiciones de temperatura, salinidad y tiempo (28°C, 35ppt y 1 hora de inmersión).

**Tabla 5** Composición bromatológica y estabilidad en el agua del alimento artificial (comercial) y composición de la *U. clathrata* utilizados en el bioensayo.

Análisis	Alimento artificial	<i>U. clathrata</i>
<b>Humedad</b>	11.3±0.2	88.9±0.1
<b>Proteína</b>	37.7±0.2	20.4±0.1
<b>Lípidos</b>	8.9±0.1	1.4±0.2
<b>Fibra cruda</b>	1.1±0.1	5.6±0.1
<b>Ceniza</b>	7.2±0.1	34.4±0.2
<b>ELN</b>	33.5±0.1	38.2±0.1
<b>Energía (Kcal/g)</b>	4.6	2.4
<b>Estabilidad en el agua</b>		
<b>%PMS</b>	4.2±0.2	NA
<b>%PP</b>	9.2±0.4	NA
<b>%WA</b>	61.2±2.1	NA

NA= No aplica

Valores de bromatológico reportados en g 100g<sup>-1</sup> de muestra en base seca

Los resultados zootécnicos del bioensayo, se muestran en la **Tabla 6**. No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados, Esta pérdida de diferencias se debe a que en este experimento se decidió alimentar en la misma proporción con la finalidad de eliminar un cambio en la expresión de los genes como consecuencia del alimento ingerido.

La suma del consumo del alimento artificial y el alga en base seca y la tasa de conversión alimenticia no presento diferencias significativas ( $P=0.790$ ); al igual que la suma de la tasa de conversión alimenticia del alimento artificial más la tasa de conversión alimenticia de *Ulva* ( $P=0.890$ ). Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Lombardi y colaboradores en el 2006, ellos llevaron a cabo un experimento de cocultivo de *L. vannamei* y el alga filipina *Kappaphycus alvarezii* en jaulas flotantes; después de 103 días, el crecimiento, sobrevivencia y TCA no fue significativamente diferente entre el sistema de cocultivo y los de monocultivo. También concuerdan con los resultados de Marinho-Soriano y colaboradores en el 2007, quienes probaron una dieta para camarón hecha con 50% *Gracilaria cerviconis* (secada a 50°C/24 h) y 50% de una dieta comercial, y no encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de crecimiento. Otro estudio comparativo con el nuestro es el de Peña-Rodríguez en el 2010, realizó un bioensayo de 28 días en el laboratorio, donde camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* fueron distribuidos en 4 bloques de 3 acuarios, a una densidad de 8 camarones por acuario; donde un primer grupo de camarones fue alimentado a saciedad con una dieta comercial (30% proteína cruda) tomando esto como 100% ración (C100); el segundo y tercer grupo de camarones fueron alimentados con *U. clathrata* fresca a saciedad (siempre presente en los acuarios) más 75% y 50% de la ración de alimento artificial utilizado en el tratamiento C100. En un primer experimento, se obtuvo un incremento significativo en la tasa de crecimiento en camarones alimentados con *U. clathrata* fresca en combinación con 25% menos alimento artificial que los camarones control (sin *U. clathrata*); mientras que en el caso del tratamiento con *U. clathrata* fresca y 50% menos alimento artificial, no se presentaron diferencias significativas respecto al control; es decir que en condiciones controladas de laboratorio se puede ahorrar hasta un 50% de alimento balanceado.

**Tabla 6** Parámetros zootécnicos de los camarones alimentados con un alimento artificial (comercial) y *U. clathrata* fresca en condiciones controladas de laboratorio, evaluados a los 18 días del bioensayo.

Tratamiento	Con Ulva	Sin Ulva	
Parámetro	Mean ± DS	Mean ± DS	Probabilidad
TC	53.39 ± 7.64	56.54 ± 8.68	0.805
CONS	6.04 ± 0.28	5.90 ± 0.22	0.790
TCA	3.29 ± 0.58	3.57 ± 0.57	0.790
TCA a + U	3.63 ± 0.57	3.97 ± 0.69	0.890

(TC) Tasa de crecimiento en %, (CONS) consumo de alimento en g/ camarón, (TCA) Tasa de conversión alimenticia, (TCA a+U) Tasa de conversión alimenticia sumando el consumo de alimento artificial más el consumo de Ulva en base seca.

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros zootécnicos evaluados, excepto la pigmentación que fue mayor con el suplemento del alga.

## 7.2 Extracción y purificación de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa de camarón

La extracción de ARN total de hepatopáncreas y hemolinfa, se realizó mediante el protocolo de PureZOLE (6.5.1), pero solo resultó muy buen método para el tejido de hepatopáncreas obteniendo suficiente cantidad y calidad en cada muestra para la formación de los pools de cada tratamiento; con respecto a las muestras de hemolinfa extraídas de cada camarón, se logró extraer muy poca cantidad de hemolinfa, por consiguiente no se logró obtener suficiente cantidad de ARN total de las mismas al ser cuantificada cada muestra con el Experion.

En la **Tabla 7**, se muestran las cantidades y calidades de ARN total de diferentes muestras de hemolinfa del T1 (HL1.1, 1.2, 1.3) y T2 (HL2.1, 2.2) obtenidos por el método PureZOLE, observando muy poca concentración de ARN total (un promedio de 23.9 para T1 y 13.14 para T2), ya que lo normal es obtener un área de ARN mayor que el Ladder 95.75; estas mismas muestras tuvieron muy baja calidad ( $RQI \leq 6$ ) en todas las muestras, por lo cual decidimos no usar hemolinfa para formar los pools, esto puede ser atribuido a que no se realizó una buena toma de hemolinfa en los camarones; y con respecto a la calidad de ARN total de hemolinfa se atribuye a que se necesita suficiente cantidad de muestra para una mejor calidad de ARN total, como lo recomienda el protocolo de PureZOLE (<500,000 células o <10 mg de tejido) (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001481A.PDF>).



**Tabla 7 Cantidad y calidad de los ARN total purificados con (PureZOLE) de diferentes muestras de hemolinfas (HL).**

<b>ID</b>	<b>Nombre de la muestra</b>	<b>ARN Área</b>	<b>Concentración de ARN (ng/uL)</b>	<b>RQI</b>
<b>L</b>	Ladder	95.75	160	
<b>1</b>	HL1.1	8.19	13.68	N/A
<b>2</b>	HL1.2	14.8	24.73	1.8
<b>3</b>	HL1.3	20.04	33.49	N/A
<b>4</b>	HL2.1	22.53	24.25	2.7
<b>5</b>	HL2.2	1.88	2.03	N/A

En la **Tabla 8**, se muestran las cantidades (ng/μL) y calidades (RQI) de ARN total de hepatopáncreas extraídos con el método PureZOLE y purificados, tanto para el Tratamiento 1(1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, 1.15) como para el Tratamiento 2 (2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15). Analizados en el equipo Experion™ Automatied Electrophoresis System, observando en la mayoría de las muestras buena cantidad de ARN total (>130 ng/uL), además en la fila L (Ladder) de la tabla se muestra el marcador de ARN total que incluye el kit de los chips de ARN total del equipo Experion como un corrector para determinar la concentración de ARN total de la muestra (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000976C.pdf>). Con respecto a la calidad de las muestras (RQI), las seleccionadas para la formación de pools fueron las que obtuvieron un  $RQI \geq 7$ , ya que en el manual del Experion menciona que valores de 7 a 10 RQI indican una calidad aceptable.

**Tabla 8 Cantidad y calidad de ARN total purificados de hepatopáncreas (PureZOLE).**

<b>ID</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nombre de la muestra</b>	<b>Área de ARN</b>	<b>Concentración de ARN (ng/uL)</b>	<b>RQI</b>
L	---	Ladder	167.58	160	
1	1	1.1	1,050.14	391.72	7.7
2	1	1.2	730.17	272.36	8.3
3	1	1.3	697.38	260.13	8.5

4	1	1.4	1,080.94	403.21	7
5	1	1.5	788.57	294.15	5.1
6	1	1.6	389.34	145.23	10
7	1	1.7	629.85	234.94	8
8	1	1.8	680.36	402.47	6.8
9	1	1.9	498.1	294.66	8
10	1	1.10	259.65	153.6	7.9
11	1	1.11	438.54	259.42	7.7
12	1	1.12	936.51	894.15	8.5
13	1	1.13	493.21	539.03	8.2
14	1	1.14	461.78	504.68	6.7
15	1	1.15	806.86	770.36	9.8
16	2	2.1	608.92	581.38	7.3
17	2	2.2	577.73	215.5	6.8
18	2	2.3	663.51	247.5	4.2
19	2	2.4	567.14	211.55	4.5
20	2	2.5	983.71	366.94	8.1
21	2	2.6	592.73	350.63	8.6
22	2	2.7	221.16	130.83	6.1
23	2	2.8	470.31	278.21	7.8
24	2	2.9	416.75	246.53	6.9
25	2	2.10	404	238.99	8.4
26	2	2.11	535.29	316.66	7.3
27	2	2.12	252.96	149.64	4.9
28	2	2.13	329.95	195.19	6.8
29	2	2.14	723.19	690.48	9.3
30	2	2.15	768.29	733.54	8.1
31	2	2.16	608.92	581.38	7.3

### ***7.3.1 Formación de POOLs equimolar de cada tratamiento (T1 y T2)***

Para la formación de los Pool equimolar de cada tratamiento se tomaron 11 muestras para cada pool, todas con  $RQI \geq 7$ , haciendo excepción con dos muestras del T2 con un ( $RQI=6.8$  y  $6.9$ ), considerando su buena concentración de ARN total (**Tabla 9**).

**Tabla 9 Muestras seleccionadas de cada tratamiento para los pools.**

T1 Nombre Muestra	Área ARN	Concentración ARN (ng/uL)	RQI	T2 Nombre muestra	Área ARN	Concentración ARN (ng/uL)	RQI
1.1	1,050.14	391.72	7.7	2.1	608.92	581.38	7.3
1.2	730.17	272.36	8.3	2.5	983.71	366.94	8.1
1.3	697.38	260.13	8.5	2.6	592.73	350.63	8.6
1.6	389.34	145.23	10	2.8	470.31	278.21	7.8
1.7	629.85	234.94	8	2.10	404	238.99	8.4
1.9	498.1	294.66	8	2.11	535.29	316.66	7.3
1.10	259.65	153.6	7.9	2.14	723.19	690.48	9.3
1.11	438.54	259.42	7.7	2.15	768.29	733.54	8.1
1.12	936.51	894.15	8.5	2.16	608.92	581.38	7.3
1.13	493.21	539.03	8.2	2.9	416.75	246.53	6.9
1.15	806.86	770.36	9.8	2.2	577.73	215.5	6.8

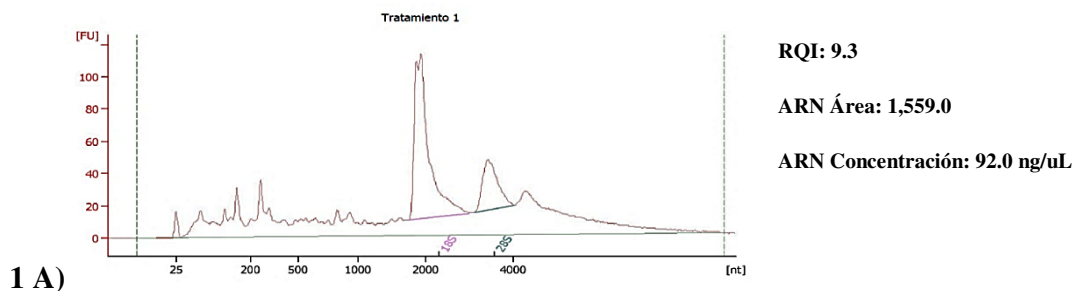
En la siguiente **Tabla 10** se muestran los cálculos para la formación de los pools equimolares de cada tratamiento, se muestran la cantidad de uL tomados de cada muestra con la finalidad de tomar 100ng/uL de cada una, posteriormente se le agrego agua grado biología molecular libre de ARNsas para redondear a 400uL en cada pool.

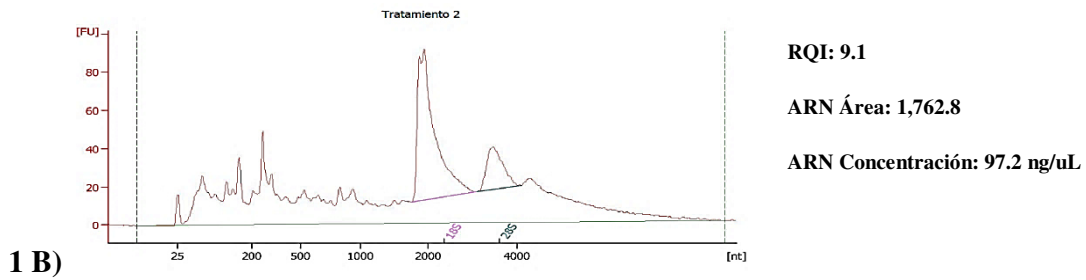
**Tabla 10 Cálculos para formación de pools (T1 y T2).**

T1	Área ARN	Concen tración	ARN Dil. 1:100 Conc. (ng/uL)	Cantidad µL tomados	T2	Área ARN	Concen tración	ARN Dil. 1:100 Conc. (ng/uL)	Cantidad µL tomados
Nombre		ARN (ng/uL)			Nombre		ARN (ng/uL)		
Muestra					muestra				
1.1	1,050.14	391.72	3.9172	25.53	2.1	608.92	581.38	5.8138	17.20
1.2	730.17	272.36	2.7236	36.72	2.5	983.71	366.94	3.6694	27.25
1.3	697.38	260.13	2.6013	38.44	2.6	592.73	350.63	3.5063	28.52
1.6	389.34	145.23	1.4523	68.86	2.8	470.31	278.21	2.7821	35.94
1.7	629.85	234.94	2.3494	42.56	2.1	404	238.99	2.3899	41.84
1.9	498.1	294.66	2.9466	33.94	2.11	535.29	316.66	3.1666	31.58
1.1	259.65	153.6	1.536	65.10	2.14	723.19	690.48	6.9048	14.48
1.11	438.54	259.42	2.5942	38.55	2.15	768.29	733.54	7.3354	13.63
1.12	936.51	894.15	8.9415	11.18	2.16	608.92	581.38	5.8138	17.20

<b>1.13</b>	493.21	539.03	5.3903	18.55	<b>2.9</b>	416.75	246.53	2.4653	40.56
<b>1.15</b>	806.86	770.36	7.7036	12.98	<b>2.2</b>	577.73	215.5	2.155	46.40
<b>Total pool <math>\mu\text{L}</math></b>				392.41	<b>Total pool <math>\mu\text{L}</math></b>				314.62
<b>Agua libre de ARNsas <math>\mu\text{L}</math></b>				7.59	<b>Agua libre de ARNsas <math>\mu\text{L}</math></b>				85.38
<b>Total pool <math>\mu\text{L}</math></b>				400	<b>Total pool <math>\mu\text{L}</math></b>				400

En las imágenes de los electroferogramas (**Figura 10**) se muestra similitud entre los tratamientos en la cantidad (ARN concentración) y tamaño de ARN total (pb) y se puede observar los ARN ribosomales 18S y 28S en cada pool. Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo Experion de los ARN total purificado de cada pool equimolar por tratamiento; teniendo una buena concentración de ARN total, tanto para T1 (92.0ng/ $\mu\text{L}$ ) como para T2 (97.2ng/ $\mu\text{L}$ ), con calidades mayores de 9 (RQI) para ambos tratamientos, ya que el RQI es un indicador de la calidad del ARN, permite estimar el nivel de degradación en una muestra total de ARN eucariota (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000976C.pdf>). Los resultados demuestran cantidades y calidades similares entre los pools de los dos tratamientos lo cual es favorable para que no influya en las variaciones de expresión génica de cada transcriptoma (Li *et al.*, 2013).



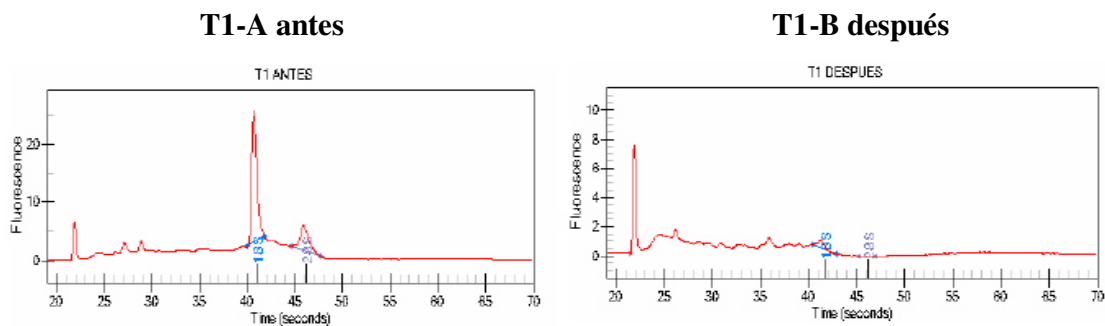


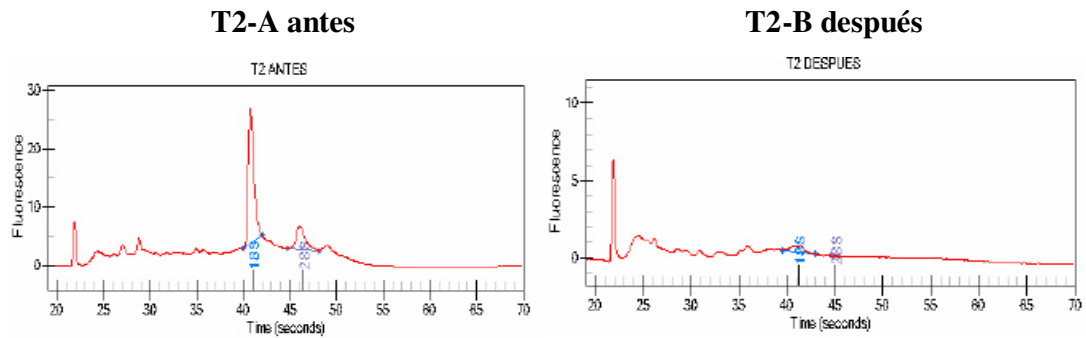
**Figura 9 Electroferogramas de los pools de ARN total de hepatopáncreas (T1 (1A) y T2 (1B)).**

#### **7.4 Piro-secuenciación masiva con GFLX Flex 454 y Junior de Roche**

Para iniciar con la pirosecuenciación masiva en las plataformas de Roche, era necesario iniciar la preparación de librería con ARNm, por lo cual se usó la enzima Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (Epicentre) para eliminar el ARN ribosomal (18S y 28S), los resultados de los electroferogramas de cada pool de la obtención de los ARNm, se muestran en la **Figura 11**, siendo muy similares en ambos tratamientos.

En las figuras T1-A y T2-A (**Figura 11**) se muestran los electroferogramas antes del pretratamiento con la enzima terminator y se observa el ARN ribosomal (pico de 18S y 28S) con un tamaño de 400 a 500 pb, el cual representa un 90% del ARN total de esta especie (*Litopenaeus vannamei*) como lo reporta (Khayat *et al.*, 2001), mientras que el ARN mensajero se presenta un tamaño de 250 a 350pb y representa un 10% del ARN total de esta especie. En las figuras T1-B y T2-B, se muestra que al pretratar con la enzima terminator se logra observar después de la digestión como disminuye el pico del ARN ribosomal y casi se eliminó de la muestra, obteniendo sólo el pico correspondiente al ARN mensajero.



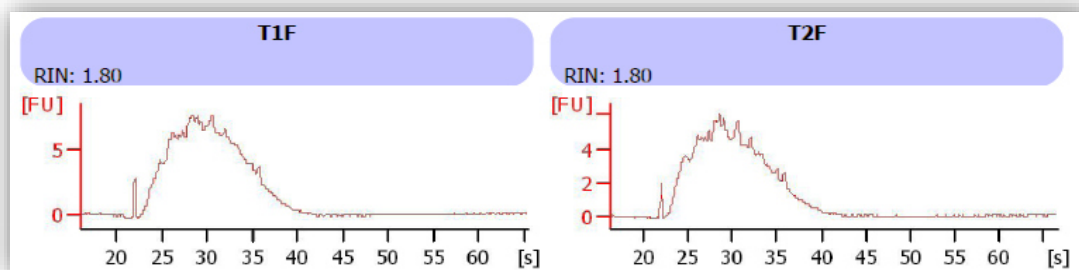


**Figura 10 Electroferogramas de la purificación de ARNm de cada pool de hepatopáncreas (Terminator)** T1-A= pool del tratamiento 1 antes de aplicar la digestión con la enzima terminator. T1-B= pool del tratamiento 1 después de aplicar la digestión con la enzima terminator. T2-A= pool del tratamiento 2 antes de aplicar la digestión con la enzima terminator. T2-B= pool del tratamiento 2 después de aplicar la digestión con la enzima terminator.

#### 7.4.1 Preparación de librerías (*Protocolo cDNA Rapid Library Preparation Method Manual*)

Una vez obtenido el ARN mensajero de cada pool se inició con la preparación de librerías siguiendo el protocolo antes mencionado (ver material y método punto 6.6), este proceso duró aproximadamente 3 semanas hasta dejar preparada la muestra para introducirla en la picoplaca de secuenciación.

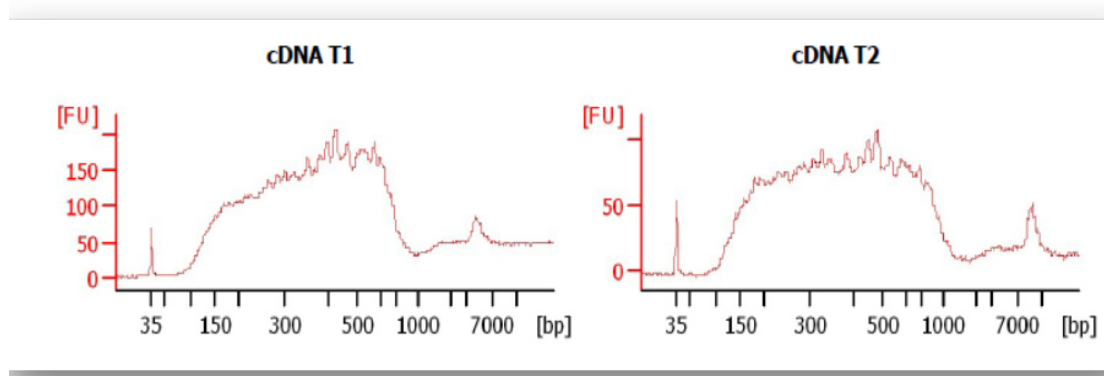
Como ya se indicó, este protocolo se inició con la fragmentación del ARN mensajero de cada pool con cloruro de zinc, para obtener un tamaño de población homogénea. En la **Figura 12** se observa los electroferogramas de cada tratamiento, en donde se observan entre los rangos máximos visibles de 23 a 40 (s). Observando una fragmentación similar en los dos tratamientos, con una mayor zona de acumulación de fragmentos entre los rangos máximos visibles de 23 a 38 (s); la puntuación RIN es en gran medida independiente de la cantidad de ARN utilizado.



**Figura 11 Electroferogramas de fragmentación Química 300ng de mRNA inicial con 2uL de Cloruro de Zinc.**

(FU=cantidad en fluorescencia, RIN=Integridad del mRNA, Rango mínimo y máximo visible 17-70 (s).

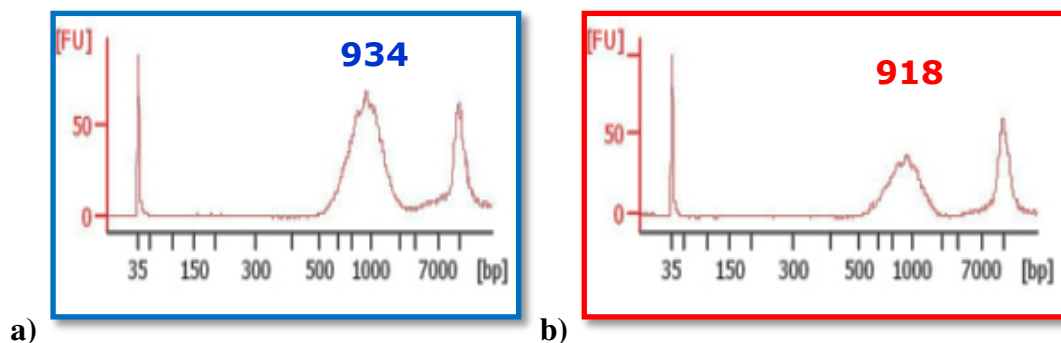
Posteriormente se realizó la síntesis de las cadenas complementarias de ADNc de cada tratamiento, obteniendo poblaciones de 50pb hasta 900pb en ambos tratamientos, las cuales se muestran en los electroferogramas de la **Figura 13**. Se observó similitud en tamaño de población de fragmentos (130-1000 pb) entre los dos tratamientos, solo diferencia en la cantidad de población de fragmentos (T1>100 y T2<100 FU).



**Figura 12 Electroferogramas de síntesis de la 2ª cadena complementaria ADNc.**

(FU=cantidad en fluorescencia, bp= tamaño en pares de bases)

Una vez sintetizadas las segundas cadenas complementarias, se llevó a cabo una remoción de fragmentos pequeños de las librerías, ya que este protocolo está diseñado para crear librerías de tamaño 600 a 1200 pb ([http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx-plus/cDNA%20Rapid%20Library%20Preparation%20Method%20Manual\\_XLPlus\\_May2011.pdf](http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx-plus/cDNA%20Rapid%20Library%20Preparation%20Method%20Manual_XLPlus_May2011.pdf)). El tamaño promedio obtenido de las librerías fue de 934pb (T1) y 918pb (T2), las cuales quedaron en el rango aceptable recomendado por Roche, estas se muestran en los electroferogramas de la **Figura 14**. Para la librería T1 se obtuvo una cantidad mayor de 50 (FU) diferente a la del T2 con menor a 50 (FU), esto se debe a los procesos de purificación donde se pueden haber lavado más cantidad de librería en una muestra que en la otra, pero no afecta al momento de utilizar las muestras, lo más importante es la similitud en el tamaño de fragmentos de librería (T1:934 pb) y (T2:918 pb) como fue mencionado el en párrafo anterior (protocolo de Roche).



**Figura 13 Electroferogramas de librerías a) T1 y b) T2**  
(FU=cantidad en fluorescencia, bp= tamaño en pares de bases)

#### 7.4.2 Secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche

Una vez preparadas las librerías de cada tratamiento, se inició con la secuenciación en la plataforma Flex 454 de Roche, sin embargo, debido a que los resultados no fueron satisfactorios en la primera corrida se realizó una segunda y una tercera corrida de secuenciación en el mismo equipo. Las tres corridas en el Flex 454 se llevaron a cabo en diferentes tiempos, usando una picoplaca por corrida, la cual fue dividida en dos áreas, una para cada librería (T1 y T2).

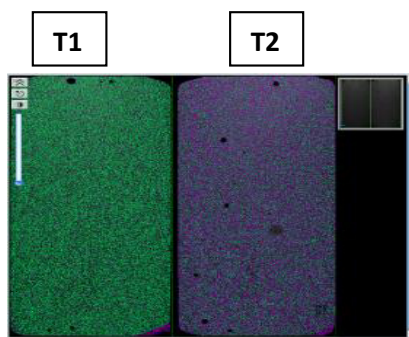
En las **Tablas 11, 12 y 13** y las **Figuras 15 y 16**, se muestran los resultados de las corridas efectuadas en el Flex 454, obteniendo resultados no satisfactorios en las tres corridas.

**Primera corrida.** En la **Tabla 11**, se muestran los resultados de lecturas que pasaron los filtros de calidad del equipo ( $\geq Q20$ ) y podemos notar que para el T1 solo el 0.3% y para T2 solo el 13.3% de las lecturas pasaron los parámetros de calidad del equipo. En la Figura 15 se puede ver el procesamiento de imagen de las dos regiones de la picoplaca para la primera corrida, donde notamos que para el T1 se observó el área en color verde y para la zona del T2 se observó el área en color morado debido a la gran cantidad de luminiscencia de secuencias. Los malos resultados obtenidos en esta corrida, se deber (según lo que comentó el fabricante) a que el oligonucleótido de amplificación, pudiera presentar una degeneración en su secuencia específica (la secuencia llave que tiene que ser detectada por el equipo). Así mismo se pudo deber a una falla en el flujo de reactivos del equipo.



**Tabla 11 Resultado de la primera secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche.**

Tratamiento	% Paso de filtros (parámetros de calidad del equipo)
T1 DC	0.30
T2 DC + Ulva	13.30



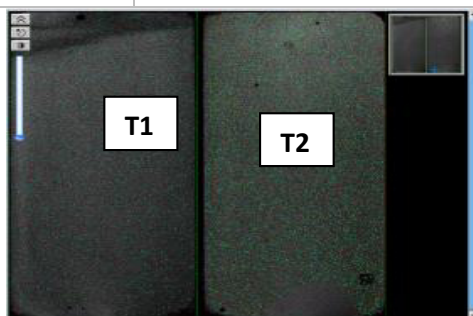
**Figura 14 Procesamiento de imagen de picoplaca de la primera secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche.**

**Segunda corrida.** Los resultados de la segunda secuenciación que se llevó a cabo en la plataforma GFLX Flex 454 de Roche se presentan en la **Tabla 12** y **Figura 16**, nuevamente la picoplaca se dividió en dos regiones para colocar en cada una uno de los dos tratamientos.

Los resultados de lecturas que pasaron los filtros de calidad del equipo en la Región 1 (T1) fue del 66.10% y en la Región 2 (T2) fue de 62.50% lo cual fue significativamente mejor que para la primera corrida. Por otro lado, en el procesamiento de imagen de las regiones de la picoplaca, tanto para el T1 como para el T2 se observó la mayor parte del área en color gris pero aún se pueden ver puntos en morado y color verde, estos colores se deben a la gran cantidad de luminiscencia de secuencias y son puntos que no pasan los parámetros de calidad del equipo. Esta corrida se realizó con la finalidad de validar la librería, sin embargo, los bajos resultados se deben en esta ocasión (según lo indicado por el fabricante del equipo), al lote de reactivos usados presentaba un defecto en las perlas de enriquecimiento (perlas magnéticas) lo que probablemente pudo ser la causa del error en esta corrida.

**Tabla 12 Resultados de la segunda corrida de secuenciación masiva en la plataforma GFLX Flex 454 de Roche.**

	%Paso de filtros
	(parámetros de calidad del equipo)
T1 DC	66.10%
T2 DC + Ulva	62.50%



**Figura 15 Procesamiento de imagen de picoplaca de la segunda secuenciación masiva con la plataforma GFLX Flex 454 de Roche.**

**Tercera y cuarta corrida.** En las dos primeras corridas la cantidad de lecturas crudas que pasaron los filtros fue muy escasa, en esta tercera corrida en el GS-FLX 454 fue de 19,282 para T1 y de 15,915 para el T2, aun así, fueron pocas las lecturas crudas obtenidas para considerarse como un transcriptoma completo de *L. vannamei*. Además, en esta tercera corrida se corroboró que el equipo tenía falla en el flujo de reactivos, debido a eso se atribuyó la escasa cantidad de lecturas en cada corrida.

Posteriormente se llevó a cabo una **cuarta corrida** en el pirosecuenciador GS Junior, pero esta vez solo para el tratamiento T2 para comparar el funcionamiento del equipo, obteniendo como resultado un total de 15,177 lecturas crudas que pasaron los filtros, igualmente un número escaso. En esta 4ª corrida se observó el mismo patrón a las corridas anteriores (**Tabla 13**).

**Tabla 13 Resultado de lecturas crudas que pasaron los filtros (Tercera y cuarta corrida).**

<b>3ª CORRIDA</b>	Cantidad de lecturas pasaron filtros
	(parámetros de calidad del equipo)
T1 DC	19,282
T2 DC + Ulva	15,915

4ª CORRIDA	Cantidad de lecturas pasaron filtros (parámetros de calidad del equipo)
T2 DC + Ulva	15,177

Para concluir con las corridas de pirosecuenciación de la plataforma de Roche, debido a las insuficientes cantidades de lecturas crudas y contigs generados en los resultados obtenidos, se decidió validar las muestras de librerías (T1 y T2) amplificándolas con Random Hexamer Primers (son una mezcla de oligonucleótidos conocidos como cebadores aleatorios que pueden usarse para iniciar la síntesis de ADNc), para corroborar que en efecto era el equipo, y no las muestras las que estaban mal sintetizadas, por lo que se concluyó que los efectos de excesiva luminiscencia en las corridas se debían a un fallo en el sistema del equipo secuenciador, ya que paso lo mismo con más muestras de diferente naturaleza y especie que se sometieron al mismo secuenciador (comunicación personal estudiante de doctorado FCB, UANL Jessica Giselle Herrera Gamboa).

Además otros investigadores han presentado problemas en esta plataforma, los cuales se mencionan en las siguientes páginas web (<http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21970>; <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=3772&page=4>; <https://flxlexblog.wordpress.com/2012/01/17/what-is-going-on-with-454-gs-flx-sequencing/>).

#### **7.4.3 Ensamblaje de lecturas usando el software Newbler 454**

A pesar de la poca cantidad de lecturas crudas en las corridas anteriores (pirosecuenciación), se llevó a cabo el ensamblaje de *novο* en cada una de las corridas tomando el total las lecturas crudas obtenidas en cada tratamiento con la finalidad de validar que el procedimiento técnico realizado en cada corrida fue bueno, demostrando que los transcritos ensamblados obtenidos pueden ser homologados con secuencias de genes presentes en los bancos de genes. En la **Tabla 14** se muestran la cantidad de contigs obtenidos en cada corrida por tratamiento. Tres corridas se llevaron a cabo en el GS-FLX

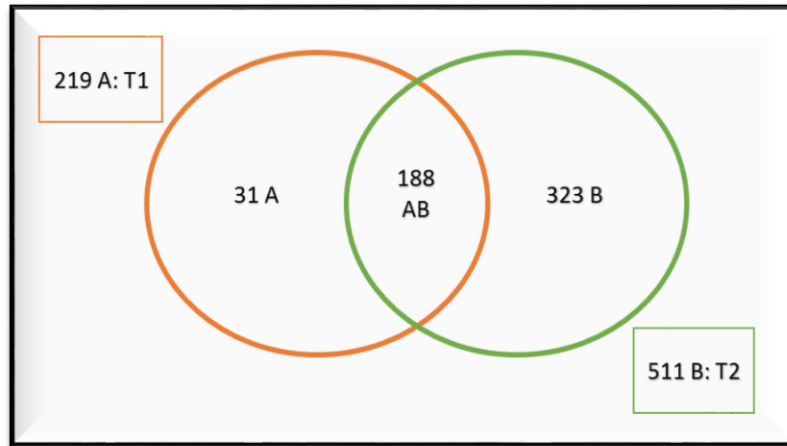
454 con (T1 y T2), al realizar el ensamblaje de las lecturas crudas en el Newbler 454 se obtuvieron para la 1ª corrida T1:1 y T2:73 contigs, en la 2ª corrida se obtuvieron T1:188 y T2:204 contigs y en la 3ª corrida T1:30 y T2:234 contigs. En la 4ª corrida en el GS Junior donde solo se secuencio el T2 se obtuvieron 58 contigs. Cabe mencionar que cuando el organismo de estudio en este caso el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* no tiene su genoma completo publicado, se lleva a cabo un ensamblaje de *novo*, el cual consiste en utilizar solo la información obtenida de la secuenciación para reconstruir el genoma en cuestión, sin conocimiento *a priori* de la organización del mismo (Miller *et al.* 2010).

**Tabla 14 Transcritos (contigs) obtenidos de cada ensamblaje en cada corrida.**

	Newbler 454 Ensamblaje	
	T1 DC	T2 DC+ Ulva
<b>1a corrida</b>	1 contig	73 contig
<b>2a corrida</b>	188 contig	204 contig
<b>3a corrida</b>	30 contig	234 contig
<b>4ª corrida</b>		58 contig

#### **7.4.4 Mapeo de transcriptomas usando el software Newbler 454**

Después de realizar el ensamblaje de *novo* en cada corrida, se realizó un mapeo usando el software Newbler 454 entre los dos tratamientos, se tomó como referencia al T1 (219 contigs totales) y se comparó con el T2 (511 contigs totales), con la finalidad de observar poblaciones de transcritos, los que estaban similares y diferentes en los dos tratamientos; se utilizaron todos los contigs de las 3 primeras corridas de cada tratamiento, obteniendo 31 contigs del T1 diferentes de T2 (círculo rojo A), 323 contigs de T2 diferentes de T1 (círculo verde B) y 188 contigs diferentes entre (T1 y T2 AB). La diferencia se debe a las condiciones alimenticias de cada tratamiento y a la cantidad diferente de contigs ensamblados entre cada tratamiento. En la **Figura 17** se muestra el diagrama de círculos de poblaciones de contigs entre las dos condiciones.



**Figura 17** Diagrama de círculos de poblaciones de contigs entre la condición A:T1 y condición B:T2

### 7.5 Secuenciación masiva con MiSeq Illumina

Debido al poco rendimiento obtenido en la plataforma de Roche, se decidió probar la plataforma de Illumina usando el secuenciador MiSeq en una corrida con los dos tratamientos (T1 y T2). Esto debido a que en un estudio realizado por Li *et al.* (2014), donde comparo las plataformas de Illumina y 454 de Roche para la detección de variantes de VIH-1 resistentes al fármaco raltegravir (VIH-1 MVs) en plasma de 5 pacientes con pretratamiento con el fármaco, observaron una mayor cobertura de secuenciación con la plataforma Illumina, lo cual ayudo a detectar con precisión todas las VIH-1 MVs; así como una menor detección de falsos positivos comparada con la plataforma 454 Roche. En otro estudio realizado por Loman *et al.* (2012) quien comparó el rendimiento de 454 GS Junior (Roche), MiSeq (Illumina) y Ion Torrent PGM (Life Technologies), mediante la secuenciación de un aislado de *Escherichia coli* O104: H4, que causó un brote de intoxicación alimentaria en Alemania en 2011. El MiSeq tuvo el mayor rendimiento por corrida (1.6Gb/corrida, 60Mb/h) y tasas de error más bajas. El 454 GS Junior generó las lecturas más largas (hasta 600 bases) y la mayoría de ensamblajes contiguos, pero tuvo el menor rendimiento (70 Mb/corrida, 9Mb/h). Ejecutado en el modo de 100 bp, el Ion Torrent PGM tuvo el rendimiento más alto (80-100Mb/h). Pero a diferencia del MiSeq, el Ion Torrent PGM y el 454 GS Junior produjeron errores indel asociados a homopolímeros (1,5 y 0,38 errores por cada 100 bases, respectivamente).

En la plataforma Illumina con el secuenciador MiSeq, se inició el protocolo de preparación de librerías con 2µg de ARN total purificado de cada pool (T1 y T2), como lo estipula el protocolo del fabricante (ver el punto 6.7).

### 7.5.1 Preparación de librerías (TruSeq® RNA Sample Preparation Guide v2)

Después de llevar a cabo todo el protocolo para la preparación de las librerías que se indicó en material y métodos (ver el punto 6.7.1, los resultados de la segunda cadena de ADNc se muestran en la **Figura 18**, en donde se puede notar que los electroferogramas de los dos tratamientos son muy similares tanto en tamaño de secuencia que oscila entre 100 a 200pb, estos resultados eran los esperados.

También en las figuras de cada electroferograma se muestran los marcadores (35 y 10380pb), los que indican el rango de tamaño en que debemos obtener nuestras secuencias de librerías.

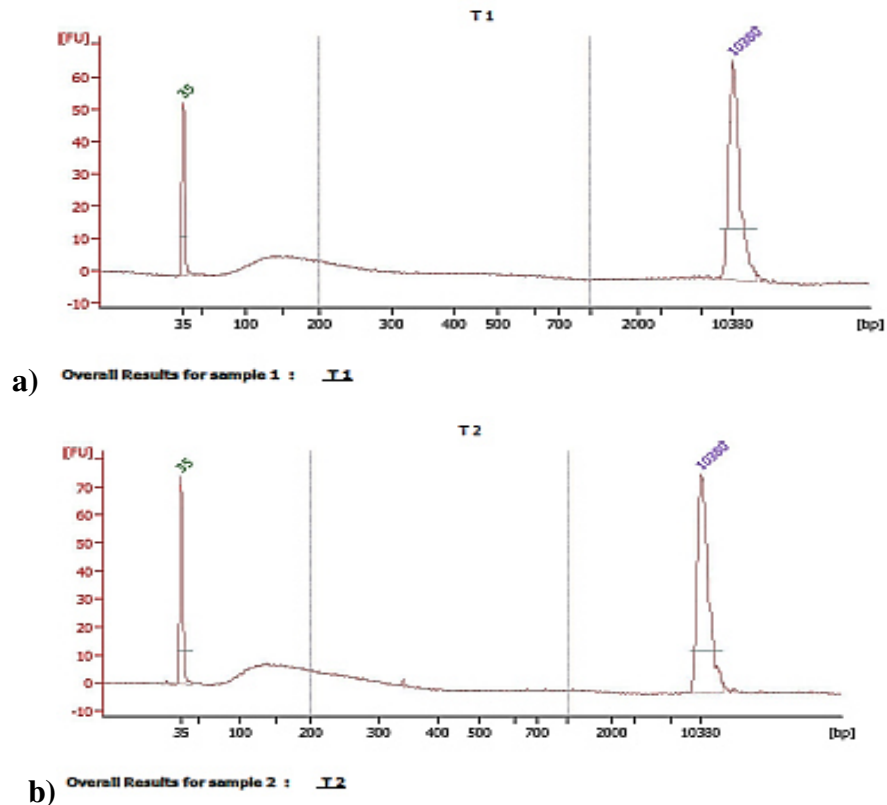
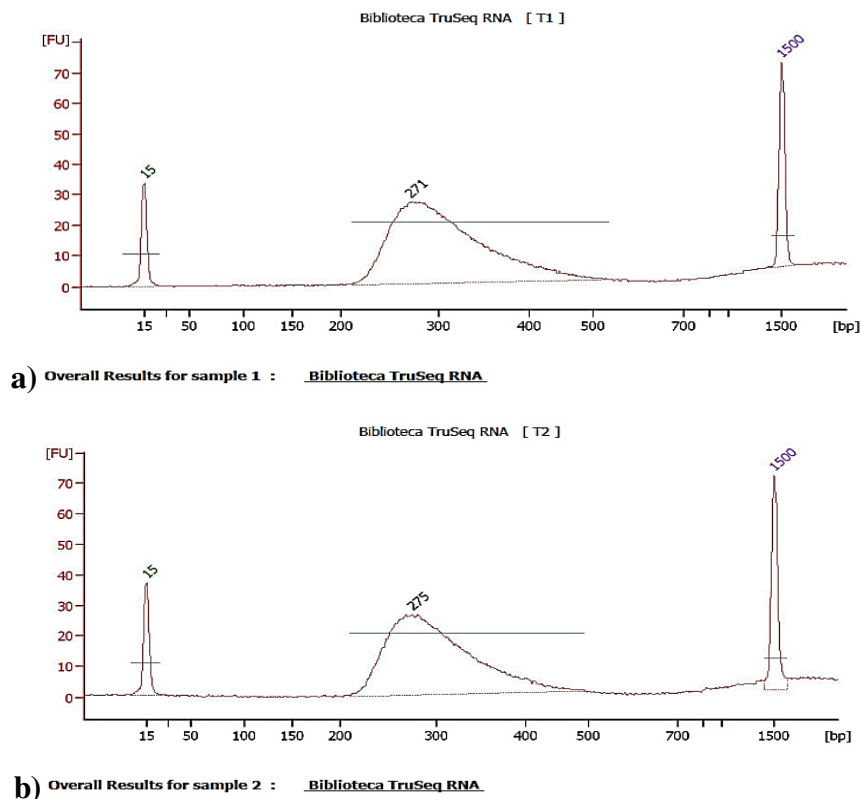


Figura 18 Electroferogramas de síntesis de la 2ª cadena de ADNc a) T1 y b) T2.

Por otro lado, en lo que respecta a la síntesis de las librerías los resultados obtenidos en cada tratamiento se muestran en la **Figura 19**, se utilizó el equipo Experion™ Automatied Electrophoresis System para cuantificar cada librería. Donde se observa un tamaño promedio de 271pb para el T1 y 275pb para el T2, tamaños promedio similares entre las dos librerías, los cuales se esperaban debido al protocolo usado de 300 ciclos (longitud de secuencia) de Illumina (Pag.44 del protocolo TruSeq® RNA Sample Preparation Guide v2). También en las figuras de cada electroferograma se muestran los marcadores (35 y 10380pb).



**Figura 19** Electroferogramas de librerías a) T1 y b) T2.

### 7.5.2 Secuenciación masiva

Los resultados de la secuenciación masiva utilizando la plataforma del secuenciador MiSeq se muestran en la **Tabla 15**, donde se observa que se obtuvieron 7,706,527 lecturas crudas totales entre los dos tratamientos, con un 48% de GC (guanina

y citosina), lo cual es aceptable debido a la naturaleza del código genético, y al porcentaje reportado en otros estudios de transcriptoma en *L. vannamei* (Li *et al.* 2013; Guo *et al.* 2013); además con un valor de N50 (medida por la cual están el 50% del total de los contigs o transcritos según lo determina Lin *et al.* 2011) de 1007pb para T1 y 800pb para T2. Se utilizó el parámetro de calidad de Q30 tal como lo sugiere el fabricante de Illumina ([http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf)).

Y un %N de 0 para los dos tratamientos, el cual es un buen valor, ya que significa que no hubo posiciones ambiguas de nucleótidos, el porcentaje de N en una buena secuenciación debe ser menor a 5%. Ya que el alfabeto de EST tiene cinco caracteres: ACGTN: Los cuatro nucleótidos y N que se emplea cuando existe una posición ambigua, que no sea G-C o A-T, como lo determina Brockman *et al.* (2008). El total de las lecturas crudas se filtraron usando el software **Trimmomatic**, se filtraron las de mejor calidad ( $\geq Q30$ ) (Patel y Jain 2012), mediante el programa Trimmomatic usando los parámetros default, obteniendo un total de 6,591,856 de lecturas crudas totales entre los dos tratamientos, de las cuales 3,855,181 corresponden al T1 y 2,736,675 al T2, como se muestra en la **Tabla 15**. Estos resultados, demuestran una buena cobertura de secuenciación, ya que como lo mencionan Sims *et al.* (2014) y Conesa *et al.* (2016), cinco millones de lecturas mapeadas son suficientes para cuantificar con precisión genes altamente expresados en la mayoría de los transcriptomas eucariotas, aunque otros autores (Li *et al.* 2012; Guo *et al.* 2013) han obtenido hasta 100 millones de lecturas para cuantificar genes con bajos niveles de expresión. Con esta información podemos determinar que el secuenciador MiSeq ha sido el adecuado para nuestro estudio, ya que la importancia de esta investigación era observar los genes altamente expresados bajo el consumo de Ulva; y si utilizamos otra plataforma como el HiSeq, solo se observarían millones de copias de estos mismos genes altamente expresados.

Tarazona y colaboradores en el 2011, concluyen que para tener un buen análisis de expresión diferencial en las tecnologías de secuenciación de RNA, lo más importante no es obtener millones de lecturas en un análisis transcripcional, sino que la profundidad de secuenciación entre las dos condiciones esté equilibrada. En los resultados obtenidos



en nuestro estudio se obtuvo un equilibrio de profundidad de secuenciación entre las dos condiciones al obtener 3,855,181 y 2,736,675 lecturas crudas después de la limpieza respectivamente para cada tratamiento (T1 y T2).

**Tabla 15 Información general de la corrida con MiSeq.**

<b>INFORMACION GENERAL DE LOS TRANSCRIPTOMAS T1 Y T2</b>			
<b>NOMBRE</b>	<b>T1 DC</b>	<b>T2 DC + ULVA</b>	<b>TOTAL (T1 Y T2)</b>
<b>TOTAL DE LECTURAS CRUDAS</b>			<b>7,706,527</b>
<b>TOTAL DE LECTURAS QUE PASARON FILTROS</b>	3, 855, 181	2, 736, 675	6,592,856
<b>% TOTAL DE LECTURAS QUE PASARON FILTROS</b>	574,707	407,967	98.2674
<b>% Q30</b>	78.9	78.9	78.9
<b>N50 (pb)</b>	1007	800	903
<b>% GC</b>	48	48	48
<b>% N</b>	0	0	0

### **7.5.3 Ensamblaje de ARN de novo usando el software Trinity**

Una vez obtenidas las lecturas de mejor calidad, se extrajeron los archivos en formato FASTA y se llevó a cabo el ensamblaje *de novo* de los transcriptomas en el programa Trinity, obteniendo 37,078 transcritos (contigs) para T1 y 31,615 transcritos para T2, con un tamaño promedio entre los dos tratamientos de 629pb y una N50 entre los dos tratamientos de 903pb, como se muestra en la **Tabla 16**.

**Tabla 16 Información general del ensamblaje *de novo* de T1 y T2.**

<b>Conjunto de datos</b>	<b>T1 Dieta control</b>	<b>T2 Dieta control + Ulva</b>	<b>Total (T1 y T2)</b>
<b>Contigs totales</b>	37,078	31,615	68,693
<b>N50 (pb)</b>	1007	800	903
<b>Tamaño promedio (pb)</b>	666	592	629

#### 7.5.4 Análisis bioinformáticos de los transcriptomas completos:

##### 7.5.4.1 Anotación funcional

En la **Tabla 17** se muestra la cantidad total de contigs de cada tratamiento (T1: 37,078) y (T2: 31,615) anotados en el programa Blast2GO, con un total de unigenes (T1: 23,510) y (T2: 20,901). Los contigs son segmentos de ADN superpuestos, que juntos representan una región consenso de ADN; los unigenes se refiere a un grupo de genes que desempeñan una función en particular. Un total de 15,861 transcritos para T1 y 14,246 para T2 fueron anotados de acuerdo a su función homóloga en la base de datos del NCBI Nr (no redundantes).

Cuando se sometieron al programa de GO (Ontología de Genes sección 6.6.1.5.1) para determinar la ontología de cada transcrito o unigen; se obtuvieron resultados de 64% y 65.86% los cuales corresponden a T1 y T2 respectivamente los cuales se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17 Información general de la anotación funcional de cada transcriptoma (T1 y T2).**

Anotación funcional de transcriptomas T1 y T2		
	T1 DC	T2 DC + ULVA
<b>Total de contigs</b>	37,078 (100%)	31,615 (100%)
<b>Total de unigenes anotados</b>	23,510 (63.41%)	20,901 (66.11%)
<b>Anotación en base de datos Nr</b>	15,861 (42.77%)	14,246 (45.06%)
<b>Anotación en base de datos GO</b>	23,733 (64.00%)	20,824 (65.86%)

La comparación de los transcriptomas entre el T1 y T2, mostró similitud en la distribución de los unigenes en las tres categorías de GO, observando que 50.40% y 50.30% unigenes corresponden a procesos biológicos, 39.03% y 39.01% a componentes celulares y 21.25% y 21.52% a funciones moleculares, los cuales fueron clasificados dentro de 49 subcategorías (**Figura 20**). Para el T2 DC+Ulva dentro de la categoría de procesos biológicos las tres subcategorías más representadas fueron proceso metabólico lipídico, proceso de sistema inmune y respuesta a estímulos; en la categoría de componentes celulares las subcategorías más representadas fueron componentes de espacio extracelular, extracelular zona parcial y región extracelular; y por último en lo que corresponde a la categoría de función molecular las dos subcategorías más representadas

fueron la unión a carbohidratos y actividad del transportador. Estos resultados muestran que la distribución funcional de los genes de los dos grupos de camarones no difiere en los dos tratamientos, esto indica que el número de genes expresados en cada categoría GO no se vio afectada significativamente por el consumo de *Ulva clathrata*.

En comparación con el estudio realizado por Zeng *et al.*, (2013) el cual realizó el análisis de dos transcriptomas de hepatopáncreas de *L. vannamei*, uno infectado con el virus de la mancha blanca y el otro sin infección, encontró en tanto infectados y camarones no infectados, la mayor parte del proceso biológico corresponden a genes involucrados en los procesos celulares, procesos metabólicos y localización; la mayoría de los genes codifican proteínas componente celular asociado con partes de las células y orgánulos celulares; la mayoría de genes de función moleculares se asociaron con actividad catalítica, actividad transductor vinculante y molecular. El resultado mostró que la distribución funcional de los genes de los dos grupos de camarón fue similar, lo que indica que el número de genes expresados en cada GO categoría no se vio afectada significativamente por WSSV-infección.

En un estudio de nutrigenómica realizado por Zou *et al.* (2013) con la especie *Arma chinensis*, el cual realizó dos análisis transcripcional, uno bajo un régimen de dieta artificial y otro con una dieta con fuente de alimento natural a base de pupas polilla de seda de roble chino, en el cual obtuvo una alta cantidad de secuencias asociadas a las asignaciones de función molecular, en procesos celulares como proteólisis, procesos metabólicos de carbohidratos, la reducción de la oxidación, y los procesos metabólicos. Este estudio concuerda con el nuestro en las asignaciones de función molecular, ya que se encontró una alta similitud en la unión a carbohidratos, esto puede atribuirse a que los organismos solo fueron sometidos a una fuente de alimento natural como en nuestro estudio, sin utilizar algún efector patógeno.

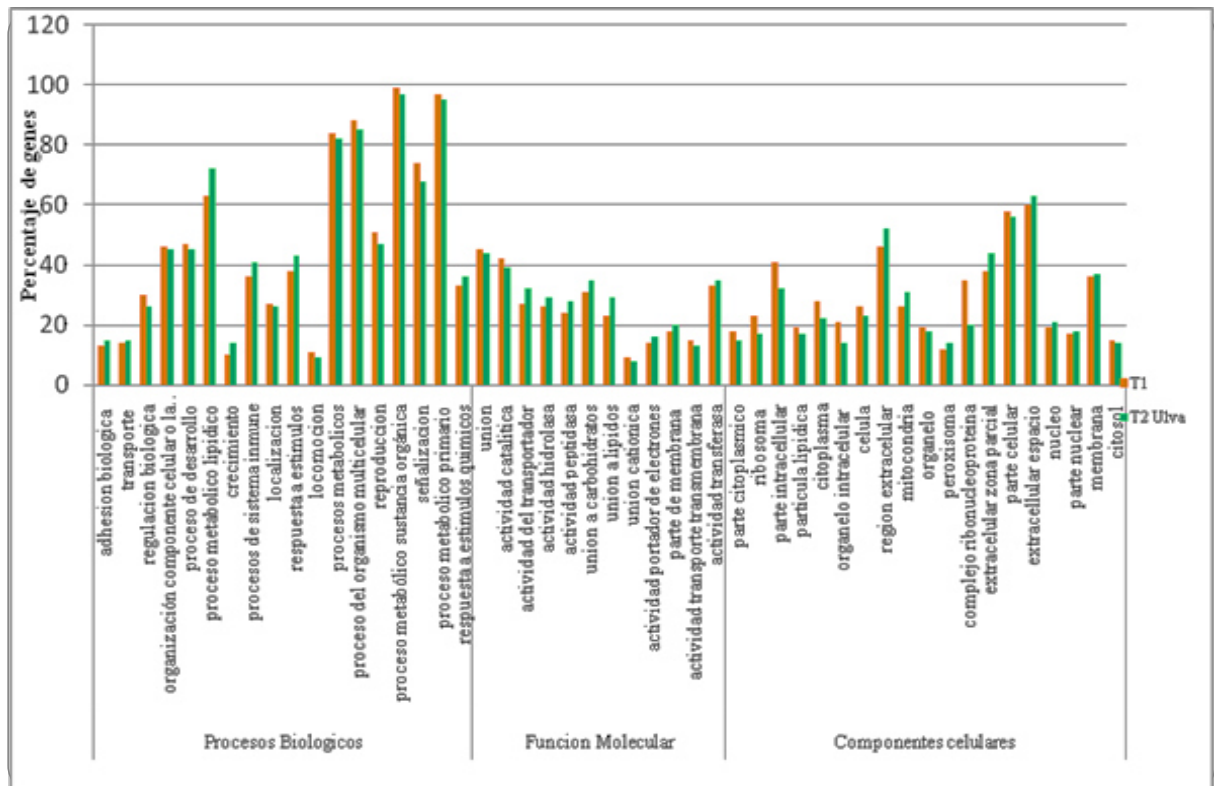


Figura 20 Categorías de ontología de genes GO encontradas en los dos transcriptomas de camarones (T1 Dieta Control) y (T2 DC + Ulva).

Los resultados de la distribución de especies con mejor alineamiento de secuencias arrojadas por el programa Blast2GO se muestran en la **Figura 21**. Del total de los unigenes anotados, mostraron alineamiento con unigenes de *Daphnia pulex* (12%), *Tribolium castaneum* (6%), *Pediculus humanus* (5%), *Branchiostoma floridae* (3%), *Crassostrea gigas* (3%), *Ixodes scapularis* (3%), *Nasonia vitripennis* (3%), *Capitella teleta* (3%), seguido de *Litopenaeus vannamei* (3%).

Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Guo *et al.*, (2013) y Chen *et al.*, (2013), quienes indican que el hecho de que la mayoría de los unigenes sean similares a los de *Daphnia pulex*, *Tribolium castaneum* y *Pediculus humanus*, se puede atribuir a su estrecha relación filogenética ya que existe abundante información genética de estas especies; además estas especies con las cuales se alinearon la mayoría de secuencias son artrópodos como *L. vannamei*, lo cual corrobora un buen ensamblaje realizado de secuencias.

Por otro lado, el resto de los unigenes (30%), muestran similitud con otras especies. En el estudio de Zeng y colaboradores en el 2013 realizaron dos transcriptomas de hepatopáncreas de *L. vannamei*, uno infectado con el virus de la mancha blanca y el otro sin infección, encontró que la distribución de las especies de los mejores partidos resultante para cada secuencia muestra que los unigenes de *L. vannamei* tienen el 13.68% de coincidencias con *Pediculus humanus corporis* de secuencias seguidas de *Bos taurus* (9,93%) y *Nematostella vectensis* (9,40%). Inesperadamente, se encontraron sólo 5.19% unigenes similar al de la misma especie *L. vannamei*. Esto podría atribuirse a que la cantidad de las secuencias de proteínas de crustáceos especialmente de *L. vannamei* disponibles en las bases de datos es relativamente limitada.

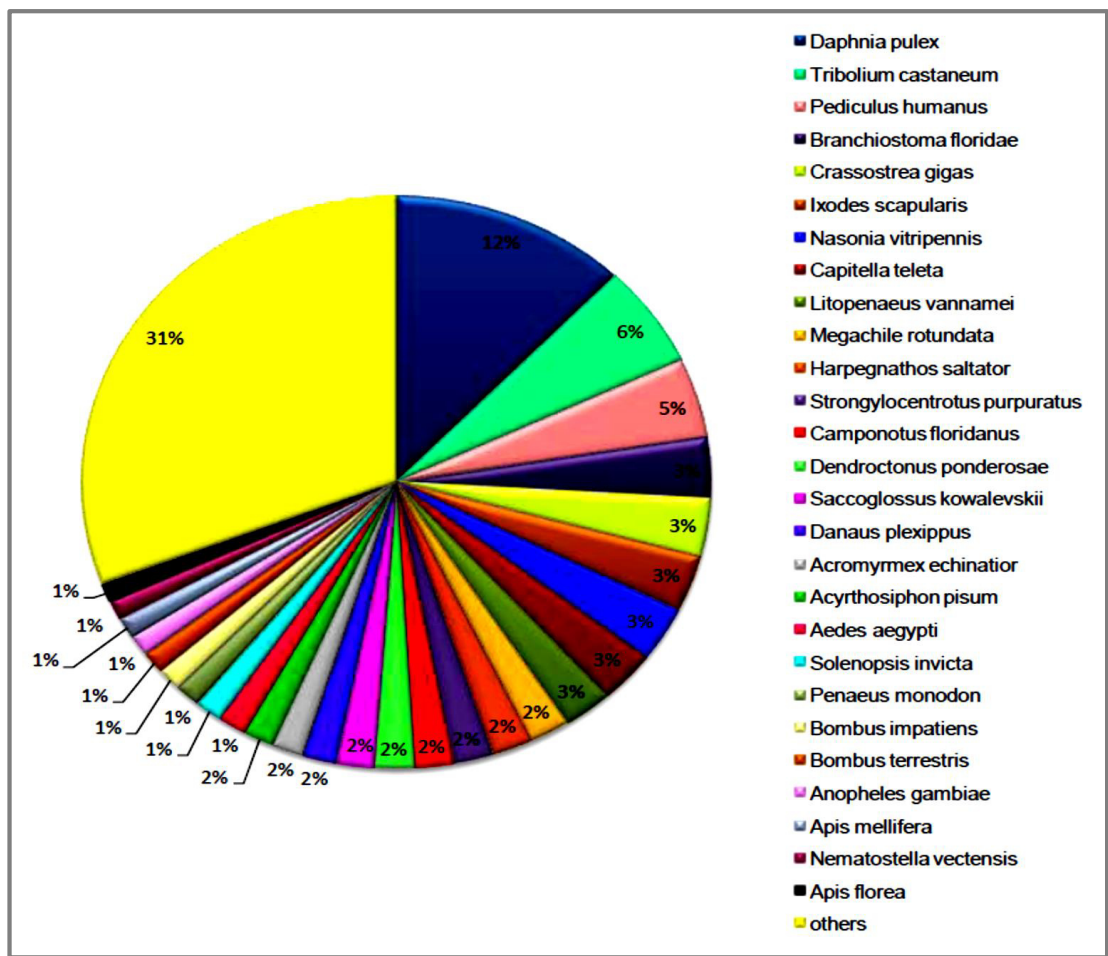


Figura 21 Distribución de especies de los resultados del Blast2GO de los transcriptomas (T1 y T2).

#### 7.5.4.2 Anotación de rutas metabólicas (KEGG)

Cuando los contigs fueron procesados en la base de datos KEGG para determinar las rutas metabólicas descritas y su función homóloga, se obtuvieron 560 y 558 rutas metabólicas representadas por nuestros transcriptomas (T1 y T2). Del total de contigs se pudieron ubicar el 26.02% y 23.37% de unigenes respectivamente para cada tratamiento (T1 y T2) en las diferentes rutas metabólicas (**Tabla 18**); obteniendo las 10 vías más representadas las cuales son: vías metabólicas (662 y 670 transcritos), biosíntesis de metabolitos secundarios (188 y 185 transcritos), biosíntesis de antibióticos (136 y 132 transcritos), ribosoma (120 y 119 transcritos), el metabolismo microbiano en diversos ambientes (116 y 116 transcritos), enfermedad de Huntington (105 y 104 transcritos), endocitosis (102 y 102 transcritos), espliceosoma (101 y 100 transcritos), transporte de ARN (97 y 98 transcritos), fosforilación oxidativa (96 y 96 transcritos) respectivamente para cada tratamiento (T1 y T2). Comparado con el estudio de Zeng *et al.* (2013), quien realizó dos análisis trascipcionales en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, para identificar los genes implicados en la respuesta a la infección por TSV (virus del síndrome de Taura); y genes en hepatopáncreas de camarones no infectados (control). Obteniendo en el ensamblaje de *nov* 15004 unigenes totales de las dos condiciones, los cuales fueron anotados en el KEGG encontrando 174 rutas metabólicas asignadas a sus transcritos; obteniendo las 10 vías más representadas: vías metabólicas (1762 transcritos), fagosoma (1035 transcritos), adhesión focal (815 transcritos), unión estrecha (779 transcritos), unión adherente (768 transcritos), biosíntesis de metabolitos secundarios (624 transcritos), lisosoma (374 transcritos), ribosoma (320 transcritos), fosforilación oxidativa (267 transcritos) y metabolismo de tirosina (217 transcritos). Si comparamos las 10 vías más representadas de nuestro estudio con este anterior, tenemos en común la vía metabólica, biosíntesis de metabolitos secundarios y fosforilación oxidativa.

**Tabla 18 Información de la anotación de los transcriptomas completos en la base de datos KEGG PATHWAY**

Anotación funcional de los transcriptomas T1 y T2		
<b>Total de transcritos anotación en base de datos KEGG</b>	<b>T1 DC</b>	<b>T2 DC + ULVA</b>
	9,649 (26.02%)	8,655 (23.37%)
<b>Total de transcritos en las 10 rutas más representadas</b>	<b>T1 DC</b>	<b>T2 DC + ULVA</b>
ko01100 vías metabólicas	662	670

ko01110 Biosíntesis de metabolitos secundarios	188	185
ko01130 Biosíntesis de antibióticos	136	132
ko03010 Ribosoma	120	119
ko01120 Metabolismo microbiano en diversos ambientes	116	116
ko05016 Enfermedad de Huntington	105	104
ko04144 Endocitosis	102	102
ko03040 Espliceosoma	101	100
ko03013 Transporte ARN	97	98
ko00190 Fosforilación oxidativa	95	96

### 7.5.5 Expresión diferencial de transcritos usando el software Edge R

Para la expresión diferencial de genes utilizando el primer nivel de significancia como se indicó en material y métodos (ver punto 6.7.7), se obtuvieron 133 transcritos diferencialmente expresados y con el segundo nivel de significancia se obtuvieron 396 transcritos diferencialmente expresados, por tanto se decidió tomar los resultados de la significancia de  $\alpha=0.05$ , ya que fue con la que se obtuvo mejor cantidad de transcritos diferencialmente expresados. En la siguiente **Tabla 19** se muestra la lista de los 25 transcritos más sobre expresados de cada tratamiento (FPKM normalizado  $\geq 15$ ); encontrando en el T2 (comp5599\_c0\_seq1= 212.58) el transcrito con la mayor expresión génica de todos los transcritos diferencialmente expresados (FPKM normalizado = 212.58).

A diferencia de otros estudios donde realizaron análisis transcripcional para determinar transcritos diferencialmente expresados induciendo a las diferentes especies de crustáceos (*L. vannamei* y *Fenneropenaeus chinensis*) con virus del síndrome de la mancha blanca (Chen *et al.* 2013; Li *et al.* 2013) y con inducción al virus de síndrome de Taura (Zeng *et al.* 2013), donde se han obtenido alrededor de 1,300 genes con expresión diferencial, en nuestro estudio solo encontramos 396 genes, esto probablemente se debe a que el efector utilizado para inducir la expresión diferencial en nuestro estudio fue la complementación de la dieta con *Ulva*, por lo que los animales estaban siempre bajo las mismas condiciones (estrés, salud, nutricionales, etc.); mientras que en los estudios antes mencionados, el efector de cambios en la expresión de genes fue la infección con un virus,

lo cual obviamente es mucho más drástico, ya que provoca enormes diferencias entre animales sanos y enfermos.

En un estudio de nutrición genómica en *Apis mellifera* realizado por Alaux *et al.* (2011) donde se alimentó a abejas sanas e infectadas (con el acaro parásito Varroa), con una dieta a base de polen o una dieta sin polen (a base de azúcar), encuentran que el número de genes con expresión diferencial depende del efecto que se esté comparando ya que mientras un número similar de genes fueron sub y sobre regulado por la nutrición del polen en abejas sanas, en las abejas parasitadas se presenta un efecto inhibitorio importante en la expresión génica (3,789 genes sub regulados), pero solo 25 genes fueron sobre regulados. Comparado con nuestro estudio podemos observar una diferencia en la cantidad de transcritos diferencialmente expresados, debido a que los organismos de nuestro estudio, se eligieron completamente sanos libres de patógenos y de alguna lesión, para observar los cambios de expresión génica solo por la nutrición de Ulva.

Tarazona y colaboradores en el 2011, concluyen que si la profundidad de secuenciación es muy alta en las tecnologías de secuenciación de RNA, el análisis de expresión diferencial puede arrojar falsos positivos; mencionando que lo más importante es tener un equilibrio de profundidad de secuenciación entre las dos condiciones.

Haas y colaboradores (2013) mencionan que el software Trinity facilita el uso de la herramienta de edgeR para estudios de transcriptoma, ya que incluye pasos fáciles de seguir para aprovechar el software R y poder identificar transcritos diferencialmente expresados; el edgeR te genera las visualizaciones en formato PDF. Con el fin de comparar los niveles de expresión de diferentes transcripciones o genes a través de las muestras, edgeR lleva a cabo una adicional escala de normalización TMM (Trimmed Mean of M-values) que tiene como objetivo explicar las diferencias en la producción de ARN celular total en todas las muestras. Otros autores mencionan que en las librerías de ADNc normalizadas, encontraron una eficacia mucho más alta del descubrimiento de genes en comparación con las librerías de ADNc no normalizadas, en estudios de RNA-Seq. También mencionan que en las librerías normalizadas son más eficaces para encontrar



marcadores de microsatélites. Además demuestran que el ADNc normalizado puede ser utilizado en la caracterización de la variación de expresión debido a una correlación entre el número relativo de lecturas por gen, en los contigs de las librerías normalizadas y no normalizadas. Concluyendo que las librerías de ADNc normalizadas son preferibles para muchas aplicaciones de RNA-Seq y que estos también pueden ser utilizados en estudios de expresión cuantitativa de genes (Hale *et al.* 2009; Ewen-Campen *et al.* 2011; Ekblom *et al.* 2012).

**Tabla 19 Los 25 transcritos más sobre expresados diferencialmente de cada tratamiento (T1 y T2) con significancia 0.05.**

No. Contig	T1 FPKM Norm.	No. Contig	T2 FPKM Norm.
comp8719_c0_seq1	107.26	comp5599_c0_seq1	212.58
comp6864_c0_seq1	70.39	comp6864_c0_seq4	62.18
comp8223_c0_seq1	56.32	comp10290_c0_seq1	53.92
comp9717_c0_seq7	49.61	comp11173_c0_seq1	41
comp10789_c0_seq2	45.32	comp7481_c0_seq1	34.97
comp9845_c0_seq1	45.28	comp10789_c0_seq4	34.72
comp11090_c0_seq4	44.64	comp11140_c0_seq3	31.73
comp5599_c0_seq1	37.59	comp10290_c0_seq4	28.13
comp11170_c0_seq3	35.88	comp11052_c0_seq3	26.36
comp10765_c0_seq2	33.52	comp8535_c0_seq2	25.87
comp11173_c0_seq2	32.94	comp11114_c1_seq15	24.98
comp10001_c0_seq9	32.36	comp9717_c0_seq4	24.78
comp10794_c0_seq3	28.2	comp7209_c0_seq3	22.47
comp9626_c0_seq1	27.98	comp9717_c0_seq10	22.24
comp10923_c0_seq2	25.97	comp5733_c0_seq2	21.62
comp10406_c0_seq2	24.27	comp30800_c0_seq1	21.21
comp8673_c0_seq3	24.26	comp9621_c0_seq1	18.53
comp11046_c0_seq3	23.31	comp7481_c0_seq2	18.21
comp9641_c0_seq1	21.91	comp10793_c1_seq2	17.99
comp8384_c0_seq5	21.07	comp10944_c0_seq7	17.64
comp10954_c0_seq2	20.74	comp10001_c0_seq4	17.5
comp9717_c0_seq2	20.33	comp10455_c0_seq2	16.36
comp11079_c0_seq2	19.34	comp7585_c0_seq1	16.18
comp11176_c0_seq13	19.12	comp10915_c0_seq2	15.91
comp10966_c0_seq15	18.83	comp8693_c2_seq2	15.42

### **7.5.6 Análisis de anotación funcional con Blast2GO y de dominio funcional (InterPro Protein) de los genes diferencialmente expresados.**

Se realizaron estos análisis para explorar qué componentes funcionales están regulados por la alimentación con el alga. Para la anotación funcional, todos los unigenes diferencialmente expresados fueron anotados usando el programa Blast2GO (Blastx Nr, InterPro Protein, GO) con un valor de E de  $10^{-5}$ . De todos los genes con expresión diferencia, 87.4% se anotaron en BLASTx, 71.7% por GO, 80.5% por InterPro Protein; dando en promedio un total de 87% de genes anotados, sin embargo, un 13% presento una homología de secuencia baja con las secuencias ya conocidas en bases de datos públicas. Lo observado concuerda con lo reportado anteriormente por Zeng *et al.*, (2013), quienes realizaron análisis transcripcional en camarones de la especie *L. vannamei* infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca y camarones no infectados: reportan un total de 1206 unigenes diferencialmente expresados y lograron anotar el 80.6% por NR y 819 (54,7%) con Blast Nt, 840 (56,1%) con UniProtKB/Swiss-Prot, 534 (35,7%) con GO y 758 (50,7%) COG.

### **7.5.7 Anotación de los transcritos diferencialmente expresados en KEGG**

Los 396 transcritos diferencialmente expresados se homologaron con la base de datos de KEGG PATHWAY (Kanehisa *et al.*, 2008). Las 15 vías mejor representadas se muestran en la (Tabla 20) y algunas de ellas en la (Figura 22). La distribución de transcritos sobre y sub expresados entre los dos tratamientos es diferente. El T1 presenta la mayor cantidad de transcritos sobre expresados en las rutas de vías metabólicas, biosíntesis de metabolitos secundarios y metabolismo de glicerofosfolípidos, mientras el T2 los transcritos sobre-expresados se encuentran en las rutas de transporte del ARN, espliceosoma y lisosoma. Por otro lado, en lo que respecta a los transcritos sub expresados se encuentran mayor representados en las rutas transporte del ARN, espliceosoma y lisosoma para el T1 y en las rutas vías metabólicas, biosíntesis de metabolitos secundarios y metabolismo de glicerofosfolípidos para el T2. Con respecto a los resultados obtenidos para T1 donde se representaron más los transcritos sobre expresados al contrario del T2, estos datos indicaron cambios del estado fisiológico del camarón durante el consumo de *Ulva clathrata*.

Tabla 20 KEGG PATHWAY Las 15 rutas metabólicas más representadas de los genes diferencialmente expresados entre los dos tratamientos (T1 y T2).

Código y nombre de ruta metabólica
ko01100 Rutas Metabólicas
ko01110 Biosíntesis de metabolitos secundarios
ko03013 Transporte de ARN
ko03040 Espliceosoma
ko05200 Vías en cáncer
ko01120 Metabolismo microbiano en diversos ambientes
ko00564 Metabolismo de Glicerofosfolipidos
ko05206 Micromas en cáncer
ko04972 Secreción Pancreática
ko00561 Metabolismo de Glicerolipidos
ko04142 Lisosoma
ko05164 Influenza A
ko01200 Metabolismo del Carbón
ko00565 Metabolismo de lípidos éter
ko00520 Amino azúcar y el metabolismo del azúcar nucleótido

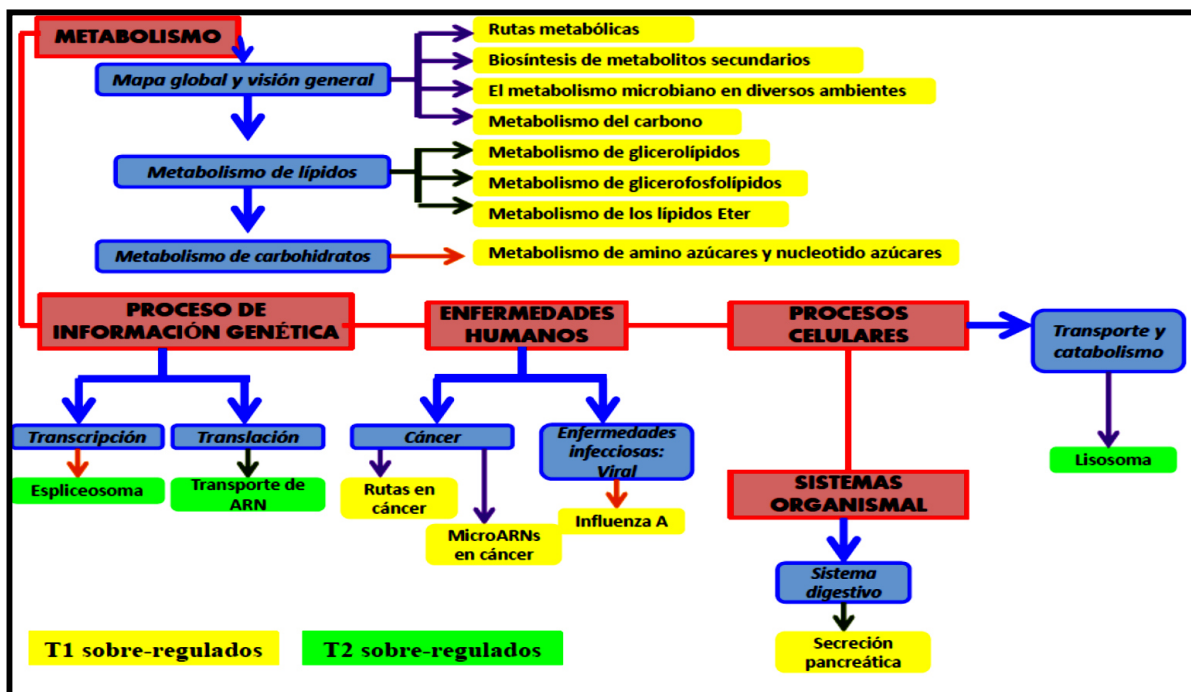


Figura 22 KEGG PATHWAY rutas metabólicas más representadas de los genes diferencialmente expresados entre los dos tratamientos (T1 y T2).

Comparado con la investigación de nutrigenómica realizada por Zou *et al.* (2013), quienes realizaron dos análisis transcripcional con la especie *Arma chinensis*, bajo un régimen de dieta artificial y otro con una dieta con fuente de alimento natural a base de pupas de la polilla de seda del roble chino; observaron que las vías más representadas fueron las vías metabólicas (891, 15.16%), las vías cáncergenicas (215, 3.66%), la regulación de la citoesqueleto de actina (201, 3.42%), la adhesión focal (178, 3.03%), la gripe A (166, 2.82%), el transporte de ARN (157, 2.67%), la endocitosis (156, 2.65%), el procesamiento de la proteína en el retículo endoplasmático (150, 2.55%), la proteólisis mediada por ubiquitina (150, 2.55%) y la interacción del receptor ligando neuroactivo (144, 2.45%). En nuestros resultados obtenemos que en las rutas de vías metabólicas y la del transporte de ARN, las tenemos sobre-expresados en el tratamiento T2 cuando consumieron los camarones *Ulva clathrata*; lo cual nos indica que hubo una mejor transportación del ARN desde el núcleo hasta el citoplasma y esto es fundamental para la expresión génica.

#### ***7.5.8 Rutas metabólicas relacionadas en el metabolismo de lípidos y en la respuesta inmune en *L. vannamei****

En la **Tabla 21**, se muestra la lista de las rutas metabólicas relacionadas con metabolismo de lípidos y de respuesta inmune de los genes sub y sobre expresados según el análisis de KEGG PATHWAY. Para el caso de las rutas metabólicas asociadas al **metabolismo de lípidos** que fueron modificadas, tenemos las siguientes: la ruta de metabolismo del ácido linoléico, la de metabolismo del ácido alfa-linoléico, la de metabolismo de los lípidos éter, la de metabolismo del ácido araquidónico, la de biosíntesis de ácidos grasos, la de biosíntesis de ácidos grasos insaturados, la de biosíntesis de glicosfingolípidos, la de degradación de ácidos grasos y la de absorción, y digestión de grasa (**Figura 23**).

Los resultados observados en el presente estudio confirman el efecto de *U. clathrata* en el camarón *L. vannamei* a nivel molecular, sobre el metabolismo de lípidos concordando con estudios reportados anteriormente en los que se demuestran que en diversas especies de peces y animales terrestres la suplementación del alimento con

diferentes especies de macroalgas tiene un efecto en la composición lipídica. En un estudio realizado por Carrillo-Domínguez *et al.* (2008) reportan que la inclusión de 10% de *Macrocystis pyrifera* en alimentos para gallinas ponedoras incrementó el contenido de  $\eta$ -3 en huevo, la inclusión de *Sargassum sinicola* y *Enteromorpha sp.* no produjeron los mismos resultados. en gallinas ponedoras con el objetivo de observar la composición lipídica de los huevos, incorporando en cada dieta el 10% de inclusión de cada macroalga *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum sinicola* y *Enteromorpha sp.*, los resultados mostraron que la incorporación de 10% *M. pyrifera* en las dietas es un eficaz manera de aumentar el contenido de ácidos grasos de n-3. Ergün *et al.* (2008), realizaron un ensayo de nutrición en tilapia juvenil del Nilo, *Oreochromis niloticus* con dos dietas una baja y otra alta en lípidos, suplementando ambas dietas con el 5% de la inclusión de harina de *Ulva rigida* en cada una, con la finalidad de observar los efectos de los niveles de lípidos en la dieta, cambios en el crecimiento, la eficiencia alimenticia, la utilización de nutrientes y la composición corporal, donde los resultados indican que la inclusión de harina de *Ulva rigida* en ambos niveles de lípidos en la dieta mejora el rendimiento del crecimiento, la eficiencia de la alimentación, la utilización de nutrientes, y la composición corporal lipídica de la tilapia del Nilo.

Kim y colaboradores (2010), cultivaron una línea celular de adipocitos 3T3-L1 durante 8 días con un tratamiento con fucoïdan (polisacárido extraído del alga *Fucus vesiculosus*) a 50, 100, 200 $\mu$ g/ml y un tratamiento control sin fucoïdan, demostrando a los 2 días en todos los tratamientos con fucoïdan la inhibición de la adipogénesis ya que suprime la diferenciación de adipocitos y la expresión de factores de transcripción adipogénicos como el C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y AP2, a través de la supresión de la diferenciación de adipocitos e inhibición de la expresión de factores de transcripción adipogénicos, tales como  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ),  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y AP2. Así mismo, en ratas se ha demostrado que la inclusión a la dieta de *Ulva linza* y *L. trabeculata* reduce significativamente el contenido de grasa intra-abdominal tanto cuando fue suministrada a animales sanos y diagnosticados con síndrome metabólico.

Seo y colaboradores (2013), realizaron un estudio *in vitro* en células 3T3-L1 con un extracto etanólico al 80% de la macroalga *G. lanceolata*, donde evaluaron durante 2 días la acumulación de lípidos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), examinando factores de transcripción adipogénicos y genes reguladores de ROS a nivel molecular. El tratamiento con el extracto de *G. lanceolata* condujo una reducción en los niveles de transcripción de los ARNm de los factores adipogénicos que son necesarios para inducir la adipogénesis, así mismo incrementa la transcripción de los ARNm de las enzimas de exploración del ROS incluyendo superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, y catalasa.

Ramirez-Higuera y colaboradores (2014), evaluaron el efecto antihipertensivo y antioxidante de las algas marinas (*Ulva linza* y *Lessonia trabeculata*). Se administraron algas a 400 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal durante 8 semanas a ratas Wistar sanas como grupo control y en ratas con síndrome metabólico, las cuales fueron alimentadas con una dieta hipercalórica, demostrando que la inclusión de ambas algas marinas a la dieta reduce significativamente el contenido de grasa intra-abdominal, la presión arterial, la resistencia a la insulina, los niveles de colesterol y triglicéridos tanto en animales sanos como en animales con síndrome metabólico, encontrando que ambas algas disminuyen la expresión del gen SOD y GPx y aumentan la expresión del gen CAT en el grupo control y que ambas algas reducen la expresión del gen CAT en animales con síndrome metabólico.

En lo que respecta a las rutas metabólicas asociadas a **respuesta inmune**, las que se encontraron modificadas en el presente estudio fueron las siguientes: apoptosis, la vía de las MAP quinasas (MAPK), ruta de señalización TOLL, melanogénesis, metabolismo del fármaco-citocromo P450, células asesinas naturales (NK), vía de señalización TNF (**Figura 24**). Varios estudios reportan que la suplementación dietaria de harina de algas o sus extractos pueden mejorar la respuesta inmune, la resistencia y la supervivencia cuando los camarones desafiados con algunas bacterias o virus debido a la presencia de algunos compuestos con capacidad inmunoestimulante, tales como fucoidan, alginatos, laminarinas, carragenanos, entre otros (Selvin *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2008). En otro estudio *in vitro*, se usó la fracción soluble en agua de un extracto en metanol de *Ulva*

*lactuca*, a una concentración de 140µg/mL y se encontró que podía inhibir el 50% del crecimiento de la línea celular de leucemia humana U937, mientras que el crecimiento de esplenocitos fue estimulado a una concentración de 100mg/ml lo que indica que *Ulva lactuca* puede ser útil como un antitumoral natural y agente inmunoestimulante (Lee *et al.*, 2004).

Por otro lado, Deachamag *et al.* (2006), utilizando PCR real time, demuestran un incremento significativo en la expresión del gen de una proteína ribosomal L26 (RPL26) que actúa como activador de macrófagos, después de inyectar intramuscularmente a camarones *P. japonicus* con *Vibrio harveyi* inactivado, o con WSSV inactivado con formalina, o con fucoïdan de *S. polycystum*, e indican que la máxima expresión del gen se da a las 72 horas, una semana y dos semanas respectivamente para cada tratamiento después de la inmunoestimulación.

Peña-Rodríguez y colaboradores (2011), realizaron un bioensayo con camarones de la especie *L. vannamei* alimentados con alimento artificial y camarones alimentados con alimento artificial más *U. clathrata* fresca; para determinar la expresión diferencial de genes utilizando microarreglos con un número de 292 genes de camarón. Del total de 292 genes que contenía la laminilla, 155 fueron detectados (expresados), de los cuales 46 presentaron una expresión diferencial entre los tratamientos. De los elementos determinados con una expresión diferencial, 22 fueron sobre estimulados mientras que 24 fueron reprimidos en los camarones alimentados con alimento artificial y *U. clathrata* fresca. Los genes de las proteínas de “ATPase sub 6”, “Cytochrome P450” y “Acyl-CoA-Binding Protein” fueron los genes significativamente más sobre-expresados, mientras que los diferentes clones de las proteínas “Crustin” y la “Diphenol Oxidase A2” resultaron en los más significativamente reprimidos.

Kim y colaboradores (2011) realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* de la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos sulfatados del alga *Enteromorpha prolifera* y encuentran que dos de sus fracciones (F2 y 3, ya que se obtuvieron 3 fracciones por intercambio iónico), estimularon la proliferación de la línea celular de macrófagos Raw

264.7, e indican que esta inducción se dio a través de una considerable sobre regulación en la expresión de los ARNm del óxido nítrico y varias citoquinas. Los resultados *in vivo* muestran que los polisacáridos sulfatados (las fracciones de crudo y F2) aumentaron significativamente la proliferación de esplenocitos inducidos por Con A (un tipo de macrófagos) y la secreción de interferón gamma e interleucina-2 (un tipo de citoquinas producidas por los linfocitos T y natural killer), lo que significa según los autores que la fracción F2, puede activar las células T mediante la sobre-regulación de la respuesta de los linfocitos Th-1.

Las diferentes investigaciones mencionadas en los párrafos anteriores, demuestran que el uso de ingredientes funcionales en la acuicultura marina, como los polisacáridos derivados de diferentes algas marinas, brinda una mejoría en el metabolismo de lípidos y del sistema inmunológico a los organismos en cultivo, a nivel *in vivo* e *in vitro*.

En nuestro estudio, se logró obtener la identificación de los genes y/o las rutas metabólicas de lípidos y de respuesta inmune que modifica el consumo *Ulva* en el metabolismo de los camarones; de las rutas del metabolismo de lípidos, los genes presentes en la mayoría de las rutas y que además obtuvieron expresión diferencial fueron: el gen de la fosfolipasa secretoria A2 (sPLA2), acetil-CoA oxidasa y etanolamina fosfotransferasa. La fosfolipasa secretoria A2 ha demostrado en algunos estudios que modifica la ruta de metabolismo de lípidos y de respuesta inmune, tal como lo menciona Boilard *et al.* (2010), esta cataliza la liberación de ácido araquidónico para la generación de mediadores lipídicos de la inflamación y es crucial en diversos procesos inflamatorios. Por otro lado, al igual que en el estudio anteriormente mencionado de Peña-Rodríguez *et al.* (2011) quienes encontraron mediante un microarreglo la sobre expresión del gen acetil-CoA nosotros encontramos la sobreexpresión de este mismo gen utilizando la tecnología RNA-seq lo que demuestra en los camarones alimentados con *Ulva clathrata*, modifica el metabolismo de lípidos, ya que esta enzima participa en varias de las rutas metabólicas que encontramos modificadas.

De las rutas de respuesta inmune, los genes presentes en la mayoría de las rutas y que además obtuvieron expresión diferencial fueron: MAPK quinasa 1 y



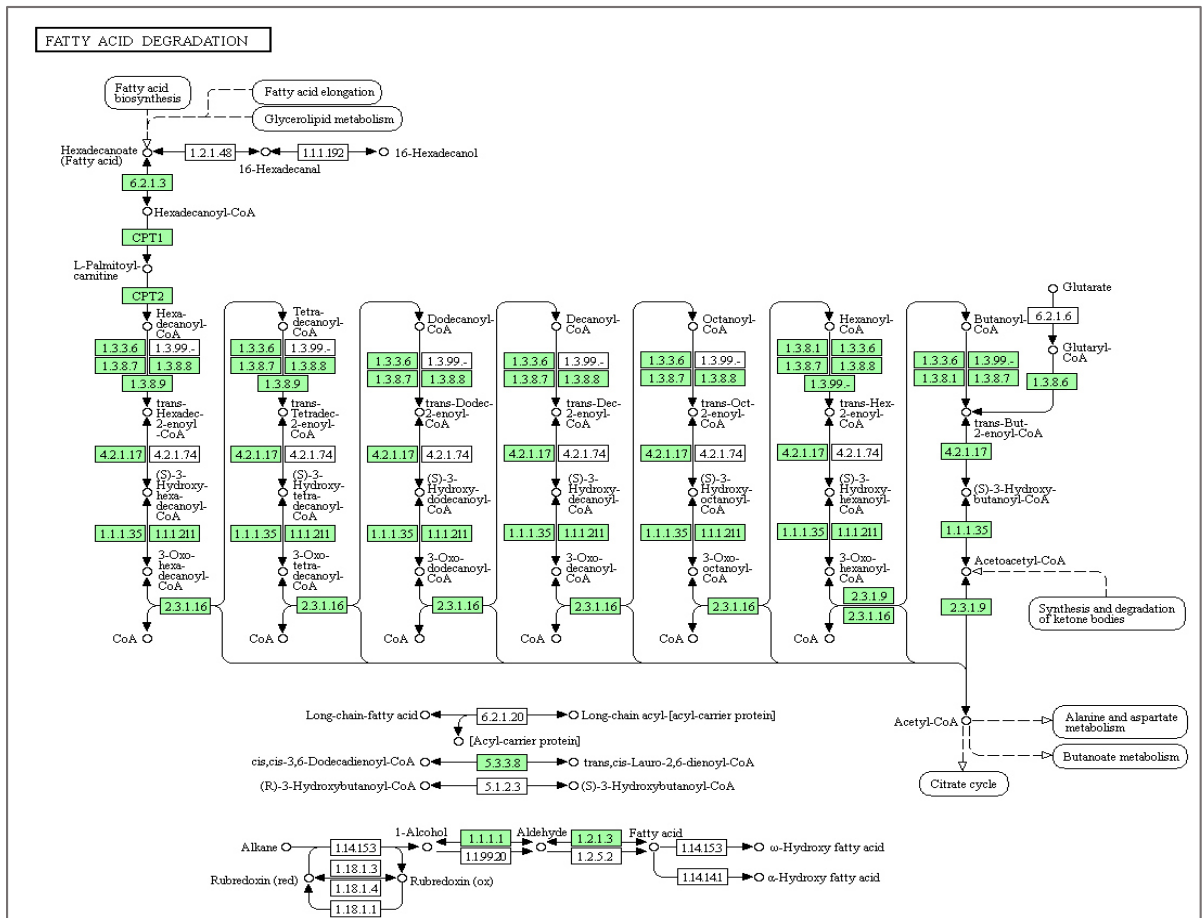
glucuronosiltransferasa. Desde hace algunos años se conoce uno de los mecanismos de defensa mejor caracterizado en crustáceos, es el sistema fenoloxidasa, éste es activado por componentes de pared celular microbiana como lipopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos y b 1-3 glucanos (zimosan); sin embargo, también existen estudios en donde han demostrado que *Ulva clathrata* tiene efecto antiviral contra virus envueltos de ADN, debido a su contenido de polisacáridos sulfatados Toda esta información confirma las modificaciones obtenidas en los camarones a nivel genómico por la macroalga *Ulva*, debido a que en nuestros resultados el gen presente en las rutas de respuesta inmune de nuestros resultados fue el MAPK quinasa 1, y hay estudios donde demuestran que la participación a nivel molecular de las MAP quinastas, se da en procesos de apoptosis, de transcripción, traducción y síntesis de ácidos nucleicos, en la dinámica del citoesqueleto y en la respuesta inmune Yang *et al.* (2003).

Los resultados de este estudio serán de gran valor para la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la mejora del sistema inmune del camarón, así como en la deposición y movimiento de diferentes tipos de lípidos en los tejidos de los camarones alimentados con *Ulva*.

**Tabla 21 Genes involucrados en respuesta inmune y metabolismo de lípidos de *L. vannamei*.**

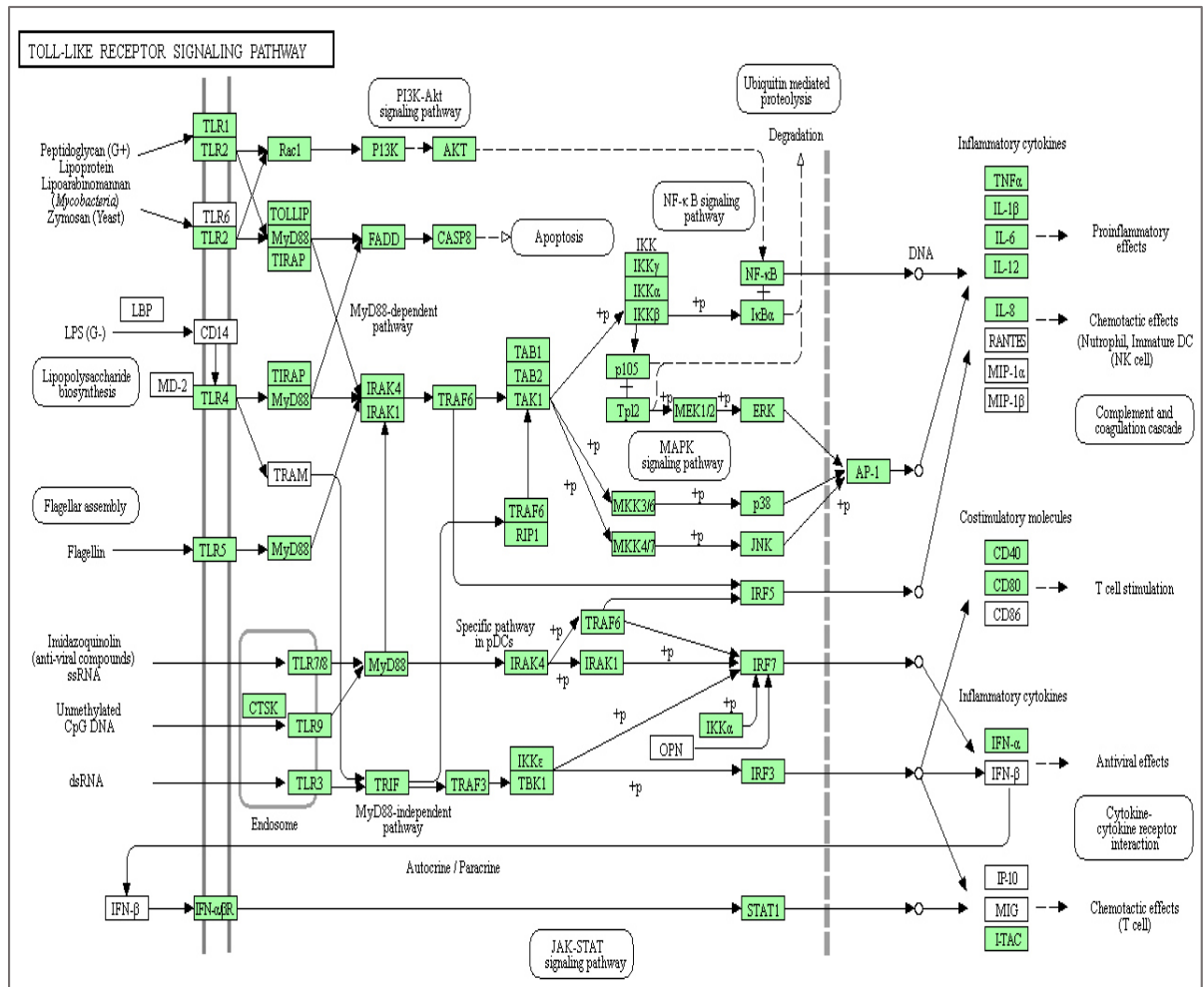
Categoría o gen ID	Función homóloga
Metabolismo lípidos Eter	
comp8505_c0_seq1	Etanolaminafosfotransferasa
comp5464_c0_seq1	fosfolipasa secretoria A2
comp10353_c0_seq12	factor acetilhidrolasa activador de plaquetas
comp10841_c0_seq3	fosfolipasa D1/2
Absorción y digestión de grasa	
comp5464_c0_seq1	fosfolipasa secretoria A2
comp8774_c0_seq2	triacilglicerol lipasa pancreática
comp8223_c0_seq1	pancreático proteína relacionada con la lipasa-2
Metabolismo Glicerofosfolípidos	
comp8026_c0_seq1	glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (NAD+)
comp5501_c0_seq1	glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa ½
comp8505_c0_seq1	Etanolaminafosfotransferasa
comp5464_c0_seq1	fosfolipasa secretoria A2
comp10841_c0_seq3	fosfolipasa D1/2
comp11062_c0_seq1	lisofosfolipasa III

Degradación de ácidos grasos	
<b>comp11173_c0_seq2</b>	aldehído dehidrogenasa (NAD+)
<b>comp11057_c0_seq2</b>	acil-CoA oxidasa
Metabolismo de Alfa-Linolenico	
<b>comp11057_c0_seq2</b>	acil-CoA oxidasa
<b>comp5464_c0_seq1</b>	fosfolipasa secretoria A2
Biosíntesis de ácidos grasos	
<b>comp45386_c0_seq1</b>	sintasa de ácidos grasos, tipo de animal
Metabolismo de ácido linoléico	
<b>comp5464_c0_seq1</b>	fosfolipasa secretoria A2
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	
<b>comp11057_c0_seq2</b>	acil-CoA oxidasa
Metabolismo de ácido araquidónico	
<b>comp5464_c0_seq1</b>	fosfolipasa secretoria A2
Vía de señalización del receptor de tipo Toll	
<b>comp9997_c0_seq1</b>	MAPK quinasa 1
Apoptosis	
<b>comp10789_c0_seq4</b>	proteína baculoviral repetición IAP contiene 2/3
Ruta de señalización MAPK	
<b>comp9997_c0_seq1</b>	MAPK quinasa 1
Melanogénesis	
<b>comp9997_c0_seq1</b>	MAPK quinasa 1
<b>comp9273_c0_seq4</b>	proteína guanina nucleótido vinculante G (i) subunidad alfa
Metabolismo de Drogas- citocromo P450	
<b>comp10988_c0_seq1</b>	Glucuronosiltransferasa
Natural killer cell mediated cytotoxicity	
<b>comp9997_c0_seq1</b>	MAPK quinasa 1
Ruta de señalización TNF	
<b>comp9997_c0_seq1</b>	MAPK quinasa 1
<b>comp10789_c0_seq4</b>	proteína baculoviral repetición IAP contiene 2/3



**Figura 23 KEGG PATHWAY Rutas de metabolismo de lípidos modificadas por Ulva.**

Es el proceso en el que los ácidos grasos se descomponen en sus metabolitos, al final generando acetyl-CoA, la molécula de entrada para el ciclo del ácido cítrico, el principal suministro de energía de los animales. Incluye tres pasos principales: Lipólisis y liberación del tejido adiposo, Activación y transporte en las mitocondrias y B-oxidación. Las de color verde fueron modificadas por Ulva.



**Figura 24 KEGG PATHWAY Rutas de sistema inmune modificadas por Ulva**

Los receptores Toll-like (TLR) son receptores ligados a la membrana identificados como homólogos de Toll en crustáceos. Las vías de señalización de TLR se dividen en dos grupos: una vía dependiente de MyD88 que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias con activación rápida de NF- $\kappa$ B y MAPK, y una vía independiente de MyD88 asociada con la inducción de IFN-beta y genes inducibles por IFN y maduración de células dendríticas con activación lenta de NF- $\kappa$ B y MAPK. Las de color verde fueron activadas por Ulva.

### 7.5.9 Validación de la expresión diferencial por PCR cuantitativa (qPCR)

De la lista de los genes relacionados con el metabolismo de lípidos y de respuesta inmune que presentaron por bioinformática expresión diferencial (edgeR), se seleccionaron genes que no presentaran variantes del mismo gen (isotigs), ya que en el resultado de expresión (FPKM) con programas bioinformáticos, se cuantifican cada una de las variantes de un gen; mientras tanto en un análisis de qPCR solo se cuantifica la variante para la cual se diseñó su primer, por lo tanto, se tendrían que diseñar primers para cada una de las variantes (Mortazavi *et al.* 2008; Lee *et al.* 2013; Tsankov *et al.* 2015).

Una vez obtenidos los resultados del análisis de validación con qPCR, se utilizó el método anteriormente mencionado ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , ver material y método punto 6.8.3), se determinaron las expresiones relativas tomando la expresión del Tratamiento 2 (Ulva) receptor en relación con la expresión del Tratamiento 1 (control). Obteniendo una expresión relativa de 22.7 veces el cambio del gen de *ácido graso sintasa*, 1.3 veces el cambio del gen *dominio Sam y Hd que contiene la proteína 1*, 0.42 veces el cambio del gen *homólogo del factor 2 de unión al potenciador de la interleucina*; 0.60 veces el cambio del gen *familia soluto portador 7* (transportador de aminoácidos catiónicos), 0.47 veces el cambio del gen *factor activador de plaquetas acetilhidrolasa*, 0.54 veces el cambio del gen *serina palmitoil transferasa 1*, 0.49 veces el cambio del gen *factor de elongación 1 alfa* (**Tabla 23**). Al realizar la comparación del análisis de expresión relativa (qPCR), con el análisis de expresión en el programa bioinformático edgeR, los resultados confirman que efectivamente estos genes se sobre expresaron cuando consumieron Ulva (**Tabla 22**).

**Tabla 22 Lista de genes seleccionados para el panel de expresión génica qPCR**

Nombre del gen	FPKM	log2(FPKM)	$\Delta\Delta Ct$
dominio Sam y Hd dominio que contiene la proteína 1	3.23	1.69	1.30
homólogo del factor 2 de unión al potenciador de la interleucina	6.20	2.63	0.42
familia soluto portador 7	2.93	1.55	0.60
factor activador de plaquetas acetilhidrolasa	18.18	4.18	0.47
serina palmitoiltransferasa 1	5.27	2.40	0.54
ácido graso sintasa	212.58	7.73	22.70
factor de elongación 1 alfa	6.18	2.63	0.49

**Tabla 23 Análisis doble delta Ct**

Nombre del gen	$\Delta Ct$ (T2)	$\Delta Ct$ (T1)	Delta Delta Ct	Expresión veces el cambio
	$\Delta Ct$ T2	$\Delta Ct$ T1	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
factor de elongación 1 alfa	-3.333	-4.353	1.020	0.493
homólogo del factor 2 de unión al potenciador de la interleucina	-3.09	-4.35	1.26	0.42
factor activador de plaquetas acetilhidrolasa	-3.363	-4.446	1.083	0.472
dominio Sam y Hd dominio que contiene la proteína 1	1.026	1.435	-0.409	1.328
familia soluto portador 7	-2.281	-2.959	0.678	0.625
serina palmitoiltransferasa 1	-3.564	-4.445	0.881	0.543
ácido graso sintasa	29.538	34.045	-4.507	22.735

## 8. CONCLUSION

Con el presente estudio se concluye que:

1. Este se considera el primer trabajo a nivel molecular referente a nutrigenómica relacionado con el consumo de algas marinas por *L. vannamei*.
2. No se presentaron diferencias entre los dos tratamientos en ninguno de los parámetros zootécnicos evaluados lo cual indica que los resultados de expresión de genes fueron debido al consumo del alga y no están sesgados por la cantidad de alimento consumido y que solo el consumo de *Ulva* en un tiempo muy corto (21 días) modificara su transcriptoma.
3. La mejor plataforma de secuenciación masiva para el transcriptoma diferencial de *L. vannamei* inducido por el consumo o no de *Ulva clathrata*, fue la plataforma Illumina utilizando el secuenciador MiSeq el cual generó 3,855,180 lecturas para T1 y 2,736,675 para T2 después de pasar los filtros. Las plataformas de Roche (tanto en el pirosecuenciador GS Flex 454 como en el pirosecuenciador GS Junior) arrojaron para T1: 485,232 y T2: 955,122 lecturas crudas después de pasar los filtros las cuales representan un 12.8% y 34.9% respectivamente para cada tratamiento, debido a un mal funcionamiento de los equipos.
4. Las bases de datos usadas en el presente estudio permitieron determinar la ontología de cada transcrito o unigen los cuales se alinearon con genes de artrópodos lo que corrobora un buen ensamblaje, la mayoría de los unigenes son similares a los de *Daphnia pulex* (12%), *Tribolium castaneum* (6%), *Pediculus humanus* (5%), *Branchiostoma floridae* (3%), *Crassostrea gigas* (3%), *Ixodes scapularis* (3%), *Nasonia vitripennis* (3%), *Capitella teleta* (3%), seguido de *Litopenaeus vannamei* (3%).
5. Se detectaron genes expresados diferencialmente entre ambas condiciones nutricionales (396 transcritos) y el 87% fueron anotados con las diferentes bases de datos, se identificaron las rutas metabólicas en las que participan cada unigen y

se encontró que la mayoría de ellos se encontraron en las rutas de respuesta inmune, metabolismo de lípidos, respuesta al estrés y estímulo y la ruta de los procesos de oxidación-reducción. Los genes identificados y / o las rutas metabólicas descritas sugieren que el consumo de Ulva modificó los mecanismos moleculares involucrados en el sistema inmune del camarón, así como en la deposición y el movimiento de diferentes clases de lípidos en los tejidos del camarón.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Conte YL. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on health and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* 12: 496–508. doi:10.1186/1471-2164-12-496.
- Alvírez-Morales, AA, BE González-Martínez y Z Jiménez-Salas. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 3 (3). [http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos\\_funcionales.html](http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos_funcionales.html)
- AOAC. (1990). *Official Methods of analysis*, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Au KF, Underwood JG, Lee L, Wong WH. (2012). Improving PacBio Long Read Accuracy by Short Read Alignment. *PLoS One* 7:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0046679
- Awang AN, Ng JL, Matanjun P. (2013). Anti-obesity property of the brown seaweed, *Sargassum polycystum* using an in vivo animal model. *Journal of Applied Phycology* 26(2):1043. doi: 10.1007/s10811-013-0149-6
- Bahar B, O'Doherty J V., Hayes M, Sweeney T. (2012). Extracts of brown seaweeds can attenuate the bacterial lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in the porcine colon ex vivo. *J Anim Sci* 90:46–48. doi: 10.2527/jas.53944
- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falque E and Dominguez H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem* 138, 1764-1785. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Bae SJ, Choi YH. (2007) Methanol extract of the seaweed *Gloiopeltis furcata* induces G2/M arrest and inhibits cyclooxygenase-2 activity in human hepatocarcinoma HepG2 cells. *Phytotherapy Research* 21, 52-57
- Banerjee K, Mitra A, Mondal K. (2010). Cost-effective and eco-friendly shrimp feed from red seaweed *Catenella repens* (Gigartinales: Rhodophyta). *Curr Biot* 4:23–43.
- Blüthgen N, Brand K, Cajavec B, Swat M, Herzel H. (2005). Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome Inform* 16: 106–115.
- Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioka, D., & Thornhill, T. S. (2010). A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO molecular medicine*, 2(5), 172-187.



- Briggs MRP, Funge-Smith SL. (1996). The potential of *Gracilaria* spp. meal for supplementation of diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Fish. Manage* 27(5):345-354. Bula-Meyer,
- Brockman W, Alvarez P, Young S, Garber M, Giannoukos G, Lee WL, Russ C, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB. (2008). Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Res.* 2008, 18 (5): 763-770. 10.1101/gr.070227.107.
- Burr G, Gatlin D, Ricke S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *J World Aquac Soc* 36:425–436. doi: 10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.
- Callaghan TR, Degnan BM, Sellars MJ. (2010). Expression of sex and reproduction-related genes in *Marsupenaeus japonicus*. *Mar Biotechnol* (NY) 12:664–77. doi: 10.1007/s10126-009-9254-6
- Carrillo Domínguez, S., E. López, M.M. Casas Valdez, E. Avila, R.M. Castillo, M.E. Carranco, E. Calvo & F. Pérez-Gil. (2008). Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. *Journal of Applied Phycology*, 20(5): 721-728. DOI: 10.1007/s10811-008-93334-4
- Casas-Valdez M, Portillo-Clark G, Águila-Ramírez N, Rodríguez-Astudillo S, Sánchez-Rodríguez I, Carrillo-Domínguez S. (2006). Efecto del alga marina *Sargassum* spp. sobre las variables productivas y la concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Rev Biol Mar Oceanogr* 41:97 –105
- Castro R, MC Piazzon, I Zarra, J Leiro, M Noya & J Llamas. (2006). Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture* 254: 9-20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.012
- Cerenius L, Söderhäll K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198:116–126. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Cheng A-C, Chen Y-Y, Chen J-C. (2008). Dietary administration of sodium alginate and kappa-carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Vet Immunol Immunopathol* 121:206–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.09.011
- Cheng W, Liu C-H, Tsai C-H, Chen J-C. (2005). Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 18:297–310. doi: 10.1016/j.fsi.2004.08.002

- CONAPESCA (2013). Seguimiento Mensual de la Producción de Camarón Enero - Junio (2013/p). In: Com. Nac. Acuicultura y Pesca, Secr. Agric. Ganad. Desarro. Rural Pesca y Aliment. [http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/seguimiento\\_mensual\\_de\\_la\\_produccion\\_de\\_camaron\\_20](http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/seguimiento_mensual_de_la_produccion_de_camaron_20)
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 17:13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8
- Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Guajardo-Barbosa C. (2000). Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. En: Cruz- Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Cerecedo-Olvera R (eds). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Quinto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* pp. 227-266. Universidad Autonoma de Nuevo Leon. Nuevo León, México., Noviembre 19-22.
- Cruz-Suarez, L. E. ; Ricque-Marie, D. ; Tapia-Salazar, M. ; McCallum, I. M. ; Hickling, D. (2001). Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196 (1-2): 87-104
- Cruz-Suarez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-Lopez MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. (2009<sup>a</sup>). Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition* 15:421-430.
- Cruz-Suarez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Ricque-Marie D. (2009<sup>b</sup>). Use of seaweeds for shrimp nutrition: Status and potential. In: Browdy CL, Jory D (eds) *The Rising Tide, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming, World Aquaculture 2009*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana USA., pp 131–147
- Cruz-Suárez LE, León A, Peña-Rodríguez A. (2010). Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301:64–68. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.01.021
- Deachamag P, Intaraphad U, Phongdara A, Chotigeat W. (2006). Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture* 255:165 – 172. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.01.010

- De la Vega, Enrique, Michael R. Hall, Kate J. Wilson, Antonio Reverter, Rick G. (2007). Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Woods and Bernard M. Degnan Physiol. Genomics 31:126-138, 2007. First published 12 June 2007; doi:10.1152/physiolgenomics.00068.2007
- Dhar, A.K., Dettori, A., Roux, M.M., Klimpel, K.R., Read, B. (2003). Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. Arch. Virol.
- Dillies MA, Rau A, Aubert J. (2013). A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. Brief Bioinform 14:671–683. doi: 10.1093/bib/bbs046
- Durazo-Beltrán E, Viana MT, D’Abramo LR, Toro-Vazquez JF. (2004). Effects of starvation and dietary lipid on the lipid and fatty acid composition of muscle tissue of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*). Aquaculture 238:329–341. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.03.025.
- Ekblom, R., Slate, J., Horsburgh, G. J., Birkhead, T., & Burke, T. (2012). Comparison between normalised and unnormalised 454-sequencing libraries for small-scale RNA-Seq studies. Comparative and functional genomics, 2012.
- Ergün S, Soyutürk M, Güroy B. (2008). Influence of Ulva meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. Aquac Int 17:355–361. doi: 10.1007/s10499-008-9207-5.
- Ewen-Campen, B., Shaner, N., Panfilio, K. A., Suzuki, Y., Roth, S., & Extavour, C. G. (2011). The maternal and early embryonic transcriptome of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. BMC genomics, 12(1), 1.
- Fagutao FF, Yasuie M, Caipang CM, Kondo H, Hirono I, Takahashi Y, Aoki T. (2008). Gene expression profile of hemocytes of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* following peptidoglycan stimulation. Marine Biotechnology 10:731-740
- F A O (2011). World aquaculture 2010. Fisheries and Aquaculture Resources Use and conservation division FAO fisheries and aquaculture department. <http://www.fao.org/docrep/014/ba0132e/ba0132e.pdf>
- Fu, Y. W., W. Y. Hou, S. T. Yeh, C. H. Li & J. C. Chen. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 17:41–51. doi: 10.1016/j.fsi.2006.08.014

- Ghaednia B, Mehrabi MR, Mirbakhsh M., Yeganeh V., Hoseinkhezri P., Garibi G., Ghaffar Jabbari A. (2011). Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences , Volume 10 , Number 4; Pages 616-630.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Res 36: 3420–3435. doi: 10.1093/nar/gkn176
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Regev, A. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. Nature Biotechnology, 29(7), 644–652. <http://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* , and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. Dev. Comp. Immunol. 25: 565-577
- Guo, H., Ye, C. X., Wang, A. L., Xian, J. A., Liao, S. A., Miao, Y. T., & Zhang, S. P. (2013). Transcriptome analysis of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to nitrite by RNA-seq. Fish & shellfish immunology, 35(6), 2008-2016.
- Gupta S, Abu-Ghannam N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends in Food Science and Technology, 22: 315-326. doi: 10.1016/j.tifs.2011.03.011
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from ARN-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat Protoc 8:1494–512. doi: 10.1038/nprot.2013.084
- Hafezieh M, Ajdari D, A AP, Hosseini SH. (2014). Using oman sea *Sargassum illicifolium* meal for feeding white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Iran J Fish Sci 13:73–80.
- Hale, M. C., McCormick, C. R., Jackson, J. R., & DeWoody, J. A. (2009). Next-generation pyrosequencing of gonad transcriptomes in the polyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): the relative merits of normalization and rarefaction in gene discovery. BMC genomics, 10(1), 1.
- Hansen KD, Wu Z, Irizarry R a, Leek JT. (2011). Sequencing technology does not eliminate biological variability. Nat Biotechnol 29:572–573. doi: 10.1038/nbt.1910.

- Heffernan N, Smyth TJ, Soler-Vill. (2014) Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *J Appl Phycol* 519–530. doi: 10.1007/s10811-014-0291-9.
- Hou W-Y, Chen J-C. (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 19:127–38. doi: 10.1016/j.fsi.2004.11.009
- Izzati M. (2011). The role of seaweeds *Sargassum polycistum* and *Gracilaria verrucosa* on growth performance and biomass production of tiger shrimp (*Penaeus Monodon Fabr*). *J Coast Dev* 14:235–241.
- Jang, Y. J., Kwon, S. O., Yeo, K. M., Hong, M. J., Kim, B. N. and Han, D. S. (2011). Anti-obesity effect of *Sargassum confusum* ethanol extract in obese rats. *Korean J Food Sci Technol* 43, 189-194.
- Jarvie T, Harkins T. (2008). 3K Long-Tag paired end sequencing with the genome sequencer FLX system. *Nat Methods* 5: 1–2.
- Jeon, H. J., Seo, M. J., Choi, H. S., Lee, O. H., & Lee, B. Y. (2014). *Gelidium elegans*, an edible red seaweed, and hesperidin inhibit lipid accumulation and production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in 3T3-L1 and RAW264. 7 Cells. *Phytotherapy Research*, 28(11), 1701-1709.
- Ju ZY, Forster IP, Dominy WG. (2009). Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292:237–243. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.040
- Khadijah S, Neo SY, Hossain MS, Miller LD, Mathavan S. (2003). Identification of white spot syndrome virus latency related genes in specific pathogen free shrimps by use of a microarray. *J Virol* 77(18): 10162–10167. doi:10.1128/JVI.77.18. 10162-10167.2003.
- Kandasamy S, Khan W, Evans F. (2011). A product of *Ascophyllum nodosum* enhances immune response of *Caenorhabditis elegans* against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mar Drugs* 9, 2256–2282, doi:10.3390/md9112256.
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 36: D480–4.

- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30, doi:10.1093/nar/28.1.27.
- Kanjana K., Radtanatip T., Asuvapongpatana S., Withyachumnarnkul B., Wongprasert K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Fish Shellfish Immunol.* 30, 389–396. doi: 10.1016/j.fsi.2010.11.016
- Katayama, M., Fukuda, T., Okamura, T., Suzuki, E., Tamura, K., Shimizu, Y., & Suzuki, K. (2011). Effect of dietary addition of seaweed and licorice on the immune performance of pigs. *Animal science journal*, 82(2), 274–281.
- Kellogg, J.; Lila, M.A. (2013). Chemical and in vitro assessment of Alaskan coastal vegetation antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 11025–11032.
- Khayat M, Babin PJ, Funkenstein B, Sammar M, Nagasawa H. (2001). Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins. *Biol Reprod* 64: 1090–1099.
- Kim, J.K.; Cho, M.L.; Karnjanapratum, S.; Shin, I.S.; You, S.G. (2011). In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 1051–1058, doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.08.032.
- Kim K-J, Lee O-H, Lee B-Y. (2010). Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Life Sci* 86:791–7. doi: 10.1016/j.lfs.2010.03.010
- Kim MS, Kim JY, Choi WH, Lee SS. (2008). Effects of seaweed supplementation on blood glucose concentration, lipid profile, and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 2:62–67. doi: 10.4162/nrp.2008.2.2.62
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C.R.K. and Jha, B. (2010). Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry*, 120, 749–757. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.006>
- Lan Y, Xu X, Yang F, Zhang X. (2006). Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. *Arch Virol* 151:1723–1733
- Lee dg, Hyun JW, Kang KA, Lee JO, Lee SH, Ha BJ, Ha JM, Lee EY and Lee JH. (2004). *Ulva lactuca*: A Potential Seaweed for Tumor Treatment and Immune Stimulation.

Biotechnol Bioprocess Eng 9, 236-238. doi: 10.1007/BF02942299

- Lee, J. H., Choi, J. Y., Tao, X. Y., Kim, J. S., Kim, W., & Je, Y. H. (2013). Transcriptome Analysis of the Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus* Carrying Rice stripe virus. *The Plant Pathology Journal*, 29(3), 330–337. <http://doi.org/10.5423/PPJ.NT.01.2013.0001>
- Lee, O.H., Yoon, K.Y., Kim, K.J., You, S., Lee, B.Y. (2011). Seaweed extracts as a potential tool for the attenuation of oxidative damage in obesity-related pathologies. *J. Phycol.* 2011, 47, 548–556, doi:10.1111/j.1529-8817.2011.00974.x.
- Leonard S.G., Sweeney T., Pierce K.M., Bahar B., Lynch B.P., O'Doherty J.V. (2010). The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livestock Science*. 134: 1-3, 135-138. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.118
- Lehnert, S.A., Wilson, K.J., Byrne, K., Moore, S.S. (1999). Tissue-specific expressed sequence tags from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1, 465–476.
- Leiro JM, Castro R, Arranz J a., Lamas J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int Immunopharmacol* 7:879–888. doi: 10.1016/j.intimp.2007.02.007
- Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC. (2007) Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* 8:120PubMed
- Li JZ, Chapman B, Charlebois P, Hofmann O, Weiner B, et al. (2014) Comparison of Illumina and 454 deep sequencing in participants failing raltegravir-based antiretroviral therapy. *PLOS ONE* 9(3): e90485. doi: 10.1371/journal.pone.0090485
- Li S, Zhang X, Sun Z, Li F, Xiang J. (2013). Transcriptome analysis on Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV acute infection. *Plos One* 8: e58627. doi: 10.1371/journal.pone.0058627
- Li X, Cui Z, Liu Y. (2013). Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from hepatopancreas of microbial challenged mitten crab *Eriocheir sinensis*. *PLoS One* 8:e68233. doi: 10.1371/journal.pone.0068233

- Lin Y, Li J, Shen H, Zhang L, Papasian CJ. (2011). Comparative studies of *de novo* assembly tools for next-generation sequencing technologies. *Bioinformatics* 27: 2031–2037. doi: 10.1093/bioinformatics/btr319
- Liu, C.H., Cheng, W., Chen, J.C. (2005). The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 431–444.
- Liu L., Li Q., Lin L., Wang M., Lu Y., Wang W., Yuan J., Li L. & Liu X. (2013). Proteomic analysis of epithelioma papulosum cyprini cells infected with spring viremia of carp virus. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 26–35.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., & Pallen, M. J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology*, 30(5), 434-439.
- Lombardi JV, Marques HLD, Pereira RTL, Barreto OJS, de Paula EJ. (2006). Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Aquaculture* 258:412-415.
- Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Funayama, K.; Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 392–397.
- Matanjun P, Mohamed S, Mohamed-Mustapha N. (2008) Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* 20:367–373. doi: 10.1007/s10811-007-9264-6
- María A, Piñeiro R, Páez M. (2008). La inevitable estadística en el mundo de la proteómica. *Proteomica* Numero 2. 36–47.
- Marinho-Soriano E, Camara MR, Cabral TD, Carneiro MAD. (2007). Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquacult Res* 38:182-187.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. (2008). RNA-seq: An



assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*. 18(9):1509–1517. doi: 10.1101/gr.079558.108

McKillen, D.J., Chen, Y.A., Chen, C., Jenny, M.J., Trent 3rd, H.F., Robalino, J., McLean Jr., D.C., Gross, P.S., Chapman, R.W., Warr, G.W., Almeida, J.S. (2005). Marine genomics: a clearing-house for genomic and transcriptomic data of marine organisms. *BMC Genomics* 6, p34.

Miller JR, Koren S, Sutton G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* 95:315–27. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.03.001

Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol* 23:83–96. doi: 10.1016/j.tifs.2011.09.001

Mondal K, Bhattacharyya SB, Ghosh R. (2014). Improving the quality of tiger prawn (*Penaeus monodon*) through seaweed (*Enteromorpha intestinalis*) based diet. *Journal of Agricultural and Marine Sciences* Vol. 19 (1): 62-65.

Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, 5(7), 621-628.

Motshakeri M, Ebrahimi M, Goh YM. (2013). *Sargassum polycystum* reduces hyperglycaemia, dyslipidaemia and oxidative stress via increasing insulin sensitivity in a rat model of type 2 diabetes. *J Sci Food Agric*. 4;93(7):1772-8. doi: 10.1002/jsfa.5971

Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Wu, C. H. (2005). InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D201–D205. <http://doi.org/10.1093/nar/gki106>

Nakagawa H. (1997). Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. *Biomed. Pharmacother*. 51:345–348.

Nakagawa H, Kasahara S, Sugiyama T. (1987). Effect of Ulva meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker). *Aquaculture* 62:109–121.

National Research Council. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies. <http://www.nap.edu/catalog/13039/nutrient-requirements-of-fish-and-shrimp>

- Nederbragt A. J., Rounge T. B., Kausrud K. L., Jakobsen K. S. (2010). Identification and quantification of genomic repeats and sample contamination in assemblies of 454 pyrosequencing reads. *Sequencing* 2010 12.
- O'Leary NA, Trent HF, III, Robalino J, Peck MET, Mckillen DJ, Gross PS. (2006). Analysis of multiple tissue-specific cDNA libraries from the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Integrative and Comparative Biology*. 46: 931–939. doi: 10.1093/icb/icl006.
- Okai Y, Higashi-Okai K, Yano Y, Otani S. (1996). Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (*Asadusa nori*). *Cancer Lett* 100:235–240. doi: 10.1016/0304-3835(95)04101-X
- Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernández J, Bozzo C, Navarrete E, Osorio A, Rios A. (2005). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem*. 2005;99:98–104. doi: 10.1016/j.foodchem. 07.027.
- Patel RK, Jain M. (2012). NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0030619
- Pengzhan, Y; Ning, L; Xiguang, L; Gefei, Z; Quanbin, Z; Pengcheng, L. (2003). Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol Res* 48, 543–549, doi:10.1016/S1043-6618(03)00215-9. 14527817
- Peñaflorida VD, Golez NV. (1996). Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. 143:393-401.
- Peña-Rodríguez A. (2011). Uso potencial de la macroalga verde *Ulva clathrata* en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Peña-Rodríguez. A., León. A, Moll. B., Tapia-Salazar. M. Nieto-López. M. G., Villarreal-Cavazos. D., & Cruz-Suarez. L. E. (2010). Uso de *Ulva clathrata* en la nutrición del camarón blanco: revisión. *Avances en Nutrición Acuícola V*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey. México. 700-712.
- Perez, F., Ortiz, J., Zhinaula, M., Gonzabay, C., Calderon, J., Volckaert, F.A. (2005). Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Mar. Biotechnol.* (NY) 7, 554–569.

- Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C, González-Bermúdez CA, Ros-Berruezo GF, Martínez-Graciá C. (2012). Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Rev Biol Mar Oceanogr* 47(3):373–381 doi: 10.4067/S0718-19572012000300001
- Pongsomboon S, Tang S, Boonda S, Aoki T, Hirono I, Yasuike M, Tassanakajon A. (2008). Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB reports* 41:670-677.
- Ramírez-Higuera A., Quevedo-Corona L., Paniagua-Castro N., Chamorro-Ceballos G., Milliar-García A., Jaramillo-Flores M.E. (2014). Antioxidant enzymes gene expression and antihypertensive effects of seaweeds *Ulva linza* and *Lessonia trabeculata* in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *J. Appl. Phycol.* 26:597–605. doi: 10.1007 /s10811-013-0134-0.
- Reilly, P., J.V. O'Doherty, K.M. Pierce, J.J. Callan, J.T. O'Sullivan and T. Sweeney. (2008). The effects of seaweed extract inclusion on gut health and immune status of the weaned pig. *Animal.* 2 (10):1465-1473. doi:10.1017/S1751731 108002711
- Ricque-Marie D, Peña-Rodríguez A, Tapia-Salazar M, Nieto Lopez MG, Villarreal-Cavazos D, Guajardo-Barbosa C, Cruz Suarez LE, Locateli ML. (2006). Effect of pré-prandial nutrient leaching in seawater and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *International Aquafeed* 9(5):32-33
- Robalino J, Carnegie RB, O'Leary N, Ouvry-Patat SA, de la Vega E. (2009). Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 110–118. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.329
- Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, Chen YA, Peck MET, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW, Gross PS. (2007). Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological Genomics* 29:44-56. doi: 10.1152/physiolgenomics.00165.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Warr, G. W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: Convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response. *Journal of Virology*, 79 (21), 13561–13571. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13561-13571.2005>.

- Robertson L, Bray W, Leung-Trujillo J, Lawrence A. (1987). Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. J World Aquac Soc 18:180–5. doi: 10.1111/j.1749-7345.1987.tb00437.x
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol, 11(3), R25.
- Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM. (2007) Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. J Appl Phycol 19:153–160. doi: 10.1007/s10811-006-9121-z
- Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, Takahashi Y, Aoki T. (2002). Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. Fish Shellfish Immunol 13: 69–83
- Rowley, A, Vogan, C, Taylor G, Clare A. (2004). Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. Experimental Biology, 208,3-14
- Selvin J, Huxley AJ, Lipton AP. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. Aquaculture 230:241–248. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00427-7
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., & Lipton, A. P. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso<BR>Facultad de Recursos Naturales<BR>Escuela de Ciencias del Mar.
- Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G., & Griffiths, L. R. (2001).  $\beta$ -Actin—an unsuitable internal control for RT-PCR. Molecular and cellular probes, 15(5), 307-311.
- Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, Kim SK. (2013). Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. Int J Biol Macromol 60:366–374. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030
- Seo MJ, Choi HS, Lee OH, Lee BY. (2013). *Grateloupia lanceolata* (Okamura) Kawaguchi, the edible red seaweed, inhibits lipid accumulation and reactive oxygen species production during differentiation in 3T3-L1 cells. Phyther Res 27:655–663.

doi: 10.1002/ptr.4765

- S. G. Leonard. (2010). The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livest. Sci.* 134:135–138.
- Shoji Y, Nakashima H. (2004). Nutraceuticals and delivery systems. *J Drug Target* 12:385–91. doi: 10.1080/10611860400003817
- Shui Y, Guan ZB, Xu ZH, Zhao CY, Liu DX. (2012). Proteomic identification of proteins relevant to ovarian development in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquaculture* (370) 14–18.
- Sims D, Sudbery I, Ilott NE. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 15:121–32. doi: 10.1038/nrg3642
- Sookruksawong, S., Sun, F., Liu, Z., and Tassanakajon, A. (2013). RNA-Seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura Syndrome Virus (TSV) in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 523–533. doi: 10.1016/j.dci.2013.07.020
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2002). Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.* 4, 487–494
- Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J. (2011). Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res* 21:2213–2223. doi: 10.1101/gr.124321.111
- Tecator (1983). Fat extraction on feeds with soxtec system H.T. Application Note AN 67/87, In: Manual Tecator Soxtec System HT2. 4p.
- Tecator (1987). Determination of Kjeldahl nitrogen content with kjeltec system 1026. Application Note AN 80/87, In: Tecator Kjeltec System 1026 Distilling Unit. 9p.
- Trigui M, Gasmi L, Zouari I, Tounsi S. (2013) Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *J Appl Phycol* 25:319–328. doi: 10.1007/s10811-012-9866-5.
- Tsankov, A. M., Akopian, V., Pop, R., Chetty, S., Gifford, C. A., Daheron, L., & Meissner, A. (2015). An improved ScoreCard to assess the differentiation potential of human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, 33(11), 1182.

- Vargas-Albores, F., Guzman-Murillo, M.A., Ochoa, J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp *Penaeus californiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 299–303.
- Villarreal-Cavazos DA. (2011). Determinación de la digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes utilizados en alimentos comerciales para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en México. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Wang B, Li FH, Dong B, Zhang XJ, Zhang CS, Xiang JH. (2006). Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology* 8:491-500
- Williams, J.; Mallet, S.; Leconte, M.; Lessire, M.; Gabriel, I. (2008). The effects of fructooligosaccharides or whole wheat on the performance and digestive tract of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, 49 (3): 329-339
- Wong KH, Sam SW, Cheung PCK, Ang PO. (1999). Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr Res* 19:1519–1527. doi: 10.1016/S0271-5317(99)00108-6
- Wong ML, Medrano JF. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75–85.
- Wongpanya R, Aoki T, Hirono I, Yasuik M, Tassanakajon A. (2007). Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white Spot syndrome virus by cDNA microarray. *ScienceAsia* 33:165–174
- Woo, M.-N., Jeon, S.-M., Shin, Y. C., Lee, M.-K., Kang, M. A. and Choi, M.-S. (2009). Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53: 1603–1611. doi: 10.1002/mnfr.200900079
- Yamano K, Unuma T. (2006). Expressed sequence tags from eyestalk of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143(2):155–61.
- Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*. 320:3–21. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00816-3.
- Yang YJ, Nam S-J, Kong G, Kim MK. (2010). A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer. *Br J Nutr* 103:1345–1353. doi:

10.1017/S0007114509993242

- Ye, J., Fang, L., Zheng, H., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Z. (2006). WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic. Acids Res.*34, W293–W297. doi: 10.1093/nar/gkl031
- Yocum GD, Coudron TA, Brandt SL. (2006) Differential gene expression in *Perillus bioculatus* nymphs fed a suboptimal artificial diet. *J Insect Physiol* 52:586–592
- Yoon, W.J., Y.M. Ham, S.S. Kim, B.S. Yoo and J.Y. Moon. (2009). Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsia J. BioSci.*, 3: 130-143. doi: 10.5053/ejobios.2009.3.0.17
- Zeng, D. (2013). Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas in response to Taura syndrome Virus (TSV) experimental infection. *PLoS One* 8, e57515, 10.1371/journal.pone .0057515.
- Zou, D., Coudron, T. A., Liu, C., Zhang, L., Wang, M., & Chen, H. (2013). Nutrigenomics in *Arma chinensis*: Transcriptome Analysis of *Arma chinensis* fed on artificial diet and chinese oak silk moth *Antheraea pernyi* pupae. *PLoS ONE*, 8(4), e60881. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060881>

## RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Nutrición y Tecnología de Alimentos Para Organismos Acuáticos

**Tesis: NUTRIGENÓMICA DEL CAMARÓN: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* EN RESPUESTA AL CONSUMO DE *Ulva clathrata* COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO.**

**Campo de estudio:** Nutrigenómica Acuícola.

**Datos personales:** Nacida en Ciudad de Monterrey, Nuevo León, el 03 de febrero de 1985.

**Educación:** Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el grado de: Lic. Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2003-2007 (cédula profesional 5658748).

**Experiencia profesional:**

**Puesto:** Docente en Bachiller

**Lugar de trabajo:**

- Colegio Bachiller Militarizado Gral. Mariano Escobedo, San Nicolás de los Garza, N.L.

**Funciones desarrolladas:** Planeación semanal, mensual y semestral de materias, Tutoría de grupo, Impartición de clases de Biología y Ética y valores

**Puesto:** Docente en Técnico Superior e Ingeniería de Mantenimiento Industrial

**Lugar de trabajo:**

- Universidad Tecnológica Mariano Escobedo, N.L.

**Funciones desarrolladas:** Impartición de clases de Álgebra lineal, Funciones matemáticas, Seguridad y medio ambiente, y Gestión ambiental.

**Realización de tesis Doctoral:** Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

**Lugares de trabajo de realización de tesis:**

- Departamento de Ecología, Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Unidad de Biología Molecular, Genética y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDCS, UANL.

**Tesis:** Nutrigenómica del camarón: Análisis transcripcional del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en respuesta al consumo de *Ulva clathrata* como suplemento alimenticio.

**Áreas de conocimiento y experiencia profesional:**

Formulación y preparación de dietas para organismos acuáticos, Nutrición y Bioquímica de organismos acuáticos, Biología Molecular, Genómica, Secuenciación genómica, Proteómica, Bioinformática, Maricultura y Acuicultura.

**Realización de tesis de Licenciatura:** Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

**Lugar de trabajo:**

- Laboratorio de Parasitología Acuícola, Departamento Sanidad Acuícola, FCB, UANL.

**Tesis:** Identificación de *Hexamita salmonis* en muestras de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* del municipio de Toluca, Estado de México, en base a la técnica de tinción Hematoxilina y Eosina estandarizada (H & E) para el diagnóstico histopatológico.

**Áreas de conocimiento y experiencia profesional:**



Biopsias y cortes histológicos, Tinción Hematoxilina y Eosina estandarizada (H & E), Identificación de patógenos en juveniles de Trucha arco iris por microscopio electrónico.

#### **Presentación en congresos:**

- **Presentación oral del proyecto de investigación:** Análisis transcripcional del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con y sin inmuoestimulación oral, usando el secuenciador 454 GSFLX TITANIUM ROCHE. Simposio de Piro-secuenciación masiva, 6 de octubre de 2011. Centro de Investigación y Desarrollo de las Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL, Monterrey, México.
- **Presentación del cartel:** Análisis transcripcional del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con y sin inmuoestimulación oral, usando el secuenciador GSFLX Titanium 454 Roche. XI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUICOLA (SINA), UNAM / FES Iztacala, México / 23, 24 y 25 de Noviembre (2011).
- **Presentación del cartel:** Análisis transcripcional del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en respuesta al consumo de *Ulva clathrata* como suplemento alimenticio. XII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUICOLA (SINA), Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México 20-22 de Noviembre (2013). **Reconocimiento 1er Lugar de presentación de cartel categoría Doctorado.**
- **Participación en el Concurso al Premio Biotecnología 2014** con el trabajo sometido de Tesis de Doctorado, en el XI Aniversario del Instituto de Biotecnología, FCB, UANL. Diciembre 05, 2014. **Reconocimiento 1er Lugar en trabajo de Investigación.**

#### **Estancia:**

- Estancia en Laboratorio Nacional de Genómica, CINVESTAV Langebio, Irapuato, Guanajuato, México Enero 2013.

#### **Publicación en revista Arbitrada:**

- **Edith Elizondo-Reyna;** Ramsés Medina-González; Martha G. Nieto-López; Rocío OrtizLópez; Ramiro Elizondo-González; Madison S. Powell; Denis Ricque-Marie; Lucia Elizabeth Cruz-Suárez. Consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement stimulates immune and lipid metabolism genes in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-016-0889-1