



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología**

---

Efecto de alimentos ricos en proteínas vegetales, en la nutrición, fisiología digestiva y balance bioenergético en reproductores y postlarva de *Litopenaeus vannamei*

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias**

**Presenta:**

**Biol. Juan Carlos Maldonado Flores**

Directora de Tesis:

**Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortes**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este presente trabajo se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés, con el financiamiento de los siguientes proyectos de investigación: UNAM-IN 220502-3 y 216406-3 y CONACYT 41513-Q., y la beca otorgada por el CONACyT.

Se agradece a los siguientes técnicos académicos de la Unidad por:

- a) Manejo de los reproductores y obtención de los nauplios: Ing. Miguel Arévalo
- b) Círia de las larvas de camarón: Ing Adriana Paredes
- c) Producción del alimento vivo para las larvas de camarón: Biol. Gabriela Palomino
- d) Elaboración de los alimentos balanceados para los reproductores y las postlarvas: Biol. Gabriel Taboada.

*Agradecimiento.*

*A Dios por permitirme la evolución de mi persona, en este tiempo que he estado lejos de lo que siempre conocí.*

*A mi Madre (Sra. Herminia Flores Chavira) la cual me a formado con su amor y cariño incondicional.*

*A mi Hermana (Herminia Maldonado Flores) por todos sus ejemplos de constancia para lograr metas y su gran amor.*

*A mi Tío (José Juan Flores Chavira) por hacerme ver que la gratitud es la memoria del corazón.*

*A mi Hermano (Salvador Sánchez Fabela) que se ha vuelto parte fundamental de la familia.*

*A mi hermano Arturo Pérez el cual siempre esta hay cuando se le necesita, y por recordarme que lo mas valioso en una amistad es un abrazo.*

*A mi compadre Alberto el cual me ha acompañado en este camino.*

*Y a mi familia por el cariño que se me dio en diferentes tiempos y por el apoyo.*

*A Gabriela Gaxiola la cual no solo a sido una Tutora académica, si alguien que me a enseñado con su ejemplo a ser mejor cada día.*

*A mis amigas Yamel, Nubia, Mimi, Nancy, Jessica, Erika, Yumari y Victoria las cuales siempre están para cargar de energía cada vez que viajo a casa.*

*A los Profesores de la UMDI los cuales me han apoyado en mi desarrollo profesional y personal.*

*Por el apoyo de Andrés, Liz, Carmen, Rich y Liliana los cuales han hecho que la vereda recorrida en Sisal sea más fácil.*

*A 😊 por mostrarme que las cosas se viven y no siempre se tiene que analizar y darme fuerzas para terminar esto.*

*A la gente que me acompañado en Sisal (Ariadna, Claudia, Braulio, Emilio, Mao, Merlyn, Sara, Luis, Ale, Pedro, Elis, Chaggy, Sofy, Cholo, Rene, Tere, Gemma y Reyna)*

*Y a la familia Hernández por permitirme estar con ellos.*

*Dedicatorias.*

*A mi abuela que me crió y me formo cuando mas indefenso era yo, gracias Agustina por acompañarme hasta este año en vida y el resto del camino en mi corazón.*

*A mi Madre y Hermana por darme todo su ser.*

*En memoria de Kike el cual me mostró la fragilidad del ser humano.*

*A Daniel's por ser mi más fiel compañero.*

# ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>2.- ANTECEDENTES.</b>	<b>4</b>
<b>3.- HIPÓTESIS.</b>	<b>12</b>
<b>4.- OBJETIVOS.</b>	<b>12</b>
4.1.- Objetivos Generales.	12
4.2.- Objetivos particulares.	12
<b>5.- MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>13</b>
5.1.- Obtención de progenitores.	13
5.2.- Descripción de la cría larval.	17
5.3.- Fase postlarval de la F <sub>1</sub> .	19
5.3.1.- Diseño experimental y composición de las dietas.	19
5.3.2.- Formulación, Nutrientes, Aporte Calórico y Perfil de Aminoácidos de las Dietas.	20
5.3.3.- Dispositivo experimental.	22
5.4.- Parámetros a Evaluar.	23
5.4.1.- Indicadores zootécnicos.	23
5.4.2.- Indicadores fisiológicos.	23
5.4.3.-Bioquímica.	25
5.4.4.- Electroforesis.	26
<b>6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.</b>	<b>29</b>
<b>7.- RESULTADOS.</b>	<b>30</b>
7.1.- Obtención de la F <sub>1</sub> .	30
7.2.- Reproducción.	30
7.3.- Cría larval.	32
7.4.- Experimentos de la fase postlarval de la F <sub>1</sub> (UNAM-Sisal).	33
7.4.1.- Adaptación bioquímica a los cambios de la composición del alimento.	33
7.4.2.- Modelo bioenergético.	38
7.4.3.- Modelos de balance bioenergético.	40

7.4.4.- Parámetros de zootecnia.	42
<b>8. DISCUSIÓN.</b>	<b>44</b>
8.1.- Influencia de diferentes alimentos balanceados en los progenitores de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	44
8.2.- Genética cuantitativa.	47
8.3.- Enzimas digestivas.	54
8.4.- Zootecnia y bioenergética.	55
<b>9.- CONCLUSIONES.</b>	<b>58</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>60</b>

# ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>2.- ANTECEDENTES.</b>	<b>4</b>
<b>3.- HIPÓTESIS.</b>	<b>12</b>
<b>4.- OBJETIVOS.</b>	<b>12</b>
4.1.- Objetivos Generales.	12
4.2.- Objetivos particulares.	12
<b>5.- MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>13</b>
5.1.- Obtención de progenitores.	13
5.2.- Descripción de la cría larval.	17
5.3.- Fase postlarval de la F <sub>1</sub> .	19
5.3.1.- Diseño experimental y composición de las dietas.	19
5.3.2.- Formulación, Nutrientes, Aporte Calórico y Perfil de Aminoácidos de las Dietas.	20
5.3.3.- Dispositivo experimental.	22
5.4.- Parámetros a Evaluar.	23
5.4.1.- Indicadores zootécnicos.	23
5.4.2.- Indicadores fisiológicos.	23
5.4.3.-Bioquímica.	25
5.4.4.- Electroforesis.	26
<b>6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.</b>	<b>29</b>
<b>7.- RESULTADOS.</b>	<b>30</b>
7.1.- Obtención de la F <sub>1</sub> .	30
7.2.- Reproducción.	30
7.3.- Cría larval.	32
7.4.- Experimentos de la fase postlarval de la F <sub>1</sub> (UNAM-Sisal).	33
7.4.1.- Adaptación bioquímica a los cambios de la composición del alimento.	33
7.4.2.- Modelo bioenergético.	38
7.4.3.- Modelos de balance bioenergético.	40

7.4.4.- Parámetros de zootecnia.	42
<b>8. DISCUSIÓN.</b>	<b>44</b>
8.1.- Influencia de diferentes alimentos balanceados en los progenitores de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	44
8.2.- Genética cuantitativa.	47
8.3.- Enzimas digestivas.	54
8.4.- Zootecnia y bioenergética.	55
<b>9.- CONCLUSIONES.</b>	<b>58</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>60</b>

## 1.- INTRODUCCIÓN.

La acuicultura como una actividad intensiva es relativamente nueva, si la comparamos con la agricultura y la ganadería, y tiene como objetivo coadyuvar a satisfacer la demanda alimenticia mundial. Una de las industrias más importantes es el cultivo de camarón, que como los otros sectores pecuarios, busca producir carne con máximos rendimientos al mínimo costo. El uso de alimentos balanceados puede mejorar la producción de camarón e incrementar las utilidades ya que en este tipo de cultivo se emplea el alimento artificial a partir de la fase postlarval, sin embargo, los alimentos son caros y pueden variar del 50 al 70% del total de los gastos de producción Cruz et al., 2002. Es por esto que la acuicultura de los crustáceos en las últimas décadas ha conducido a la necesidad de un mejor entendimiento de la relación entre la anatomía y la función del tracto digestivo de los crustáceos decápodos (Ceccaldi, 1997), así como el papel de los nutrientes en la estabilidad del material genético (ADN), en los procesos de reparación y de expresión genética es un tema que se vuelve de gran relevancia en la ciencia de la nutrición debido a la interacción compleja y bi-direccional entre la información genética y los nutrientes (Paoloni et al., 2003) en particular los camarones peneidos.

Uno de los factores que se vuelve de gran importancia es la expresión genética como ya se mencionó y ésta tiene su importancia en el hecho de que es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariotas el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como "housekeeping genes". El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. Por ejemplo, genes que codifican proteínas responsables del transporte axonal se expresan en neuronas pero no en linfocitos en donde se expresan genes responsables de la respuesta inmune. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la

vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos (National Human Research Institute ([www.genoma.gov](http://www.genoma.gov))); Esto reafirma lo dicho por Paoloni sobre la regulación de genes y su posible aplicación en la nutrición.

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* una de las especies de camarones peneidos más importantes para la producción comercial en las costas del pacífico de México (Jiménez, 2004), este representó en el continente americano más del 90% de la producción con 45,000 TM (Sagarpa, 2002).

En relación con los aspectos nutricionales de estos organismos, al igual que el de los peces, tienen altos requerimientos de proteína, consecuentemente, para su alimentación se utilizan alimentos ricos en ese nutriente (Cuzon et al., 1997).

Los peneidos se adaptan muy bien a los cambios en la composición de la dieta mediante la inducción de un conjunto de enzimas digestivas (Le Moullac et al., 1996) sintetizadas y secretadas en el hepatopáncreas (Ceccaldi, 1997). En el caso específico de *L. vannamei*, se ha demostrado una tolerancia nutricional mayor que otras especies; Ésta tolerancia se debe, en parte, a su alta capacidad para utilizar un amplio rango de proporciones proteína/energía para su crecimiento (Rosas et al., 2001). Estas adaptaciones representan una ventaja técnica en cuanto a la elaboración de alimentos artificiales porque el camarón aceptará e hidrolizará un gran número de ingredientes incluidos en las dietas.

La preferencia alimenticia de los camarones peneidos, se puede estudiar posteriormente a la ingestión del alimento en el sistema digestivo. En el estómago el alimento ingerido es fragmentado mecánicamente y bioquímicamente mediante la participación de las enzimas digestivas provenientes de la glándula digestiva. Una vez completado el proceso, el quimo y las partículas finas del alimento pasan a la glándula digestiva donde se llevan a cabo los procesos de degradación, aprovechamiento y almacenamiento de los elementos nutricionales contenidos en el material ingerido (Lovett y Felder, 1989, 1990a,b y c, Gaxiola, 1994) En general las especies de camarones peneidos son descritas como omnívoras, con una constante actividad de alimentación. *Litopenaeus vannamei* también presenta esta tendencia de herbivoría a omnivoría en

estadios larvales consumiendo microalgas y presenta picos de actividad enzimáticas en PIII y va a estar dado por la  $\alpha$ -amilasa, tripsina y quimotripsina (Le Moullac, 1996).

Uno de los objetivos centrales de la nutrición es la evaluación del impacto que ejercen los nutrientes durante la ontogenia de la fisiología digestiva de los camarones peneidos, especialmente de *Litopenaeus vannamei*, especie para la cual se ha reportado una pérdida de capacidad de digestión de nutrientes como los carbohidratos, durante el proceso de domesticación (Arena et al., 2003). Esta pérdida de capacidad de digestión de los carbohidratos puede deberse a una pérdida de expresión de las enzimas encargadas de la digestión de este nutriente, que originalmente, los organismos del medio silvestre pueden digerir (Arena et al., 2003).

Jiménez-Yan, (2004) y Brito (en proceso) abordando lo antes mencionado concluyen que la capacidad de recuperación de la omnívora en postlarvas y juveniles tempranos de *L. vannamei* es real al poder asimilar alimentos artificiales con proteína animal con y sin carbohidratos y alimentos con proteína vegetal con y sin carbohidratos.

Además Brito (en proceso), investigación de la cual provienen los reproductores de la presente investigación menciona que las dietas con proteína de origen animal presentan altos costos energéticos comparativamente al de origen vegetal además de que el incremento de la actividad enzimática, puede ser afectado por sustratos que se encuentran en mayor cantidad en las dietas artificiales, o por los sustratos que se encuentran en bajos niveles.



## 2.- ANTECEDENTES.

La maquinaria genómica juega un papel fundamental en el desarrollo de los organismos ya que ésta es la que determina que la supervivencia y el funcionamiento de los organismos sea mayor o menor (Paoloni et al., 2003), y esto es por el conjunto de información que lleva consigo la cual da instrucción particular que generalmente codifica una proteína; El ADN que conforma los genes, almacena la información genética en el núcleo, existen fragmentos de ADN que no codifican una proteína y puede codificar otras moléculas como el ARN estructural y a esos también los debemos denominar genes. Además, se presentan situaciones en las que un fragmento de ADN es capaz de codificar más de una proteína. Entonces, ¿se debe hablar de un gen o de varios? En esas situaciones tendemos a confundirnos un poco con la terminología. Pero en general, se puede decir que un gen es un fragmento de ADN, que puede tener 100 pares de bases o hasta dos millones de pares de bases, como en el caso del gen de la distrofia muscular, el cual codifica una proteína en particular que tiene a su vez una función particular; Es entonces posible que esta maquinaria a su vez es influenciada por las condiciones a las que son sometidos los organismos y parte fundamental de las condiciones es la dieta, lo cual es un factor crucial pues se ha observado que los cambios en el peso, la talla y la textura del tejido están relacionados con las características del alimento, como la concentración de proteínas en la dieta (Ezquerro et al., 2003). Siendo este uno de los elementos más caros en la elaboración de las dietas por eso la tendencia a buscar proteína de alta calidad pero de menos costo (Akiyama, 1991). La harina de pescado es uno de los ingredientes más socorridos, sin embargo en los últimos años se ha observado una gran variabilidad en los costos y en el suministro debido a las pescas intensivas o efectos globales como el del niño (Forster et al., 2003).

Otras materias primas ampliamente estudiadas en la nutrición de los camarones peneidos son las proteínas de origen vegetal siendo de muy diversos orígenes (harina de soya, harina de chícharo, pasta de soya, gluten de trigo). New, (1976) presentó una revisión de las diferentes fuentes de proteína que se emplean en la formulación de alimentos artificiales para camarón. Y ya se han reportan niveles de inclusión variables de fuentes de proteína de origen vegetal, entre las que se encuentra la harina de soya, en primer lugar, la harina de trigo, harina de semilla de algodón, gluten de trigo y la harina de cacahuete. Kureshy et al., 2002 reportan altos porcentajes de digestibilidad in

vitro para la harina de soya (83.2%) harina de girasol (85%) y afrechillo de trigo (61.8%), usando homogenizados de hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. Así mismo Akiyama et al., (1989) reportó altos porcentajes de digestibilidad aparente para el gluten de trigo (85.4%), concentrado proteico de soya (84.1%) para los juveniles de *L. vannamei*. La adición de enzimas exógenas frecuentemente mejora el valor nutritivo de este tipo de ingredientes y ha sido probado en juveniles de *Marsupenaeus japonicus*, usando la amilasa y en *Penaeus monodon* (Buchanan et al., 1997). Este último autor usó como fuente de proteína la harina de canola, usando una mezcla de enzimas denominada porzime estabilizada por calor.

Por otro lado se han realizado estudios comparativos con harina de chícharo y harina de canola con diferentes procesos en los juveniles de *L. vannamei* (Cruz-Suárez et al., 2001). La harina de chícharo se había descartado anteriormente debido a la presencia de factores anti-nutricionales (Tacon, 1997). Sin embargo como resultado del entrecruzamiento de variedades de esta planta, diversos factores han sido eliminados (taninos y factor antitriptico) (Castell, 1976). Por otro lado la harina de canola se ha mejorado por los procesos de extrusión para mejorar su valor nutritivo (Cruz-Suárez, et al., 2001). Estas dos fuentes de proteína se incluyeron en un 30%, en dietas con 23% de harina de pescado y 4 % de harina de camarón para juveniles de *L. stylirostris* También en juveniles de *L. vannamei* fue incluido el chícharo tratado por extrusión o micronizado, y al parecer puede ser recomendado como una fuente de sustitución promisoría para dietas de estos organismos (Davis et al., 2002).

Ya que los estudios sobre los hábitos alimenticios de los camarones peneidos indican que estos son omnívoros y que algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras (Akiyama et al., 1992). Se ha observado que en general, las especies del subgénero *Litopenaeus* (*L. setiferus*, *L. vannamei*, *L. schmitti*) tienen hábitos omnívoro herbívoros (Marte, 1980; Hunter y Feller, 1987). Cuzon et al., 1997). afirman que estas preferencias están asociadas con diferentes proporciones de materia de origen animal o vegetal en la dieta y podrían evidenciar requerimientos nutricionales distintos.

El tipo de material vegetal presente en los estanques de cultivo y que frecuentemente es encontrado también en el contenido estomacal de los camarones,

esta representado por diatomeas, algas filamentosas, masas de cianobacterias y fragmentos de macrofitas acuáticas y terrestres (Bombeo- Tuburan et al., 1993; Nunes et al., 1997; Focken et al., 1998). El análisis del contenido estomacal señala la presencia de camarones, poliquetos, moluscos bivalvos, ophiuridos, nemátodos y detritus de origen vegetal. Aunque se señala que el aporte de almidón proveniente de los restos vegetales, contribuye sólo en una pequeña fracción en la dieta de los camarones y que el glucógeno presente en las presas animales podría jugar un papel más importante en la actividad de las enzimas relacionadas con su degradación, se cuestiona que las cantidades sean más elevadas que el almidón debido, esencialmente, a que en el momento que las presas son matadas, la pequeña cantidad de glucógeno es rápidamente degradada y prácticamente ha desaparecido en el momento de la ingestión (Pike, 1984). De cualquier manera, los camarones peneidos y especialmente *Litopenaeus vannamei*, presentan una armadura enzimática capaz de digerir alimentos de muy diverso origen. Sin embargo, en estos organismos se presenta cambio ontogenético del tracto digestivo, tanto morfológico, como a nivel de enzimático. (Lovett y Felder, 1989, 1990 a y b), correspondiendo de manera directa a los cambios de hábitat (oceánico en adultos y larvas a estuarino en postlarvas y juveniles), y hábitos alimenticios (de filtradores en la Zoeas a raptorial de Mysis en adelante).

En particular en lo que se refiere a las postlarvas tempranas de *L. vannamei*, se ha determinado como mejor régimen alimenticio la mezcla de dos microalgas, nauplios de *Artemia* y alimento microparticulado en condiciones de cultivo (Brito et al., 2001). Hay evidencias de que la gran flexibilidad de la respuesta enzimática hacia la dieta en los estadios larvales explica la habilidad de crecer y sobrevivir con alimentos del zoo y fitoplancton. (Rodríguez et al., 1994; y Kurmaly et al., 1989). Por otro lado y relacionado con el origen de la proteína se han encontrado diversas respuestas enzimáticas, especialmente de la tripsina, con diferentes condiciones alimentarias en las larvas de camarón. Un incremento de la tripsina se ha determinado cuando las larvas fueron alimentadas con alimento artificial (Le Vay et al., 1993). Aunque no hay una relación clara entre la actividad de la tripsina y las algas en la dieta, en el caso de las larvas de camarón, como las postlarvas tempranas de *L. vannamei*, la calidad de la proteína es el factor que regulador de la tripsina. Jones, (1997) han señalado que las algas parecen proveer un mejoramiento de la actividad enzimática de las fases larvales iniciales. Sin embargo el esquema de alimentación propuesto para las postlarvas

tempranas indica que el papel benéfico de las microalgas se extiende también a las postlarvas tempranas de *L. vannamei* (Brito et al., 2001).

Mientras que la proteína es el ingrediente más crítico presente en las dietas independientemente de su origen dado que, como macro-nutriente, es el que soporta el crecimiento de los organismos. Una determinante clave de la digestibilidad y de la eficiencia de asimilación de las proteínas ingeridas es la presencia de las enzimas proteasas en el tracto digestivo (Brito et al., 2000). Dentro de éstas, la tripsina es la enzima más importante en los crustáceos porque interviene en un 50 a 60% de la hidrólisis proteica (Le Moullac et al., 1994).

Cambios en la actividad enzimática digestiva, pueden indicar respuestas fisiológicas a diferentes condiciones nutricionales y ha sido hipotetizado que la actividad enzimática es más alta para aquellos substratos que son más comunes en la dieta (Gamboa, 2001) Además, los tipos y las propiedades de las enzimas digestivas de los camarones definen capacidades digestivas y por lo tanto, definen también los ingredientes a ser incluidos en las dietas para camarón (Gamboa et al., 2003).

Otro ingrediente a considerar son los carbohidratos (CBH) dietéticos los cuales pueden sustituir parcialmente el uso de proteína, por esto en los peneidos es una de las principales líneas de investigación en la nutrición de los camarones. Los estudios (Rosas et al., 2001) realizados en este sentido han demostrado que la utilización que pueden hacer los camarones de los CBH es limitada, por la falta de sitios para el almacenamiento, como por la capacidad de procesamiento enzimático que presentan. Aunque a la fecha el metabolismo de CBH ha sido ampliamente estudiado en crustáceos, aún existen numerosas interrogantes relacionadas con sus limitaciones y la forma en que estas afectan los mecanismos de uso y aprovechamiento de la materia y la energía y sus consecuencias en el crecimiento.

Estudios previos han demostrado que la forma en que los carbohidratos son mejor asimilados es cuando se incluyen en la dieta en forma de almidón. En este sentido (Abdel-Rahman, 1979) demostró que la velocidad con que se asimila la glucosa es mucho más rápida que cuando se utiliza al almidón como fuente de CBH. Esto se debe a que la glucosa puede interferir en la absorción de otros nutrientes debido a que

ésta puede saturar rápidamente los sitios de absorción, inhibiendo la captación de aminoácidos y afectando el crecimiento (Shiau, 1998). Así mismo se ha observado que los carbohidratos en exceso, producen daños en la glándula digestiva y en las branquias, principalmente por la limitación física que presentan las células para almacenar este nutriente (Pascual, 1983.).

Un extenso estudio sobre la digestibilidad de diferentes fuentes de carbohidratos fue llevado a cabo por Cousin, (1995), quien reportó un 96% de digestibilidad (ADC) para el almidón de papa, para el almidón de maíz varió entre el 63-94% dependiendo de su presentación (nativo, pregelatinizado) y el de trigo con 92%. Asimismo, la interacción entre el nivel de inclusión del almidón de trigo y la digestibilidad de otros nutrientes fue evaluada para *L. stylirostris* y *L. vannamei*. La digestibilidad del almidón varió entre 82-87% para ambas especies, y la proteína (mezcla de caseína y harina de calamar) varió entre 96-98% y no se determinó ninguna interacción significativa con el almidón nativo de trigo en un rango entre 10 y 40% (Cuzon et al., 2000).

Es por esto que la asimilación de los CBH requiere de toda un complejo enzimático presente en los camarones peneidos, especialmente en *L. vannamei*. Donde la primera enzima comprometida es la  $\alpha$ -amilasa, que rompe los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. del polisacárido, ya sea el almidón o el glucógeno. Una vez liberadas maltodextrinas, interviene la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, que libera a las moléculas de glucosa. Una vez liberadas estas moléculas penetran por difusión facilitada a las células y para estar biodisponible requieren ser fosforiladas por el sistema de hexoquinasas, cuya función esencial es unir el grupo fosfato a la glucosa. (Gaxiola et al., 2005).

De estas enzimas, la  $\alpha$ -amilasa es una de las mejor estudiadas en los camarones, siendo de carácter polimórfico (Arena et al., 2002 ). Dos formas alélicas fueron medidas para *Asellus aquaticus* (Lomholt y Christensen, 1970), 4 isoformas en *Palaemonetes varians* (Christensen y Lomholt, 1972), 7 isoformas en *P. elegans* (Van Womhoudt y Favrel, 1988) 3 isoformas en *P. serratus* y *L. vannamei* (Van Womrhoudt, 1983; Le Moullac et al., 1996) y tres isoformas en *Farfantepenaeus notialis* (García-Machado et al., 2001) en *L. schmitti* (Díaz et al., 1995) y *L. setiferus* (Arena, 1999; Ball et al., 1998). La actividad de

esta enzima puede ser inducida por muy diversos factores, como el incremento de carbohidratos en la dieta, los niveles de proteína en la dieta, por el ciclo circadiano y de la muda (Van Wormhoudt et al., 1974 y 1977). Rosas et al., (2001) mostró un incremento de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en función de los niveles de inclusión de los carbohidratos dietéticos. Lovett y Felder, (1990a) durante el desarrollo de las postlarvas que puede ser en respuesta de los bajos niveles de carbohidratos en la dieta.

Tomando en cuenta que los patrones de expresión génica en organismos pluricelulares cambian continuamente durante todas las etapas de la diferenciación celular y del desarrollo de los tejidos, la expresión de diferentes genes en estas etapas, en una manera dependiente del tiempo y del espacio, define las características celulares particulares y le permite a una célula o grupo de células responder o adecuarse al medio ambiente de una manera eficiente y desarrollar adecuadamente sus funciones básicas, las cuales pueden incluir el mantenimiento de la homeostasis. (Kozian y Kirschbaum, 1999; Liang y Pardee, 1992).

Si bien las técnicas de biología molecular se han desarrollado en los últimos años, los mecanismos relacionados con la expresión genética no están del todo estudiados en los camarones, sin embargo se sabe que los aminoácidos pueden jugar un papel importante en la modulación de la expresión de ciertos genes, en el control de la transcripción y estabilización del RNAm fungiendo como un modulador. Por consiguiente el conocimiento de los mecanismos de regulación de la expresión proteica contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de procesos como el crecimiento. (Paoloni et al., 2003).

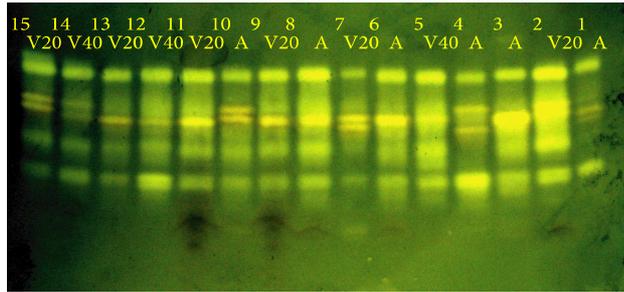
Existen ejemplos del efecto de los nutrientes en la expresión genética, aunque no se conoce con certeza el mecanismo, bajo la acción de ciertos componentes de la dieta puede aumentar la tasa transcripcional o puede prolongarse la estabilidad del mensajero. Además, se puede regular la velocidad con que los mensajeros son traducidos y el número de veces que deben traducirse.

Existe un control general, global o inespecífico de la traducción ejercido sobre los factores del complejo de traducción. Por otro lado se conocen casos específicos o control particular de la traducción de ciertos ARNm. Por esta razón el estudio del

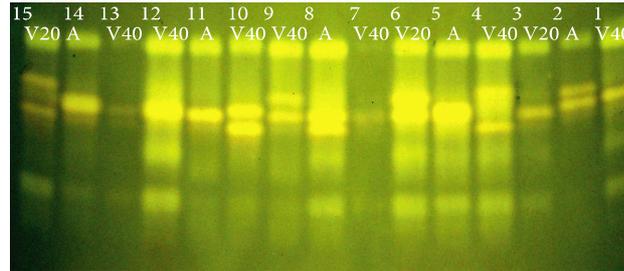
ARNm se ha vuelto una herramienta clave en los estudios que vinculan la nutrición y la genética.

Arena et al., (2003) estudiaron la relación del polimorfismo de la  $\alpha$ -amilasa y el comportamiento bioquímico y fisiológico de los juveniles de tres poblaciones de *L. vannamei*: una silvestre, una de séptima generación de cultivo (Sisal) y una de 25 generaciones (Ifremer Tahiti), concluyendo que la selección artificial basada en el peso corporal afectó la capacidad de adaptación de las poblaciones sujetas a cierre de cultivo. Como consecuencia de este proceso de selección en las poblaciones cultivadas, las rutas del metabolismo de carbohidratos (hidrólisis, absorción y síntesis) resultaron afectadas en los camarones alimentados con diferentes niveles de inclusión de carbohidratos. En relación con la actividad de la  $\alpha$ -amilasa se observaron diferentes patrones, mientras que en la población silvestre, la actividad resultó inducida por dietas ricas en carbohidratos, en las poblaciones cultivadas, la inducción de la enzima se observó en los animales alimentados con dietas pobres en carbohidratos. Al parecer, la inducción de la actividad de la enzima estuvo relacionada con la presencia de todas las isoformas presentes en los camarones, respondiendo a los altos niveles de almidón de la dieta. Arena et al., 2003 también observó una disminución de los valores medios de actividad entre las tres poblaciones evaluadas, (24 a 39 UI mg de proteína<sup>-1</sup>, para los silvestres; entre 16 y 25 UI mg de proteína<sup>-1</sup> para la población de Sisal; y de 3.6 a 15.8 UI mg de proteína<sup>-1</sup> para la población de Tahiti).

Es por esto que en la presente investigación se evaluara el efecto que tiene la proteína sobre la descendencia de la séptima generación de Sisal (industrias Pecis) ya que según Hernández, (2006) en análisis electroforético realizado en los progenitores que se ocuparon para la investigación se observó un patrón de 8 bandas bien definidas como se ha reportado en la bibliografía (Arena, 2004). (Fotos 1 y 2); Donde las bandas fueron nombradas ascendentemente de acuerdo a su movilidad empezando por la letra **a**. Los zimogramas fueron clasificados en dos sistemas para su análisis, un sistema con tres alelos que se mantiene constante y otro de 5 alelos que es más variable, y se describen el comportamiento de la frecuencia de aparición de los alelos, a, b, c, etc. En las poblaciones de *L. vannamei* alimentados con las diferentes dietas.



GEL 1 e8, 6-Junio



Gel 2 e8, 6-Junio

**Fotos 1 y 2 frecuencias alélicas en reproductores de Pécis.**

Dentro de las muestras del experimento, se notó una pequeña diferencia en el alelo “C” para el cual se observó una mayor activación dentro de las dietas vegetales tanto en un 40 % y un 20 % , en comparación con la dieta de proteína animal. (Tabla 1)

**Tabla 1. Diferencias en la X<sup>2</sup> en aparición de alelos en reproductores de Pécis.**

		Experimento Reproductores		
		alelo a	alelo b	alelo c
Alelo a		N/d	N/d	S/d
alelo b		N/d	N/d	S/d
alelo c		S/d	S/d	S/d

N/d = no hay diferencia  
S/d = si hay diferencia

Es por esto la importancia del la presente investigación que profundizara en la capacidad de digestión tanto de las proteínas de diverso origen, como los carbohidratos, en las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, provenientes de la población de la F<sub>1</sub> de la Unidad de Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencia, UNAM, Sisal, Mérida Yucatán para poder restablecer la expresión de las enzimas digestivas.

### 3.- HIPÓTESIS.

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación con los cambios en la frecuencia alélicas para la familia de genes de la enzima  $\alpha$ -amilasa, de los progenitores de *L vannamei* es su fase postlarval y juvenil (Fo), se espera que se verifiquen los cambios en la frecuencia alélica para este gen, en los descendientes (F<sub>1</sub>), correspondiendo así con la teoría de que los nutrientes pueden modular activamente la expresión génica de genes como el que codifica para la  $\alpha$ -amilasa en los camarones peneidos.

### 4.- OBJETIVOS.

#### 4.1.- Objetivos Generales.

Determinar si una dieta extrema DPV (20 % de proteína (cp) Vegetal y 40 % de carbohidratos) modula activamente la expresión genética del gen que codifica para la  $\alpha$ amilasa (visto a través de la expresión de las isozimas proteicas) de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, cuando es comparada con una dieta patrón (40 % de proteína (cp) animal marina y 20 % de cbh); y si estos cambios se traducen en cambios de los parámetros como crecimiento, supervivencia y balance bioenergético.

#### 4.2.- Objetivos particulares.

Determinar cambios en las frecuencias alélicas en la descendencia de organismos sometidos a diferentes regimenes alimenticios (DPA y DPV).

Determinar las diferencias en los parámetros a nivel organismo (crecimiento, supervivencia y bioquímicas) según al régimen alimenticio al que fueron sometidos.

Determinar la capacidad digestiva de la combinación entre proteína de diverso origen (Animal y Vegetal) y carbohidratos en la progenie de la F<sub>1</sub> Animal y F<sub>1</sub> Vegetal.

Determinar la diferencia de gasto de energía bajo el análisis bioenergético del los dos regimenes alimenticios en la progenie de F<sub>1</sub> Animal y F<sub>1</sub> Vegetal.



## 5.- MATERIALES Y METODOS.

### 5.1.- Obtención de progenitores.

Los Animales de los cuales se obtuvieron los desoves, para la presente investigación, fueron donados por la Granja Sisal de Industrias Pecis S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México (F<sub>8</sub> Pecis). Estos organismos habían sido sometidos a tres diferentes dietas desde postlarvas: i) 40 % de cp animal con 20 % de cbh (F<sub>0</sub> Animal), ii) 40 % de cp de origen vegetal y 20 % de cbh (F<sub>0</sub> Vegetal) y iii) 20 % de cp de origen vegetal, y 40 de cbh.

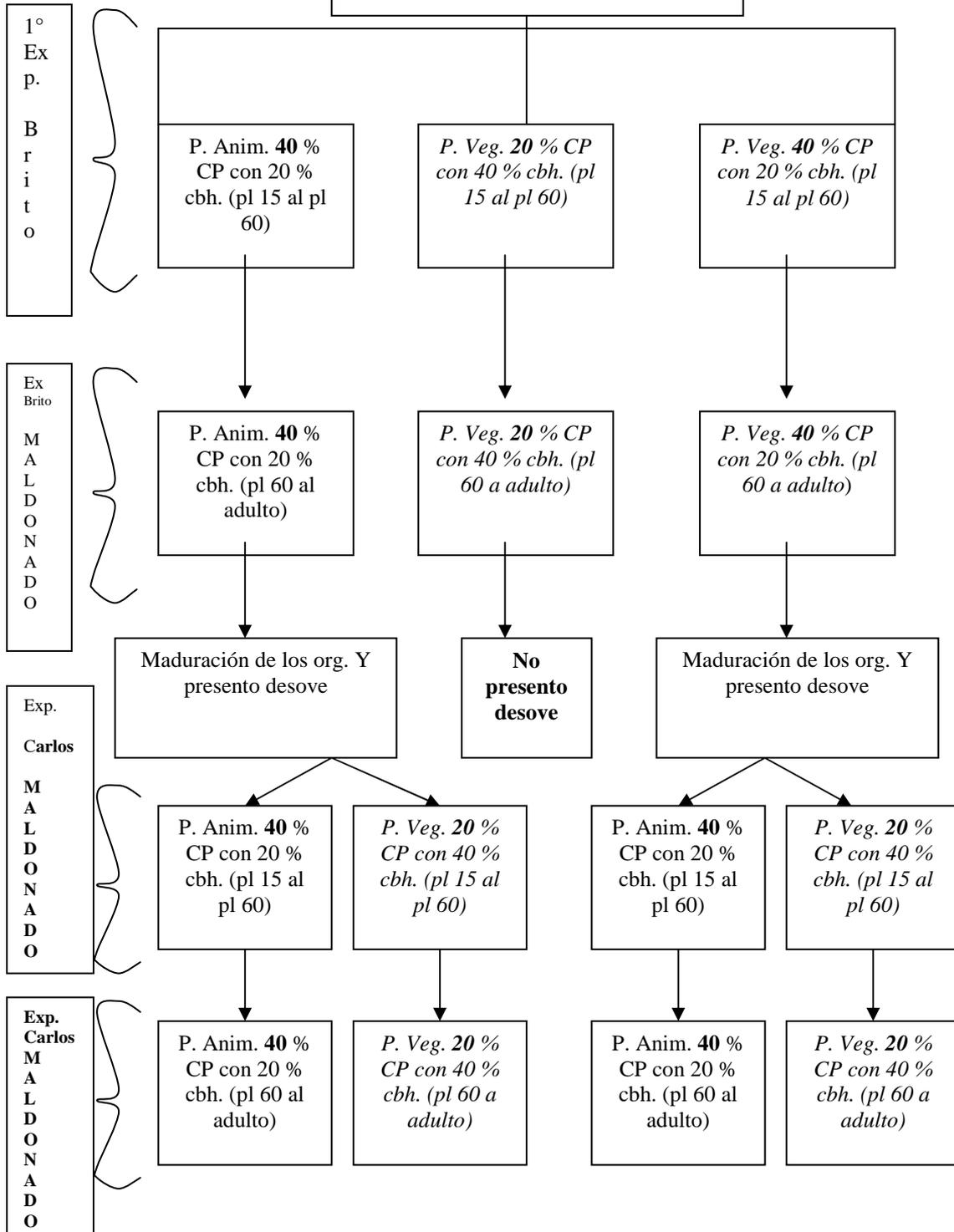
Los organismos se desarrollaron en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Sisal Mérida Yucatán, teniendo la alimentación antes mencionada para así realizarse su tesis de maestría. (Brito en revisión).

Para poder dar una visión mas gráfica del trabajo realizado se presenta el siguiente diagrama de flujo.

### Materiales e instalaciones de la sala de maduración:

Los progenitores empleados en la presente investigación fueron identificados como Camarón Blanco del Pacífico (*L. vannamei*) organismos que se mantuvieron desde noviembre de 2004 hasta Julio del 2005 que presentaron un peso promedio inicial de 17.46 g para la F<sub>0</sub> D. Animal (que corresponde a la F<sub>8</sub> de Industrias PECIS) y para la F<sub>0</sub> Vegetal al 40 % (que corresponde a la F<sub>8</sub> de Industrias PECIS) de 15.46 g y un peso final de 35.0 g para la F<sub>0</sub> D. Animal y para la F<sub>0</sub> Vegetal al 40 % un prot. de 25.7, los cuales se pasaron a la sala de maduración que contaba con 6 tanques ovalados de fibra de vidrio de 10 toneladas de capacidad (4.69 m<sup>2</sup>) con una columna de agua de mar de 40 cm, la cual fue mantenida en un sistema cerrado de circulación de agua, mediante filtros (biológicos mecánicos y físicos) la cual era renovada parcialmente en un 30% cada semana. El agua de mar se mantuvo con aireación constante mediante el uso de un soplador y la salinidad se mantuvo en 35-38 ‰. La temperatura por su parte se mantuvo en 28 ±1 °C.

# Materiales y Métodos



Cada una de las líneas F<sub>0</sub> D. Animal 40% de cp y 20% de cbh y para la F<sub>0</sub> Vegetal al 40 % de prot. y 20 % de cbh, fueron alimentadas desde larvas con las dietas experimentales de 40 % de prot. de origen Animal y 40 % de cp de origen Vegetal (Tabla 2 y 3).

Se les dio un foto-periodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad contando con un gradiente de una hora para pasar de luz a oscuridad y al llegar a la talla de 17 gramos en la F<sub>0</sub> de D. Animal y para la F<sub>0</sub> de la D. Vegetal a los 16 gramos se comenzó aplicar la dieta para reproductores la cual consiste en mejillón, almeja y pellet semi-húmedo.

**Tabla 2. Formulación de los Alimentos Utilizados para la Alimentación de las Post-larvas y Juveniles Tempranos del Camarón Blanco del Pacífico (*L.vannamei*) % = g kg<sup>-1</sup>.**

DIETA VEGETAL 20% PROTEÍNA 40% CARBOHIDRATOS DPV 20%		DIETA VEGETAL 40% PROTEÍNA 20% CARBOHIDRATOS DPV 40%		DIETA PROTEÍNA ANIMAL 40% PROTEÍNA 20% CARBOHIDRATOS DPA 40%	
Ingrediente	%	Ingrediente	%	Ingrediente	%
Concentrado de Soya	15	Concentrado de Soya	30	Harina de Pescado	19
Concentrado Proteico de Pescado	4.5	Concentrado Proteico de Pescado	9	Concentrado Proteico de Pescado	14
Concentrado Proteico de Papa	2.5	Concentrado Proteico de Papa	5	Caseína	12
Espirulina	4.5	Espirulina	9	Calamar	20
Mezcla de Vitaminas	1	Mezcla de Vitaminas	1		1
Robimix C	0.45	Robimix C	0.45		0.45
Carofila	0.01 5	Carofila	0.01 5		0.015
Colesterol	0.5	Colesterol	0.5		0.5
Gluten de Trigo	4.5	Gluten de Trigo	9		
Lecitina de Soya	2	Lecitina de Soya	2		2
Aceite de Hígado de Bacalao= (ACH BAC)	6	Aceite de Hígado de Bacalao	5		3.7

**Tabla 3. Porcentaje de Nutrientes y Aporte Calórico (Kj) de los Alimentos Utilizados para la Alimentación de Post-larvas y Juveniles Tempranos de *L. vannamei*.**

Determinaciones	DPV 20%	DPV 40%	DPA 40%
Humedad	7.40	8.26	4.34
Cenizas	21.87	13.78	22.81
Proteína	17.53	36.81	39.50
Grasas	8.68	8.48	10.37
Fibra Cruda	0.00	0.22	0.00
hidratos de carbono	44.52	32.45	22.98
Sumatoria	100	100	100
Aporte Calórico (KJ)	326.32	353.36	343.25

### Método para acelerar la maduración de las hembras

Con el objeto de acelerar el proceso de maduración a las hembras se les extirpó un pedúnculo ya que en su base se encuentra el complejo neurosecretor órgano x-glándula del seno, el cual secreta las hormonas que inhiben el desarrollo del ovario. Con este procedimiento las hembras suelen acelerar la maduración reduciendo este periodo de 3-4 meses a únicamente 7-8 días. Al momento de realizar la ablación las hembras fueron marcadas con anillos hechos de silicón teñidos con pintura vegetal comestible.

Una vez que a las hembras se les ablación el pedúnculo ocular se inicia el período del ensayo. Durante este tiempo todos los días se observó la evolución del desarrollo del ovario y la conducta reproductiva.

Desove y eclosión ( inseminación artificial):

Diariamente se realizó una inspección de las hembras ablacionadas usando para ello una red y una lámpara sumergible (**Foto 3**), que se coloca por debajo de la hembra para observar el grosor de las gónadas. Este procedimiento se realiza una hora antes del anochecer; en el caso de los machos también se revisan para determinar cuales están maduros y aptos para poder extraer el espermatóforo.



**Foto 3 Revisión de gónada a una hembra.**

La extracción del espermatozoide se realiza utilizando la técnica electroestimulación. La cual se realiza por medio de una descargas eléctrica (la cual tiene un voltaje (4-5volt)) y por medio de dos electrodos que se colocan en el quinto par de pereiópodos se da la descarga eléctrica que va a estimular a las ámpulas terminales y se obtendrá la masa espermática.

Teniendo ya hembras en estado IV de madurez gonádica, éstas fueron inseminadas artificialmente y fueron colocadas en los tanques cónicos de 200 L. con un diámetro de 50 cm, que en su interior presentan una estructura de sostén redonda hecha de manguera y malla de 1 cm de abertura de la red. Las hembras próximas a desovar son introducidas en estos tanques, con agua de mar filtrada por cartuchos hasta 5  $\mu\text{m}$  y esterilizada con luz ultravioleta, con aireación constante. Los tanques deben ser llenados dos horas antes ya que se agrega EDTA (Etilenediaminotetraacetato disódico) en una concentración de 10 mg/L con la finalidad de quelar los metales pesados que pudieran estar presentes en el agua de mar. Los tanques son tapados para garantizar las condiciones de oscuridad que requieren las hembras para desovar.

Al término del desove, las hembras fueron regresadas a los tanques de maduración y los huevos se cosechados usando cosechadores con malla de 110  $\mu\text{m}$  colocados en el interior de un depósito de agua. El depósito externo evita el exceso de presión producido por el agua al salir del cosechador.

Una vez cosechados, los huevos fueron contados y transferidos a los tanques de eclosión, los cuales fueron previamente llenados con agua de mar filtrada a 5  $\mu\text{m}$  y esterilizada con luz ultravioleta y con EDTA (10 mg/L).

## 5.2.- Descripción de la cría larval.

Para la cría larval se uso el método Galveston que se creo en 1960'S en laboratorio en el servicio nacional de la pesca el laboratorio en Galveston, Texas con la experiencia del sistema Galveston nos permite tener un mayor control en el sistema de cultivos intensivo.

El método Galveston predomina en el hemisferio oeste para el cultivo de las especies de peneidos: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus setiferus*, *P.schmitti* y *P.Aztecus*.

El sistema galveston se caracteriza por sembrar a altas densidades los nauplios de camarón se recomienda entre (100-150 larvas /L) en tanques de (2000 L) hasta el final del estadio de postlarva (PL5-8) en la cual ya están listas para ser cosechadas.

#### Característica de los Tanques de cría larvaria

Los tanques empleados son rectangulares de 1.50 m de largo, por 50 cm de ancho y 1 m de profundidad, con una capacidad de 400 L, (**Foto 4**) con el fondo cóncavo, de fibra de vidrio revestidos de blanco con pintura epóxica. Presentan un sistema de desagüe que consiste en una llave de 2' colocada en la parte baja anterior del tanque.



**Foto 4. Tinas para desove.**

El área de cría larval trabaja bajo control de foto periodo permanente (se debe de respetar el periodo de oscuridad).

El alimento vivo que se les suministra a las larvas es (fitoplancton y zooplancton)

Las larvas de camarón se han alimentado comúnmente con dos clases de microalgas diatomeas y microflagelados verdes, aun que no se ha logrado la sustitución al 100% debido a que ningún alimento reúne las características físicas (tamaño) y nutricionales.

Cuando empiezan a pasar las primeras protozoa se ajusta el esquema de alimentación establecido por Gallardo, 1995. El primer alimento que requieren los nauplios son la diatomea *Chaetoceros ceratosporum* Se utilizó una concentración inicial de 6,000 cel /ml de diatomea (Comunicación personal E. Alfonso 994).

Como se ha venido mencionando, el Sistema Galveston está basado en un concepto de manejo de una alta calidad del agua combinado con altas densidades de siembra de las larvas de camarón. Por ello se comienza con el 50% del volumen total de agua, dando una densidad inicial de siembra de 100 nauplios de camarón /L. Los aumentos de volumen son de alrededor del 25% del volumen total cada 24 horas, de tal manera que en Mysis I la densidad en el tanque de cría larvaria, ha bajado a 50 organismos/L. Así mismo es necesario tomar los parámetros ambientales al menos dos veces al día, una a las 8 am, y la otra a las 4 pm. Esto se sugiere a partir de que la temperatura máxima del día, se registra durante la tarde.

### Fase Postlarval

Cuando los organismos alcanzaron estadios postlarvales (PL5-PL10), el método de cosecha es similar al empleado en la cosecha de los nauplios vivos. Para ello se usó el dispositivo de recambio de agua. Se utilizó un cosechador de 350  $\mu\text{m}$ , en un cosechador que se deja inmerso en un recipiente con agua, se baja el nivel al 50% de su capacidad y cuando se alcanza este porcentaje se quita el filtro de 350 $\mu\text{m}$  y se empieza a cosechar las postlarvas.

Una vez cosechadas y concentradas las larvas, se realizó el conteo en submuestras y los animales fueron trasladados a la zona de precría.

### 5.3.- Fase postlarval de la F<sub>1</sub>.

#### 5.3.1.- Diseño experimental y composición de las dietas.

Para la fase postlarval se realizaron 2 experimentos, uno para la progenie animal (F<sub>1</sub> animal) y otro para la progenie vegetal (F<sub>1</sub> vegetal).

El diseño experimental empleado en el experimento 1 (F<sub>1</sub> animal) fue el diseño completamente aleatorizado con 2 tratamientos 5 replicas/tratamiento. Para el experimento 2 (F<sub>1</sub> vegetal), se usó un diseño completamente aleatorizado con 2 tratamientos y 2 réplicas por tratamiento. Las dietas empleadas en ambos experimentos son: DPA: dieta 40% de cp de origen animal marino y 20% de y carbohidratos, como control y DPV: dieta vegetal con 20% de cp vegetal y 40% de carbohidratos, como dieta extrema. Cabe señalar que para el segundo experimento denominado F<sub>1</sub> vegetal, el número de postlarvas inicial fue muy bajo (96 postlarvas)

por lo que no fue posible montar completo el diseño y sólo se montaron 2 tanque de 30 L, con una densidad de 23 organismos/tanque. Para el experimento 1 se contó con un un desove de 20 000 animales, lo cual permitió el manejo de 5 réplicas/tratamiento con una densidad de siembre de 30 camarones/tanque de 30 L.

### 5.3.2.- Formulación, Nutrientes, Aporte Calórico y Perfil de Aminoácidos de las Dietas.

Para evaluar la calidad proteica de una dieta vegetal frente a una dieta animal se utilizaron dos formulaciones (**Tabla 4**), la primera se formuló para contener un 40% de cp animal, sin embargo, en el análisis proximal se obtuvo un 39% de proteína animal (DPA39%). La segunda dieta se formuló para contener un 20% de cp de origen vegetal obteniéndose un porcentaje después de elaborar el análisis proximal del 17% (DPv17%). (**Tabla 5 y 6**).

**Tabla 4. Formulación de los alimentos utilizados en el experimento para la alimentación de las postlarvas y juveniles tempranos del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (g 100g<sup>-1</sup>).**

Dieta DPA 40 %		Dieta DPV20 %	
M. prima	%	M. prima	%
HARINA de PESCADO	19	GLUTEN	7
CONCENTRADO PROTEICO de PESCADO	4		4.5
SUERO DE LECHE	12	ESPIRULINA	4.5
H. CALAMAR	20	CON SOYA	15
PREMEZCLA DE VITAMINAS	1		1
COMPLEMENTO VITAMÍNICO C	0.45		0.45
CAROFILA	0.015		0.015
COLESTEROL	0.5		0.5
LECITINA DE SOYA	2		2
ACHBAC	3.7		6
ALMIDÓN	20		40
ALGINATO	1		1
TALCO	16.335		18.035
TOTAL	100		100

**Tabla 5. Nutrientes (%) y aporte calórico (kjoules g<sup>-1</sup> ps<sup>-1</sup>) de las dietas utilizadas en el experimento para la alimentación de postlarvas y juveniles tempranos del camarón blanco del pacífico *L. vannamei*.**

DETERMINACIONES	DPA 40%	DETERMINACIONES	DPV 20%
Humedad	4.34	Humedad	7.40
Cenizas	22.81	Cenizas	21.87
Proteína	39.50	Proteína	17.53
Grasas	10.37	Grasas	8.68
Fibra cruda	0.00	Fibra cruda	0.00
Hidratos de carbono	22.98	Hidratos de carbono	44.52
Aporte calórico	1416.25	Aporte calórico	1346.40

En todas las formulaciones se mantuvo el mismo porcentaje de lípidos, siendo la proteína y los carbohidratos los factores determinantes en el crecimiento y supervivencia del camarón, actividad enzimática, concentración de metabolitos y aspectos relacionados con la fisiología como lo es el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada.

**Tabla 6. Comparación del perfil aminoacídico de las dietas del experimento para la alimentación de postlarvas y juveniles tempranos del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* con la cantidad de aminoácidos encontrados en el (MÚSCULO) abdominal de *L. vannamei* (Lim, 1993). Y los porcentajes existentes en ambas dietas con respecto al músculo abdominal (%/100 g).**

AMINOÁCIDOS	DPA40%	DPV20%	MÚSCULO	DPA40%	DPV120%
Esenciales AAE					
Arginina	5.17	5.63	7.5	68*	100
Histidina	1.96	2.08	1.9	100	100
Isoleucina	3.78	3.57	3.6	100	100
Leucina	7.77	7.73	6.5	100	100
Lisina	7.22	5.27	6.4	100	76
Metionina	2.46	1.28	2.6	96	39*
Fenilalanina	4.13	4.97	3.6	100	100
Treonina	4.23	4.14	3.4	100	100
Triptófano	1.09	1.22	1.1	100	100
Valina	4.56	4.25	3.8	100	100
No Esenciales AANE					
Ácido Aspártico	8.77	9.98			
Ácido Glutámico	15.82	20.86			
Serina	4.69	5.39			
Cisteína	0.44	0.62	0.7	57	93
Glicina	4.99	5.37			
Alanina	5.18	5.02			
Tirosina	3.48	3.02			
AAE/AANE	0.98	0.80			

Nota: estas pruebas se realizaron por laboratorios contratados.

\*primer aminoácido limitante

### 5.3.3.- Dispositivo experimental.

Para el experimento denominado F<sub>1</sub> vegetal se contó con un dispositivo experimental de 4 tanques blancos cuadrados de 30 L de capacidad en los cuales se sembraron 23 organismos/tanque.

Mientras que el experimento denominado F<sub>1</sub> Animal contó con 14 tanques blancos de 30 L de capacidad, las cuales tienen una densidad de 30 organismos/tanque; De los cuales en cada una de las dietas se contada con 2 tanques para poder realizar muestreos en el tiempo y así calcular la cantidad de alimento a suministrar además de realizar la biometría y tomar las muestras que se utilizaron para poder medir la diferencia de concentraciones de la Proteína,  $\alpha$  Amilasa y Tripsina en hepatopáncreas, estos muestreos se realizaron cada 15 días teniendo en total 3 muestreos así llegando a juvenil temprano, (el análisis de las muestras se realizo después de no mas 30 días).

El manejo de la calidad de agua empleada para el experimento fue el siguiente, se contó con filtros de arena, filtros de cartuchos que van desde las 30 mm hasta las 5 micras, éstos se colocaron en la entrada principal del agua proveniente del mar, mientras que en la segunda fase que es de los contenedores interno (Rotoplas 500 l, y un reservorio de 400 l) se contó con la segunda etapa de filtrado la cual estuvo formada por un filtro mecánico (fibras), un filtro biológico, y el filtro químico constituido por el C activado (estos tres de la marca ZOO), además de un desproteinizador, y solo después de 24 hr de haber sometido el agua a este tratamiento y aireación continua es que se usa el agua para hacer el recambio al 50 % diario a cada tara, para mantener los parámetros físico-químicos constantes y en niveles óptimos para los organismos. Los parámetros que se registraron a diario fueron temperatura, salinidad, oxígeno, pH, NH<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub> siendo solo la temperatura medida 3 veces al día (8:10 am, 2:10 pm y 8:10 pm.), mientras que los demas se tomaban a las 7:45 am.

El manejo que se tuvo para los organismos estuvo basado en una alimentación de 3 veces al día, teniendo horas fijas que son las 8:00 am. 2:00 pm. y 8:00 pm. Al igual que una limpieza a base de un recambio al 50 % del volumen de las taras el cual se realizada a las 10:00 am para retirar el exceso de alimento y las excretas, y mantener así los parámetros físico-químicos antes mencionados en niveles óptimos para los

organismos; El dispositivo contó con aeración continua por medio de difusores y air life.

Se realizaron 3 muestreos en la F1 Animal a lo largo del experimento con un intervalo de tiempo de 15 días entre cada uno, tomándose al azar 1 tina de cada tratamiento (DPA y DPV) por muestreo, para así poder recalcular la ración de alimento la cual fue inicialmente del 150% de la biomasa, al los 15 días 80 % de la biomasa para terminar con un 20 % de biomasa por tara, en cada uno de los muestreos se midió la supervivencia, y se realizó una biometría basada en diferentes indicadores, estos indicadores zootécnicos fueron crecimiento (en peso) y supervivencia, y solo en el ultimo muestreo se realizó la parte fisiológica (consumo de oxígeno, excreción nitrogenada) además de tomar muestras para poder hacer los análisis bioquímicos de los organismos (actividades enzimáticas y metabolitos).

#### 5.4.- Parámetros a Evaluar.

##### 5.4.1.- Indicadores zootécnicos.

La supervivencia se obtuvo a partir de la diferencia entre los 30 organismos sembrados en cada tina a inicios del experimento y los que quedaron vivos en el último muestreo y fue representado como porcentajes.

La evaluación de crecimiento se realizó a partir del peso húmedo restando el peso húmedo inicial, el cual cabe mencionar que es obtenido de un promedio de 50 organismos del mismo lote, ya que el uso de animales tan pequeños no nos permiten tener un peso individual ya que la manipulación a este nivel provoca una alta mortalidad es por eso que el peso inicial es el mismo para todas las replicas.

##### 5.4.2.- Indicadores fisiológicos.

El consumo de oxígeno y la excreción amoniacal se determinó al finalizar los experimentos usando los juveniles tempranos (PL<sub>60</sub>), para lo cual se usó un respirómetro de sistema abierto, utilizando 10 cámaras con capacidad de 140 ml, en las cuales en 9 se les colocó 1 camarón, y se mantuvo una cámara control. Las determinaciones se realizaron por medio de las diferencias en la concentración de oxígeno y de amonio en el agua de entrada y salida de las cámaras y conociendo la velocidad (constante promedio de 10 ml por min.) y temperatura (28<sup>o</sup>± 1 C) (Rosas et al., 1999)

$$VO_2 = \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}}) * \text{Flujo}\} - \{([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}})_{\text{control}} * \text{Flujo}_{\text{control}}\}$$

$$N = \{([N-NH_3]_{\text{salida}} - [N-NH_3]_{\text{entrada}}) * \text{Flujo}\} - \{([N-NH_3]_{\text{salida}} - [N-NH_3]_{\text{entrada}})_{\text{control}} * \text{Flujo}_{\text{control}}\}$$

Donde  $VO_2$  es el consumo de oxígeno expresado en mg de  $O_2$  por hora por animal,  $[O_2]_{\text{entrada}}$  es la concentración en mg por litro de  $O_2$  en el agua que entra a la cámara respirométrica,  $[O_2]_{\text{salida}}$  es la concentración en mg por litro de  $O_2$  en el agua sale de la cámara respirométrica, N es la excreción de amonio en mg de amonio por hora por animal,  $[N-NH_3]_{\text{entrada}}$  es la concentración de nitrógeno en mg por litro en el agua que entra a la cámara respirométrica,  $[N-NH_3]_{\text{salida}}$  es la concentración de nitrógeno amoniacal en mg por litro en el agua que sale de la cámara respirométrica, F es la velocidad o flujo del agua que pasa a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora (Rosas et al 1999).

Para la determinación de la excreción amoniacal se tomaron alícuotas del agua de cada una de las cámaras respirométricas antes de ser introducidos los organismos a las cámaras y después del minuto 20 de haber medido consumo de oxígeno. La excreción amoniacal es la diferencia en la concentración de amonio en el agua de las cámaras al inicio y a finales de este periodo, las muestras de agua fueron congeladas dentro de tubos Ependorff hasta ser procesadas en un tiempo siempre menor a 12 días (Rosas et al 1999).

La medición del amonio se realizó colorimétrica mediante el método de azul de indofenol (Parson et al., 1992 ), donde se adicionan en los posos de microplaca 250  $\mu\text{L}$  de la muestra, seguidamente se le adiciona 10  $\mu\text{L}$  de solución de fenol y agitar, seguidamente adicionar 10  $\mu\text{L}$  de nitroprusiato, agitando nuevamente y se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad, posteriormente leer la absorbancia a 640 nm. A partir de estas variables, se obtiene la información necesaria para poder determinar la energía bio-digerible (Rosas et al 1999).

$$EB = END + ED [ExNF(E_{\text{EXC-AY}} + E_{\text{ENPA}}) + ER (E_{\text{RUT}} + E_{\text{ICA}}) + EN + E_{\text{EXV}}]$$

Donde:

EB= Energía Bruta

END= Energía no Digerible

ED= Energía Digerible

ExNF= Energía perdida por Excreciones no Fecales

E<sub>EXC-AY</sub>= Energía Perdida por Excreción Amoniacal del Ayuno

E<sub>ENPA</sub>= Energía Perdida por Excreción Amoniacal Pos-alimenticia

ER= Energía Perdida por Respiración

E<sub>RUT</sub>= Energía Perdida por Metabolismo de Rutina

E<sub>ICA</sub>= Energía Perdida por Incremento Calórico Aparente

EN= Energía Neta

E<sub>EXV</sub>= Energía Perdida por Exuvia

RE= energia retenido

#### 5.4.3.- Bioquímica.

Para la medición de las actividades enzimáticas en los muestreo se obtuvieron los hepatopáncreas, cada uno de los organismos se pesaron en una balanza analítica (Ohaus®±0.0001g) para obtener el peso húmedo promedio y se almacenaron en microtubos Ependorff™ manteniéndose en nitrógeno líquido (-70°C) hasta el momento de su análisis.

Para preparar los extractos de las postlarvas y de sus hepatopáncreas se les adicionó a cada microtubo 500 µL de agua destilada y se homogeneizaron las muestras sobre hielo por 1 minuto con un "rotor" a velocidad máxima. Seguidamente se centrifugaron 10 minutos a 14 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante (extracto crudo) se separó por decantación el cuál fue en parte utilizado para medir la actividad enzimática de la tripsina y quimotripsina. Del mismo sobrenadante se tomaron 100 µL y se diluyeron en 900 µL de agua destilada obteniendo una dilución (1:10) y fueron utilizadas para medir la actividad de la α-amilasa, metabolitos y proteína total Geiger R., (1988), El procesamiento de las muestras se llevó a cabo manteniendo en todo momento las muestras a baja temperatura para evitar la desnaturalización de las enzimas y los extractos crudos y diluidos fueron utilizados inmediatamente para su análisis.

Las determinaciones para la tripsina y quimotripsina se realizó por el método Geiger R., (1988) a partir de los extractos crudos, estos métodos se usaran en la lectura directa en el espectrofotómetro debido a que sus reacciones son rápidas en las cuáles se

evaluaran la aparición de los productos de la reacción entre las enzimas y los sustratos. La actividad de la tripsina se determinó con BAPNA (Benzoil—Arginine—ParanitroAnilide) (Sigma B7632) 100mM como sustrato en un amortiguador TRIS 0.1 M, pH 8. La tasa de hidrólisis del sustrato se midió como el incremento en la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic modelo 21D a 405 nm durante dos minutos, obteniéndose la diferencia en absorbancia entre el primer minuto y el segundo utilizándose un coeficiente de extinción  $\epsilon_{405} = 1.02 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Geiger, 1988). Una unidad fue definida como la actividad correspondiente a 1  $\mu\text{M}$  de p-nitroaniline liberado en un minuto.

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa se realizó de acuerdo al método Bernfeld, (1955) con glucógeno de ostión (Sigma G8751) como sustrato al 1% preparado con un amortiguador fosfato 10 mM , pH 7. En donde se incubaron las muestras a 37°C por 45 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm (Bernfeld, 1955). La unidad de actividad de la  $\alpha$ -amilasa se definirá como miligramos de maltosa liberados en un minuto a 37°C.

Para la determinación de la proteína se usó el método Bradford, (1976) con la utilización del kit (proteína Bio-Rad-500-0006). Se determinó la concentración de proteína soluble a través de la acción de una solución ácida de color, el azul de Coomassie, el cual se liga a los aminoácidos primariamente básica y aromática, especialmente la arginina. Las muestras fueron leídas después de 10 minutos con un filtro de 595 nanómetros. Se colocó 10  $\mu\text{L}$  del extracto crudo en un pozo de las microplacas por triplicado para cada muestra y posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del la solución reactiva del kit, se dejó incubar 10 minutos y se leyó en un lector de la marca Biorad modelo 550 a 595 nm.

#### 5.4.4.- Electroforesis.

##### Preparación del Extracto

Para la preparación del extracto se usó 0.5 g de hepatopáncreas, el cual fué homogenizado en 500  $\mu\text{l}$  de buffer tris-ácido fosfórico 0.06-0.03 mol/k pH=7 en proporción 1:1 (p:v), usando un homogenizador mecánico.

Se centrifuga por 5 minutos a 20,000 rpm y 4° C y El sobrenadante se recuperó y se mantuvo a -40° C, para su posterior análisis.

## Preparación de los Geles de Poliacrilamida

Se utilizó la técnica reportada por Davis, 1964, con algunas modificaciones, el gel concentrador que se utilizó fue el descrito en Walker et al., 1994. El agua utilizada es ultrapura, la solución C se cambió por una solución de acrilamida 30% comercial marca Biorad (Catalogo 161-0158).

Se utilizaron geles al 10% se depositaron 10 µl de muestra con 10 µl de azul de bromofenol, se utilizó un voltaje de 250 V durante 3 a 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de corrida, los geles se incubaron en ácido bórico al 3% durante 10 minutos posteriormente los geles se colocaron en una solución de almidón-agar 1% soluble en buffer fosfato ph 6 y fueron incubados durante 30 min a 37° C.

El revelado de los geles se realizó retirando la solución de almidón-agar y agregando lugol diluido en agua ultrapura en proporción 1:5 en el cual se mantuvieron hasta que las bandas fueron visibles, momento en el cual se retiró el lugol, los geles son fijados con una solución de ácido acético 7.5% y lavados con etanol al 10%.

A partir de 0.5g los hepatopáncreas se extrae el contenido de amilasas, las bandas observadas de electroforesis son isoformas que corresponden a los aleles del mismo gen. Esos aleles (en el sentido del concepto mendeliano) se identifican (Arenas et al., 2002) a pesar del sistema multi-genético de las amilasas (genes 27, 20 y 4) (Santos et al., 1997), los Alelos se identifican ya que pertenecen a un lugar geométrico del gen (Arenas et al., 2006).

En caso de la frecuencia alelicas de varios genes (27, 20 y 4) (FA) vendría como:

$$FA(\text{gene}27) + FA(\text{gene}20) + FA(\text{gene}4) = 1$$

Con los álelos correspondientes:

f y g para el gene 27

e y d para GEN 20

c para el gene 4

Para los alelos a y b no hay secuencia sabida y después se reúne en el sistema I. El resto de los alelos se reúnen en el sistema II a menos que el Alelo c del alelo C. se deba ligar a una utilización de una dieta que contenga el nivel bajo del carbohidratos (Arena et al., 2002).

En caso de varios genes y de una ausencia de alelos verdaderos en el término mendeliano, eso restringiría la interpretación a los isoformas con la expresión diferenciada de diverso lugar geométrico de los genes de la amilasa.

Los resultados fueron expresados en frecuencias alélicas (Fr) mediante la fórmula:

$$Fr = \frac{2(\text{homocigotos}) + \text{heterocigotos}}{2(n)}$$

n= número de organismos

Para conocer si las diferencias entre los valores de las frecuencias alélicas es significativa, fueron comparados con  $\chi^2$  utilizando la siguiente formula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-e)^2}{e}$$

O= frecuencias observadas, e= frecuencias esperadas

## **6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de cómputo Microsoft Excell; Statistica, StatSoft, Inc. (2004) aplicando las pruebas de ANDEVA (Zar, 1999) de bloques anidados cuando se cumplan los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, y en caso de no cumplir es cuando se usó la prueba de Mann-Witney (primer experimento) y Origin® 6.0, Microcal. USA. En todas las pruebas estadísticas se trabajó con una probabilidad de 0.05 ( $p > 0.05$ ), cuando esta probabilidad fue menor se indico como ( $p < 0.05$ ); Y la aplicación de Arcoseno en los valores expresados en porcentaje y pruebas de  $x^2$  para las frecuencias alélicas.

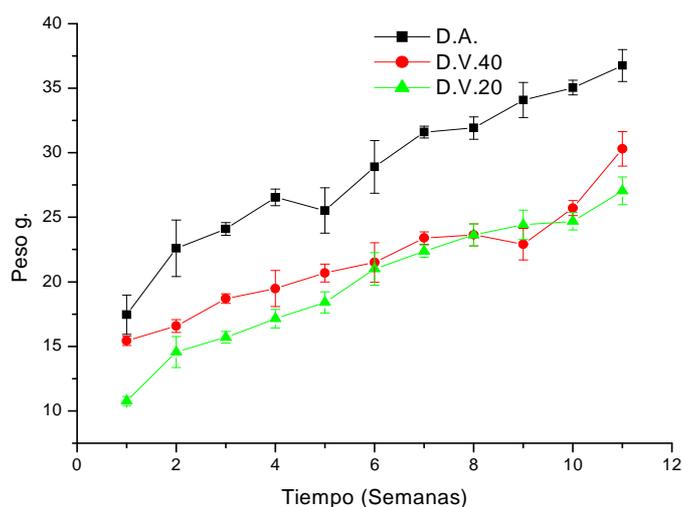
Para análisis estadístico los parámetros del balance bioenergético, se empleó el ANDEVA de bi-factorial el 2x2 (2 para el factor progenitores y 2 para el factor dieta) la prueba para la ponderación de las medias es la de Bonferroni.

Para la supervivencia se aplicó una la transformación de de Arcoseno en los valores expresados en porcentaje y así usar la pruebas de  $x^2$

## 7.- RESULTADOS.

### 7.1.- Obtención de la F<sub>1</sub>.

Los resultados del crecimiento de los juveniles adaptados, desde Pl<sub>15</sub> a tres alimentos artificiales (Brito, en proceso y Garfias, en proceso) señalan que a largo plazo, los camarones alimentados con la dieta con 40% de cp animal marina y 20% de carbohidratos llegaron a los 35 g de peso promedio. Aquellos juveniles alimentados con 40% de cp vegetal y 20% de cbh, llegaron muy cerca de los 30 g, mientras que los camarones alimentados con 20% de cp vegetal y 40% de cbh, no alcanzaron a llegar ni a los 30 g (**Fig. 1**). En lo que concierne a la supervivencia (**Tabla 7**) los valores mas bajos (72%) de todos fueron para los organismos alimentados con la dieta animal, mientras que para los organismos alimentados con proteína vegetal la mejor supervivencia es para los organismos de la dieta Vegetal al 20 % (94%) de Proteína superando a los de 40 % de proteína vegetal (82).



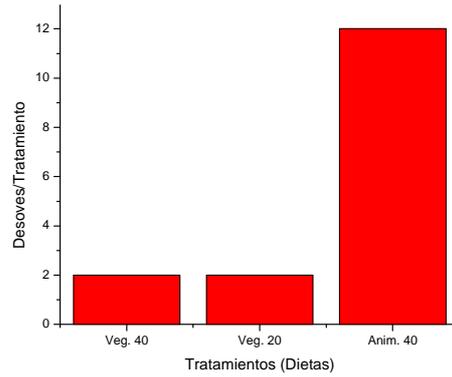
**Figura 1. Ganancia en peso (g) de los organismos de la F<sub>0</sub> de Pécis.**

**Tabla 7 supervivencia de los organismos de la F<sub>0</sub> de Pécis.**

Dieta	Animal 40 CP: 20 cbh	Vegetal 40 :20 cbh	Vegetal 20 :40 cbh
Supervivencia final	77%	82%	94%

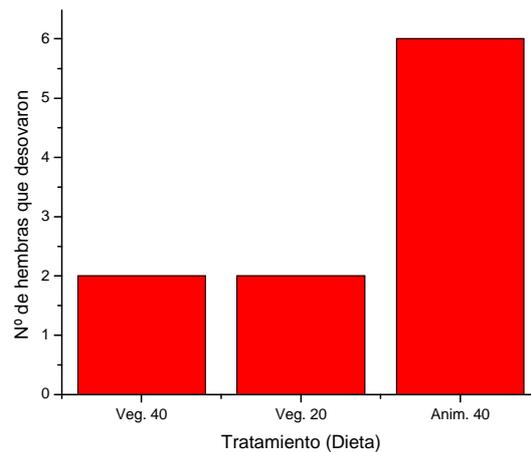
### 7.2.- Reproducción.

La **figura 2** muestra el número de desoves/tratamiento obtenidos en las condiciones experimentales. Como se puede apreciar este indicador mostró valores de 2, 2 y 12 desoves, correspondiente para los animales previamente alimentados con 40% cp Vegetal (40% PV), 20% cp Vegetal (20% PV) y 40% cp Animal (40% PA), respectivamente.



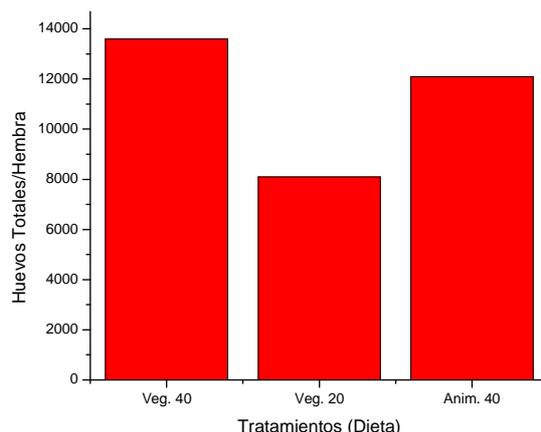
**Figura 2. Efecto del Tipo de alimento en los desoves/tratamiento de adultos de camarón Blanco del Pacífico (*L. vannamei*) mantenidos en condiciones experimentales.**

El número de hembras que desovó en las dietas 20%, 40 % de cp vegetal, fue similar (2 organismos de 6 que es el total, en cada tratamiento). En el tratamiento 40% de cp animal, todas las hembras maduraron y desovaron (Fig.3).



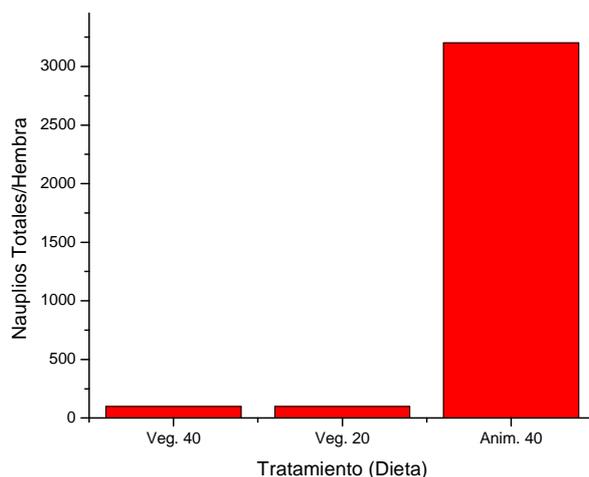
**Figura 3. número de organismos que tuvieron desoves por los diferentes tratamientos por dieta de adultos de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) mantenidos en condiciones experimentales.**

En contraste el número de total de huevo por hembra resultó ser mayor en los animales previamente alimentados con 40% PV a pesar de que en este tratamiento únicamente se registraron 2 desoves al igual que con el tratamiento de 20% PV (Fig. 4).



**Figura 4. Efecto del Tipo de alimento en el total de huevos/hembra de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) Mantenidos en Condiciones Experimentales.**

La calidad de un desove puede ser cuantificado a partir del número de nauplios obtenidos. Como se puede apreciar el número de nauplios totales/hembra fue afectado por el tratamiento nutricional previo a la maduración, con valores que resultaron ser muy superiores en los animales alimentados con 40% PA (3000 nauplios/hembra) en comparación con los obtenidos en los animales alimentados con 20% PV (66 nauplios/hembra) más aun, considerando que el índice de mortalidad para los Nauplios de este tratamiento fue del 100% o(66 nauplios/hembra) (Fig. 5).



**Figura 5. Efecto del tipo de alimento sobre la supervivencia en nauplios totales/hembra de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) mantenidos en condiciones experimentales.**

### 7.3.- Cría larval.

Para obtener las postlarvas requeridas para la presente investigación, se realizaron 2 crías larvarias, una correspondiente al tratamiento de 40% de cp animal y

la otra proveniente del tratamiento de 40% de cp vegetal. Cabe señalar que para los desoves de las hembras provenientes del tratamiento de 20% de cp vegetal y 40% de cbh, la supervivencia larvaria fue nula por lo cual no hubo producción de postlarvas para ese tratamiento (**Tabla 8**). Para ambas crías larvales se observó una baja supervivencia en las postlarvas de 15 días de edad, Sin embargo la dimensión en magnitud de las consecuencias de las bajas supervivencias fue muy diferente, ya que en el caso de las postlarvas provenientes de padres alimentados con 40% de cp animal (F<sub>1</sub>A) fueron lo suficientemente numerosas para montar el experimento completo de alimentación (capítulo 2 de la presente investigación) mientras que las provenientes de los progenitores alimentados con la dieta con 40% de cp vegetal, fueron insuficientes para montar todas las réplicas programadas, lo cual redujo algunas posibilidades de comparación entre origen de la progenie , como se describe más adelante.

**Tabla 8. Supervivencia de larvas procedentes de la F<sub>0</sub> Pecis con diferentes dietas**

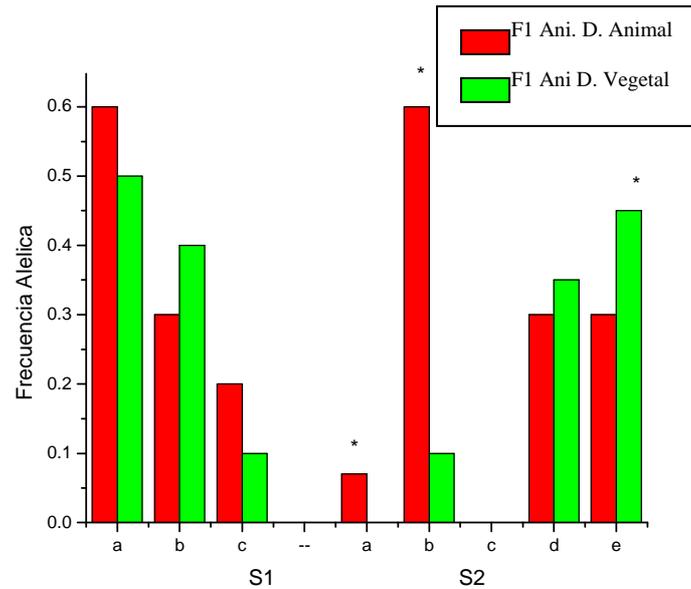
	D. Animal 40 % Prot.	D. Vegetal 40 % Prot.	D. Vegetal 20 % Prot.
Nº de nauplios	37 000	400	0
Nº de postlarvas Pl (15)	13 500	98	0
Supervivencia	36.5 %	24.5 %	0 %

#### 7.4.- EXPERIMENTOS DE LA FASE POSTLARVAL DE F<sub>1</sub> (UNAM-Sisal).

7.4.1.- Adaptación bioquímica a los cambios de la composición del alimento.

##### **Electroforesis de la $\alpha$ -amilasa.**

El patrón electroforético observado en todos los casos coincide con estudios anteriores, en el cual se encuentran representados dos sistemas, uno (S1) con tres alelos **a**, **b** y **c** y un segundo (S2) con 5 alelos nombrados de la **a** a la **e**. En los cuatro casos estudiados el S1 no presenta modificaciones. Los organismos provenientes de camarones alimentados con proteína animal, muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas del sistema dos en el alelo **a**, y **b**, hay que resaltar que los alelos **a** y **c** no se expresan cuando los animales son alimentados con proteína vegetal. Por otro lado el alélo **b** se induce con la dieta con proteína animal (**Fig. 7**).

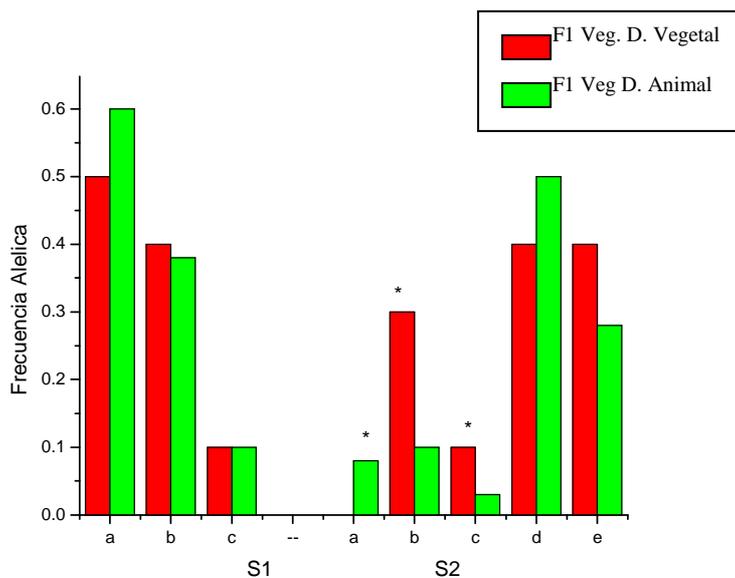


**Figura 7. F1 Animal, con 2 regimenes alimenticios 1 proteína animal y 2 proteína vegetal.**

Los organismos provenientes de camarones alimentados con proteína vegetal, muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas del sistema dos en el alelo a, b y c, hay que resaltar que el alelo a no se expresa cuando los animales son alimentados con proteína vegetal. Por otro lado el alelo b se induce con la dieta con proteína animal (**Fig. 8**).

En ambos casos los alelos más sensibles al alimento son a, b y c en el sistema dos.

Es importante mencionar que estos organismos son hermanos completos de tal forma que las variantes en las frecuencias pueden ser debido al tipo de alimento o a la deficiencia que presentaron los alimentos en alguno de los amino ácidos.



**Figura 8. F1 Vegetal, con 2 regimenes alimenticios 1proteína vegetal y 2 proteína animal.**

A partir de la frecuencia calculada se aplico una prueba  $X^2$  para verificar si esta diferencia era estadísticamente significativa.

### **Proteína total y actividad específica de la $\alpha$ amilasa y la tripsina.**

En la **tabla 9** se presentan los valores promedio por tratamiento de la proteína soluble y la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa y la tripsina del hepatopáncreas de los juveniles (PL 59) tempranos provenientes de las 2 progenies, alimentados con los diferentes alimentos. A todos estos parámetros se les aplicó un ANDEVA trifactorial, ya que además de las variables consideradas en la presente investigación (Origen de la progenie y tratamiento dietético) se determinó el estadio de muda en el que estuvieron los camarones muestreados.

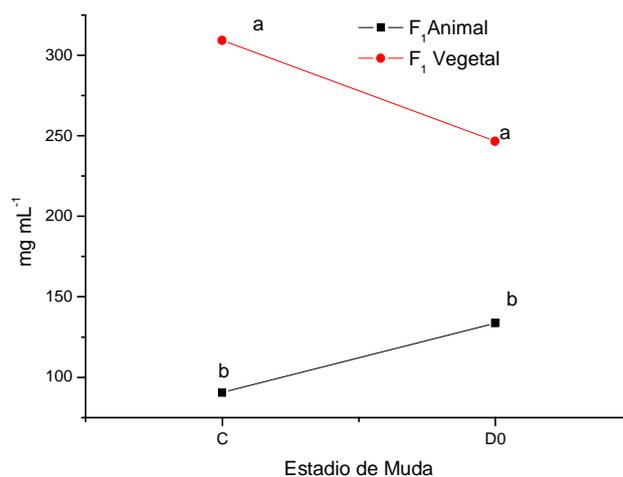
**Tabla 9 Valores promedio por tratamiento de la proteína soluble del hepatopáncreas y la actividad específica de la amilasa y la tripsina.**

Progenie	Dieta	Estadio de Muda	Proteína	$\alpha$ Amilasa	Tripsina
F1 Animal	Animal	C	1.04 $\pm$ 0.15	58.26 $\pm$ 6.06	1.8 $\pm$ .097
		D0	1.37 $\pm$ 0.23	51.17 $\pm$ 12.22	0.9 $\pm$ 0.44
	Vegetal	C	0.93 $\pm$ 0.20	76.68 $\pm$ 16.05	1.5 $\pm$ 0.62
		D0	1.43 $\pm$ 0.17	48.43 $\pm$ 2.55	0.7 $\pm$ 0.38
F1 Vegetal	Animal	C	3.35 $\pm$ 0.63	41.28 $\pm$ 11.99	1.9 $\pm$ 1.18
		D0	2.75 $\pm$ 0.62	46.66 $\pm$ 9.99	2.6 $\pm$ 1.15
	Vegetal	C	3.14 $\pm$ 0.42	35.10 $\pm$ 2.96	1.6 $\pm$ 0.40
		D0	2.39 $\pm$ 0.33	35.10 $\pm$ 2.54	1.5 $\pm$ 0.40

El ANDEVA trifactorial aplicado a la proteína soluble del hepatopáncreas resultó significativo para el factor Progenie y para la interacción de este factor con el estadio muda ( $p < 0.05$ ) (**Tabla 10**), aunque cuando se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tuckey, sólo el factor progenie fue significativo, resultando la progenie vegetal con un valor de proteína significativamente más elevado (4 mg mL<sup>-1</sup>) que para la progenie animal (1.2 mg mL<sup>-1</sup> **Fig. 9**). Para el factor dieta no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ , **Tabla 10**).

**Tabla 10 ANDEVA trifactorial de la proteína soluble del hepatopáncreas (mg mL<sup>-1</sup>).**

ANDEVA					
Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	MS	F	p
Progenie	3.785	1	3.785	37.52	.000*
Dieta	0.048	1	0.048	0.47	0.496
Muda	0	1	0	0	0.994
Progenie*Dieta	0	1	0	0	0.995
Progenie*Muda	0.449	1	0.449	4.45	.041*
Dieta*Muda	0.041	1	0.041	0.4	0.529
Progenie*Dieta*Muda	0.037	1	0.037	0.37	0.548



**Figura 9. Efecto en cantidad de proteína según la Progenie y el estadio de muda. Letras distintas indican diferencias significativas**

Actividad específica de la  $\alpha$  amilasa (Tabla 9)

La actividad específica de la  $\alpha$  amilasa (U mg de proteína) sólo resultó afectada por los factores principales origen de la progenie y dieta ( $p < 0.05$ ), mientras para el factor estadio de muda, no se observaron diferencias significativas. Así mismo, no se detectaron interacciones significativas entre estos factores ( $p > 0.05$ ). La progenie animal (F<sub>1</sub>A) presentó una actividad amilásica significativamente más elevada, que la progenie vegetal (F<sub>1</sub>V). (Tabla 11).

**Tabla 11. ANDEVA trifactorial de la actividad específica de la  $\alpha$  amilasa del hepatopáncreas (U mg de proteína<sup>-1</sup>) de los camarones de *L. vannamei***

	SS	Degr. of	MS	F	P
Ordenada al origen	16.89	1	16.89	705.36	
Progenie	0.19	1	0.19	8.10	0.00*
Dieta	0.003	1	0.003	0.12	0.006*
Muda	0.01	1	0.010	0.44	0.72
Progenie*Dieta	0.01	1	0.013	0.56	0.51
Progenie*Muda	0.02	1	0.021	0.91	0.45
Dieta*Muda	0.002	1	0.002	0.091	0.34
Progenie*Dieta*Muda	0.001	1	0.001	0.076	0.76
Error	1.005	42	0.023		0.78

\*Se muestran diferencias significativas

Actividad específica de la tripsina (Tabla 9).

En relación con la actividad específica de la tripsina (valor promedio 1.76), el ANDEVA tri- factorial no presentó diferencias significativas ni para los factores principales (progenie, dieta y muda) ni en las interacciones ( $p > 0.05$ , Tabla 11).

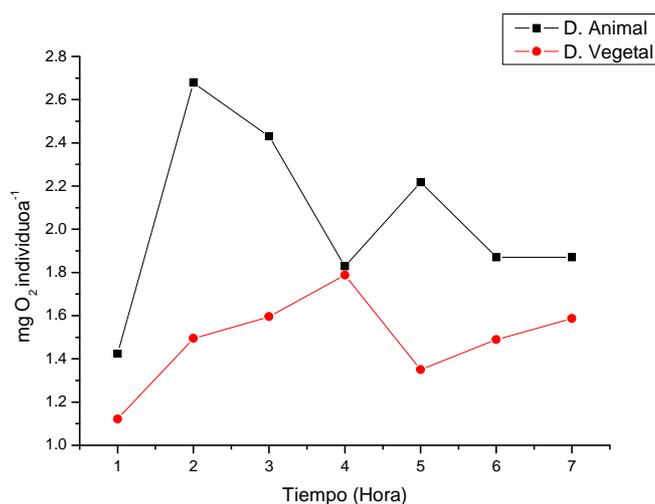
**Tabla 11. ANDEVA trifactorial de la actividad específica de la tripsina del hepatopáncreas (U mg de proteína<sup>-1</sup>) de los camarones de *L. vannamei*.**

ANDEVA	Suma de cuadrados	Grados de libertad	MS	F	P
Progenie	0.827	1	0.827	2.26	0.14
Dieta	0.132	1	0.132	0.361	0.551
Muda	0.078	1	0.078	0.213	0.647
Progenie*Dieta	0.002	1	0.002	0.004	0.949
Progenie*Muda	0.309	1	0.309	0.844	0.364
Dieta*Muda	0.051	1	0.051	0.14	0.711
Progenie*Dieta*Muda	0	1	0	0.001	0.981

#### 7.4.2.- Modelo bioenergético.

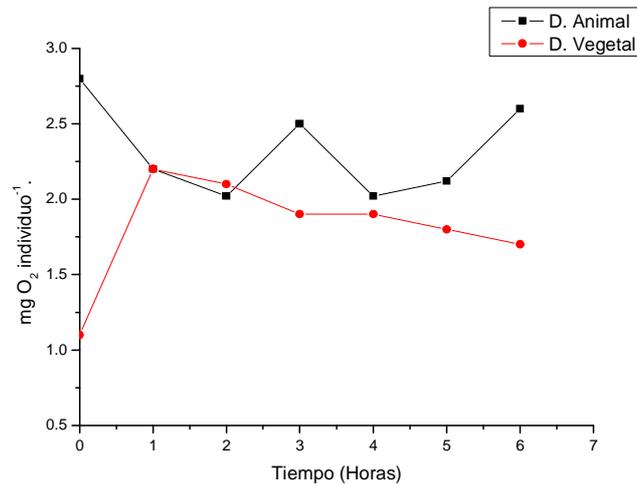
##### Consumo de Oxígeno.

En relación con la evaluación del consumo de oxígeno, se observaron diferencias en los valores registrados para los tratamientos dietéticos de las dos progenies estudiadas. Los picos de consumo de oxígeno post-alimentario cambiaron con la progenie y con la dieta. Para la F<sub>1</sub> A alimentada con la dieta animal, el pico de consumo se observó en la primera hora de alimentación mientras que para los camarones que se alimentaron con la dieta vegetal, el incremento fue más gradual desde la primera hora aunque el consumo máximo se observó al cabo de cuatro horas (Fig 10)



**Figura 10. Consumo de O<sub>2</sub> en F1 Animal Dieta Animal 40 % Prot. c/ 20 CHB VS. Dieta Vegetal 20 % Prot. c/ 40 CHB**

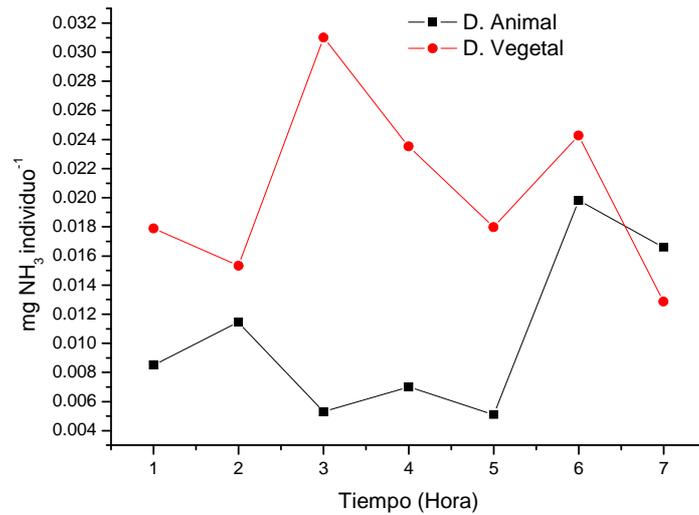
Para la F<sub>1</sub> Vegetal, los camarones alimentados con la dieta animal, no presentaron un pico de consumo de oxígeno post-alimentario, y la medición de ayuno evaluada a las 7 horas de medición fue mas elevada que para la F<sub>1</sub> animal, lo cual denota un comportamiento de los individuos poco usual (**Fig. 11**).



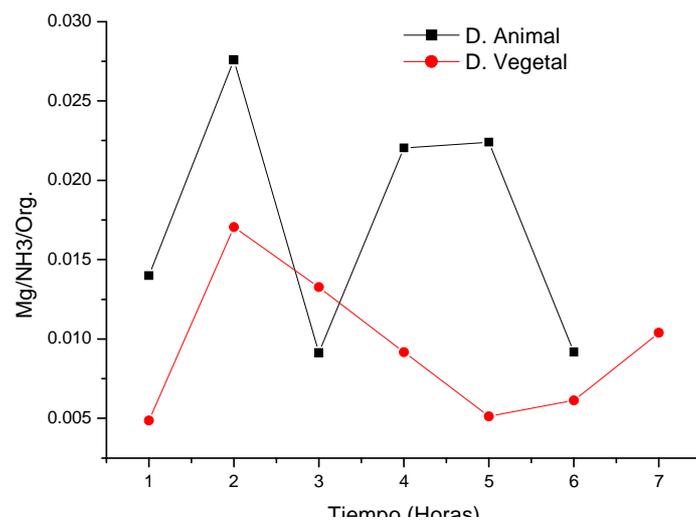
**Figura 11. Consumo de oxígeno en F<sub>1</sub> Vegetal Dieta Animal (40 % Prot. c/ 20 cbh) VS. Dieta Vegetal (20 % Prot. c/ 20 cbh)**

### Excreción amoniacal

Por otra parte en la evaluación de la excreción amoniacal tenemos un comportamiento también diferente entre los tratamientos el cual se muestra a continuación (**Figura 12 y 13**). En este caso en las figura 13 que corresponden a la F<sub>1</sub>vegetal, no se observó un pico de excreción post-alimentaría, sino por lo contrario, fue en los animales en ayuno que se observaron los valores más elevados. Ello implicó la imposibilidad del cálculo de la E<sub>ENPA</sub> en los modelos de balance de estos dos tratamientos.



**Figura, 12 Excreción de NH<sub>3</sub> en F1 Animal  
Dit. Animal 40 % Prot. c/ 20 cbh VS. Dit.  
Vegetal 20 % Prot. c/ 40 cbh**



**Figura, 13 Excreción de NH<sub>3</sub> en F1 Vegetal  
Dit. Animal 40 % Prot. c/ 20 cbh VS. Dit.  
Vegetal 20 % Prot. c/ 40 cbh**

#### 7.4.3.- Modelos de balance bioenergético.

En la **tabla 12** se presentan los resultados de los modelos de balance bioenergético, calculados a partir del consumo de oxígeno y la excreción amoniaca. En este caso se realizó la prueba de ANDEVA bifactorial para evaluar las diferencias entre origen de la progenie y tratamiento dietético, para cada uno de los parámetros del modelo.

**Tabla 12. Modelos de balance bioenergético en Joules/animal/día.**

Procedencia	Dieta	Valor ED.	E. R. (O <sub>2</sub> )		E.NH <sub>3</sub>		E. Crecimiento	
			ERUT	EICA	E <sub>EXC-AY</sub>	E <sub>ENPA</sub>	Er	E <sub>EXV</sub>
F1 Animal	Animal	573.29±75.38	488.75 <sup>a</sup> ±69.13	53.77 <sup>a</sup> ±9.81	11.15 <sup>a</sup> ±5.07	4.81 <sup>a</sup> ±1.69	14.11 <sup>a</sup> ±1.73	0.71 <sup>a</sup> ±0.09
	Vegetal	903.03 ±172.47	775.63 <sup>a</sup> ±171.14	46.27 <sup>a</sup> ±16.30	47.90 <sup>a</sup> ±7.92	5.99 <sup>a</sup> ±0.99	37.36 <sup>a</sup> ±0.40	1.87 <sup>a</sup> ±0.52
F1 Vegetal	Animal	1173.21±208.24	1095.01 <sup>b</sup> ±224.57	8.00 <sup>a</sup> ±46.97	59.75 <sup>a</sup> ±14.88	0.00*	25.20 <sup>a</sup> ± 2.02	1.26 <sup>a</sup> ±0.1
	Vegetal	722.32±69.74	579.83 <sup>b</sup> ±65.30	22.06 <sup>a</sup> ±13.69	102.12 <sup>a</sup> ±8.64	0.00*	17.45 <sup>a</sup> ± 3.06	0.87 <sup>a</sup> ±0.15

Letras diferentes en el superíndice indican diferencias significativas.

\* No se presentó un pico de excreción amoniacal post-alimentaría en estos tratamientos.

Teniendo estos resultados podemos hacer el análisis para cada uno de los parámetros que componen la ecuación del balance expresados en Joules/animal / día con la finalidad de diferenciar entre los gastos de la energía digestible ocupada por los organismos en cada tratamiento.

- El ANDEVA bi-factorial aplicado a la Er Rutina fue significativa solamente para el factor procedencia, F1 vegetal (medio global para ambas dietas: 837.42/J/animal/día) fue mayor que la F1 Animal (media global: 632.19 J/animal/día) ( $p < 0.05$ ), no existiendo efectos en el factor dieta significativos, ni una interacción significativa entre ambos factores ( $p > 0.05$ )
- El ANDEVA bi-factorial para el caso de R-ICA no muestra que el factor procedencia, factor dieta y su interacción no presentan ninguna diferencia significativa ( $p < 0.05$ )
- Para el caso de E<sub>EXC-AY</sub> la prueba de ANDEVA nos reveló que las diferencias son significativas tanto para la procedencia con valores mas bajos para la F<sub>1</sub> Animal (media global para ambas dietas: 59.05 J/animal/día) que la F<sub>1</sub> Vegetal (161.87 J/animal/día) como para la Dieta con valores mas bajos para la dieta Animal (media global para ambas progenies: 29.52 J/animal/día) que para la dieta Vegetal (80.93 J/animal/día) ( $p > 0.05$ ), mientras que la interacción no fue significativa ( $p < 0.05$ ).
- En el caso del E<sub>ENPA</sub> el ANDEVA solo se aplicó en la F<sub>1</sub> Animal en el cual el Factor dieta no presento diferencia ( $p < 0.05$ ). Mientras que para la F<sub>1</sub> Vegetal nunca se presentó el pico de mayor consumo post- alimenticio (la proteína del organismo es la que se ocupa en la forma de ayuno, teniendo así el pico en esta hora, mientras que el declive se va presentando a lo largo del muestreo).

- Para el caso Er (crecimiento) tanto Eexv el ANDEVA no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en ningún factor (Procedencia, Dieta o su interacción).

#### 7.4.4.- Parámetros de zootecnia.

##### Supervivencia

Para la  $F_1$  animal, el porcentaje de supervivencia no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (valor medio 79%  $p > 0.05$ , **Tabla 13**). De la misma manera los valores de la supervivencia para la  $F_1$  Vegetal, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (valor medio 49.5%  $p > 0.05$ , **Tabla 14**).

**Tabla 13; De crecimiento y de supervivencia de la  $F_1$  Animal para DPA y PDV y para  $F_1$  Vegetal para DPA y DPV.**

		Peso inicial	Peso final	Supervivencia
F1 Animal	D. Animal	0.0042±0.001	0.21±0.01	89.10%
	D. Vegetal	0.0042±0.001	0.18±0.01	69.50%

**Tabla 14. Prueba de Mann Whitney para la  $F_1$  Animal (Prueba de Mann-Whitney con una sig. menor a  $p < 0.05$ )**

S. de Anim.	S. de Veg.	nivel de p	Z ajustada	nivel de p	Valid N Anim.	Valid N Veg.
13858	14583	0.071814	1.800303	0.071814	108	130

##### Crecimiento

El análisis de los datos de crecimiento en peso, para la  $F_1$  Animal la prueba no paramétrica (Mann-Whitney) no arrojó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las dietas (valor medio 0.19).

Mientras que para la  $F_1$  Vegetal el ANDEVA de una vía mostró diferencias significativas entre de la interacción de progenie dieta ( $p > 0.05$ ). El peso final promedio significativamente más elevado ( $p < 0.05$ ) se obtuvo en los camarones alimentados con la dieta animal (0.7 g, **Tabla 15**).

**Tabla 15. De crecimiento de la F<sub>1</sub> Vegetal para DPA y PDV ANDEVA con la prueba de Tuckey para la F<sub>1</sub> Vegetal**

ANDEVA					
Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	MS	F	p
Inter.	18.95	1	18.94	270.67	0.00*
D. Anim.	0.35	1	0.35	5.08	0.03*
D. Veg. (D. Anim.	1.24	2	0.62	8.85	0.001*
Error	2.87	41	0.07		

\*Demuestra diferencias significativas

		Peso inicial	Peso final	Supervivencia
F1 Vegetal	D. Animal	0.0042±0.001	0.72 <sup>a</sup> ±0.16	50%
	D. Vegetal	0.0042±0.001	0.54 <sup>b</sup> ±0.10	49%

## 8.- DISCUSIÓN.

La influencia de los nutrientes en la expresión genética de la actividad de las enzimas relacionadas con la digestión del alimento y su repercusión en la descendencia de los camarones de *Litopenaeus vannamei* ha sido demostrada en el camarón blanco del Pacífico. (Arenas et al., 2003)

8.1.- Influencia de diferentes alimentos balanceados en los progenitores de *Litopenaeus vannamei*.

Los resultados obtenidos en relación con el desempeño de los reproductores, sometidos desde la etapa de postlarvas, juveniles y preadultos, a tres diferentes alimentos, muestra que tanto cambios en la calidad y calidad proteica, así como los niveles de carbohidratos, impactan no sólo el crecimiento y la supervivencia, sino su desempeño reproductivo. En lo que respecta a los carbohidratos, el hecho de que los camarones hayan sido alimentados con una dieta de 20 % de cbh (almidón principalmente) (Devresse, 1998), se forzó una adaptación para asimilación de esta cantidad de cbh y que la actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa se expresó en varias iso-formas (LeMoullac et al., 1997). Por otro lado, desde el punto de vista ontogenético la adaptación a las dietas en la etapa larval, puede modificar la expresión fenotípica de la  $\alpha$ -amilasa impactando a las demás etapas del ciclo de vida, en particular en juveniles tempranos. Las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa que se activan en la fase larval, son producto de la inclusión de los almidones presentes en las microalgas, en la vida silvestre, lo cual refleja la modulación de los alimentos, (Le Moullac et al., 1997 y Arena et al., 2004).

La originalidad de la presente investigación, reside en el control de la nutrición es desde postlarvas en la generación F<sub>0</sub>, de los reproductores y del control en los descendientes F<sub>1</sub>. y el impacto de la nutrición es sobre:

- En las Pl
- En los juveniles tempranos
- Juveniles tardíos
- En los de los reproductores
- En los descendientes

A partir de estos resultados, surge la interrogante en relación con hasta que punto el camarón podría guardar una adaptación a una dieta específica, entonces es necesario considerar el proceso de la selección, para el mejor aprovechamiento de los cbh, como lo muestra Arena, (2005) en animales silvestres los cuales tienen una gran capacidad de aprovechamiento para este nutriente.

El presente trabajo muestra información sobre la adaptación de *L. vannamei* a dietas extremas, a nivel genético que se ve reflejada en la plasticidad del fenotipo regido por el gen de la  $\alpha$ -amilasa el cual tiene la capacidad de expresarse, si se aplica cierto tipo de alimento, como se pudo observar en el ostión, donde la expresión de este gen fue influenciada por una dieta específica (Samain, 2001); lo cual lleva a pensar en la potencialidad que tienen los juveniles para expresar este gen y así poder usar los CBH como fuente de energía por crecimiento minimizando el uso de las proteínas.

Una de las preguntas implícita del proyecto es la influencia que ejercieron las diferentes dietas- i) DPA: 40 % :20 % de cbh; ii) DPV 40 % : 20 % de cbh y iii) DPV 20 % :40 % cbh sobre los organismos reproductores.

A lo cual reevidencia en los resultados en la siguiente **Tabla 16**:

**Tabla 16. De rendimiento de los reproductores.**

%CP	DPA40	DPV40	DPV20
Talla	50g	40g	30g
Capacidad de maduración	++++	++	-
Desoves	+++	+	-
Viabilidad de larva	++	-	-

Algo a resaltar sobre los resultados obtenidos en los reproductores es que la dieta es factor importante, pero no sólo en lo referente al rendimiento de desove, si no en el crecimiento, el cual afecta directo al desove

La influencia del alimento puede no ser directa sobre la reproducción, ya que este proceso más bien es determinado por otros factores como puede ser el

desarrollo general del organismo, ya que la dieta influye directamente en el crecimiento del organismo y presenta un impacto directo en la capacidad de maduración, y el buen desarrollo necesita ciertas condiciones; por ejemplo, la maduración del ovario depende de la talla según la especie. Así se reporta desde los 6g para *P. merguensis*, 25g para *P. japonicus*, 35-50g para *L. vannamei*, *P. stylirostris*. Después de la ablación del pedúnculo ocular la maduración puede suceder antes que alcance el peso de 15 g para *P. aztecus*, 45g para *P. monodon* (90g en el silvestre) y 20g para *L. vannamei* (Aquacop, 1985). Ello permite concluir que la diferencias en el rendimiento de la reproducción de los organismos de la presente investigación pudo ser influido por los cambios en la dieta a través de las diferencias en el crecimientos.

La **Tabla 16** resume la diferencia observada, y hay que resaltar el hecho que una alimentación normal de la maduración, no podría compensar en todo las “deficiencias” existentes en su desarrollo de Pl a juvenil tardío.

Desde un punto de vista alimenticio, se pueden señalar dos aspectos principales que pudieron influir el estado nutricional de los progenitores: El patrón de aminoácidos y el cociente n-3/n-6 de los ácidos grasos poli-insaturados (González Félix et al., 2003) En la primer observación, la proteína marina tiende a proporcionar más aminoácidos esenciales que otras fuentes (como la obtenida en la proteína vegetal), y debido la inclusión de tales aminoácidos se observo el mejor desempeño reproductivo con esta clase de fuente de la proteína. La segunda observación se refiere a los ácidos grasos y al hecho de que una buena maduración depende de una relación óptima n-3/n-6 tal como la que está presente con el alimento fresco (calamar, mejillón, gusanos), debido a esto es que la dieta DPA40 proporcionó definitivamente una relación n-3/n-6 mayor que las dos dietas DPV debido a que la combinación del aceite de pescado junto con la harina de pescado contiene mas ácidos grasos de la serie n-3 (**Tabla 17**).

**Tabla 17. Cociente de amino ácidos.**

	PA40	PV40	PV20
n-3/n-6	~1	~0.5	~0.5

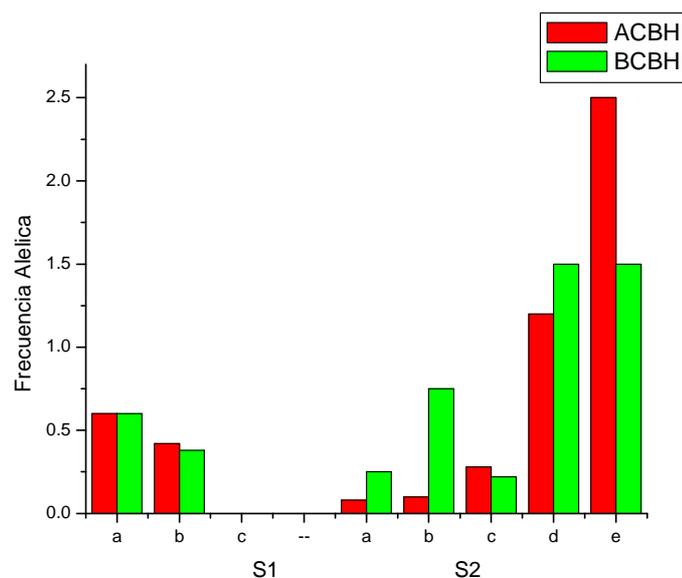
Lo anterior nos muestra la influencia que tienen las dietas sobre el metabolismo en las Pl, se puede ver reflejado en juveniles (Paoloni et al., 2003). En las larvas se observa un cambio morfológico de los túbulos digestivos anteriores los cuales presentan una función para producir las enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasa y las proteasas); hasta la etapa MIII y al final de esta etapa es cuando la formación de una zona lateral en la que se hace presente la formación del hepatopáncreas. La formación de los túbulos, hepatopancreáticos durante la fase postlarval (hasta Pl de 35 días) dará una alta capacidad de digestibilidad a los camarones (Lovett y Felder, 1989). Es en este tiempo cuando se presenta la alta capacidad de adaptación a las dietas (ya que los requerimientos dietarios se modifican según la edad), ya que los peneidos presentan esta característica. por efecto de cambios biotopos que están presentes en su ciclo de vida, y de lo que derivan de las adaptaciones naturales que tienen a realizar de sus hábitos alimenticios los cuales pueden presentar de generación en generación según la dieta a la cual sean sometidos, (Arena et al., 2003), lo cual deberá ser comprobado en posteriores investigaciones.

## 8.2.- Genética cuantitativa.

Los cambios en la frecuencia alélica en las isoformas de la  $\alpha$  amilasa, confirman la hipótesis de que la expresión genética, puede estar modulada en cierto grado por la dieta a la cual son sometidos los organismos.

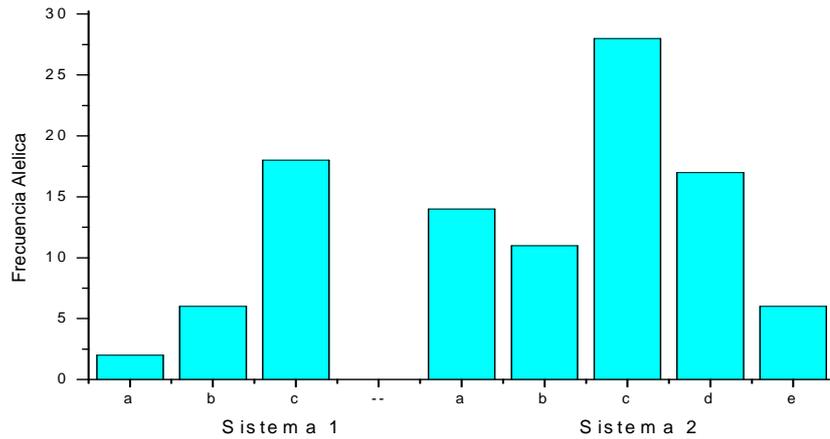
Existen varios estudios sobre camarón que demuestran los cambios en la frecuencia alélica del gen de la  $\alpha$ -amilasa, los cuales analizan individuos silvestres y cultivados (Arena, 2004; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; ). Arena, (2004) realizó el análisis de una población silvestre, proveniente de las costas de Sinaloa, la cual fue sometida a dos dietas con altos valores de cbh (ACHO) y bajos valores de los mismos (BCHO) (**Fig. 14**); mientras que en otro estudio se

reporta la frecuencia alélica de individuos provenientes de otra población silvestre de origen panameño (**Fig. 15**) (Van Wormhoudt y Sellos, 2003). En ambas poblaciones se presenta el mismo patrón de bandas el cual fue observado y descrito por (Arena, 2004.) Conformado por dos sistemas el primero constituido por 3 alelos (a, b y c) y el segundo constituido por 5 alelos (a, b, c, d, y e) donde las diferencias son notables en primer sistema, sin importar a la dieta a la cuales fueron sometidos los organismos provenientes de la población mexicana, ya que esta pierde la capacidad de expresión del alelo "c" en ambos casos (ACHO y BCHO), mientras que la población silvestre de Panamá se expresa este alelo. Teniendo el segundo sistema activado por completo en ambos casos, siendo esta nuestra primera fuente de explicación de la modulación por el alimento.



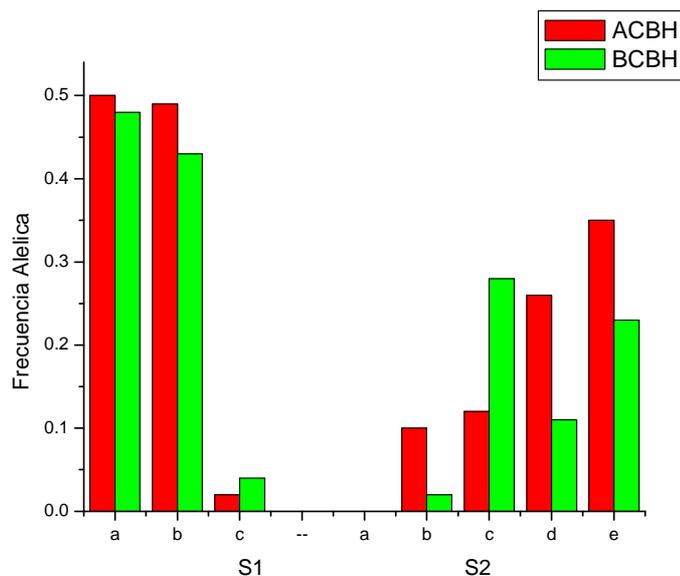
**Figura 14 Población de Sinaloa México (Arena 2005)**

Las diferencias presentes en las poblaciones de México y de Panamá son notables pero cabe resaltar que la población mexicana antes de ser evaluada fue sometida a 2 dietas lo cual pudo influenciar de manera importante la expresión alélica del  $\alpha$  amilasa.



**Figura 15 Poblaciones de silvestre de Panamá.(Van Wormhoudt and Sellos, 2003)**

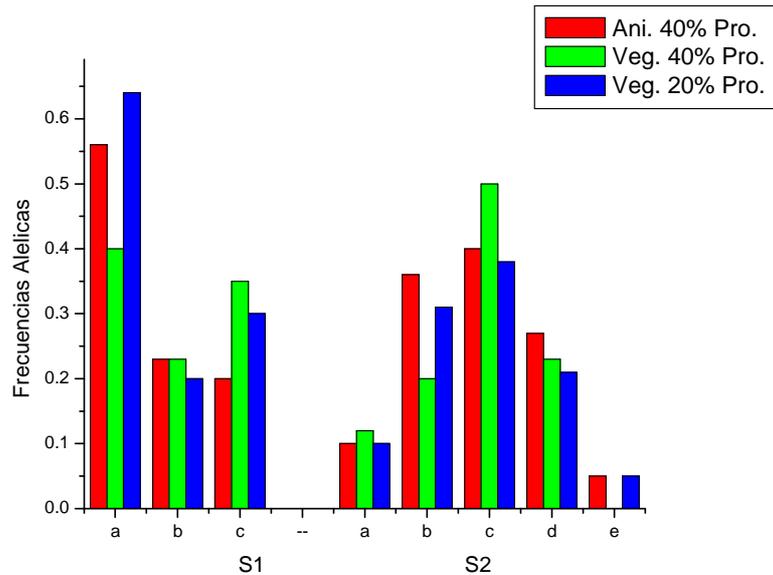
Teniendo este marco de referencia, se decidió comparar los resultados de la presente investigación, con la población silvestre de Panamá, de la cual provienen los camarones cultivados en la granja de PECIS, de donde se obtuvieron los progenitores alimentados una dieta para reproductores, y a partir de estos se obtuvieron las postlarvas empleadas en la presente investigación. La población silvestre de Panamá (**Fig. 15**), (Van Womrhoudt y Sellos, 2003) presentó diferencias con la población que estudió Arena et al., (2004) la cual es la generación 7 de ciclo cerrado de cultivo (F7) de Pecis (**Fig. 16**). En esta figura se observa que es contrario la frecuencia tanto para la dieta ACHO y BCHO de la F<sub>7</sub> contra la que presenta la población silvestre, teniendo la disminución del valor de frecuencia alélica para el alelo "c" del sistema 1, en la población domesticada, lo cual podría indicar la influencia de las dietas comerciales sobre el mecanismo de utilización de los nutrientes en los *L. vannamei*, mientras que el alelo "a" del segundo sistema es inhibido lo cual puede indicar que ambos sistemas son participes en la absorción de los cbh.



**Figura 16 Población de Pecis F<sub>7</sub> (Arena et al., 2005)**

Un análisis posterior de la misma población de PECIS en su novena generación en ciclo cerrado, (F<sub>9</sub> de Pecis, Hernández, 2006) también presenta diferencias con respecto a la población inicial de la cual son provenientes (Panamá silvestre) y a la vez presenta diferencias entre una población de la misma empresa (F<sub>7</sub>) Pecis la cual fue anterior mente mencionada (Arena, 2004).

Para el mejor análisis de las diferencia presentadas entre la F<sub>9</sub> y sus comparativos se realizara el análisis primero con la población silvestre (**Fig. 17**) la cual solo presenta cambios en el alelo "e" del segundo sistema y solo por la dieta la cual cuenta con un baja cantidad de cbh (20 %) y alta cantidad de proteína (37 %), la cual es muy similar a la que nosotros utilizamos en la presente investigación que denominamos (DPV), y es esta dieta la que inhibe la expresión de este alelo.



**Figura 17. Frecuencias alélicas y grado de homogeneidad en los patrones de expresión entre los regímenes y la presencia del alelo c. (Arena et al., 2006)dieta 1: 39% de proteína/40 cbh, dieta 2: 37% de proteína/20 cbh, dieta 3: 20% de proteína/42 cbh.**

Mientras que la diferencia que esta presente en ambas poblaciones de Pecis puede entenderse mejor, si se da el antecedente de que entre la población de Arena (F<sub>7</sub>) y la de Brito en proceso (F<sub>9</sub>) se presento un cambio de régimen alimenticio ó una renovación en la línea de los reproductores; Las diferencias entre las dos poblaciones es notable en el segundo sistema, en los alelos a, b y e, en donde el alelo "a" presenta una reactivación de actividad para la F<sub>9</sub>, mientras que en el alelo "b" la frecuencia es magnificada y por ultimo en el alelo "e" es disminuida su frecuencia, esto es para todas las dietas de las dos diferentes poblaciones (F<sub>7</sub> y F<sub>9</sub>). (Arena et al., 2006.).

El gen de la  $\alpha$ -Amilasa durante el proceso de domesticación en diferentes poblaciones con las cuales se tiene una relación directa o indirecta en la presente investigación se notaran las diferencias que se encontraron en la F<sub>1</sub> UNAM-SISAL Animal (F<sub>1</sub> A.) (**Fig. 7**) tanto como Vegetal (F<sub>1</sub> V.) (**Fig. 8**) entre si y con las poblaciones de donde surgen.

Analizando las diferencias entre la F<sub>1</sub> UNAM-SISAL Animal (F<sub>1</sub> A.), Vegetal (F<sub>1</sub> V.) y la población silvestre, notamos que solo la diferencia es entre la última y las dos primeras en la frecuencia que presentan en alelo "c" del sistema I en donde la silvestre tiene una actividad muy alta (1.5 F.A) mientras que la actividad reflejada en las dos F<sub>1</sub> UNAM-SISAL es baja (0.1 F.A.),

Siendo específicos para la F<sub>1</sub>A tenemos que en ambas dietas tanto para la DPA y DPV se presenta una inhibición en el alelo "c" del sistema II a diferencia del alto valor (0,3 F.A.) reportado para este mismo alelo en la población silvestre,

En el mismo sistema se presentan características específicas en la DPV inhibiendo el alelo "a" (Fig.7; Fig.8), y presentan en general diferencias de frecuencia con los alelos restantes (0.05 vs 0.3-0.4 F.A.)

Para la F<sub>1</sub>V se observa una marcada disminución en la frecuencia del alelo "c" (Fig. 7) en ambos sistemas para ambas dietas, y de nuevo una diferencia en el alelo "a" con respecto al sistema II en la interacción con la DPA.

Hablando ahora de la diferencia que presentan los organismos de la F<sub>1</sub> UNAM-SISAL F<sub>1</sub> A. al igual que la F<sub>1</sub> V. con respecto a la F<sub>9</sub> de Pecis (sus progenitores) se observa diferencias en el sistema I donde se nota una disminución en la frecuencia del alelo "c" (0,1 F.A.) lo cual nos lleva a suponer la confirmación de la pérdida de ese alelo conforme avanza la domesticación de la especie, mientras que en el sistema II con respecto a la F<sub>1</sub> A. hay una desaparición del alelo "c" (Fig.7) para ambos tratamientos (DPA y DPV) mientras que solo el DPV se ve afectado en el alelo "a" del sistema II, se puede asumir que es en el sistema la dieta vegetal administrada tiene un efecto relevante en la expresión alelica; Mientras que la F<sub>1</sub> V. se tiene una disminución considerable en la frecuencia para el alelo "c" para ambas dietas, lo que nos indica que este uno de los alelos que se alumbran o se apagan conforme a la

dieta tendiendo a la preferencia a la proteína de origen vegetal y altos carbohidratos, mientras con la diferencia que se presenta en el alelo "a" del sistema dos para la dieta Animal nos confirma que este es un alelo que está en funcionalidad de la proteína animal y bajo contenido de cbh.

Hemos hablado de la diferencia que se presentan entre la F<sub>1</sub> UNAM-SISAL Animal y Vegetal con respecto a sus progenitores y con la población silvestre pero no hemos mencionado las diferencias entre las F<sub>1</sub>A y la F<sub>1</sub>V en donde se pueden ver diferencias dentro de estas y de la misma progenie según la dieta, y así se puede llegar a remarcar la importancia que tiene la dieta aplicada en el ciclo de vida de los organismos y que se puede ver reflejada en la frecuencia de la enzima  $\alpha$ -Amilasa.

Las diferencias en el sistema I entre la F<sub>1</sub> A. y F<sub>1</sub> V. son mínimas demostrando así que este sistema es el más estable a lo largo del tiempo mientras que el sistema II es el que sufre un cambio inmediato por medio de la dieta a la cual fueron sometidos los reproductores y en donde es más notable la influencia es en los alelos a, b y c y estos alelos no son solo afectados por el factor antes mencionado. También reflejan la influencia que tienen las dietas, el alelo más afectado de estos en la F<sub>1</sub> A. y F<sub>1</sub> V. es el alelo "c" el cual dependiendo de la F se inhibe o se activa según su procedencia demostrando que el alelo "c" en la F<sub>1</sub> A. se pierde por completo mientras que en la F<sub>1</sub>V se puede ver una mínima recuperación de este alelo para ambas dietas (DPA y DPV) reafirmando con la dieta vegetal el estímulo que presenta este régimen alimenticio a este alelo. Otro de los alelos afectados es el "a" que al parecer presenta una tendencia a la activación o inhibición, influenciado por la dieta Animal, ya que en la F<sub>1</sub> A. está presente en la DPA pero en la DPV no está presente. Mientras en la F<sub>1</sub> V. se ve alumbrado.

### 8.3.- Enzimas digestivas.

Se puede resaltar que en el primer sistema del gen  $\alpha$  Amilasa no se encuentran diferencias significativas entre las F<sub>1</sub> de la UNAM-SISAL, pero si entre sus progenitores directos y silvestres, y que el sistema II es quien refleja mas directamente los cambios inmediatos de las condiciones a los cuales son sometidos los organismos.

Es por esto que se puede cuestionar la existencia de una correlación entre la expresión genética y la actividad específica, incluso en el crecimiento; ya que la actividad específica es el control para la misma clase del peso y de la procedencia del camarón.

Los factores de la expresión alélica se pueden ver reflejados no sólo en las frecuencias alélicas, sino en la actividad específica para esta enzima. La F<sub>1</sub> UNAM- SISAL se pudo observar que sólo el factor progenie tuvo un efecto significativo, lo cual puede deberse a que los organismos se condicionan a cierta dieta y preparan a su descendencia al mismo régimen alimenticio y eso se puede confirmar en el sistema I que no sufre cambios significativos. El sistema II si presentó cambios inmediatos según sea el régimen alimenticio; esto puede deberse a que la maquinaria digestiva que presentan los camarones peneidos y en especial *L. vannamei* tiene una gran plasticidad a corto y largo plazo y presenta varias adaptaciones confirmando así su estatus de omnivoría (detritivoria) en los estudios ecológicos lo cual nos puede llevar a decir que la utilización de materias primas de origen vegetal en los alimentos balanceados para esta especie son factibles. Remarcando que las materias primas de origen vegetal deben de ser de alta calidad de tal manera que se puede cubrir el requerimiento amino-acídico de la especies y para el estadio de desarrollo en cuestión (Gaxiola 1993; 1994).

Y en el caso de la tripsina otra de las enzimas más importantes por la gran participación que tiene en el sistema de absorción de los nutrientes, no

presentó ninguna diferencia y esto puede deberse a que el modelo de hidrólisis digestiva que en términos generales es muy similar a la que ocurre en vertebrados, en donde primeramente existe una hidrólisis endoproteásica del alimento ingerido seguido de una hidrólisis exoproteásica de los péptidos resultantes de la primera hidrólisis (Vega- Villasante et al., 1993) no puede variar sin importar su origen o la dieta a la que son sometidos. Esto implica una capacidad específica para la degradación de diferentes tipos de sustratos alimenticios (Taboada et al., 1998; Lovett y Felder, 1990 a, b).

#### 8.4.- Zootecnia y bioenergética.

Los factores como crecimiento el cual es un indicador de amplio espectro, debido a que refleja el efecto neto de las condiciones ambientales, incluido el alimento, sobre las respuestas fisiológicas de los individuos (Beamish et al., 1990) se puede observar en los resultados para el primer experimento (F<sub>1</sub> A.) la diferencia entre las dietas no nos refleja diferencias en crecimiento en peso y talla tal es debido a la adaptación fisiológica que efectúan en la fase postlarval, especialmente a lo que corresponde al aparato digestivo permitió una adaptación para la digestión de ambas dietas; esto puede estar influenciado por la actividad enzimática asociada con la degradación del alimento en la mayoría de los camarones peneidos la cual posiblemente pudiera estar controlado genéticamente, y en este caso se puede ver la diferencias en el gen del  $\alpha$ -Amilasa lo cual nos puede hablar sobre la implicación de una capacidad específica para la degradación de diferentes tipos de sustratos alimenticios (Taboada et al., 1998)

Para la F<sub>1</sub> Vegetal. Kureshi et al., (2002) observa que en juveniles de *L. vannamei* alimentados con 17 % de proteína vegetal si resultó afectado el crecimiento, presentan bajos crecimientos, probablemente debido a la gran cantidad de alimento que tiene que consumir para acceder a los requerimientos diarios de aminoácidos. Esto en periodos prolongados de tiempo pudo provocar las diferencias que se encuentran en la frecuencia alelica del sistema

II, lo cual nos lleva a mostrar la adaptación inmediata regida por este sistema. Además que confirma lo dicho por Hochachka, (1997) que demostró que la utilización de un nivel alto de carbohidratos no representa una ventaja para los juveniles tempranos *L vannamei* al ser utilizados como fuentes de energía. El costo metabólico (HiE.) es relativamente bajo comparado con los costos que se tienen con la degradación para economizar las fuentes de proteína como se demostrado anteriormente, los cbh son posibles fuentes de energía para economizar los fuentes de proteína como se demostrado anteriormente (Arena, 2005).

Respecto al otro factor, que es la supervivencia nos muestra que en la F1 Animal tiene mejor "rendimiento" (80%) ante la dieta vegetal esto puede deberse a que cuando son alimentados con una sola dieta presentan menor supervivencia (Gaxiola, 1993) y como menciona Rosas et al., (1996) que la digestibilidad de altos niveles de proteína ingerida a través de la dieta resulta en altos costos metabólicos y estos organismos se adaptaron mas a la dieta vegetal que a la animal. Mientras que para el F1 Vegetal no se contó con una buena supervivencia debido tal vez a que los organismos provenientes de esta línea eran muy débiles como se puede ver el la supervivencia de nauplios.

Otro punto importante es la relación energética de la respiración (HeE+HiE) dentro del cual la cantidad de oxígeno consumido es un buen indicador. Pues nos puede decir cuanta energía esta disponible para procesos biológicos y en particular nos muestra la cantidad de energía que se presenta en la etapa de ayuno (HeE) y en la etapa postprandial (HiE.). Lo cual permite la determinación de los destinos energéticos provenientes de los alimentos ingeridos (Rosas et al., 1999); y estas diferencias pueden ser determinadas por la expresión genética que se tenga.

Y con respecto al análisis de los efectos de los alimentos en la respiración se evaluaron diferentes factores no tan típicos como los antes mencionados si no por el efecto calorigénico del alimento (ICA o HiE y ENPA o UE+ZE) y el sustrato metabólico (razón O:N) .

En el caso de factor ICA (HiE) no presentó diferencia lo cual contrasta el hecho que se observó en el comportamiento de sus progenitores en donde el ICA se ve directamente influenciado por la cantidad de carbohidratos presente en las dietas (Arena et al., 2003); y la cantidad de proteína influye directamente al valor d.

Mientras que para la excreción amoniacal ENPA (UE+ZE) para la F<sub>1</sub> Animal no presentó diferencias entre las dietas y esto puede ser influenciado por la desaparición del alelo "c" en el sistema II para ambas dietas, mientras que en la F<sub>1</sub> Vegetal no se notó un claro incremento post-alimenticio y esto puede ser por la dieta presenta muy baja concentración de proteína la cual no es suficiente para crecer y la que tiene la utiliza con fines energéticos pero para metabolizar esta se necesita más tiempo o no esto lleva a no presentar el pico .

Estudios sobre requerimientos nutricionales han demostrado que en los camarones peneidos y decápodos en general están muy bien adaptados para el uso de las proteínas como fuentes de energía metabólica y como base para la conformación de nuevo tejido (Lemos et al., 2000; Rosas et al., 2000).

Lo anterior se puede relacionar con el factor respiración de rutina donde la diferencia solo fue significativa para el factor de procedencia siendo la F<sub>1</sub> Vegetal superior a la F<sub>1</sub> Animal y esto confirma que cuando la cantidad de proteína es baja es utilizada con fines de manutención y como la proteína presenta un valor más alto para metabolizar.

## 9.- CONCLUSIONES.

La hipótesis es comprobada es decir se presenta un influencia directa en la expresión alelica en las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa según la procedencia y la dieta a la que son sometidos los organismos (esto sin contemplar la influencia que tiene la carencia de amino asidos).

El papel de la nutrición se hace presente en la regulación del gen.

La influencia que tiene la nutrición se refleja desde la  $F_0$  y es reafirmada en la  $F_1$  lo cual nos muestra un efecto doble de la dieta sobre los organismos.

Un alelo que tiene gran importancia es el alelo "c" en ambos sistemas pues se ve afectado directamente por la dieta a la cual son sometidos los reproductores como a la dieta a que es sometida la progenie.

Lo antes mencionado nos puede reflejar que el alelo "c" en el primer sistema es afectado a largo plazo mientras que el alelo "c" de sistema II es quien responde a los estímulos directos a corto plazo.

El presente trabajo confirma la posibilidad de la reactivación de genes según sea la dieta aplicada como se puede observar en el caso de del alelo "c" la  $F_1$  Vegetal donde se vuelve a presentar influenciado tanto por la dieta a la que fueron sometidos los progenitores como los descendientes.

La descendencia de la  $F_1$  Animal pierde alelos, parte de la polimerasa es expresada en los alelos de la población como lo menciona Arena et al., 2003), en la población de Tahití (25 generación) donde entre mas es su domesticación es menor es la varibilidad de l gen del  $\alpha$ -Amilasa.

Con los datos presentes en la F<sub>1</sub> A. y F<sub>1</sub> V. nos muestra que el sistema I es el más estable mientras que el sistema II es más sensible a la dieta.

Remarcando el anterior punto se puede observar tanto en el trabajo de Arena et al 2003, y el presente que el sistema I es quien presenta estabilidad a corto plazo pero se ve influenciado a largo plazo como se puede observar en las diferencias que presenta: Arena et al., (2003)

La F silvestre VS F<sub>7</sub> de Pecis,

F<sub>9</sub> de Pecis al igual que la nuestra.

La F<sub>1</sub> UNAM- SISAL (F<sub>1</sub> A. y F<sub>1</sub> V.)

## 10.- BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Rahaman, S.H., Kanazawa, A., Teshima, S., 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 45, 1491-1494.

Akiyama, D., Chwang, N.C.M., 1989. Shrimp feed requirements and feed management. In: Akiyama, D.M. Ed. Proc. Southeast Asia Shrimp Farm Management Workshop. American Soybean Association, Singapore, pp. 75-82.

Akiyama, D.M., 1991. The use of soy products and other plant protein supplements in aquaculture feeds. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailand and Indonesia, September 19-25. (ed. by D.M. Akiyama & R.K.H. Tan), 199-206.

Akiyama, D.M., Dominy, W., Lawrence, A., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A.W. Lester, L. J Edits. Marine Shrimp Culture; Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam. 535-568.

Aquacop., 1985. Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps at the Centre Océanologique du Pacifique. In : CRC Handbook of Mariculture, Vol. 1, Crustacean Aquaculture, McVey J.P. Ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida : 179-188.

Arena, L., 1999. Caracterización de poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus*: estudio morfométrico y molecular. Facultad de Ciencias, UNAM, 1-81.

Arena, L., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola G., Soyez, C., Van Wormhoudt and Rosas, C., 2002 Evaluation of physiological and genetic variations in domesticated 7TH and 25TH generation: A comparison with a natural *Litopenaeus vannamei* shrimp population. Journal of Marine Experimental Biology.

Arena, A., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Soyez, C., Van Wormhoudt, A., and Rosas, C., 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *L. vannamei* fed different carbohydrate levels. J. Shellfish Research, 22(1):269-279.

Arena L., 2004. Etude des populations de crevettes Penaeides; Aspects génétiques du métabolisme des glucides chez *Litopenaeus vannamei* (populations sauvages et cultivées). Thèse EPHE, Paris, pp

Arena, L., Gaxiola, G., Cuzon, G., Espinosa, G., Van Wormhoudt, A., and C. Rosas., 2004. Molecular genetic analysis of shrimp *L. vannamei* wild and domesticated populations using allozymes and mitochondrial DNA markers. Of a amylase and 16S gene.

Arena, L., 2005. Etude des populations sauvages et domestiquées de *L. vannamei* (Boone): polymorphisme de l'amylase et utilisation des glucides. Thèse EPHE, Concarneau; 150pp.

Arena, L., Brito, M.J., Maldonado, C., Soto, L., Cuzon, G., and Gaxiola, G., 2006. Growth performances ; specific activities and isoforms variation of  $\alpha$ -amylase with F0 and F1 juveniles *L. vannamei* undergoing feed alteration. IX th Int. Symp. Genet. Aquacult., Montpellier, France.

Ball, A.O., Leonard, S., Chapman, R.W., 1998. Characterization of (GT) sub(n) microsatellites from native white shrimp (*Litopenaeus setiferus*). Mol. Ecol. 7, 1251-1253.

Bauchanan, J., Sarac, H.S., Poppi, D., Cowan, R. T., 1997. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. Aquaculture 151: 29-35.

Beamish, F., Trippel, E., 1990. Heat increment: a Static or dynamic dimension in bioenergetic models? Transactions of the American Fisheries Society. 119:649-661

Bernfeld, P., 1955. Sur une méthode de dosages des amylases. In Methods in Enzymology. Colowick Kaplan, O.C. (eds) Vol. 1. Academic Press. N.Y. pp. 149-154.

Bombero-Tuburan, I., Guanzon, N. G. Y., Schroeder, G. L., 1993. Production of *Penaeus monodon* (Fabricius) using four natural food types in an extensive system. *Aquaculture* 112, 57-65.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72, 248.

Brito, R., Chimal, M. E., Gaxiola, G., Rosas, C., 2000. Growth, metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 255, 21-36.

Brito, R., Rosas, C., Chimal, M.E., Gaxiola, G., 2001. Effect of different diets and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research.* 32, 257-266.

Castell, J. D., and Covey, J. F., 1976. Dietary lipid requirements of adult lobster, *Homarus americanus* (M.E.). *J. Nutr.* 106, 1159-1165.

Ceccaldi, H. J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, 1997 Vol. 6* (ed. By D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M.). World Aquaculture Society, BatonRouge, LA. USA. pp 261-291.

Christensen, B., Lomholt, B., 1972. Amylase heterogeneity in *Palaemonetes varians* (L) (Crustacea., Decapoda). *Ophelia* 10, 63-65.

Cousin, M., 1995 Contribution à l'étude de l'utilisation des glucides et du rapport protéine/énergie chez *P. vannamei* et *P. stylirostris*. Thèse INA/PG. Paris Pp. 201.

Cruz-Suarez, E., Rique, Marie, D., Tapia- Salazar, M., McCallum, I., Hikling, D., 2001. Assessment of differently process feed pea (*Pisum satibum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) I diets blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* 196 : 87-104.

Cruz-Rodríguez., and Fu-Lin, E. Chu., 2002 Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments *Aquatic Toxicology*, Volume 60, Issues 3-4, 30 October

Cuzon, G., Gillaume, J., 1997. Energy and Protein: Energy Ratio In: Crustacean Nutrition, *Advances in World Aquaculture*, Vol 6 (ed. by L.R. D'Abramo, D.E. Concklin and D.M. Akiyama), pp. 51-70. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Cuzon, G., Rosas, R., Gaxiola, G., Taboada, G., A, Van Wormhoudt. 2000. Utilization of carbohydrate by shrimp. In *Avances en Nutrición Acuícola V*.

Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. Part II. *Ann N.Y. Acad. Science*. 121: 402-421 pp

Davis D. A., Arnold, C. R., Mac Callum, I ., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum satibum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nut.:(8)* 87-94.

Devresse, B., 1998 . Productino of water stable shrimp feeds: how to solve the problem . *Aquaculture '98 . Book of abstracts*, p143.

Diaz-Lazcoz, Y., Hénaut, A., Vigier Ph., Risler, J. L., 1995 Differential Codon Usage for Conserved Amino Acids: Evidence that the Serine Codons TCN were Primordial *Journal of Molecular Biology*, Volume 250, Issue 2, 7 July

Ezquerria, Brauer., JM., Jesffls, B., Salazar, L., Bringas, L., Rouzaud, O., 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Eur Food Res Technol* 217:277-280

Focken, U., Groth, A., Coloso, R. M., Becker, K., 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture* 164,105-116.

Forster, I.P., Dominy, L., Obaldo, A.G.J. Tacon., 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 219, 655-670.

Gallardo, P., Alfonso, E., Gaxiola, G., Soto, L.A., Sánchez, A., Rosas, C., 1995. Feeding schedule of *Penaeus setiferus* larvae based in diatoms *Chaetoceros ceratosporum*, flagellates *Tetraselmis chuii* and *Artemia nauplii*, *Aquaculture*. 131, 239-252.

Gamboa D. J. 2001 "Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia." E. S. P. Del L. Fac. de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar .

Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, Ch., 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*. 34, 1403-1411

Garcia-Machado, E., A. Robainas, G. Espinosa, M.Oliva, J. Páez, N. Verdecia, M. Monnerot., (2001) :Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuba populations of the shrimps *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Deca-poda). *Marine Biology*

Gaxiola, G; Garcia, T; Garcia, T; Pedroza, R; Lopez, NA; Soto, LA; Rosas, C., 1993. Evaluation of the protein requirement of *Penaeus setiferus* and *P. duorarum* postlarvae through the use of purified diets Special Publication, European Aquaculture Society.

Gaxiola, G. (1994) Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *P. duorarum* (Crustácea: Peneidae). Ph.D. Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, 91p.

Gaxiola, G., Arena, L., Brito, A., Garfias, S., Maldonado, C., Arevalo, M., Taboada, G., Cuzon, G., 2005. ALIMENTOS AMIGABLES CON EL AMBIENTE EN EL CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei*. Capítulo Latinoamericano de la Sociedad Americana de Acuicultura, 12-14 de septiembre, Mérida, Yucatán

Geiger, R., 1988. Chymotrypsin. In Methods of enzymatic analysis. Vol V. e d. Bergmeyer, J. And Grab, I.M. pp. 99-104.

González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin, III. D.M., Pérez-Velázquez., 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei* :I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. Aquaculture Nutrition. 9,105-113.

Hochachka, P.W., 1997. Oxygen- a key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. Am. Zool. 37, 595-603.

Hunter, J., Feller R. F., 1987. Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from South Carolina tidal creek. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 107, 61-70.

Jiménez-Yan., 2004. Alimentos amigables con el ambiente y su efecto en l crecimiento, supervivencia y estado fisiológico de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de licenciatura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 49 pp.

Jones, D.A., Yule, A.B., Holland, D.L., 1997. Larval Nutrition In: Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol 6 (ed. by L.R. D´Abramo, D.E. Concklin and D.M. Akiyama), pp. 353-389. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Kureshy, N; Davis, D. A., 2002Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Aquaculture Vol. 204, no. 1-2, pp. 125-143. 21 Jan

Kurmaly, K., Yule, A.B., Jones, D.A., 1989. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture. 81, 13-25.

Le Vay, L., Rodríguez, A., Kamarudin, M.S., Jones, D.A., 1993 Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in *Penaeus japonicus* larvae. Aquaculture, 118, 287-297.

Le Moullac, G., Wormhoudt, A.V., AQUACOP., 1994. Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources*. 7, 203-210.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Wormhoudt, A.V., 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208, 107-125.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., (1997) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 208, 107-125.

Lemos, D., Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*. 186, 89-105.

Lomholth, B., Christensen, B., 1970. Amylase polymorphism in the water bug *Asellus aquaticus*, revealed by cellular acetate electrophoresis. *Hereditas* 64, 177-180.

Lovett, D. L., and Felder, D.L., 1989. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Journal of Morphology*, 201: 253-272.

Lovett, D. L., and Felder, D.L., 1990a. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178:144-159.

Lovett, D. L., and Felder, D.L., 1990b. Ontogenetic Changes in Enzyme Distribution and Midgut function In Development Stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, and Penaeidae). *Biol. Bull.* 178:160-174

Marte, C. L. 1980., The food and feeding habit of *Penaeus monodon* Fabricius collected from Makato river, Aklan, Philippines (Decapoda, Natantia). *Crustaceana* 38 (3), 225-236. 45

New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawn. *Aquaculture* 9: 101-144.

Nunes, a. J. P., Gesteira, T. C. V., Goddard, S., 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149, 121-136.

Paoloni A., Grimble R., Pchard, G., 2003. Genetics and Nutrition. *Clinical Nutrition* Vol 22 (5) 429-435

Pascual, P.F., Coloso, R.M., Tamse, C.T., 1983. Survival and some histological changes in *Penaeus monodon* Fabricius juveniles fed various carbohydrates. *Aquaculture*. 31: 169-180.

Pike, R.L., and Brown, M.L., 1984. *Nutrition, an Integral Approach*. Macmillan Publishing Co., New York.

Rodríguez, A., Le Vay, L., Mourente, G. Jone, D.A., (1994) Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.*, 118,

Rosas, C., Sanchez, A., Diaz, E., Soto, LA., Gaxiola, G., Brito, R., 1996 *Journal of the World Aquaculture Society* [J. WORLD AQUACULT. SOC.]. Vol. 27, no. 1, pp. 92-102..

Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sanchez, A., Soto, LA., 1999 *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* [J. Exp. Mar. Biol. Ecol.]. Vol. 234, no. 1, pp. 41-57.

Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sanchez, A., Soto, LA., 1999 The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Van Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology [J. Exp. Mar. Biol. Ecol.]. Vol. 249, no. 2, pp. 181-198. 28.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., LePriol., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A., Van Wormhoudt, A., 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259, 1-22.

Sellos, D., Soazig, Lemoine., Alain., Van Wormhoudt., (1997) Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects FEBS Letters, Volume 407, Issue 2, 28 April ,

Shiau, S. Y. C-Y., 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimp. Aquaculture. 164: 77-93.

Taboada, G., Gaxiola, g., Garcia, T., Pedroza, R., Sanchez, A., Soto, L. A., Rosas. C., 1998. Oxygen consumption and ammonia-N excretion related to protein requirements for growth of white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. Aquaculture Research. 29, 822-833.

Tacon, A.G.J., Akiyama, D.M., 1997. Feed ingredients. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 411-472.

Van Wormhoudth, A., 1974. Variations of the level of the digestive enzymes during intermol cycle of *palaemon serratus*: influence of the seasons and the effect of the eyestalk ablation. Comp. Biochem. Physiol. 49A, 707-715.

Van Wormhoudt, A., 1977. Activités enzymatiques digestives che *Palaemon serratus*: variations annuelles de l'acrophase des rythmes circadiens. *Biochem. System. Ecol.* 5, 301-307.

Van Wormhoudt, A., 1983. Immunoquantitative variations of amylase during molt cycle at different seasons on *Palaemon serratus*. *Mar. Biol.* 74, 127-132.

Van Wormhoudt A., Favrel P., (1988) Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (crustacea, decapoda)  $\alpha$  amylase system: Study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 89, Issue 2, 1988,

Van Wormhoudt, A., Sellos, D., 2003. Highly Variable Polymorphism of the alpha - Amylase Gene Family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea Decapoda) *Journal of Molecular Evolution* [J. Mol. Evol.]. Vol. 57, no. 6, pp. 659-671.

Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Civera, R., 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. 1. Properties of amylase activity in the digestive tract *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* Vol. 106B, no. 3, pp. 547-550.

Walker S.K., Hill, J.L., Bee, C.A., Warnes D.M., (1994) Improving the rate of production of sheep embryos using in vitro maturation and fertilization *Theriogenology*, Volume 41, Issue 1, January

Zar, J., 1999. *Biostatistical analysis*, Prentice Hall, Forth edition, New jersey, 661 pp.